


Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Регуляторные эффекты (p)ppGpp и индола на синтез цАМФ в клетках *Escherichia coli*

Н.М. Кашеварова , Е.А. Хаова, А.Г. Ткаченко

Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, Россия
 nkashev@mail.ru

Аннотация. Адаптивный ответ бактерий на стрессорное воздействие условий среды формируется за счет изменения генно-экспрессионного профиля клетки посредством функционирования регуляторных сетей. Сигналами в них выступают естественные метаболиты клетки, в частности индол, а также вторичные мессенджеры (p)ppGpp и цАМФ, взаимное влияние которых недостаточно изучено и представляет собой цель данного исследования. Родительский штамм *E. coli* BW25141 ((p)ppGpp⁺) и нокаут BW25141Δ*relA*Δ*spoT* ((p)ppGpp⁰), не способный синтезировать (p)ppGpp, культивировали на среде M9 с различным содержанием глюкозы (5.6 и 22.2 мМ), в присутствии триптофана в качестве субстрата для синтеза индола и в его отсутствие. Содержание глюкозы измеряли глюкозооксидазным методом, уровень индола – при помощи ВЭЖХ, концентрацию цАМФ – методом ELISA. Начало возрастания исходно низкого внутриклеточного содержания цАМФ совпадало с исчерпанием глюкозы в среде. Максимальный уровень накопления цАМФ в клетках был пропорционален концентрации исходно добавленной глюкозы. При этом (p)ppGpp⁰ мутант демонстрировал снижение максимального уровня цАМФ по сравнению с (p)ppGpp⁺ родителем, наиболее выраженное на среде с 22.2 мМ глюкозы. Таким образом, (p)ppGpp положительно регулирует образование цАМФ. Известно, что промотор триптофаназного оперона, ответственного за биосинтез индола, находится под положительным контролем механизма катаболической репрессии. Поэтому в клетках (p)ppGpp⁺ штамма в условиях низкой скорости спонтанного образования индола на бестриптофановой среде значительно усиливался его синтез в ответ на возрастание уровня цАМФ при исчерпании глюкозы, чего не наблюдалось у (p)ppGpp⁰ мутанта с пониженным накоплением цАМФ. При добавке триптофана оба штамма демонстрировали высокую продукцию индола, что сопровождалось снижением уровня накопления цАМФ по сравнению с бестриптофановым контролем. Таким образом, (p)ppGpp при исчерпании глюкозы положительно регулирует накопление цАМФ и индола, который, в свою очередь, снижает образование цАМФ.

Ключевые слова: *Escherichia coli*; сигнальные молекулы; цАМФ; (p)ppGpp; индол; глюкоза; триптофан.

Для цитирования: Кашеварова Н.М., Хаова Е.А., Ткаченко А.Г. Регуляторные эффекты (p)ppGpp и индола на синтез цАМФ в клетках *Escherichia coli*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2024;28(1):15-23. DOI 10.18699/VJGB-24-03

The regulatory effects of (p)ppGpp and indole on cAMP synthesis in *Escherichia coli* cells

N.M. Kashevarova , E.A. Khaova, A.G. Tkachenko

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia
 nkashev@mail.ru

Abstract. Bacterial stress adaptive response is formed due to changes in the cell gene expression profile in response to alterations in environmental conditions through the functioning of regulatory networks. The mutual influence of network signaling molecules represented by cells' natural metabolites, including indole and second messengers (p)ppGpp and cAMP, is hitherto not well understood, being the aim of this study. *E. coli* parent strain BW25141 ((p)ppGpp⁺) and deletion knockout BW25141Δ*relA*Δ*spoT* which is unable to synthesize (p)ppGpp ((p)ppGpp⁰) were cultivated in M9 medium supplemented with different glucose concentrations (5.6 and 22.2 mM) in the presence of tryptophan as a substrate for indole synthesis and in its absence. The glucose content was determined with the glucose oxidase method; the indole content, by means of HPLC; and the cAMP concentration, by ELISA. The onset of an increase in initially low intracellular cAMP content coincided with the depletion of glucose in the medium. Maximum cAMP accumulation in the cells was proportional to the concentration of initially added glucose. At the same time, the (p)ppGpp⁰ mutant showed a decrease in maximum cAMP levels compared to the (p)ppGpp⁺ parent, which was the most pronounced in the medium with 22.2 mM glucose. So, (p)ppGpp was able to positively regulate cAMP formation. The promoter of the tryptophanase operon responsible for indole biosynthesis is known to be under the positive control of catabolic repression. Therefore, in the cells of the (p)ppGpp⁺ strain grown in the tryptophan-free medium that were characterized by a low rate of spontaneous indole formation, its synthesis significantly increased in response to the rising cAMP level just after glucose depletion. However, this was not observed in the (p)ppGpp⁰ mutant cells with

reduced cAMP accumulation. When tryptophan was added to the medium, both of these strains demonstrated high indole production, which was accompanied by a decrease in cAMP accumulation compared to the tryptophan-free control. Thus, under glucose depletion, (p)ppGpp can positively regulate the accumulation of both cAMP and indole, while the latter, in its turn, has a negative effect on cAMP formation.

Key words: *Escherichia coli*; signaling molecules; cAMP; (p)ppGpp; indole; glucose; tryptophan.

For citation: Kashevarova N.M., Khaova E.A., Tkachenko A.G. The regulatory effects of (p)ppGpp and indole on cAMP synthesis in *Escherichia coli* cells. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024; 28(1):15-23. DOI 10.18699/VJGB-24-03

Введение

В основе адаптации бактерий к стрессовым воздействиям лежит тонкая перестройка регуляторных сетей вследствие изменения генной экспрессии и активности ферментов. При этом регуляторными сигналами в них являются продукты метаболизма бактериальных клеток, такие как индол, вторичные мессенджеры (p)ppGpp и цАМФ. Взаимодействие метаболических путей этих сигнальных молекул обеспечивает адаптацию бактерий к различным изменениям среды обитания, что представляет большой научный интерес.

Первыми среди известных к настоящему времени нуклеотидных вторичных мессенджеров наиболее подробно были изучены цАМФ (3',5'-циклический аденозинмонофосфат) и (p)ppGpp (гуанозинтетра(пента)фосфат) на модельном организме *Escherichia coli*. Они действуют как внутриклеточные «вторичные» сигналы, передавая информацию о реальном микроокружении бактериальных клеток путем преобразования внеклеточных «первичных» сигналов в каскад внутриклеточных физиологических изменений, необходимых для обеспечения важных биологических функций (Hengge et al., 2019).

цАМФ синтезируется ферментом аденилатциклазой, кодируемой геном *suvaA* и катализирующей реакцию циклизации аденозинтрифосфата (АТФ) с образованием цАМФ и неорганического пирофосфата (Botsford, Hartman, 1992), и расщепляется с образованием АМФ с помощью фосфодиэстераз *CpdA* (Imamura et al., 1996) и *DosP* (Yoshimura-Suzuki et al., 2005). Глобальный регулятор цАМФ играет важную роль во многих биологических процессах, в том числе в регуляции роста, дифференцировки и общего метаболизма клеток, клеточного деления, голодания, анаэробноза, метаболизма углерода, стрессовых реакций (Gosset et al., 2004), в осморегуляции (Balsalobre et al., 2006), кворум-сенсинге (Zhou et al., 2008). Как показал транскриптомный анализ, более 200 оперонов находятся под прямым или опосредованным контролем цАМФ (Gutierrez-Ríos et al., 2007). цАМФ в комплексе с CRP белком (cAMP receptor protein) (Rickenberg, 1974) регулирует транскрипцию нескольких сотен генов, часть из которых вовлечена в процессы катаболизма (Botsford, Hartman, 1992), и участвует во множественных регуляторных сетях.

