


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

Регуляторные эффекты полиаминов и индола на экспрессию факторов гибернации рибосом у *Escherichia coli* на уровне трансляции

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
 akkuzina-elena510@mail.ru

Аннотация. Полиамины и индол – регуляторные молекулы, которые участвуют в адаптации к стрессу у бактерий, включая регуляцию генной экспрессии. Гены, трансляция которых находится под регуляторным влиянием полиаминов, составляют полиаминовый модулон. Ранее нами показано, что полиамины стимулируют транскрипцию генов, кодирующих факторы гибернации рибосом RMF, RaiA, SRA, EttA, RsfS у *Escherichia coli*, а эффект индола ограничивался лишь двумя из них – *raiA* и *rmf*. Факторы гибернации рибосом обратимо ингибируют трансляцию в условиях стресса с целью экономии клеточных ресурсов, играя ключевую роль в выживании бактерий, в том числе при воздействии антибиотиков. Данная работа посвящена изучению влияния индола на экспрессию генов *raiA* и *rmf* на трансляционном уровне, а также регуляторных эффектов полиаминов путресцина, кадаверина и спермидина на трансляцию генов *rmf*, *raiA*, *sra*, *ettA*, *rsfS*. Проанализировав первичные структуры мРНК, а также полученные с помощью программы RNAfold модели вторичных структур мРНК, мы установили, что все исследуемые гены имеют специфические признаки полиаминового модулона. Для изучения влияния полиаминов и индола на трансляцию исследуемых генов были сконструированы трансляционные репортерные *lacZ*-слияния с использованием pRS552/λRS45 системы. Согласно полученным результатам, полиамины стимулируют экспрессию «стационарно-фазных» генов *rmf*, *raiA*, *sra*, но не оказывают влияния на трансляцию генов *ettA* и *rsfS*, наибольшая экспрессия которых наблюдается в экспоненциальной фазе роста. Стимулирующий эффект специфичен для различных полиаминов и во всех случаях наблюдается в стационарной фазе, когда клетки подвержены множественному стрессорному воздействию. Кроме того, полученные данные демонстрируют значительный ингибирующий эффект индола на экспрессию *raiA* и *rmf* на уровне трансляции, несмотря на его стимулирующее действие на транскрипцию данных генов, что может являться признаком функционирования посттранскрипционного механизма их регуляции. Ключевые слова: полиамины; полиаминовый модулон; индол; факторы гибернации рибосом; репортерные генные слияния; генная экспрессия; адаптация к стрессу.

Для цитирования: Хаова Е.А., Ткаченко А.Г. Регуляторные эффекты полиаминов и индола на экспрессию факторов гибернации рибосом у *Escherichia coli* на уровне трансляции. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(1):24-32. DOI 10.18699/vjgb-24-04

Effects of polyamines and indole on the expression of ribosome hibernation factors in *Escherichia coli* at the translational level

Е.А. Khaova , A.G. Tkachenko

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia
 akkuzina-elena510@mail.ru

Abstract. Polyamines and indole are small regulatory molecules that are involved in the adaptation to stress in bacteria, including the regulation of gene expression. Genes, the translation of which is under the regulatory effects of polyamines, form the polyamine modulon. Previously, we showed that polyamines upregulated the transcription of genes encoding the ribosome hibernation factors RMF, RaiA, SRA, EttA and RsfS in *Escherichia coli*. At the same time, indole affected the expression at the transcriptional level of only the *raiA* and *rmf* genes. Ribosome hibernation factors reversibly inhibit translation under stress conditions, including exposure to antibiotics, to avoid resource waste and to conserve ribosomes for a quick restoration of their functions when favorable conditions occur. In this work, we have studied the influence of indole on the expression of the *raiA* and *rmf* genes at the translational level and regulatory effects of the polyamines putrescine, cadaverine and spermidine on the translation of the *rmf*, *raiA*, *sra*, *ettA* and *rsfS* genes. We have analyzed the mRNA primary structures of the studied genes and the predicted mRNA secondary structures obtained by using the RNAfold program for the availability of polyamine modulon

features. We have found that all of the studied genes contain specific features typical of the polyamine modulon. Furthermore, to investigate the influence of polyamines and indole on the translation of the studied genes, we have constructed the translational reporter *lacZ*-fusions by using the pRS552/ARS45 system. According to the results obtained, polyamines upregulated the expression of the *rmf*, *raiA* and *sra* genes, the highest expression of which was observed at the stationary phase, but did not affect the translation of the *ettA* and *rsfS* genes, the highest expression of which took place during the exponential phase. The stimulatory effects were polyamine-specific and observed at the stationary phase, when bacteria are under multiple stresses. In addition, the data obtained demonstrated that indole significantly inhibited translation of the *raiA* and *rmf* genes, despite the stimulatory effect on their transcription. This can suggest the activity of a posttranscriptional regulatory mechanism of indole on gene expression. Key words: polyamines; polyamine modulon; indole; ribosome hibernation factors; reporter gene fusions; gene expression; adaptation to stress.

For citation: Khaova E.A., Tkachenko A.G. Effects of polyamines and indole on the expression of ribosome hibernation factors in *Escherichia coli* at the translational level. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(1):24-32. DOI 10.18699/vjgb-24-04

Введение

Как полиамины, так и индол, будучи нормальными метаболитами бактерий, участвуют во множестве клеточных процессов, включая адаптацию к стрессам, антибиотикоустойчивость, биопленкообразование, quorum sensing, бактериальную персистенцию (Rhee et al., 2007; Shah, Swiatlo, 2008; Tkachenko et al., 2012, 2014; Gaimster et al., 2014; Lee et al., 2015; Miller-Fleming et al., 2015; Michael, 2018; Kim et al., 2020; Zarkan et al., 2020; Lang et al., 2021). Биогенные полиамины представляют собой алифатические поликатионы, которые синтезируются из аминокислот и присутствуют в клетках всех групп живых организмов. Бактериями преимущественно продуцируются путресцин, кадаверин и спермидин (Tabor C.W., Tabor H., 1985; Michael, 2016). В свою очередь индол – это гетероциклическое ароматическое соединение, продукт расщепления аминокислоты триптофана, который продуцируется многими видами бактерий (Zarkan et al., 2020).

