

## РЕГУЛЯЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПЕРСИСТЕНЦИИ ПОЛИАМИНАМИ ЧЕРЕЗ СТИМУЛЯЦИЮ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *rpoS*, *yqjD* И *rmf*

Персисторы – это малочисленная субпопуляция клеток, которые, находясь в дормантном состоянии, характеризуются пониженной чувствительностью к воздействию различных стрессорных факторов, в т. ч. антибиотиков. После прекращения воздействия антибактериального препарата персисторы способны возобновлять рост. Благодаря этим особенностям персисторные клетки являются основной причиной рецидивов инфекционных заболеваний. В качестве факторов персистенции рассматривают компоненты общего стрессорного ответа, а также полиамины.

Изучена роль полиаминов путресцина, спермидина и кадаверина в регуляции персистенции *Escherichia coli* при периодическом культивировании. Регуляция осуществляется через стимуляцию экспрессии генов *rpoS*, *yqjD* и *rmf*, являющихся компонентами общего стрессорного ответа. На экспрессию гена *rpoS* наибольший стимулирующий эффект оказывает спермидин, а экспрессия гена *yqjD* находится в меньшей зависимости от полиаминов. Нами показан *rpoS*-зависимый характер экспрессии гена *yqjD*, что согласуется с ранее опубликованными данными. Вероятно, полиамины регулируют экспрессию гена *yqjD* через стимуляцию экспрессии гена *rpoS*. Согласно результатам исследования, мутанты с нокаутами изучаемых генов в целом демонстрируют более низкие значения частоты персистенции по сравнению с контролем. Наибольшее снижение частоты персистенции *rpoS*-нокаутного штамма по сравнению с родительским штаммом наблюдается в ранней стационарной фазе, а *yqjD*- и *rmf*-нокаутных штаммов – в поздней стационарной фазе. Эти выводы подтверждаются данными об уровне персистенции штаммов с множественными нокаутами.

Таким образом, ген *rpoS*, стимулируемый в большей степени спермидином, вносит максимальный вклад в регуляцию персистенции в ранней стационарной фазе. Ген *rmf*, также относящийся к полиаминовому модулю, и ген *yqjD*, экспрессия которого незначительно повышается полиаминами, участвуют в регуляции персистенции в поздней стационарной фазе.

**Ключевые слова:** персисторы, полиамины, механизмы общего стрессорного ответа.

Организм человека представляет собой своеобразную экосистему, населенную микроорганизмами. В процессе эволюции между микроорганизмами и макроорганизмом складывались симбиотические отношения. Симбиоз может иметь три формы: мутуализм, комменсализм, паразитизм. Симбионты на разных этапах своего существования и при изменении условий жизни могут переходить из одной формы симбиотических отношений в другую [1]. В «норме» человек и кишечная палочка находятся в мутуалистических отношениях. Однако при попадании в другие органы и полости тела непатогенные штаммы *E. coli* кишечной микрофлоры могут вызывать развитие различных инфекционных заболеваний [3]. В системе «паразит – хозяин» бактерии подвергаются значительным стрессорным воздействиям. В эволюционном процессе у бактерий возникли различные способы выживания в таких условиях, в т. ч. персистенция [1]. Персисторы – это малочисленная субпопуляция клеток, которые, находясь в дормант-

ном состоянии, характеризуются пониженной чувствительностью к воздействию различных внешних физико-химических факторов, в т. ч. антибиотиков [1], [8]. После прекращения воздействия антибактериального препарата персисторы способны возобновлять рост. Благодаря этим особенностям персисторы являются основной причиной рецидивов инфекционных заболеваний. Изучение механизмов персистенции имеет важное клиническое значение [8].

Персистенцию рассматривают как результат действия механизмов общего стрессорного ответа [8], [9], [14]. Действие этих механизмов направлено на формирование стрессорного ответа при воздействии комплекса стрессоров и сопровождается значительными морфофизиологическими изменениями и замедлением метаболических процессов в клетке [4]. Согласно опубликованным данным, наибольшее число персисторов формируется в условиях одновременного воздействия нескольких стрессоров: при переходе бактериальной культуры в

стационарную фазу, при диауксии, при воздействии иммунной системы хозяина, в биопленках и т. д. [9].