Другой хорошо известный вторичный мессенджер (p)ppGpp индуцирует один из главных адаптивных механизмов бактерий – стринджен-ответ (Potrykus, Cashel, 2008; Haurlyliuk et al., 2015), влияя на различные аспекты бактериальной физиологии, такие как персистенция, вирулентность, биопленкообразование и другие (Dalebroux et al., 2010; Maisonneuve, Gerdes, 2014). Поскольку алармон

(p)ppGpp является глобальным регулятором, под контролем которого находится экспрессия около 1400 генов (Traxler et al., 2008), его основная функция – регуляция роста и выживания бактериальных клеток в ответ на дефицит питательных веществ и различные стрессовые воздействия (Hengge et al., 2019). Повышенные уровни (p)ppGpp тормозят рост бактерий, ингибируя продукцию РНК, ДНК и белков (Mechold et al., 2013). У *E. coli* уровень (p)ppGpp в клетках определяется балансом двух алармонсинтетаз из семейства RSH (RelA/SpoT homologue) белков – RelA только с синтезирующей активностью и бифункционального фермента SpoT, который проявляет как синтетазную, так и (p)ppGpp-гидролазную активность. Синтетаза RelA активируется при связывании с рибосомами при аминокислотном голодании, когда незаряженные тРНК связываются с А-сайтом рибосомы. SpoT-зависимое накопление (p)ppGpp в бактериальных клетках происходит при недостатке источников углерода, жирных кислот, железа, азота, фосфатов, окислительном стрессе и т. д. (Arenz et al., 2016). (p)ppGpp в клетках *E. coli* регулирует генную транскрипцию посредством изменения активности РНК-полимеразы за счет прямого взаимодействия с ферментом или опосредованно, снижая клеточный пул гуанозинтрифосфата (ГТФ) и, соответственно, соотношение АТФ/ГТФ в результате расходования ГТФ для синтеза (p)ppGpp (Dalebroux, Swanson, 2012; Haurlyliuk et al., 2015).

В передаче сигналов изменения условий бактериального микроокружения также принимает участие индол, сигнальная молекула стационарно растущих бактериальных клеток. Продукция индола клетками *E. coli*, открытая в начале XX в., использовалась в качестве диагностического маркера для дифференцировки *E. coli* от других кишечных бактерий. К настоящему времени известно, что способность синтезировать индол широко распространена среди микроорганизмов. Он вырабатывается не менее чем 27 различными родами бактерий, способных продуцировать фермент триптофаназу TnaA, которая расщепляет триптофан с образованием индола, пирувата и аммония (Lee et al., 2007). Импорт индола в клетку осуществляет главным образом пермеаза Mtr (Yanofsky et al., 1991), а экспортируется он из клетки преимущественно с участием помпы множественного лекарственного выброса AcrEF (Kawamura-Sato et al., 1999). У *E. coli* индол регулирует такие важные клеточные процессы, как биопленкообразование (Lee et al., 2007), персистенцию (Kwan et al., 2015), развитие множественной лекарственной устойчивости (Hirakawa et al., 2005), изменение стабильности плазмид (Chant, Summers, 2007), подвижности (Bansal et al., 2007), а также способность выживания в смешанных бактериальных культурах (Chu et al., 2012).

Регуляторные сети, в состав которых входят сигнальные молекулы цАМФ, (p)ppGpp и индол, воспринимающие эндогенные и экзогенные физико-химические сигналы окружающей среды и запускающие каскад биохимических реакций, которые приводят к изменению генно-экспрессионного профиля клеток с последующими перестройками метаболизма, тесно взаимодействуют в бактериальных клетках. Одним из регуляторов синтеза индола является цАМФ, который в составе цАМФ-CRP-комплекса положительно регулирует транскрипцию триптофанового оперона, ответственного за синтез индола (Stewart, Yanofsky, 1985). Ранее нами показано, что образование индола у *E. coli* зависит от алармона (p)ppGpp (Кашеварова и др., 2022). Снижение уровня цАМФ в результате расщепления фосфодиестеразами снижает продукцию индола, повышая персистенцию (Kwan et al., 2015). В то же время в работе других исследователей было показано, что экзогенная добавка цАМФ, при участии цАМФ-CRP регуляторного комплекса, контролирующего экспрессию RelA, стимулировала экспрессию RelA, увеличивая продукцию алармона (p)ppGpp, что приводило к повышению персистенции. При этом активность цАМФ-CRP-комплекса и цАМФ-CRP-контролируемая экспрессия RelA возрастала при исчерпании глюкозы как в нормальных, так и персистентных клетках (Amato et al., 2013). Таким образом, регуляторные сигналы цАМФ и индол (Kwan et al., 2015), наряду с (p)ppGpp (Wood et al., 2013), участвуют во множественных путях формирования персистенции.

Цель нашего исследования – изучить влияние (p)ppGpp и индола на образование цАМФ в условиях исчерпания углеродного субстрата глюкозы.

Материалы и методы

Исследованные штаммы и условия культивирования.

Объектами исследования служили родительский штамм *E. coli* BW25141 (WT, (p)ppGpp⁺) (Datsenko, Wanner, 2000) и мутант BW25141Δ*relA*Δ*spoT*((p)ppGpp⁰) (лабораторная коллекция). Культуры, хранившиеся на скошенном агаре Luria–Bertani (LB) (Sigma, США), высевали на пробирки с 5 мл жидкой среды LB (Sigma, США). Через 5 ч клетки пересеивали на колбы Эрленмейера с минимальной средой M9 (50 мл), содержащей 5.6 мМ (0.1 %) или 22.2 мМ (0.4 %) глюкозы, и культивировали в термостатируемом шейкере (GFL 1092, Германия) при +37 °С с перемешиванием при 120 об/мин в течение 18 ч. Ночные культуры разводили в 50 мл свежей среды M9 с соответствующими концентрациями глюкозы до оптической плотности $OP_{600} = 0.2$, в часть колб добавляли триптофан (2 мМ) (AppliChem, Германия), оставляя другие в качестве контрольных, и далее культивировали при тех же условиях в течение 168 ч. Оптическую плотность культур измеряли по величине абсорбции при 600 нм на спектрофотометре UV-1650PC (Shimadzu, Япония).

Генетическое конструирование. Делеционный мутант BW25141Δ*relA*Δ*spoT* сконструирован с использованием системы сайт-специфической рекомбинации FLP/FRT по методу Дащенко–Ваннера (Datsenko, Wanner, 2000).

Содержание глюкозы в среде определяли глюкозооксидазным методом с использованием набора Глюкоза-Витал («Витал Девелопмент Корпорэйшн», Россия). Пробы

объемом 5 мкл отбирали в экспоненциальной фазе каждый час, далее – раз в сутки и инкубировали с 1 мл реагента при комнатной температуре в течение 15 мин. При окислении глюкозы кислородом воздуха под действием глюкозооксидазы образуется эквивалентное количество перекиси водорода, которая под действием пероксидазы окисляет хромогенные субстраты с образованием окрашенного продукта, интенсивность окраски которого, пропорциональную концентрации глюкозы в образце, измеряли фотометрически при 510 нм на спектрофотометре UV-1650PC (Shimadzu, Япония).