Одним из путей реализации регуляторных эффектов данных метаболитов является модуляция генной экспрессии (Igarashi, Kashiwagi, 2006, 2018; Kusano et al., 2008; Shah, Swiatlo, 2008; Miller-Fleming et al., 2015; Zarkan et al., 2020; Lang et al., 2021). В клетке полиамины присутствуют в основном в виде комплексов с РНК, в том числе с мРНК. Совокупность генов, экспрессия которых стимулируется полиаминами на трансляционном уровне, принято обозначать термином «полиаминовый модулон» (Igarashi, Kashiwagi, 2006, 2018). В то же время есть данные, что полиамины, как и индол, могут действовать также на других уровнях генной экспрессии (Miller-Fleming et al., 2015; Lang et al., 2021; Хаова и др., 2022). При этом сигнальные молекулы способны формировать единые регуляторные сети, реализующие адаптивный ответ на множественные стрессы (Ткаченко, 2012). В последние годы в литературе появляются данные о взаимном влиянии индола и полиаминов в метаболизме *Escherichia coli*. В частности, экзогенный индол способен повышать внутриклеточное содержание путресцина и спермидина, а добавка полиамина спермина, синтезируемого главным образом эукариотами, может увеличивать содержание индола в среде (Нестерова и др., 2021). Функционирование регуляторных сетей направлено на оптимизацию реакции бактериальных клеток на изменения условий внешней среды (Ткаченко, 2012). Известно, что полиамины и индол оказывают множество различных эффектов на клеточные

процессы, однако их молекулярные мишени и механизм действия остаются не до конца изученными (Rhee et al., 2007; Kusano et al., 2008; Shah, Swiatlo, 2008; Lee et al., 2015; Miller-Fleming et al., 2015; Michael, 2018; Zarkan et al., 2020).

Ранее нами исследовано влияние полиаминов и индола на экспрессию ряда генов, ответственных за адаптацию к стрессу у *E. coli*, на транскрипционном уровне; среди них гены *rmf*, *raiA*, *sra*, *ettA*, *rsfS*, кодирующие факторы гибернации рибосом (Хаова и др., 2022). Функция данных факторов заключается в обратимом ингибировании рибосом в условиях истощения питательных веществ и других стрессов в целях экономии ресурсов клетки и консервации рибосом для быстрого восстановления их функционирования при наступлении благоприятных условий. При этом действие факторов гибернации рибосом может быть связано с переходом бактериальной клетки в дормантное, т. е. метаболически неактивное состояние, характеризующееся отсутствием роста и деления (Prossliner et al., 2018; Trösch, Willmund, 2019; Усачев и др., 2020).

С дормантностью тесно связано формирование персистенции. Персистеры – это малочисленная субпопуляция бактериальных клеток, которые находятся в дормантном состоянии, что дает им возможность переживать воздействие летальных доз антибиотиков ввиду отсутствия ростовых процессов как мишеней для атаки. Такая форма устойчивости к антибиотикам, в отличие от антибиотикорезистентности, имеет фенотипическую природу и зависит от множества связанных друг с другом факторов. После снятия воздействия антибиотика персистерные клетки могут возобновлять рост, благодаря чему являются одной из причин рецидивов инфекционных заболеваний (Lewis, 2010; Zhang, 2014; Balaban et al., 2019). Кроме того, персистеры, способные мутировать и переживать воздействие высоких концентраций антибиотиков, могут служить «резервуаром» для возникновения резистентных мутантов (Zhang, 2014; Ткаченко, 2018). Хотя молекулярно-генетические механизмы персистенции до сих пор мало изучены, в последнее время активно разрабатывается модель формирования персистеров как результат функционирования факторов гибернации рибосом (Song, Wood, 2020). Кроме того, опубликованы данные, указывающие на участие в персистенции полиаминов и индола (Tkachenko et al., 2014, 2017; Zarkan et al., 2020; Lang et al., 2021). Можно предположить вовлеченность последних в формирование

Таблица 1. Штаммы *E. coli*, использованные в работе

Штамм <i>E. coli</i>	Генотип	Источник
BW25141	F-, Δ(<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB</i> -3), Δ(<i>phoBphoR</i>)580, λ- <i>galU</i> 95, Δ <i>uidA</i> 3:: <i>pir</i> +, <i>recA1</i> , <i>endA9</i> (<i>del-ins</i> :: <i>FRT</i> , <i>rph1</i> , Δ(<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514	Datsenko, Wanner, 2000
BW25141 <i>rmf</i> :: <i>lacZ</i>	Как BW25141, но λRS45 <i>rmf39</i> :: <i>lacZ</i> (<i>Hyb</i>)	Данная работа
BW25141 <i>raiA</i> :: <i>lacZ</i>	Как BW25141, но λRS45 <i>raiA174</i> :: <i>lacZ</i> (<i>Hyb</i>)	
BW25141 <i>sra</i> :: <i>lacZ</i>	Как BW25141, но λRS45 <i>sra102</i> :: <i>lacZ</i> (<i>Hyb</i>)	
BW25141 <i>ettA</i> :: <i>lacZ</i>	Как BW25141, но λRS45 <i>ettA663</i> :: <i>lacZ</i> (<i>Hyb</i>)	
BW25141 <i>rsfS</i> :: <i>lacZ</i>	Как BW25141, но λRS45 <i>rsfS81</i> :: <i>lacZ</i> (<i>Hyb</i>)	

персистенции посредством модуляции экспрессии факторов гибернации рибосом. Это обусловлено способностью полиаминов стимулировать транскрипцию генов *rmf*, *raiA*, *sra*, *ettA*, *rsfS*, кодирующих факторы гибернации рибосом, тогда как индол участвует в повышении экспрессии двух из них, *raiA* и *rmf* (Хаова и др., 2022).

Известно, что факторы гибернации рибосом имеют различные механизмы действия. Если RMF (альтернативные названия фактора – Res, RimF) совместно с другим фактором HPF (альтернативное название – YhbH) формирует неактивные 100S димеры рибосом, то RaiA (альтернативные названия – YfiA, pY, Urf1) связывает и блокирует активные центры 70S рибосом, SRA (альтернативные названия – RpsV, Protein D) ингибирует трансляцию, взаимодействуя с 30S субъединицей, EttA (альтернативное название – YjjK) инактивирует рибосомы в ответ на низкий уровень АТФ в клетке, а RsfA (альтернативные названия фактора – YbeB, RsfA) препятствует взаимодействию большой и малой рибосомальных субъединиц (Prossliner et al., 2018).

Целью данной работы было изучение влияния индола на экспрессию генов *raiA* и *rmf* на трансляционном уровне, а также регуляторных эффектов полиаминов путресцина, кадаверина и спермидина на трансляцию генов *rmf*, *raiA*, *sra*, *ettA* и *rsfS*.

Материалы и методы

Штаммы и условия культивирования. Штаммы *E. coli*, использованные в работе, представлены в табл. 1. Клетки культивировали в термостатируемом шейкере GFL-1092 (GFL) при температуре +37 °C с перемешиванием при 120 об/мин на богатой среде LB (Sigma) или на синтетической минеральной среде M9 (+0.4 % глюкозы), с добавлением канамицина, 25 мкг/мл (AppliChem), и/или ампициллина, 50 мкг/мл (AppliChem), при необходимости. Для рутинного культивирования клеток и при генетическом конструировании использовали среду LB.