В регуляции персистенции могут также участвовать такие полифункциональные соединения, как полиамины. Показана роль этих соединений в регуляции генной экспрессии, пролиферации и защите бактериальных клеток от различных стрессоров [6], [11]. Гены, экспрессия которых стимулируется полиаминами, объединены в структуру – полиаминовый модулон [6]. Ранее показана положительная регуляция персистенции *Escherichia coli* путресцином через стимуляцию экспрессии полиамин-зависимого гена *rpoS* [12], продукт экспрессии которого является ключевым регулятором механизма общего стрессорного ответа *rpoS*-регулона [4]. Мы предположили, что в персистенции могут участвовать и другие полиамин-зависимые гены, относящиеся к механизмам общего стрессорного ответа, в частности гены стационарной фазы *yqjD* и *rmf*, продукты экспрессии которых инактивируют рибосомы [13], [15].

#### Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследования использованы штаммы *E. coli* (см. табл. 1). Родительский штамм BW25141 любезно предоставлен К.В. Севериновым, 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&Wanner [5]. Частоту персистенции определяли с помощью метода Keren et al. [7]. Для определения экспрессии изучаемых генов сконструированы репортерные трансляционные слияния в соответствии с протоколом, предложенным Simons et al. [10]. Уровень экспрессии определяли с использованием метода Миллера [2]. 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  $\lambda$ RS45 [10]. 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  $\lambda$ RS45 [10].

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: ампициллин (50 мкг/мл) («MP Biomedicals», Франция), канамицин (50 мкг/мл) («Синтез», Россия), стрептомицин (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 антибио-

Таблица 1 – Штаммы, использованные в работе

Штамм	Генотип
BW25141	F <sup>-</sup> , $\Delta$ ( <i>araD-araB</i> )567, $\Delta$ <i>lacZ</i> 4787(::rrnB-3), $\Delta$ ( <i>phoB-phoR</i> )580, $\lambda$ - <i>galU</i> 95, <i>AuidA3::pir</i> <sup>+</sup> , <i>recA1</i> , <i>endA9</i> (del-ins)::FRT, <i>rph-1</i> , $\Delta$ ( <i>rhaD-rhaB</i> )568, <i>hsdR514</i>
EAT01	как BW25141, но $\Delta$ <i>rmf</i>
EAT02	как BW25141, но $\Delta$ <i>yqjD</i>
EAT03	как BW25141, но $\Delta$ <i>rpoS</i>
EAT04	как BW25141, но $\Delta$ <i>rpoS</i> $\Delta$ <i>rmf</i>
EKH1	как BW25141, но $\Delta$ <i>yqjD</i> $\Delta$ <i>rmf</i>
EAT06	как BW25141, но $\Delta$ <i>rpoS</i> $\Delta$ <i>rmf</i> $\Delta$ <i>yqjD</i>
EAT08	как BW25141, но $\lambda$ RZ5 <i>rpoS</i> 742:: <i>lacZ</i> ( <i>Hyb</i> )
EKH3	как BW25141, но $\lambda$ RS45 <i>yqjD</i> 234:: <i>lacZ</i> ( <i>Hyb</i> )
EKH4	как BW25141, но $\lambda$ RS45 <i>rmf</i> 39:: <i>lacZ</i> ( <i>Hyb</i> )
EKH5	как EAT03, но $\lambda$ RS45 <i>yqjD</i> 234:: <i>lacZ</i> ( <i>Hyb</i> )
SHT02	F <sup>-</sup> , <i>thr-1</i> , <i>araC14</i> , $\Delta$ <i>speD</i> 98, $\Delta$ ( <i>gpt-proA</i> )62, <i>lacY1</i> , <i>glnX44</i> (AS), <i>galK2</i> (Oc), $\lambda$ -, $\Delta$ ( <i>speB-speA</i> )97, $\Delta$ ( <i>speC-glcB</i> )63, <i>rpsL25</i> (strR), <i>xylA5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>thiE1</i> , <i>ampCp-1</i> , <i>cadA2</i> , $\Delta$ <i>lacZ</i>
EKH7	как SHT02, но $\lambda$ RS45 <i>yqjD</i> 234:: <i>lacZ</i> ( <i>Hyb</i> )
SHT03	как SHT02, но $\lambda$ RZ5 <i>rpoS</i> 742:: <i>lacZ</i> ( <i>Hyb</i> )