Определение индола. Концентрацию индола в среде измеряли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (Kim et al., 2013), с небольшими модификациями, на хроматографе LC-20A со спектрофотометрическим детектором SPD-M20A (Shimadzu, Япония), колонкой Luna C18 (250×4.6 мм, 5 мкм), предколонкой SecurityGuard C18 (4×3 мм) (Phenomenex, США). Для определения внеклеточного индола пробы отбирали каждые 2 ч в экспоненциальной фазе, в стационарной культуре – раз в сутки. Клетки осаждали центрифугированием. Образцы супернатанта в объеме 20 мкл анализировали при скорости потока мобильной фазы (смесь ацетонитрила («Криохром», Россия) и уксусной кислоты в соотношении 1:1) 1 мл/мин и +25 °С с детектированием при длине волны 280 нм. Для расчета содержания индола в образце использовали метод внешнего стандарта на основании предварительно построенной калибровочной кривой.

Измерение концентрации цАМФ. Количественное определение внутриклеточной концентрации цАМФ проводили методом конкурентного иммуноферментного анализа (ELISA). 1.5 мл исследуемой культуры центрифугировали при 12000 об/мин при +4 °С в течение 5 мин. Осадок ресуспендировали в 300 мкл 0.1N HCl, выдерживали 5 мин при +95 °С с последующим разрушением клеток на ультразвуковом дезинтеграторе CPX-130 (Cole-Parmer, США), используя шуп диаметром 6 мм (три цикла длительностью 30 с при амплитуде 40 %). Остатки клеток осаждали центрифугированием 15 мин, в полученном супернатанте после нейтрализации его 2M Na₂CO₃ определяли концентрацию цАМФ согласно методике производителя (RayBio® cAMP Enzyme Immunoassay). Эксперименты проводили не менее чем с двумя независимыми культурами. Полученные данные нормализованы на внутриклеточный объем по абсолютно сухой биомассе клеток.

Статистическую обработку результатов выполняли в пакете стандартных программ Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США). На графиках представлены средние значения ± стандартная ошибка среднего. Оценка статистической значимости различий средних произведена с использованием *t*-критерия Стьюдента ($p \leq 0.05$).

Результаты

В данной работе исследована динамика исчерпания глюкозы и образования цАМФ и индола в периодических культурах штамма дикого типа *E. coli* BW25141 и полученного на его основе делеционного мутанта Δ*relA*Δ*spoT* при культивировании на минеральной среде M9 с различным содержанием исходно добавленной глюкозы (5.6 и

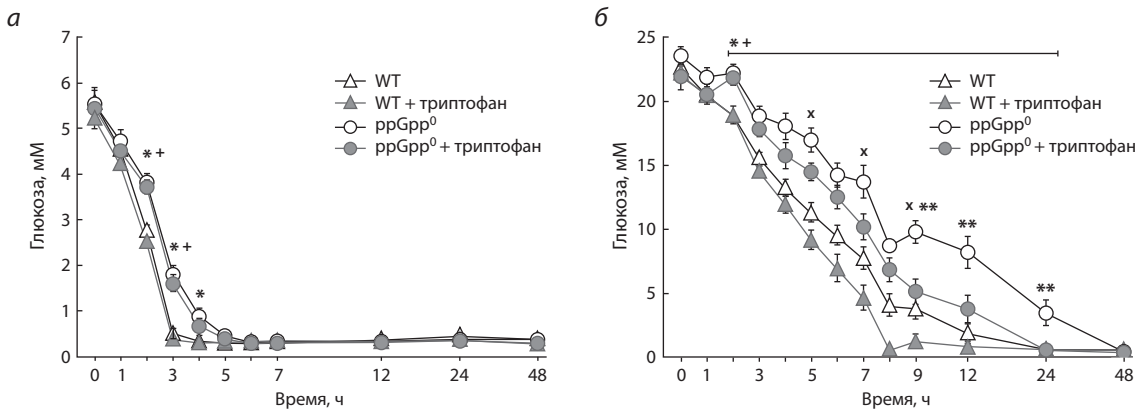


Рис. 1. Динамика истощения глюкозы в культурах родительского штамма (WT) и (p)ppGpp⁰ мутанта при росте в среде без триптофана и с добавкой 2 мМ триптофана при содержании 5.6 мМ (а) и 22.2 мМ глюкозы (б).

* Статистически значимое отличие (p)ppGpp⁰ мутанта от (p)ppGpp⁺ штамма в среде без триптофана; + статистически значимое отличие (p)ppGpp⁰ мутанта от (p)ppGpp⁺ штамма в условиях добавки 2 мМ триптофана; x статистически значимое отличие (p)ppGpp⁺ штамма с добавкой 2 мМ триптофана от (p)ppGpp⁺ штамма в бестриптофановой среде; ** статистически значимое отличие (p)ppGpp⁰ мутанта в среде с 2 мМ триптофана от (p)ppGpp⁰ мутанта в бестриптофановой среде ($p \leq 0.05$).

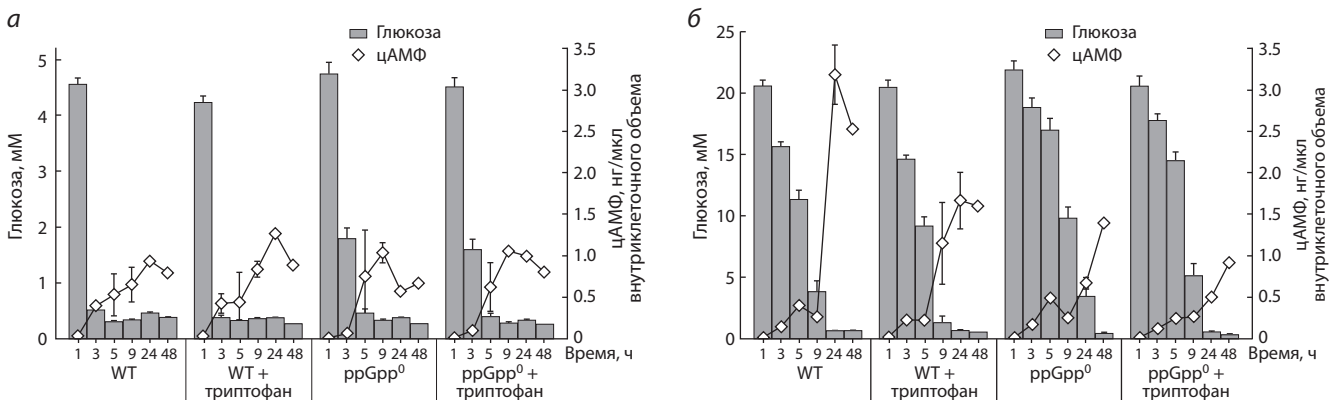


Рис. 2. Потребление глюкозы (гистограмма/столбцы) и образование цАМФ (график/ромбы) в культурах родительского штамма и (p)ppGpp⁰ мутанта в среде без триптофана и с добавкой 2 мМ триптофана при содержании 5.6 мМ (а) и 22.2 мМ глюкозы (б).

22.2 мМ). Сверхпродукцию индола воспроизводили путем экзогенной добавки аминокислоты триптофана – предшественника синтеза индола – в концентрации 2 мМ с целью выяснения его эффекта на активность метаболических процессов, в частности скорость потребления углеродного субстрата (глюкозы) и синтез цАМФ.