В экспериментах по изучению генной экспрессии клетки штаммов, несущих *lacZ*-слияния, культивировали на среде M9 (+0.4 % глюкозы). В качестве экзогенных добавок полиаминов, произведенных на 2 ч культивирования, использовали гидрохлориды путресцина, кадаверина и спермидина (Sigma) в концентрациях, указанных на рисунках. Добавку триптофана (AppliChem) в концентрации 2 мМ производили, как описано ранее (Хаова и др., 2022).

Конструирование трансляционных *lacZ*-слияний.

Штаммы BW25141, несущие в хромосоме *lacZ*-слияние, получены с использованием генетических векторов pRS552 и λRS45 (Simons et al., 1987). Праймеры, примененные в работе, приведены в табл. 2. Поиск нуклеотидных последовательностей для подбора праймеров производили в базах данных GenBank и EcoCyc (Keseler et al., 2021). Выравнивание подобранных праймеров осуществляли, используя ресурс Primer-Blast.

Вектор pRS552 содержит два уникальных сайта рестрикции EcoRI и BamHI, по которым производилось молекулярное клонирование. Исключением стало слияние *raiA*::*lacZ*, которое получено при клонировании только по одному сайту BamHI, поскольку в промоторе гена *raiA* нативно присутствует сайт рестрикции EcoRI; при этом плазмида pRS552 была обработана ферментом щелочной фосфатазой. Из плазмиды pRS552 репортерные слияния перенесены в хромосому штамма BW25141 с помощью фага λRS45 посредством гомологической рекомбинации. Репортерные слияния в хромосоме штаммов присутствуют в виде единичной копии в составе профага.

Промежуточные и окончательные генетические конструкции верифицированы при помощи ПЦР и секвенированы. Секвенирование проводили на базе компании «Евроген» (Москва, Россия). При анализе результатов секвенирования выравнивание нуклеотидных последовательностей выполняли с помощью ресурса Blastn. Все

Таблица 2. Праймеры, использованные для конструирования трансляционных *lacZ*-слияний

Ген	Последовательность праймеров
<i>rmf</i>	5'-CGAATTCGGTATGTTGCCTGAG-3' 5'-GTGGATCCTGTGCCCGTTC-3'
<i>raiA</i>	5'-ATAATCGGATCCCGTTTGGTCCGTATT-3' 5'-ACCAGAGGATCCTTAGGTGTATTGAT-3'
<i>sra</i>	5'-ATGGATTGGAATCTTGTCTCT-3' 5'-GGTTGGATCCTTTACTACGCT-3'
<i>ettA</i>	5'-TTTTGAATTCTACTGCGAGGGTGAT-3' 5'-CGGGATCCAGGAAGTAACGGT-3'
<i>rsfS</i>	5'-ATATTGAATTCGTCAGCCATCAGGGTGTA-3' 5'-TTGGGATCCACGCTAAGGCGATG-3'

использованные ферменты произведены Thermo Fisher Scientific.

Активность β-галактозидазы. Генную экспрессию детектировали посредством измерения активности β-галактозидазы методом Миллера (Miller, 1972).

Предсказание вторичных структур мРНК осуществляли при помощи программы RNAfold (Lorenz et al., 2011).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета стандартных программ Statistica for Windows 5.0 (StatSoft Inc., 1995). На рисунках приведены средние значения из серии однотипных независимых экспериментов (не менее 3), вертикальными отрезками обозначены величины среднеквадратического отклонения.

Результаты

Полиамины участвуют во множестве клеточных процессов, в том числе посредством регуляции генной экспрессии. Гены, экспрессия которых стимулируется полиаминами на трансляционном уровне, объединяют в структуру «полиаминовый модулон». Выделяют различные механизмы, благодаря которым полиамины способны модулировать генную экспрессию на трансляционном уровне, и, соответственно, специфические особенности в структуре мРНК, характерные для таких генов. Полиамины преимущественно действуют на стадии инициации трансляции. Во-первых, данные метаболиты способствуют инициации трансляции генов, в структуре мРНК которых содержится минорный, неэффективный старт-кодон. Во-вторых, полиамины стимулируют протекание инициации трансляции генов, в структуре мРНК которых необычно большое расстояние между последовательностью Шайна–Дальгарно и старт-кодоном. За счет введения изгиба мРНК в данной области полиамины способны сокращать это расстояние (Igarashi, Kashiwagi, 2006, 2018). В-третьих, полиамины способны оказывать релаксирующее действие на вторич-

ные “bulged-out” (выбухающие) структуры, которые, располагаясь между последовательностью Шайна–Дальгарно и старт-кодоном, препятствуют инициации трансляции (Lightfoot, Hall, 2014).

Нами проанализированы структуры мРНК генов *rmf*, *raiA*, *sra*, *ettA*, *rsfS* с точки зрения наличия специфических особенностей, характерных для генов полиаминового модулона, с использованием баз данных GenBank и EcoСyc (Keseler et al., 2021) и сведений литературы, а также полученных моделей вторичных структур мРНК с помощью программы RNAfold (Lorenz et al., 2011). Согласно (Sakamoto et al., 2020), для *rmf* мРНК характерно необычно большое расстояние между последовательностью Шайна–Дальгарно и старт-кодоном и наличие “bulged-out” структуры в этой области. Однако информация об остальных генах гибернации рибосом в литературе отсутствует. Анализ первичной структуры мРНК генов показал, что *ettA* мРНК и *rsfS* мРНК содержат минорные старт-кодоны GUG и UUG соответственно. Полученные модели вторичных структур мРНК показали, что для двух генов, *raiA* и *sra*, “bulged-out” структура может с высокой вероятностью встречаться в интересующей области (рис. 1). Модель вторичной структуры *raiA* мРНК демонстрирует наличие “bulged-out”-структуры на расстоянии 3 нуклеотидов до старт-кодона. Согласно модели вторичной структуры *sra* мРНК, часть последовательности Шайна–Дальгарно входит в состав “bulged-out” структуры. Таким образом, исследуемые гены имеют потенциальные признаки полиаминового модулона.