тиков, а клетки полиамин-дефицитных штаммов ЕКН7 и SHT03 – на 50 мл минимальной среды М9 с добавлением 0,4% глюкозы, пролина (0,1 мг/мл), тиамина (0,01 мг/мл), пантотеновой кислоты (0,01 мг/мл) и соответствующих антибиотиков. Культивировали 16 ч в термостатируемом шейкере GFL1092 («GFL», Германия) при 37°C 120 оборотов/мин. Далее для проведения эксперимента культуру переносили на 50 мл свежей среды с теми же добавками, доводя плотность культуры на среде LB до  $OD_{600}=0,1$  и на среде М9 до  $OD_{600}=0,45$ . Культивировали при тех же условиях. Биомассу клеток оценивали после предварительного разведения культуры физиологическим раствором по оптической плотности на спектрофотометре UV-VIS Spectrophotometer PD-303UV («Arel», Япония).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием

пакета стандартных программ Statistica for Windows 5.0. Повторность всех экспериментов 3–5-кратная.

**Результаты исследования и их обсуждение**

Нами изучено влияние полиаминов на экспрессию генов *rpoS* и *yqjD* на трансляционном уровне. Определены уровни экспрессии данных генов в полиамин-дефицитных штаммах SHT03 и ЕКН7, несущих соответствующие трансляционные слияния, без добавления полиаминов и с добавлением путресцина, спермидина и кадаверина в различных концентрациях при начальной плотности популяции, соответствующей  $OD_{600}=0,45$  (соответствует 0ч культивирования) (рис. 1). Результаты исследования показывают, что полиамины стимулируют экспрессию изучаемых генов на трансляционном уровне.

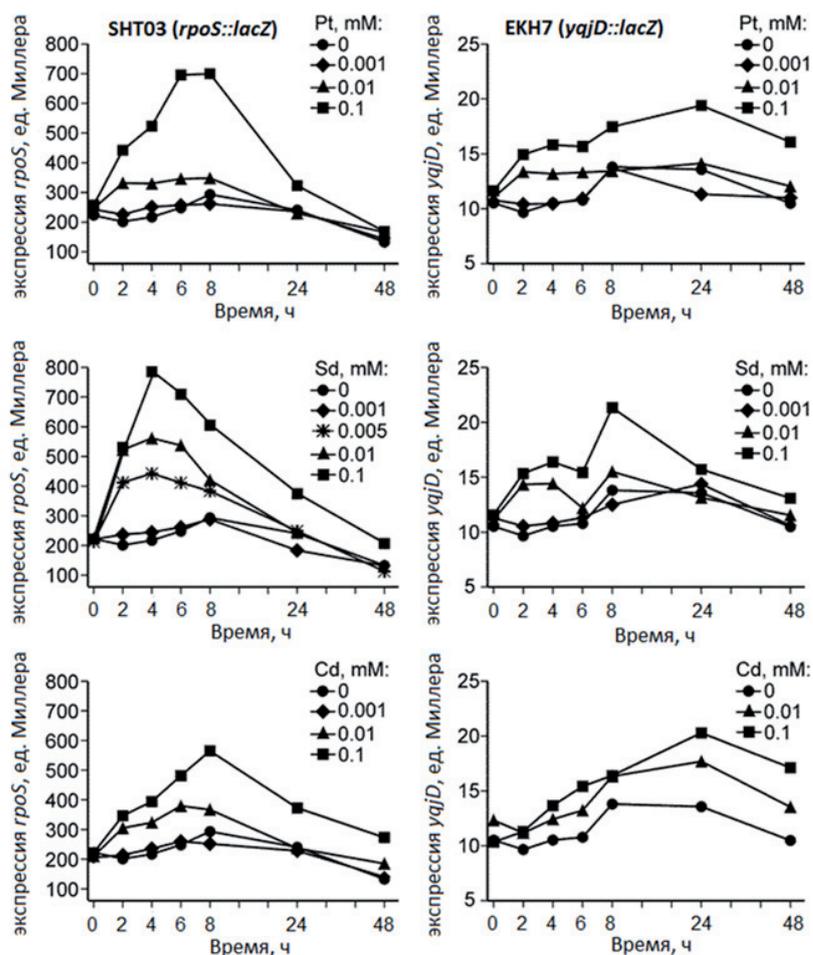


Рисунок 1 – Концентрационно - зависимая стимуляция полиаминами экспрессии генов *rpoS* и *yqjD* на трансляционном уровне. Pt – путресцин, Sd – спермидин, Cd – кадаверин

При этом стимуляция несет концентрационно-зависимый характер: чем выше концентрация добавки полиаминов, тем сильнее эффект их действия. Наибольшее влияние на экспрессию гена *rpoS* оказывает спермидин, несколько меньшее – путресцин, наименее выраженный эффект вызывает кадаверин. В отличие от гена *rpoS*, ген *yqjD* не упоминается в литературе как член полиаминового модулона [6]. Однако, согласно полученным данным, путресцин, спермидин и кадаверин примерно с одинаковой эффективностью незначительно повышают уровень экспрессии гена *yqjD*.