При исследовании потребления глюкозы в периодических культурах изучаемых штаммов установлено, что в условиях внесения изначально низкой концентрации глюкозы (5.6 мМ) истощение субстрата в клетках обоих штаммов происходило в первые часы культивирования (рис. 1, а). При этом в культуре родительского штамма глюкоза расходовалась полностью через 3 ч роста, тогда как отсутствие (p)ppGpp в клетках мутантного штамма *E. coli* приводило к замедлению истощения субстрата на 2 ч по сравнению со штаммом дикого типа. В то же время присутствие триптофана в среде не оказывало эффекта в обоих случаях.

При высоком исходном содержании глюкозы (22.2 мМ) в родительском штамме глюкоза заканчивалась спустя 12 ч после переноса клеток в свежую питательную среду

(см. рис. 1, б). Двойная $\Delta relA \Delta spoT$ мутация, так же как и в условиях добавки 5.6 мМ глюкозы, приводила к замедлению истощения субстрата более чем на 24 ч. Однако присутствие триптофана в среде вызывало ускорение потребления глюкозы более чем на 4 ч в родительском штамме и на 24 ч в (p)ppGpp⁰ мутанте.

Начало возрастания исходно низкого внутриклеточного уровня цАМФ совпадало с истощением глюкозы в среде. В культурах, растущих в среде с 5.6 мМ глюкозы, увеличение концентрации цАМФ происходило раньше, чем при 22.2 мМ глюкозы (рис. 2). В среде с низким содержанием глюкозы (см. рис. 2, а) (p)ppGpp⁺ штамм показал быстрое истощение глюкозы в интервале 1–3 ч, что сопровождалось активным накоплением цАМФ. Однако двойная делеция приводила к более резкому увеличению уровня цАМФ начиная с 5 ч, чего не наблюдалось в среде с 22.2 мМ глюкозы. К концу наблюдаемого периода первых суток культивирования (9 ч роста) более высокие значения накопления цАМФ продемонстрировал мутант при 5.6 мМ глюкозы, что примерно в два раза превышало уровень цАМФ при 22.2 мМ глюкозы.

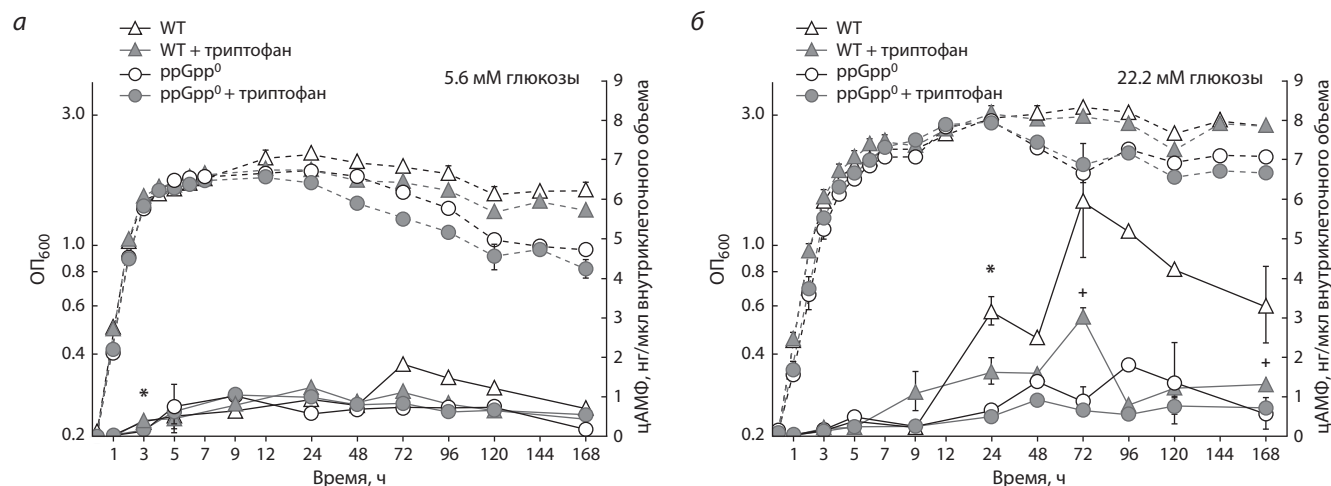


Рис. 3. Кривые роста (штриховые линии) и образование цАМФ (сплошные линии) в культурах родительского и мутантного штаммов при росте в среде без триптофана (незатитые значки) и с добавкой 2 мМ триптофана (затитые значки) при содержании в среде 5.6 мМ (а) и 22.2 мМ глюкозы (б).

* Статистически значимое отличие (p)ppGpp⁰ мутанта от (p)ppGpp⁺ штамма в среде без триптофана; + статистически значимое отличие (p)ppGpp⁰ мутанта от (p)ppGpp⁺ штамма в условиях добавки 2 мМ триптофана.

В стационарных культурах высокая концентрация исходно добавленной глюкозы (22.2 мМ) в среде приводила к более высокому уровню синтеза цАМФ, чем в условиях добавки 5.6 мМ глюкозы. В случае делеционного мутанта эти различия были менее выражены (рис. 3).

Максимальные значения накопления цАМФ в клетках были пропорциональны концентрации добавленной глюкозы. Следует отметить, что (p)ppGpp⁰ нокаут демонстрировал снижение максимального уровня цАМФ по сравнению с WT штаммом, наиболее выраженное на среде с 22.2 мМ глюкозы. Максимум накопления цАМФ при 5.6 мМ глюкозы в мутантном штамме достигался к 9 ч культивирования с последующим снижением, тогда как в (p)ppGpp⁺ родителе – на 72 ч (без триптофана) и 24 ч (с триптофаном) (см. рис. 3, а). В условиях добавки 22.2 мМ глюкозы максимальные значения цАМФ отмечены на 72 ч роста в WT штамме как в бестриптофановой среде, так и в присутствии предшественника индола (см. рис. 3, б). В то же время в (p)ppGpp⁰ нокауте уровень цАМФ на протяжении всего периода культивирования изменялся незначительно, особенно в среде с добавкой триптофана, и был до 6 раз ниже в сравнении с WT штаммом. Таким образом, отсутствие (p)ppGpp в клетках приводило к снижению образования цАМФ.

Ранее нами было показано, что эффект (p)ppGpp, сигнальной молекулы стринджент-ответа, в регуляции продукции индола клетками *E. coli* зависит от содержания глюкозы в среде культивирования (Кашеварова и др., 2022). Таким образом, (p)ppGpp положительно регулирует синтез индола в условиях спонтанного образования этого метаболита при 22.2 мМ глюкозы на бестриптофановой среде, чего не происходило при 5.6 мМ глюкозы. При экзогенной добавке 2 мМ триптофана (p)ppGpp-зависимая продукция индола наблюдалась при обеих изученных концентрациях глюкозы с более выраженным эффектом при высоком содержании углеродного субстрата. Однако лимитирование глюкозы в момент начала культивирова-

ния (5.6 мМ глюкозы) приводило к возрастанию скорости накопления индола и сокращению времени достижения его максимальных значений (рис. 4).

При исследовании эффекта сверхпродукции индола на синтез цАМФ в зависимости от содержания углеродного субстрата установлено, что добавка аминокислоты триптофана, вызывающая накопление индола в среде до 2.2–2.9 мМ (см. рис. 4, в, г), не оказывала значимого эффекта на внутриклеточную концентрацию цАМФ в изученных штаммах при исследованных концентрациях глюкозы, за исключением (p)ppGpp⁺ штамма при содержании 22.2 мМ глюкозы, когда наблюдалось снижение уровня цАМФ до 4 раз в условиях внесения триптофана в сравнении с бестриптофановым контролем (рис. 5).