С помощью полученных нами генно-инженерных штаммов, несущих *lacZ*-слияния, было исследовано влияние добавок полиаминов путресцина, кадаверина и спермидина в различных концентрациях на экспрессию генов *rmf*, *raiA*, *sra*, *ettA*, *rsfS* на трансляционном уровне. Результаты исследования демонстрируют, что экспрессия гена *rmf* значительно стимулируется путресцином в кон-

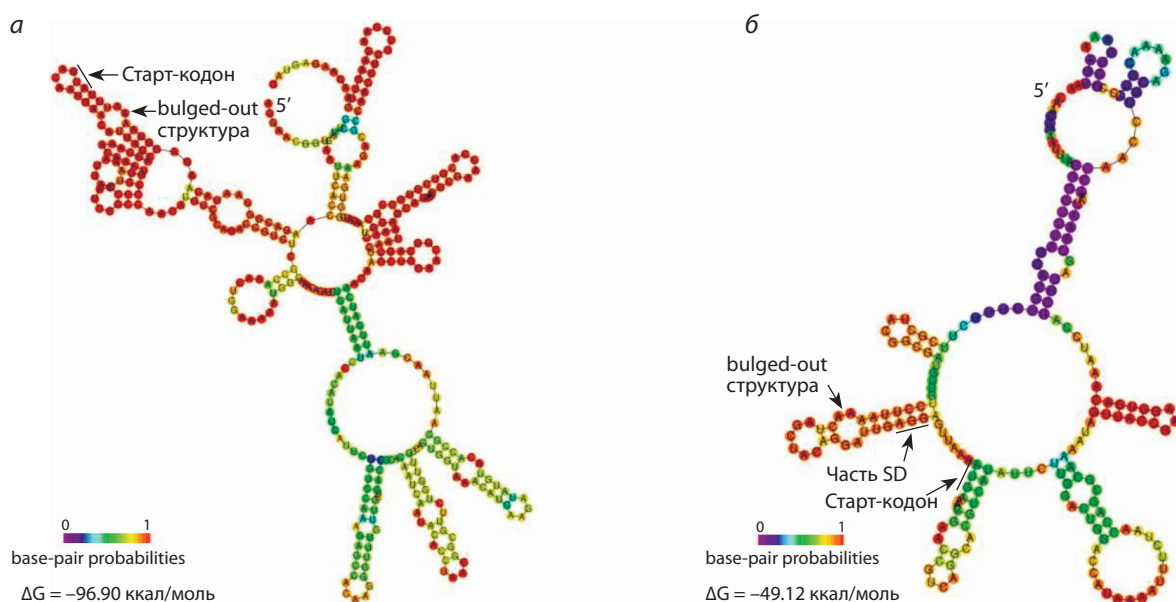


Рис. 1. Модели вторичных структур мРНК генов *raiA* (а) и *sra* (б), полученных с помощью программы RNAfold (Lorenz et al., 2011). SD – последовательность Шайна–Дальгарно.

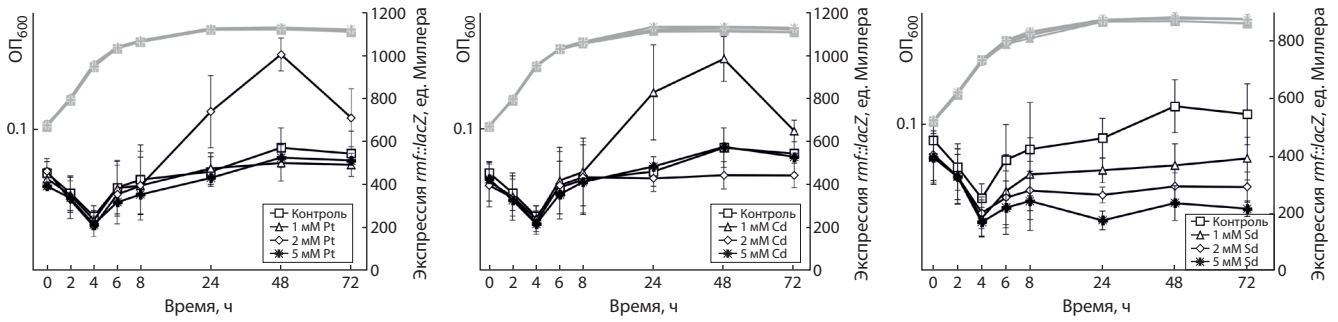


Рис. 2. Влияние добавок путресцина, кадаверина и спермидина в различных концентрациях на экспрессию гена *rnf* на трансляционном уровне.

Здесь и далее: линии черного цвета – экспрессия, серого – оптическая плотность; Pt – путресцин, Cd – кадаверин, Sd – спермидин; OP₆₀₀ – оптическая плотность при 600 нм.