Согласно данным литературы ген *yqjD* входит в состав *rpoS*-регулона [16]. Поэтому мы предположили, что полиамины регулируют экспрессию гена *yqjD* через стимуляцию экспрессии гена *rpoS*. Нами определены уровни экспрессии гена *yqjD* в штаммах ЕКН3 (*rpoS*<sup>+</sup>) и ЕКН5 (*rpoS*<sup>-</sup>) при периодическом культивировании (рис. 2). Показано, что в штамме ЕКН5 экспрессия гена *yqjD* значительно снижена по сравнению с экспрессией в контрольном штамме ЕКН3. При этом отсутствует характерная для гена *yqjD* тенденция к увеличению экспрессии в стационарной фазе. Полученные результаты согласуются с ранее опубликованными данными [15]. Таким образом, хотя ген *yqjD* не отнесен к полиаминовому модулону, полиамины могут регулировать его экспрессию опосредованно через стимуляцию экспрессии гена *rpoS*.

Нами определены уровни экспрессии генов *rpoS*, *yqjD* и *rmf* и значения частоты персистенции у нокаутных штаммов в сравнении с контрольным родительским штаммом при периодическом культивировании.

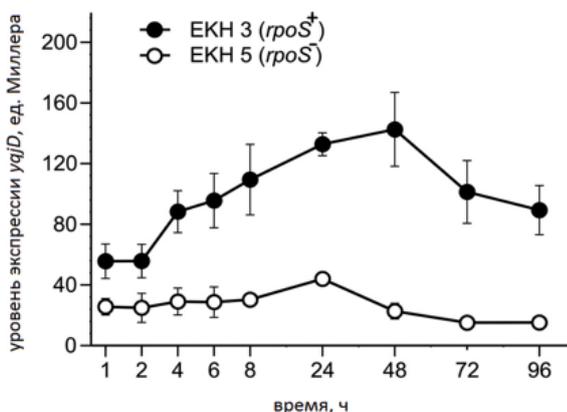


Рисунок 2 – *rpoS*-зависимая экспрессия гена *yqjD*

Нокаутные штаммы в целом демонстрируют более низкие значения частоты персистенции по сравнению с контролем. При этом в стационарной фазе негативный эффект нокаутов носит ген-специфичный характер.

Показано, что экспрессия гена *rpoS* возрастает при переходе бактериальной культуры в стационарную фазу роста и достигает максимума на 24 ч культивирования (рис. 3 а). В это