Обсуждение

Бактерии, подвергаясь различным стрессовым факторам, таким как голодание, температурный, кислотный, окислительный стресс и т. д., развили эффективные механизмы стрессовых ответов для адаптации к неблагоприятным условиям. Стрессовые ответы индуцируются сигнальными молекулами, запускающими цепочку реакций, приводящих к изменению генной экспрессии и перестройке метаболизма бактериальных клеток, что позволяет им выживать при неблагоприятных воздействиях.

В представленной работе изучено взаимное влияние сигнальных молекул (p)ppGpp, цАМФ и индола при исчерпании глюкозы в среде культивирования. Глюкоза – предпочтительный источник углерода и энергии для клеток *E. coli*, у которых сформировалась сложная регуляторная сеть, координирующая генную экспрессию, транспорт и активность ферментов в ответ на присутствие этого субстрата (Gutierrez-Rios et al., 2007). Углеродное голодание вызывает общий стрессовый ответ, регулируемый механизмом катаболитной репрессии и (p)ppGpp-опосредованным стринджент-ответом. У *E. coli* гены, контролируемые белком-регулятором катаболитной ре-

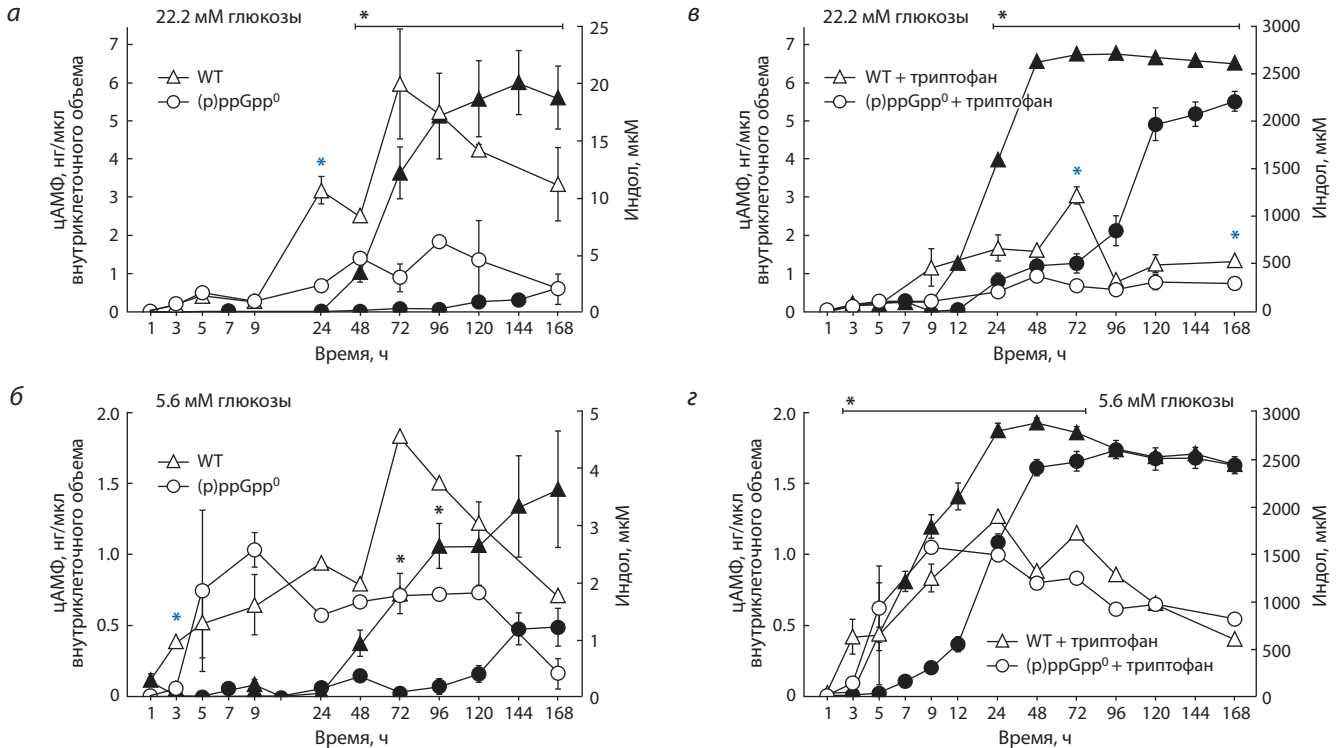


Рис. 4. Продукция индола (затитые знаки) и образование цАМФ (незатитые знаки) в культурах родительского штамма WT и (p)ppGpp⁰ нокаута при росте в среде без триптофана (а, б) и с добавкой 2 мМ триптофана (в, з) при содержании 22.2 мМ (а, в) и 5.6 мМ глюкозы (б, з).

* Статистически значимое отличие (p)ppGpp⁰ мутанта от (p)ppGpp⁺ штамма по продукции индола и цАМФ (черный и голубой цвет соответственно) ($p \leq 0.05$).

прессии CRP, являются RelA-зависимыми, что указывает на то, что (p)ppGpp выполняет функцию глобального регулятора при углеродном голодании (Traxler et al., 2006). Это демонстрирует взаимодействие механизмов катаболитной репрессии и стринджен-ответа. В недавнем исследовании с помощью флуоресцентной спектроскопии было показано, что (p)ppGpp способен связываться с CRP белком с высокой аффинностью, а результаты молекулярного докинга позволили предположить, что (p)ppGpp может отрицательно регулировать активность этого белка. Таким образом, экспрессия CRP-контролируемых генов модулируется (p)ppGpp в результате его связывания с CRP при стрессе голодания (Duysak et al., 2021).

В бактериальных клетках внутриклеточные уровни цАМФ зависят от многих факторов и определяются, прежде всего, соотношением активности ферментов аденилатциклазы и фосфодиэстераз. Сигнальная молекула цАМФ входит в состав цАМФ-CRP-комплекса, который контролируется углеводами фосфоэнолпируватфосфотрансферазной системы (Deutscher et al., 2006) и, в свою очередь, регулирует катаболитную репрессию углерода (Botsford, Harman, 1992), при которой присутствие глюкозы в ростовой среде подавляет экспрессию ферментов, катализирующих метаболизм других источников углерода, снижая уровни как CRP белка, так и цАМФ (Ishizuka et al., 1994). У *E. coli* уровни клеточного цАМФ обратны пропорциональны источнику углерода, что приводит к низким концентрациям в присутствии легко метаболизируемого источника углерода (глюкозы). Помимо катаболизма уг-

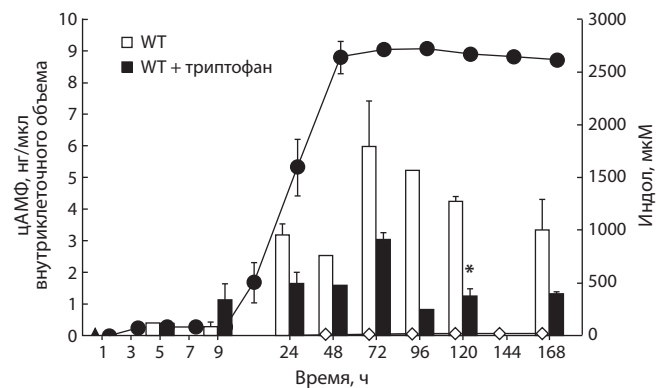


Рис. 5. Продукция индола (график) и образование цАМФ (гистограмма/столбцы) в культуре родительского штамма при росте в среде без триптофана (ромбы/белые столбцы) и с добавкой 2 мМ триптофана (кружки/черные столбцы) при содержании 22.2 мМ глюкозы.