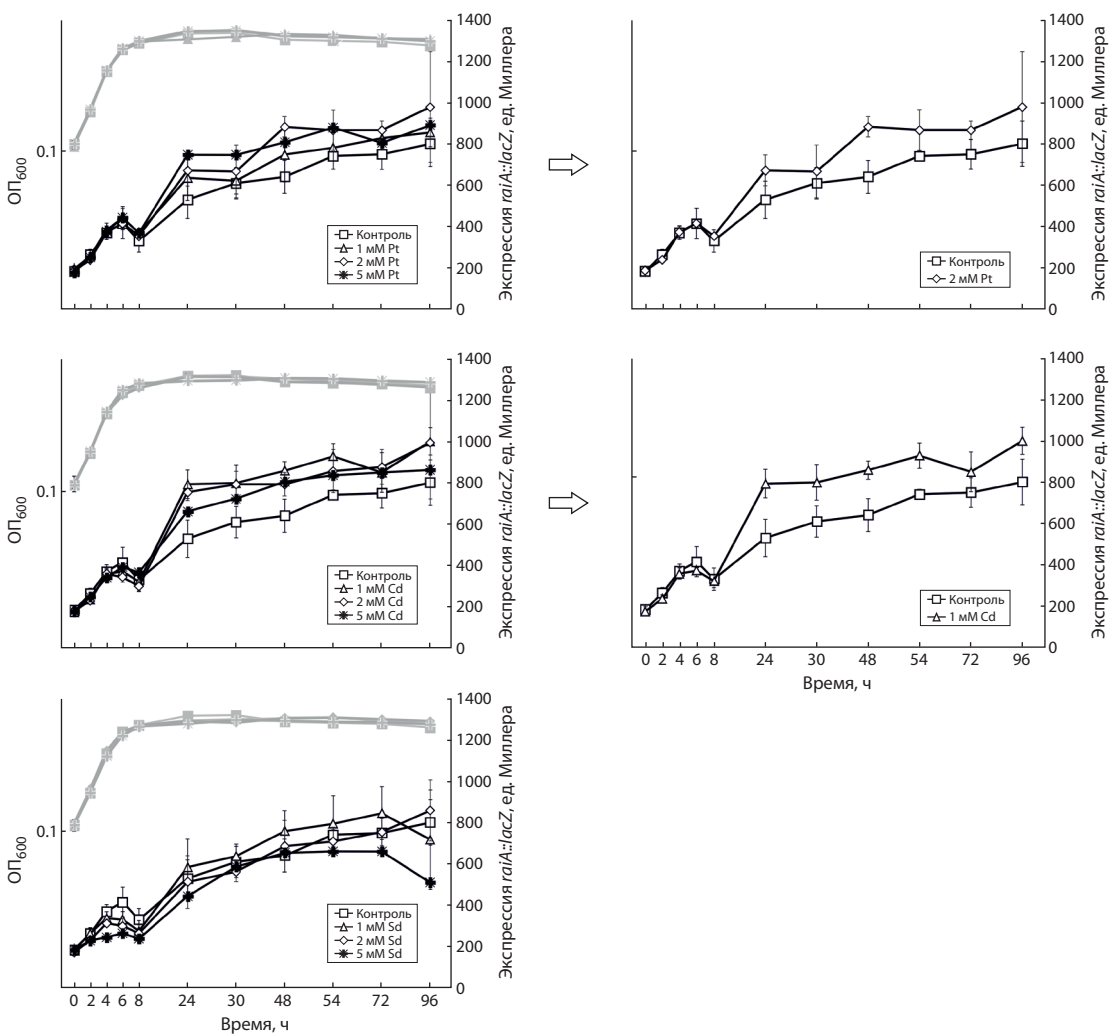


Рис. 3. Влияние добавок путресцина, кадаверина и спермидина в различных концентрациях на экспрессию гена *raiA* на трансляционном уровне.

центрации 2 мМ и кадаверином в концентрации 1 мМ (рис. 2). Наибольший стимулирующий эффект наблюдается на 48 ч культивирования в стационарной фазе. Напротив, спермидин ингибирует экспрессию *rnf* пропорционально концентрации добавленного полиамина. Нативная экспрессия гена *rnf* без добавок держится на стабильно высоком уровне в течение стационарной фазы.

Согласно результатам исследования, экспрессия гена *raiA* находится на низком уровне в ходе экспоненциального роста и возрастает в стационарной фазе (рис. 3). Добавки путресцина в концентрации 2 мМ и кадаверина в концентрации 1 мМ лишь незначительно повышают экспрессию *raiA* в стационарной фазе, тогда как спермидин не оказывает видимого влияния.

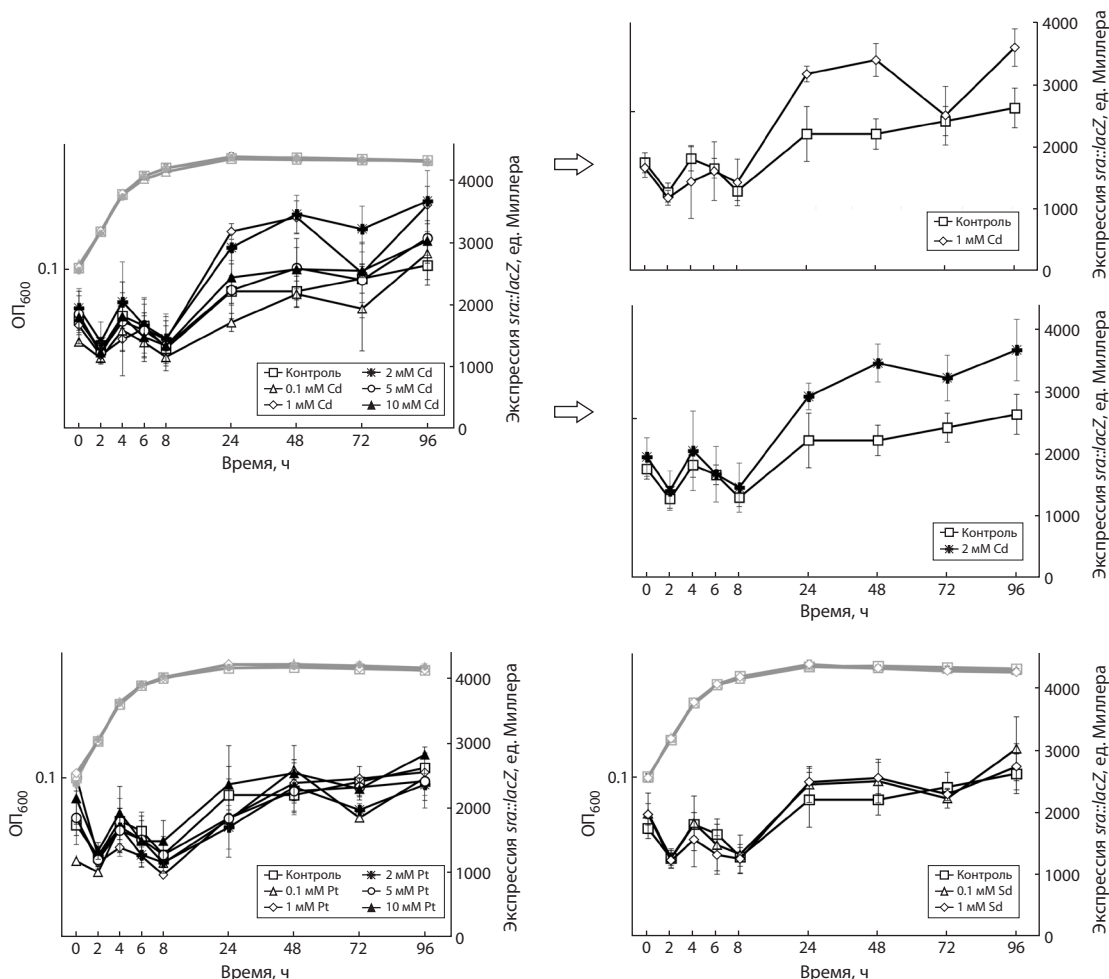


Рис. 4. Влияние добавок путресцина, кадаверина и спермидина в различных концентрациях на экспрессию гена *sra* на трансляционном уровне.

Экспрессия гена *sra* также находится на постоянно высоком уровне в стационарной фазе (рис. 4). Его экспрессию в значительной степени повышает добавка кадаверина в концентрациях 1 и 2 мМ. При этом максимальный эффект наблюдается в стационарной фазе на 48 ч культивирования. Добавки путресцина и спермидина не влияли на экспрессию *sra*.

В отличие от остальных генов, наибольшая экспрессия генов *ettA* и *rsfS* наблюдается в экспоненциальной фазе роста (рис. 5). Максимальная экспрессия у *ettA* приходится на 4 ч культивирования, а у *rsfS* – на 1–3 ч. Добавки полиаминов не оказывали влияния на экспрессию данных генов.