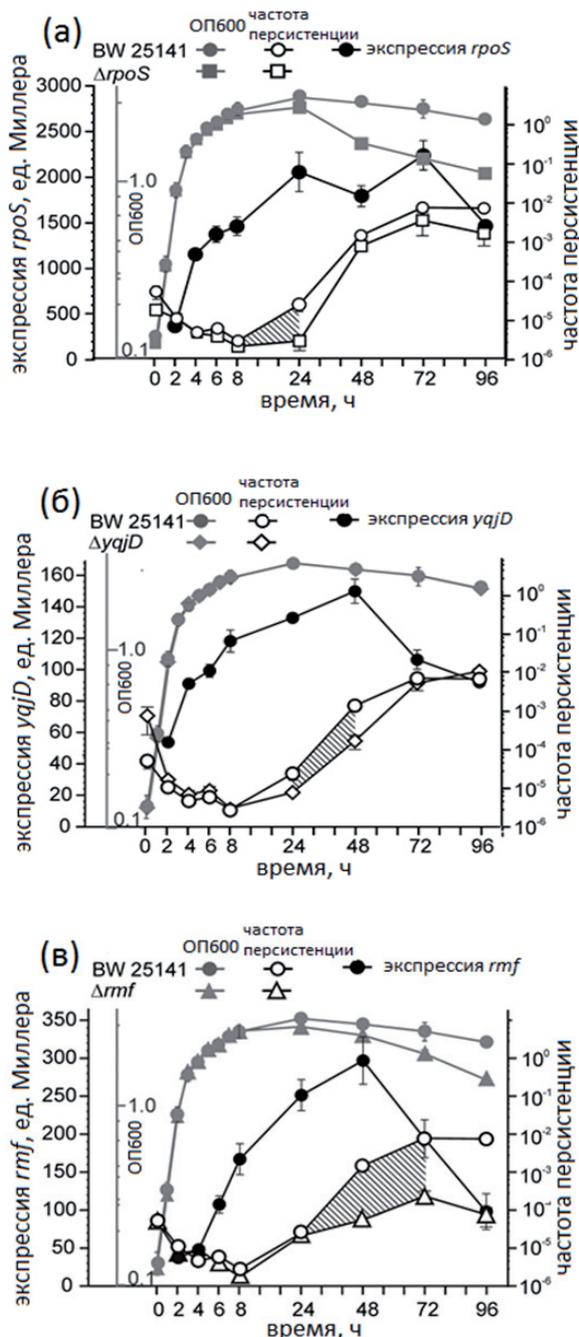


Рисунок 3 – Влияние единичных нокаутов в генах *rpoS* (а), *yqjD* (б) и *rmf* (в) на частоту персистенции

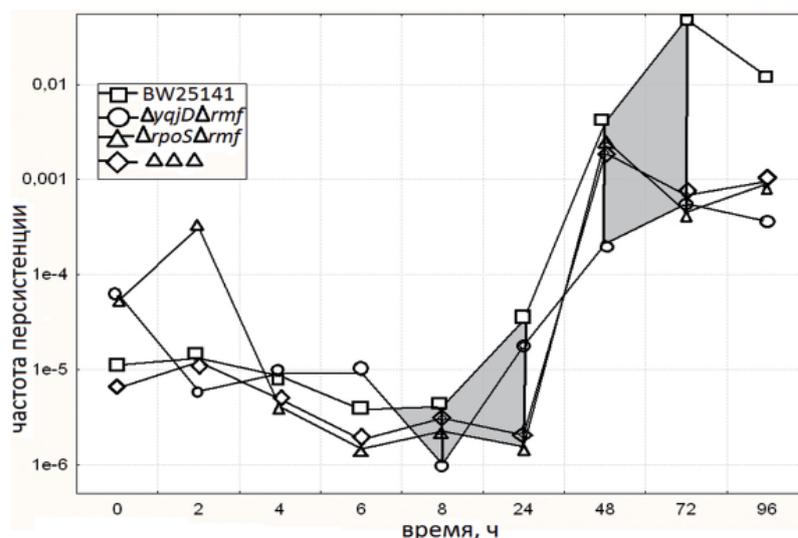


Рисунок 4 – Влияние множественных нокаутов на частоту персистенции

время *rpoS*-нокаутный штамм демонстрирует наибольшее снижение частоты персистенции по сравнению с контрольным штаммом. Таким образом, ген *rpoS*, стимулируемый спермидином, участвует в регуляции персистенции в ранней стационарной фазе.

После 24 ч культивирования частота персистенции *rpoS*-нокаутного штамма становится примерно равной частоте персистенции контрольного штамма. В это время (на 24–72 ч) *yqjD*- и *rmf*-нокаутные штаммы, наоборот, демонстрируют наибольший отрицательный эффект (рис. 3 б, в).

Это совпадает с максимальным уровнем экспрессии данных генов (на 48 ч), что подтверждает их роль в формировании персисторного состояния в поздней стационарной фазе.

Эти выводы подтверждаются данными об уровне персистенции штаммов с множественными нокаутами (рис. 4). Показано, что в целом

наибольшее снижение частоты персистенции у мутантов по сравнению с контролем наблюдается в ранней стационарной фазе (8–24 ч), обусловленное, видимо, нокаутом гена *rpoS*, и в поздней стационарной фазе (48–72ч), вызванное нокаутами генов *yqjD* и *rmf*. Следует отметить, что значения частоты персистенции у штаммов с двойным нокаутом  $\Delta rpoS\Delta rmf$  и с тройным нокаутом примерно одинаковые, что говорит о небольшом вкладе гена *yqjD* в персистообразование по сравнению с генами *rpoS* и *rmf*.

Таким образом, полиамины через стимуляцию экспрессии генов *rpoS*, *yqjD* и *rmf* участвуют в регуляции персистенции *E. coli*. Вклад каждого из полиамин-зависимых генов зависит от фазы роста периодической культуры. Ген *rpoS* вносит максимальный вклад в персистообразование в ранней стационарной фазе, а гены *rmf* и *yqjD* – в поздней стационарной фазе.