* Статистически значимое отличие (p)ppGpp⁺ штамма с добавкой 2 мМ триптофана от (p)ppGpp⁺ штамма в бестриптофановой среде ($p \leq 0.05$).

лерода, под контролем цАМФ-CRP-регулона находятся важные клеточные функции, связанные со стрессовым ответом, делением клеток и метаболизмом аминокислот, включая ген триптофаназы *tnaA*, ответственной за продукцию из аминокислоты триптофана одного из метаболитов *E. coli* – индола (Isaacs et al., 1994).

В настоящей работе изучена зависимость динамики синтеза цАМФ и индола от присутствия (p)ppGpp и со-

держания глюкозы в среде культивирования. В экспериментах использовались две концентрации глюкозы – 5.6 и 22.2 мМ, которые позиционировались нами как низкое и высокое содержание глюкозы соответственно. В условиях добавки триптофана при исчерпании глюкозы в среде происходит переключение метаболизма бактериальных клеток на утилизацию этого субстрата, который клетки *E. coli* способны использовать в качестве единственного источника углерода и азота за счет действия индуцибельного фермента триптофаназы, расщепляющей триптофан с образованием индола (Yanofsky et al., 1991).

Нами показано, что отсутствие (p)ppGpp в клетках снижает их способность расщеплять глюкозу. Этот эффект был наиболее выраженным при высоком содержании глюкозы в среде (22.2 мМ). В данных условиях ускорение исчерпания глюкозы отмечалось в среде, содержащей триптофан (см. рис. 1). Способность бактериальных клеток продуцировать (p)ppGpp играет важную роль в метаболизме глюкозы как для грамположительных, так и для грамотрицательных бактерий (Oh et al., 2015). При адаптации бактерий к глюкозному голоданию, помимо классического стринджен-ответа, при котором происходит торможение роста и ингибирование синтеза макромолекул, формируется расширенный адаптивный ответ, включающий ингибирование гликолиза и метаболические переходы, опосредованные с помощью механизма каталитической репрессии (Zhang et al., 2016). Согласно нашим экспериментам, исчерпание глюкозы в среде сопровождалось увеличением исходно низкого внутриклеточного содержания цАМФ. Максимальный уровень накопления цАМФ в клетках был пропорционален концентрации исходно добавленного субстрата. При содержании 5.6 мМ глюкозы возрастание уровня цАМФ происходило раньше, чем при 22.2 мМ глюкозы (см. рис. 2). При этом максимальные значения внутриклеточной концентрации цАМФ за 168-часовой период наблюдений достигались уже в первые сутки культивирования в (p)ppGpp⁰ мутанте и на 24-м часу в родительском штамме с добавкой триптофана. В то же время в бестриптофановой культуре (p)ppGpp⁺ штамма максимум наблюдался на 72-м часу культивирования (см. рис. 3, а), как и в условиях добавки 22.2 мМ глюкозы в среде (см. рис. 3, б). При высоком содержании глюкозы уровень цАМФ был выше у родительского штамма в сравнении с делеционным мутантом как в бестриптофановой среде, так и в присутствии этой аминокислоты (см. рис. 3, б). Таким образом, отсутствие (p)ppGpp в клетках приводило к снижению образования цАМФ, что позволяет сделать вывод о положительной регуляции процесса синтеза цАМФ в клетках *E. coli* при участии (p)ppGpp.

Вторичный мессенджер (p)ppGpp модулирует экспрессию генов в ответ на различные стрессовые воздействия у разных видов бактерий (Irving, Corrigan, 2018) и является ключевым регулятором стринджен-ответа. Это один из важнейших защитных механизмов при адаптации бактерий, который индуцируется, прежде всего, при стрессе голодания (Traxler et al., 2006, 2008). У грамотрицательных бактерий (p)ppGpp регулирует инициацию транскрипции путем непосредственного связывания с РНК-полимеразой. Стимулирующий или ингибирующий эффект (p)ppGpp

на транскрипцию зависит от структуры дискриминаторных последовательностей (с преобладанием АТ- или GC-оснований) (Sanchez-Vazquez et al., 2019). Кроме того, (p)ppGpp может напрямую связываться с белками, изменяя их каталитическую активность. Так, в работе (Ro et al., 2021) было показано, что (p)ppGpp способствует ацетилированию CRP белка, который в составе цАМФ-CRP-комплекса играет ключевую роль в регуляции генной экспрессии *E. coli*. Однако при этом не наблюдалось существенных различий ни в уровнях цАМФ, ни в экспрессии аденилатциклазы *guaA*, ответственной за продукцию цАМФ, между полноценным штаммом и мутантом с делецией одной алармонсинтетазы *ΔrelA*.

Полученные нами результаты демонстрируют влияние (p)ppGpp на уровень цАМФ, который проявляется в возрастании концентрации цАМФ в (p)ppGpp⁺ штамме по сравнению с мутантным штаммом с двойной делецией *ΔrelAΔspoT* в 2.8 и 6 раз при содержании 5.6 и 22.2 мМ глюкозы соответственно во временных точках максимального различия, что приходится на 72 ч культивирования в бестриптофановой среде (см. рис. 3). Подобный эффект (p)ppGpp на уровень цАМФ наблюдался и в условиях избыточного накопления индола, но только при высоком (22.2 мМ) исходном содержании глюкозы (см. рис. 3, б), тогда как при лимитировании глюкозы различия в концентрации цАМФ между WT и нокаутом исчезали (см. рис. 3, а). Вероятно, отсутствие эффекта (p)ppGpp на уровень цАМФ (Ro et al., 2021) можно объяснить активностью фермента SpoT-синтетазы, приводящей к накоплению (p)ppGpp, в то время как в наших экспериментах двойная делеция *ΔrelAΔspoT* обеспечивала полное отсутствие сигнальной молекулы стринджен-ответа. Интересно, что присутствие (p)ppGpp в клетках вызывало ускорение начала синтеза цАМФ в условиях лимитирования глюкозы (5.6 мМ исходного содержания), что демонстрировалось на 3 ч культивирования статистически значимым 4-кратным увеличением концентрации цАМФ в (p)ppGpp⁺ штамме по сравнению с мутантом в бестриптофановой среде. Однако в последующие две точки отбора проб – 5 и 9 ч культивирования – (p)ppGpp⁰ нокаут превосходил родительский штамм в уровне выработки цАМФ (см. рис. 4, б), что наблюдалось также в условиях добавки триптофана (см. рис. 4, в).

В данном исследовании нами показано, что (p)ppGpp вовлечен в регуляцию продукции цАМФ, как и в биосинтез индола. Известно, что триптофаназный оперон *tnaCAB*, ответственный за образование индола, положительно регулируется цАМФ-CRP-зависимым механизмом каталитической репрессии и индуцируется на транскрипционном уровне при исчерпании углеводов и переходе клеток в стационарную фазу (Stewart, Yanofsky, 1985). Этим объясняется наблюдаемое на бестриптофановой среде повышение уровня цАМФ до 1.8 и 6 нг/мкл при 5.6 и 22.2 мМ глюкозы соответственно (см. рис. 3). Возрастание цАМФ сопровождалось значительным увеличением (до 10 раз) образования индола в условиях добавки 22.2 мМ глюкозы, что характерно только для родительского штамма, но не для мутанта (см. рис. 4, а). Таким образом, можно сделать вывод, что алармон (p)ppGpp положительно регулирует процесс образования индола наравне с механизмом ката-

болитной репрессии. Как видно из рис. 4, а, б, внутриклеточная концентрация цАМФ в бестриптофановой среде снижается в $\Delta relA\Delta spoT$ мутанте в сравнении с (p)ppGpp⁺ штаммом в 6 и 3 раза в среде с 22.2 и 5.6 мМ глюкозы соответственно. Это указывает на положительную роль (p)ppGpp как в регуляции синтеза цАМФ, так и в продукции индола. В условиях добавки триптофана оба штамма при обеих исследованных концентрациях глюкозы демонстрировали высокую продукцию индола (см. рис. 4, в, з). Возрастание образования индола происходило по времени культивирования раньше при 5.6 мМ глюкозы, что может быть связано с более ранним образованием цАМФ в клетках. При этом мутант тоже демонстрировал задержку по времени в накоплении индола, более выраженную в условиях добавки 22.2 мМ глюкозы (см. рис. 4, в). Таким образом, продукция индола у *E. coli* находится под положительным контролем вторичных мессенджеров (p)ppGpp и цАМФ в условиях лимита субстрата.