Ранее нами показано, что экзогенная добавка 2 мМ триптофана на 0 ч культивирования эквивалентно конвертируется в индол на 24 ч. Содержание индола в течение 7 ч детектировалось на низком уровне, сходном с контролем, и резко возрастало на 24 ч (Хаова и др., 2022), что связано с RpoS-зависимым характером экспрессии триптофаназы TnaA, катализирующей образование индола из триптофана (Li, Young, 2013; Gaimster et al., 2014). В данных условиях была изучена экспрессия ряда генов, ответственных за адаптацию к стрессу у *E. coli*, на транскрипционном уровне. Только у двух из них, *raiA* и *rmf*,

экспрессия возрастала в ответ на повышение уровня индола (Хаова и др., 2022). В связи с этим мы исследовали влияние индола на экспрессию данных генов при тех же условиях на трансляционном уровне (рис. 6). Полученные результаты демонстрируют, что несмотря на стимулирующий эффект на уровне транскрипции, экспрессия обоих генов на трансляционном уровне существенно снижалась при повышении содержания индола, начиная с 24 ч культивирования.

Обсуждение

Функции факторов гибернации рибосом состоят в обратимом ингибировании такого ресурсоемкого процесса, как трансляция, в условиях голодания по источникам питания и воздействия других стрессов. Известно, что данные факторы находятся под контролем мастер-регуляторов (p)rrpGpp, RpoS, CRP-cAMP, ответственных за адаптацию бактерий к множественному стрессорному воздействию в стационарной фазе. В связи с этим факторы гибернации рибосом функционируют главным образом в этот период. Однако в ходе экспоненциального роста ими также поддерживается базовый уровень неактивных рибосом (Prossliner et al., 2018). Результаты исследования показывают, что наибольшая экспрессия генов *rmf*, *raiA* и *sra* наблюдается

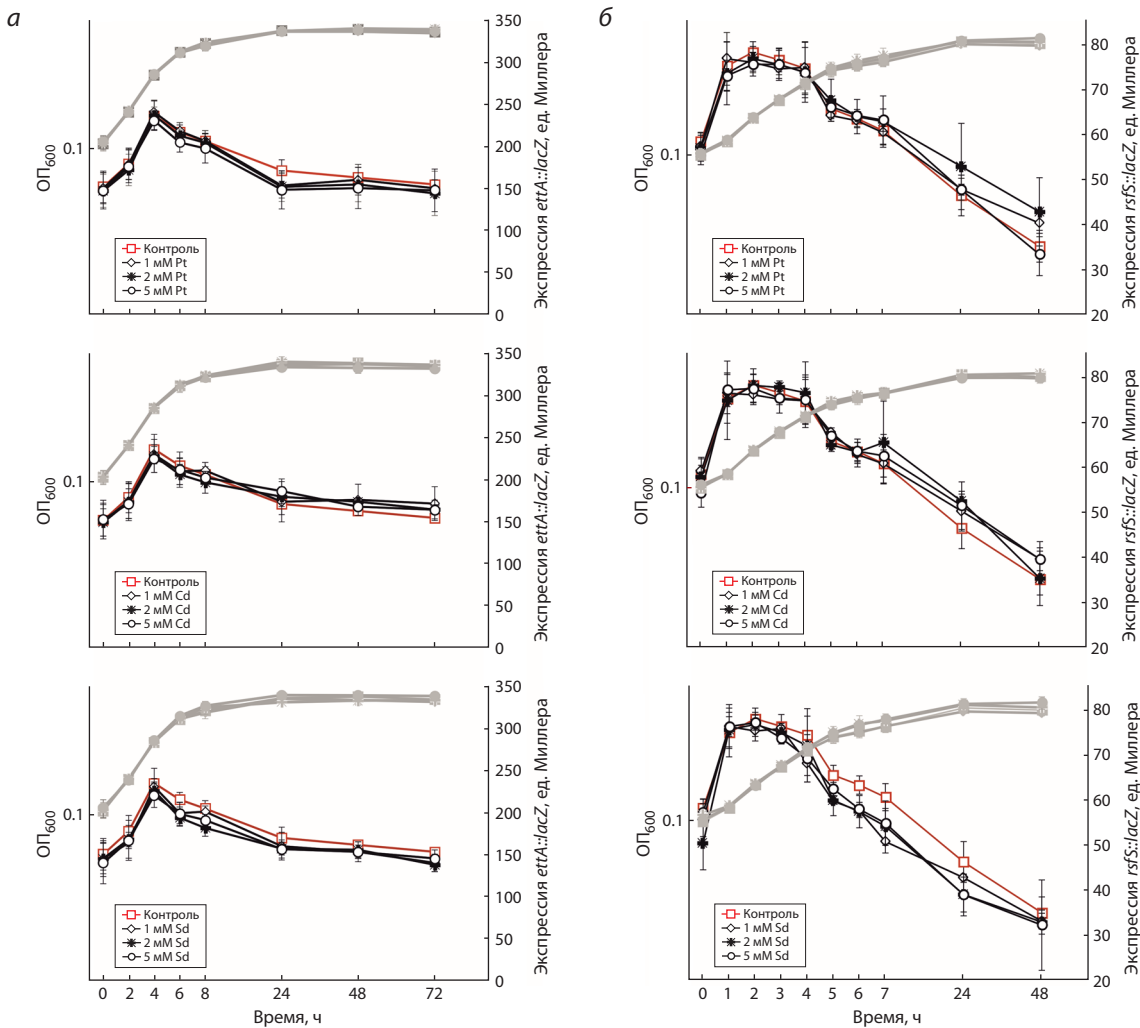


Рис. 5. Влияние добавок путресцина, кадаверина и спермидина в различных концентрациях на экспрессию гена *ettA* (а) и *rsfS* (б) на трансляционном уровне.

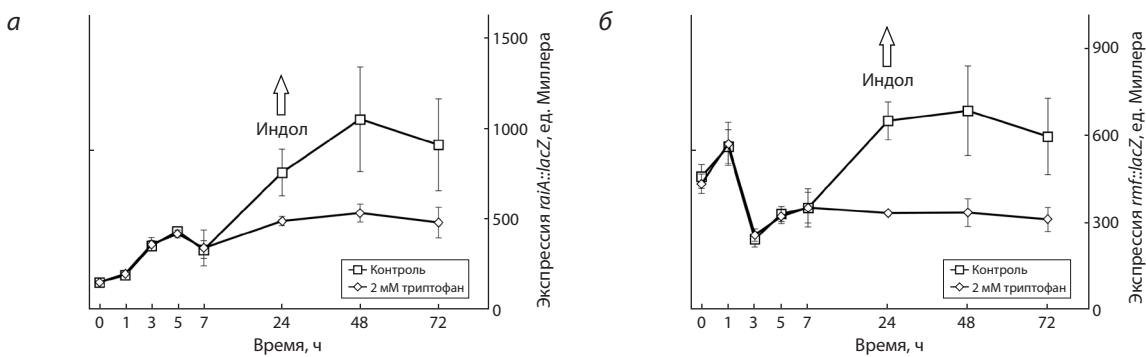


Рис. 6. Влияние индола на экспрессию генов *raiA* (а) и *rmf* (б) на трансляционном уровне.