04.10.2017

**Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ  
и Администрации Пермского края в рамках научного проекта «р\_а 16-44-590279»  
и программы УрО РАН проект № 15-4-4-1**

**Список литературы:**

1. Бухарин, О. В. Персистенция бактериальных патогенов как физиологический феномен / О.В. Бухарин // Вестник Московского университета. – 2008. - №1. – С. 6-13.
2. Миллер, Дж. Эксперименты в молекулярной генетике / пер. с англ. Ю.Н. Зографа, Т.С. Ильиной, В.Г. Никифорова под ред. С.И. Алиханяна – М: Мир. – 1976. – 436 с.
3. Бактериальная транслокация из кишечника: микробиологические, иммунологические и патофизиологические аспекты / Г.И. Подопригра, Л.И. Кафарская, Н.А. Байнов [и др.] // Вестник РАМН. – 2015. - № 6. – С. 640-650.

4. Ткаченко, А.Г. Молекулярные механизмы стрессорных ответов у микроорганизмов / А.Г. Ткаченко, - Екатеринбург: УрО РАН, 2012. – 268 с.
5. Datsenko, K.A. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products / K.A. Datsenko, B.L. Wanner // PNAS. – 2000. – Vol. 97. – No. 12. – P. 6640–6645.
6. Igarashi K., Polyamine modulon in *Escherichia coli*: genes involved in the stimulation of Cell growth by polyamines / K. Igarashi, K. Kashiwagi // J. Biochem. – 2006. - Vol. 139. – No. 1. – P. 11-16.
7. Persister cells and tolerance to antimicrobials / I. Keren, N. Kaldalu, A. Spoering [et al] // FEMS Microbiol Lett. – 2004. - Vol. 230. – No. 1. – P. 13-18.
8. Lewis, K. Persister cells / K. Lewis // Annual Review of Microbiology. - 2010. - Vol. 64. - P. 357-372.
9. Maisonneuve, E, Molecular mechanisms underlying bacterial persisters / E. Maisonneuve, K. Gerdes // Cell. – 2014. - Vol. 157. – No. 3. – P. 539-548.
10. Simons, R.W. Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions / R.W. Simons, F. Houman, N. Kleckner // Gene. – 1987. – Vol. 53. – No. 1. – P. 85 - 96.
11. Tabor, C.W. Polyamines in microorganisms / C.W. Tabor, H. Tabor // Microbiological Reviews. – 1985. - Vol. 49. – No. 1. – P. 81-99.
12. Putrescine controls the formation of *Escherichia coli* persister cells tolerant to aminoglycoside netilmicin / A. Tkachenko, N. Kashevarova, E. Karavaeva [et al] // FEMS Microbiol. Lett. – 2014. - Vol. 361. – No. 1. – P.1-9.
13. Wada, A. Growth phase coupled modulation of *Escherichia coli* ribosomes / A. Wada // Genes Cells. – 1998. - Vol. 3. – No. 4. – P. 203-208.
14. Wen, Y. Toxin – antitoxin systems: their role in persistence, biofilm formation, and pathogenicity / Y. Wen, E. Behiels, B. Devreese // Pathogens and disease. – 2013. - Vol. 70. – No. 3. – P. 240-249.
15. YqjD is an inner membrane protein associated with stationary-phase ribosomes in *Escherichia coli* / H. Yoshida, Y. Maki, A. Sakai [et al] // J. Bacteriol. – 2012. - Vol. 194. – No. 16. – P. 4178-4183.

**Сведения об авторах:**

**Хаова Елена Александровна**, лаборант-исследователь Лаборатории адаптации микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, студентка 1 курса магистратуры кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета Пермского государственного национального исследовательского университета  
614081 г. Пермь, ул. Голева, 13, тел.: (342) 212-21-59  
614990 г. Пермь, ул. Букирева, 15, тел.: (342) 2-396-501; e-mail: akkuzina-elena510@mail.ru

**Кашеварова Наталья Михайловна**, младший научный сотрудник Лаборатории адаптации микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН  
614081 г. Пермь, ул. Голева, 13, тел.: (342) 212-21-59; e-mail: nkashev@mail.ru

**Ткаченко Александр Георгиевич**, заведующий Лабораторией адаптации микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, профессор кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета Пермского государственного национального исследовательского университета, доктор медицинских наук, профессор  
614081 г. Пермь, ул. Голева, 13, тел.: (342) 212-21-59  
614990 г. Пермь, ул. Букирева, 15, тел.: (342) 2-396-501; e-mail: agtkachenko@iegmu.ru