Представленные нами данные показывают, что уровень цАМФ в клетках *E. coli* в некоторой степени зависит от содержания индола в среде. Наличие в среде субстрата для синтеза индола триптофана приводит к сверхпродукции индола в культурах обоих штаммов. Однако снижение концентрации цАМФ, более выраженное в условиях добавки 22.2 мМ глюкозы, наблюдается только в родительском штамме (см. рис. 5), тогда как в культуре $\Delta relA\Delta spoT$ нокаута высокая продукция индола не оказывала значимого эффекта на уровень цАМФ.

Полученные результаты демонстрируют, что отсутствие алармона (p)ppGpp в клетках *E. coli* приводило к снижению образования цАМФ и замедлению метаболизма глюкозы. Возрастание уровня цАМФ в ответ на исчерпание глюкозы сопровождалось синтезом индола с выраженным снижением его накопления в (p)ppGpp⁰ мутанте в сравнении с родительским штаммом как в бестриптофановой среде, так и при добавке триптофана. В клетках (p)ppGpp⁺ штамма в условиях низкой скорости спонтанного образования индола на бестриптофановой среде значительно усиливался его синтез в ответ на возрастание уровня цАМФ при исчерпании глюкозы, чего не наблюдалось у (p)ppGpp⁰ мутанта с пониженным накоплением цАМФ. Это указывает на положительную роль (p)ppGpp в регуляции процесса образования индола, контролируемого механизмом катаболитной репрессии при участии цАМФ. В условиях внесения триптофана оба штамма демонстрировали высокую продукцию индола, что сопровождалось снижением уровня накопления цАМФ в сравнении с бестриптофановым контролем и было наиболее выражено в (p)ppGpp⁺ штамме при 22.2 мМ глюкозы. Таким образом, алармон (p)ppGpp в условиях лимитирования глюкозы положительно регулирует накопление цАМФ и индола, который, в свою очередь, снижает образование цАМФ.

Заключение

Выживание бактерий в непрерывно изменяющихся условиях среды обусловлено сформировавшейся в ходе эволюционного процесса сложнейшей системой взаимодействующих многочисленных регуляторных сетей, контролирующих разнообразные физиологические функции бактерий при различных стрессовых воздействиях. В на-

шей работе рассмотрено взаимодействие сигнальных молекул цАМФ, (p)ppGpp и индола в условиях лимитирования субстрата и показано, что (p)ppGpp действует как положительный регулятор метаболизма глюкозы, синтеза цАМФ и продукции индола. Внутриклеточный уровень накопления цАМФ зависит как от обеспеченности среды углеродным субстратом, так и от алармона стринджен-ответа (p)ppGpp. Отсутствие (p)ppGpp в клетках снижает их способность продуцировать индол в условиях низкой скорости его спонтанного образования на бестриптофановой среде и замедляет скорость его накопления в среде в присутствии триптофана. Биосинтез индола у *E. coli* положительно регулируется сигнальными молекулами (p)ppGpp и цАМФ в условиях лимита субстрата. Это позволяет сделать вывод, что (p)ppGpp-зависимая продукция индола опосредуется через изменение уровня цАМФ в клетках. Полученные результаты демонстрируют модуляторный эффект (p)ppGpp в экспрессии генов триптофанозного оперона, регулируемого цАМФ-CRP-зависимым механизмом катаболитной репрессии, снятие которой индуцируется при исчерпании глюкозы.

Список литературы / References

- Кашеварова Н.М., Ахова А.В., Хаова Е.А., Ткаченко А.Г. Роль алармона (p)ppGpp в регуляции образования индола клетками *Escherichia coli* в зависимости от содержания глюкозы. *Acta Biomedica Scientifica*. 2022;7(3):162-168. DOI 10.29413/ABS.2022-7.3.17
- [Kashevarova N.M., Akhova A.V., Khaova E.A., Tkachenko A.G. Role of alarmone (p)ppGpp in the regulation of indole formation depending on glucose content in *Escherichia coli*. *Acta Biomedica Scientifica*. 2022;7(3):162-168. DOI 10.29413/ABS.2022-7.3.17 (in Russian)]
- Amato S.M., Orman M.A., Brynildsen M.P. Metabolic control of persister formation in *Escherichia coli*. *Mol. Cell*. 2013;50(4):475-487. DOI 10.1016/j.molcel.2013.04.002
- Arenz S., Abdelshahid M., Sohnen D., Payoe R., Starosta A.L., Berninghausen O., Haurlyuk V., Beckmann R., Wilson D.N. The stringent factor RelA adopts an open conformation on the ribosome to stimulate ppGpp synthesis. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(13):6471-6481. DOI 10.1093/nar/gkw470
- Balsalobre C., Johansson J., Uhlin B.E. Cyclic AMP-dependent osmoregulation of *crp* gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. 2006;188(16):5935-5944. DOI 10.1128/JB.00235-06
- Bansal T., Englert D., Lee J., Hegde M., Wood T.K., Jayaraman A. Differential effects of epinephrine, norepinephrine, and indole on *Escherichia coli* O157: H7 chemotaxis, colonization, and gene expression. *Infect. Immun*. 2007;75(9):4597-4607. DOI 10.1128/IAI.00630-07
- Botsford J.L., Harman J.G. Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiol. Rev*. 1992;56(1):100-122. DOI 10.1128/mr.56.1.100-122.1992
- Chant E.L., Summers D.K. Indole signalling contributes to the stable maintenance of *Escherichia coli* multicopy plasmids. *Mol. Microbiol*. 2007;63(1):35-43. DOI 10.1111/j.1365-2958.2006.05481.x
- Chu W., Zere T.R., Weber M.M., Wood T.K., Whiteley M., Hidalgo-Romano B., Valenzuela E.J., McLean R.J.C. Indole production promotes *Escherichia coli* mixed-culture growth with *Pseudomonas aeruginosa* by inhibiting quorum signaling. *Appl. Environ. Microbiol*. 2012;78(2):411-419. DOI 10.1128/AEM.06396-11
- Dalebroux Z.D., Svensson S.L., Gaynor E.C., Swanson M.S. ppGpp conjures bacterial virulence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 2010;74(2):171-199. DOI 10.1128/MMBR.00046-09
- Dalebroux Z.D., Swanson M.S. ppGpp: magic beyond RNA polymerase. *Nat. Rev. Microbiol*. 2012;10(3):203-212. DOI 10.1038/nrmicro2720