именно в стационарной фазе (табл. 3). Напротив, гены *ettA* и *rsfS* демонстрируют максимальную экспрессию в ходе экспоненциального роста. При этом полиамины влияют на экспрессию «стационарно-фазных» генов *rmf*, *raiA* и *sra*, но не *ettA* и *rsfS*. Во всех случаях стимулирующий эффект полиаминов наблюдается также в стационарной фазе. То есть полиамины могут индуцировать экспрессию ряда ге-

нов, ответственных за адаптацию к стрессу, в том числе *rmf*, *raiA* и *sra*, формируя адаптивное состояние клетки к стационарной фазе. Кроме того, стимулирующий эффект специфичен по типу полиамина: экспрессия каждого гена зависит от определенных полиаминов. Вместе с тем путресцин и кадаверин преимущественно положительно модулировали генную экспрессию.

Таблица 3. Эффекты полиаминов на экспрессию генов *rmf*, *raiA*, *sra*, *ettA*, *rsfS* на трансляционном уровне

Параметры	<i>rmf</i>			<i>raiA</i>			<i>sra</i>			<i>ettA</i>			<i>rsfS</i>		
	Pt	Cd	Sd	Pt	Cd	Sd	Pt	Cd	Sd	Pt	Cd	Sd	Pt	Cd	Sd
Эффект добавки ПА	+	+	-	+	+	Нет	Нет	+	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
Фаза максимальной экспрессии гена	Стационарная			Стационарная			Стационарная			Экспоненциальная			Экспоненциальная		
Потенциальные признаки ПА модулона	"Bulged-out" структура и необычно большое расстояние между старт-кодоном и SD			"Bulged-out" структура			"Bulged-out" структура			Минорный старт-кодон			Минорный старт-кодон		

Примечание. «+» – стимулирующий эффект, «-» – ингибирующий эффект, «нет» – нет эффекта. ПА – полиамины/полиаминовый; Pt – путресцин; Cd – кадаверин; Sd – спермидин; SD – последовательность Шайна-Дальгарно.

Таким образом, гены гибернации рибосом могут находиться под контролем различных мастер-регуляторов, а регуляторные сети могут оказывать взаимное влияние друг на друга. Полиамины и индол участвуют в регуляции сходных клеточных процессов, что подтверждается данными об их взаимодействии (Нестерова и др., 2021). Ранее в исследованиях на транскрипционном уровне нами показано, что точкой пересечения регуляторных сетей, контролируемых полиаминами и индолом, могут быть основные факторы гибернации рибосом у *E. coli* RaiA и RMF (Хаова и др., 2022). Результаты исследований на уровне и транскрипции, и трансляции свидетельствуют о полиамин-зависимом характере экспрессии соответствующих генов. Индол стимулировал экспрессию данных генов на уровне транскрипции (Хаова и др., 2022), однако результаты, полученные в настоящей работе, демонстрируют его значительное ингибирующее действие на трансляционном уровне при тех же условиях. Это указывает на возможность функционирования посттранскрипционного механизма регуляции генной экспрессии.

Заключение

Анализ структуры мРНК генов *rmf*, *raiA*, *sra*, *ettA*, *rsfS*, кодирующих факторы гибернации рибосом, а также полученные модели их вторичных структур показали, что исследуемые гены имеют потенциальные признаки полиаминового модулона. В связи с этим нами сконструированы штаммы, несущие соответствующие трансляционные *lacZ*-слияния, и изучена экспрессия генов при добавке поликатионов путресцина, кадаверина и спермидина в различных концентрациях и без добавок. Впервые гены гибернации рибосом, за исключением *rmf*, исследованы на способность данных метаболитов оказывать эффект на их экспрессию. Стимулирующий эффект полиаминов наблюдается в стационарной фазе и является типоспецифичным. При этом они влияли на экспрессию только генов *rmf*, *raiA* и *sra*, активных в стационарной фазе, но не *ettA* и *rsfS*, у которых наибольшая экспрессия наблюдается в ходе экспоненциального роста. Кроме того, индол ингибирует экспрессию генов *raiA* и *rmf* на уровне трансляции, несмотря на положительную модуляцию на транскрипционном уровне, что указывает на возможность посттранскрипционной регуляции генной экспрессии. Полученные результаты открывают перспективы для дальнейших исследований в данном направлении.

Список литературы / References

- Нестерова Л.Ю., Ахова А.В., Ткаченко А.Г. Влияние индола на содержание клеточных полиаминов и антибиотикочувствительность *Escherichia coli*. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология*. 2021;76(4):219-224
- [Nesterova L.Y., Akhova A.V., Tkachenko A.G. Influence of indole on intracellular polyamines and antibiotic susceptibility of *Escherichia coli*. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 16. Biologiya = Herald of Moscow University. Series 16. Biology*. 2021;76(4):219-224 (in Russian)]
- Ткаченко А.Г. Молекулярные механизмы стрессорных ответов у микроорганизмов. Екатеринбург, 2012
- [Tkachenko A.G. Molecular Mechanisms of Stress Responses in Microorganisms. Yekaterinburg, 2012 (in Russian)]
- Ткаченко А.Г. Стрессорные ответы бактериальных клеток как механизм развития толерантности к антибиотикам (обзор). *Прикл. биохимия и микробиология*. 2018;54(2):110-133. DOI 10.7868/S0555109918020022
- [Tkachenko A.G. Stress responses of bacterial cells as mechanisms of development of antibiotic tolerance (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2018;54(2):108-127. DOI 10.1134/S0003683818020114]
- Усачев К.С., Юсупов М.М., Валидов Ш.З. Гибернация – стадия функционирования рибосом. *Биохимия*. 2020;85(11):1690-1700. DOI 10.31857/S0320972520110111
- [Usachev K.S., Yusupov M.M., Validov Sh.Z. Hibernation as a stage of ribosome functioning. *Biochemistry (Moscow)*. 2020;85(11):1434-1442. DOI 10.1134/S0006297920110115]
- Хаова Е.А., Кашеварова Н.М., Ткаченко А.Г. Регуляторный эффект полиаминов и индола на экспрессию генов адаптации к стрессу у *Escherichia coli*. *Acta Biomedica Scientifica*. 2022;7(3):150-161. DOI 10.29413/ABS.2022-7.3.16
- [Khaova E.A., Kashevarova N.M., Tkachenko A.G. Regulatory effect of polyamines and indole on expression of stress adaptation genes in *Escherichia coli*. *Acta Biomedica Scientifica*. 2022;7(3):150-161. DOI 10.29413/ABS.2022-7.3.16 (in Russian)]
- Balaban N.Q., Helaine S., Lewis K., Ackermann M., Aldridge B., Andersson D.I., Brynildsen M.P., Bumann D., Camilli A., Collins J.J., Dehio C., Fortune S., Ghigo J.-M., Hardt W.-D., Harms A., Heinemann M., Hung D.T., Jenal U., Levin B.R., Michiels J., Storz G., Tan M.-W., Tenson T., Melderer L.V., Zinkernagel A. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nat. Rev. Microbiol.* 2019;17(7):441-448. DOI 10.1038/s41579-019-0196-3
- 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
- Gaimster H., Cama J., Hernández-Ainsa S., Keyser U.F., Summers D.K. The indole pulse: a new perspective on indole signalling in *Escherichia coli*. *PLoS One*. 2014;9(4):e93168. DOI 10.1371/journal.pone.0093168

- Igarashi K., Kashiwagi K. Polyamine modulon in *Escherichia coli*: genes involved in the stimulation of cell growth by polyamines. *J. Biochem.* 2006;139(1):11-16. DOI 10.1093/jb/mvj020
- Igarashi K., Kashiwagi K. Effects of polyamines on protein synthesis and growth of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 2018;293(48):18702-18709. DOI 10.1074/jbc.TM118.003465
- Keseler I.M., Gama-Castro S., Mackie A., Billington R., Bonavides-Martinez C., Caspi R., Kothari A., Krummenacker M., Midford P.E., Muñoz-Rascado L., Ong W.K., Paley S., Santos-Zavaleta A., Subhraveti P., Tierrafría V.H., Wolfe A.J., Collado-Vides J., Paulsen I.T., Karp P.D. The EcoCyc database in 2021. *Front. Microbiol.* 2021;12:711077. DOI 10.3389/fmicb.2021.711077
- Kim C.S., Li J.H., Barco B., Park H.B., Gatsios A., Damania A., Wang R., Wyche T.P., Piizzi G., Clay N.K., Crawford J.M. Cellular stress upregulates indole signaling metabolites in *Escherichia coli*. *Cell Chem. Biol.* 2020;27(6):698-707.e7. DOI 10.1016/j.chembiol.2020.03.003
- Kusano T., Berberich T., Tateda C., Takahashi Y. Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta.* 2008;228(3):367-381. DOI 10.1007/s00425-008-0772-7
- Lang M., Krin E., Korlowski C., Sismeiro O., Varet H., Coppée J.Y., Mazel D., Baharoglu Z. Sleeping ribosomes: bacterial signaling triggers RaiA mediated persistence to aminoglycosides. *iScience.* 2021;24(10):103128. DOI 10.1016/j.isci.2021.103128
- Lee J.H., Wood T.K., Lee J. Roles of indole as an interspecies and interkingdom signaling molecule. *Trends Microbiol.* 2015;23(11):707-718. DOI 10.1016/j.tim.2015.08.001
- Lewis K. Persister cells. *Annu. Rev. Microbiol.* 2010;64:357-372. DOI 10.1146/annurev.micro.112408.134306
- Li G., Young K.D. Indole production by the tryptophanase TnaA in *Escherichia coli* is determined by the amount of exogenous tryptophan. *Microbiology (Reading).* 2013;159(2):402-410. DOI 10.1099/mic.0.064139-0
- Lightfoot H.L., Hall J. Endogenous polyamine function – the RNA perspective. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(18):11275-11290. DOI 10.1093/nar/gku837
- Lorenz R., Bernhart S.H., Siederdisen C., Tafer H., Flamm C., Stadler P.F., Hofacker I.L. ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms Mol. Biol.* 2011;6:26. DOI 10.1186/1748-7188-6-2
- Michael A.J. Polyamines in eukaryotes, bacteria, and archaea. *J. Biol. Chem.* 2016;291(29):14896-14903. DOI 10.1074/jbc.R116.734780
- Michael A.J. Polyamine function in archaea and bacteria. *J. Biol. Chem.* 2018;293(48):18693-18701. DOI 10.1074/jbc.TM118.005670
- Miller J.H. Experiments in Molecular Genetics. New York, 1972
- Miller-Fleming L., Olin-Sandoval V., Campbell K., Ralser M. Remaining mysteries of molecular biology: the role of polyamines in the cell. *J. Mol. Biol.* 2015;427(21):3389-3406. DOI 10.1016/j.jmb.2015.06.020
- Prossliner T., Skovbo Winther K., Sørensen M.A., Gerdes K. Ribosome hibernation. *Annu. Rev. Genet.* 2018;52:321-348. DOI 10.1146/annurev-genet-120215-035130
- Rhee H.J., Kim E.J., Lee J.K. Physiological polyamines: simple primordial stress molecules. *J. Cell. Mol. Med.* 2007;11(4):685-703. DOI 10.1111/j.1582-4934.2007.00077.x
- Sakamoto A., Sahara J., Kawai G., Yamamoto K., Ishihama A., Uemura T., Igarashi K., Kashiwagi K., Terui Y. Cytotoxic mechanism of excess polyamines functions through translational repression of specific proteins encoded by polyamine modulon. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(7):2406. DOI 10.3390/ijms21072406
- Shah P., Swiatlo E. A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. *Mol. Microbiol.* 2008;68(1):4-16. DOI 10.1111/j.1365-2958.2008.06126.x
- Simons R.W., Houman F., Kleckner N. Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene.* 1987;53(1):85-96. DOI 10.1016/0378-1119(87)90095-3
- Song S., Wood T.K. ppGpp ribosome dimerization model for bacterial persister formation and resuscitation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2020;523(2):281-286. DOI 10.1016/j.bbrc.2020.01.102
- Tabor C.W., Tabor H. Polyamines in microorganisms. *Microbiol. Rev.* 1985;49(1):81-99. DOI 10.1128/mr.49.1.81-99.1985
- Tkachenko A.G., Akhova A.V., Shumkov M.S., Nesterova L.Yu. Polyamines reduce oxidative stress in *Escherichia coli* cells exposed to bactericidal antibiotics. *Res. Microbiol.* 2012;163(2):83-91. DOI 10.1016/j.resmic.2011.10.009
- 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;361(1):25-33. DOI 10.1111/1574-6968.12613
- 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;364(9):fmx084. DOI 10.1093/femsle/fmx084
- Trösch R., Willmund F. The conserved theme of ribosome hibernation: from bacteria to chloroplasts of plants. *Biol. Chem.* 2019;400(7):879-893. DOI 10.1515/hsz-2018-0436
- Zarkan A., Liu J., Matuszewska M., Gaimster H., Summers D.K. Local and universal action: the paradoxes of indole signalling in bacteria. *Trends Microbiol.* 2020;28(7):566-577. DOI 10.1016/j.tim.2020.02.007
- Zhang Y. Persisters, persistent infections and the Yin-Yang model. *Emerg. Microbes Infect.* 2014;3(1):e3. DOI 10.1038/emi.2014.3

ORCID

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.