- 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;97(12):6640-6645. DOI 10.1073/pnas.120163297
- Deutscher J., Francke C., Postma P.W. How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2006;70(4):939-1031. DOI 10.1128/MMBR.00024-06
- Duysak T., Tran T.T., Afzal A.R., Jung C. Fluorescence spectroscopic analysis of ppGpp binding to cAMP receptor protein and histone-like nucleoid structuring protein. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(15):7871. DOI 10.3390/ijms22157871
- Gosset G., Zhang Z., Nayyar S., Cuevas W.A., Saier M.H. Transcriptome analysis of Crp-dependent catabolite control of gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2004;186(11):3516-3524. DOI 10.1128/JB.186.11.3516-3524.2004
- Gutierrez-Ríos R.M., Freyre-Gonzalez J.A., Resendis O., Collado-Vides J., Saier M., Gosset G. Identification of regulatory network topological units coordinating the genome-wide transcriptional response to glucose in *Escherichia coli*. *BMC Microbiol.* 2007;7:53. DOI 10.1186/1471-2180-7-53
- Haurlyuk V., Atkinson G.S., Murakami K.S., Tenson T., Gerdes K. Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. *Nat. Rev. Microbiol.* 2015;13(5):298-309. DOI 10.1038/nrmicro3448
- Hengge R., Häussler S., Pruteanu M., Stülke J., Tschowri N., Turgay K. Recent advances and current trends in nucleotide second messenger signaling in bacteria. *J. Mol. Biol.* 2019;431(5):908-927. DOI 10.1016/j.jmb.2019.01.014
- Hirakawa H., Inazumi Y., Masaki T., Hirata T., Yamaguchi A. Indole induces the expression of multidrug exporter genes in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 2005;55(4):1113-1126. DOI 10.1111/j.1365-2958.2004.04449
- Imamura R., Yamanaka K., Ogura T., Hiraga S., Fujita N., Ishihama A., Niki H. Identification of the *cpdA* gene encoding cyclic 3',5'-adenosine monophosphate phosphodiesterase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 1996;271(41):25423-25429. DOI 10.1074/jbc.271.41.25423
- Irving S.E., Corrigan R.M. Triggering the stringent response: signals responsible for activating (p)ppGpp synthesis in bacteria. *Microbiology*. 2018;164(3):268-276. DOI 10.1099/mic.0.000621
- Isaacs H., Chao D., Yanofsky C., Saier M.H. Mechanism of catabolite repression of tryptophanase synthesis in *Escherichia coli*. *Microbiology*. 1994;140(8):2125-2134. DOI 10.1099/13500872-140-8-2125
- Ishizuka H., Hanamura A., Inada T., Aiba H. Mechanism of the down-regulation of cAMP receptor protein by glucose in *Escherichia coli*: role of autoregulation of the *crp* gene. *EMBO J.* 1994;13(13):3077-3082. DOI 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06606.x
- Kawamura-Sato K., Shibayama K., Horii T., Iimura Y., Arakawa Y., Ohta M. Role of multiple efflux pumps in *Escherichia coli* in indole expulsion. *FEMS Microbiol. Lett.* 1999;179(2):345-352. DOI 10.1016/S0378-1097(99)00433-4
- Kim D., Sitepu I.R., Hashidokoa Y. Induction of biofilm formation in the betaproteobacterium *Burkholderia unamae* CK43B exposed to exogenous indole and gallic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013;79(16):4845-4852. DOI 10.1128/AEM.01209-13
- Kwan B.W., Osbourne D.O., Hu Y., Benedik M.J., Wood T.K. Phosphodiesterase DosP increases persistence by reducing cAMP which reduces the signal indole. *Biotechnol. Bioeng.* 2015;112(3):588-600. DOI 10.1002/bit.25456
- Lee J., Jayaraman A., Wood T.K. Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA. *BMC Microbiol.* 2007;7:42. DOI 10.1186/1471-2180-7-42
- Maisonneuve E., Gerdes K. Molecular mechanisms underlying bacterial persisters. *Cell*. 2014;157(3):539-548. DOI 10.1016/j.cell.2014.02.050
- Mechold U., Potrykus K., Murphy H., Murakami K.S., Cashel M. Differential regulation by ppGpp versus pppGpp in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(12):6175-6189. DOI 10.1093/nar/gkt302
- Oh Y.T., Lee K., Bari W., Raskin D.M., Yoon S.S. (p)ppGpp, a small nucleotide regulator, directs the metabolic fate of glucose in *Vibrio cholerae*. *J. Biol. Chem.* 2015;290(21):13178-13190. DOI 10.1074/jbc.M115.640466
- Potrykus K., Cashel M. (p)ppGpp: still magical? *Annu. Rev. Microbiol.* 2008;62:35-51. DOI 10.1146/annurev.micro.62.081307.162903
- Rickenberg H.V. Cyclic AMP in prokaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.* 1974;28:353-369. DOI 10.1146/annurev.mi.28.100174.002033
- Ro C., Cashel M., Fernández-Col L. The secondary messenger ppGpp interferes with cAMP-CRP regulon by promoting CRP acetylation in *Escherichia coli*. *PLoS One*. 2021;16(10):e0259067. DOI 10.1371/journal.pone.0259067
- Sanchez-Vazquez P., Dewey C.N., Kitten N., Ross W., Gourse R.L. Genome-wide effects on *Escherichia coli* transcription from ppGpp binding to its two sites on RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2019;116(17):8310-8319. DOI 10.1073/pnas.1819682116
- Stewart V., Yanofsky C. Evidence for transcription antitermination control of tryptophanase operon expression in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 1985;164(2):731-740. DOI 10.1128/jb.164.2.731-740.1985
- Traxler M.F., Chang D.E., Conway T. Guanosine 3',5'-bispyrophosphate coordinates global gene expression during glucose-lactose diauxie in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006;103(7):2374-2379. DOI 10.1073/pnas.0510995103
- Traxler M.F., Summers S.M., Nguyen H., Zacharia V.M., Smith J.T., Conway T. The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 2008;68(5):1128-1148. DOI 10.1111/j.1365-2958.2008.06229.x
- Wood T.K., Knabel S.J., Kwan B.W. Bacterial persister cell formation and dormancy. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013;79(23):7116-7121. DOI 10.1128/AEM.02636-13
- Yanofsky C., Horn V., Gollnick P. Physiological studies of tryptophan transport and tryptophanase operon induction in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1991;173(19):6009-6017. DOI 10.1128/jb.173.19.6009-6017.1991
- Yoshimura-Suzuki T., Sagami I., Yokota N., Kurokawa H., Shimizu T. DOS(Ec), a heme-regulated phosphodiesterase, plays an important role in the regulation of the cyclic AMP level in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2005;187(19):6678-6682. DOI 10.1128/JB.187.19.6678-6682.2005
- Zhang T., Zhu J., Wei S., Luo Q., Li L., Li S., Tucker A., Shao H., Zhou R. The roles of RelA/(p)ppGpp in glucose-starvation induced adaptive response in the zoonotic *Streptococcus suis*. *Sci. Rep.* 2016;6:27169. DOI 10.1038/srep27169
- Zhou X., Meng X., Sun B. An EAL domain protein and cyclic AMP contribute to the interaction between the two quorum sensing systems in *Escherichia coli*. *Cell Res.* 2008;18(9):937-948. DOI 10.1038/cr.2008.67

ORCID

N.M. Kashevarova orcid.org/0000-0003-3751-8156
E.A. Khaova orcid.org/0000-0003-4457-2652
A.G. Tkachenko orcid.org/0000-0002-8631-8583

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (124020500028-4).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 14.07.2023. После доработки 13.11.2023. Принята к публикации 15.11.2023.