

## РЕГУЛЯТОРНЫЙ ЭФФЕКТ ПОЛИАМИНОВ И ИНДОЛА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ АДАПТАЦИИ К СТРЕССУ У *ESCHERICHIA COLI*

Хаова Е.А.<sup>1,2</sup>,  
Кашеварова Н.М.<sup>1</sup>,  
Ткаченко А.Г.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН (614081, г. Пермь, ул. Голева, 13, Россия)

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет» (614068, г. Пермь, ул. Букирева, 15, Россия)

Автор, ответственный за переписку:  
Хаова Елена Александровна,  
e-mail: akkuzina-elena510@mail.ru

### РЕЗЮМЕ

Индол и полиамины участвуют в регуляции физиологических процессов у бактерий, связанных с адаптацией к стрессам, биоплёнкообразованием, антибиотикоустойчивостью, бактериальной персистенцией, что имеет важное клиническое значение. Однако молекулярные мишени и механизм действия этих метаболитов до сих пор мало изучены. В данной работе исследовано влияние полиаминов и индола на экспрессию таких генов, как: *rpoS*, *relA* и *spoT*, кодирующих регуляторы общего стрессорного ответа и голодания; *hns* и *stpA*, кодирующих глобальные регуляторы генной экспрессии; *rmf*, *yajD*, *hpf*, *raiA*, *rsfS*, *sra*, *ettA*, кодирующих факторы гибернации рибосом.

**Цель исследования.** Изучить регуляторные эффекты полиаминов и индола на экспрессию перечисленных генов, ответственных за адаптацию *Escherichia coli* к стрессу.

**Материалы и методы.** В качестве объектов исследования использовали штаммы *E. coli*. Содержание полиаминов исследовали методом тонкослойной хроматографии. Концентрацию индола определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Генную экспрессию изучали при помощи ПЦР в реальном времени, сопряжённой с обратной транскрипцией.

**Результаты.** Добавка полиаминов путресцина, кадаверина и спермидина в среду стимулировала экспрессию всех исследуемых генов. Для большинства генов наибольшая стимуляция наблюдалась в стационарной фазе роста. Наиболее значительное влияние оказывали путресцин и спермидин. Показана эквимолярная конвертация экзогенного триптофана в индол через 24 ч культивирования. В это время увеличивалась экспрессия двух генов: *rmf* и *raiA*.

**Заключение.** Нами показано, что полиамины стимулируют экспрессию всех исследуемых генов на транскрипционном уровне, при этом их стимулирующий эффект специфичен по фазе культивирования и типу полиамина. Индол оказывает положительный эффект на экспрессию генов *rmf* и *raiA*, тогда как остальные из исследованных генов не подвержены его регуляторным воздействиям.

**Ключевые слова:** полиамины, индол, генная экспрессия, ПЦР в реальном времени

Статья получена: 16.03.2022

Статья принята: 22.04.2022

Статья опубликована: 05.07.2022

**Для цитирования:** 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

## REGULATORY EFFECT OF POLYAMINES AND INDOLE ON EXPRESSION OF STRESS ADAPTATION GENES IN *ESCHERICHIA COLI*

Khaova E.A.<sup>1,2</sup>,  
Kashevarova N.M.<sup>1</sup>,  
Tkachenko A.G.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Ecology and Genetics  
of Microorganisms, Ural Branch  
Russian Academy of Sciences  
(Goleva str. 13, Perm 614081,  
Russian Federation)

<sup>2</sup> Perm State National Research  
University (Bukireva str. 15, Perm  
614068, Russian Federation)

Corresponding author:

Elena A. Khaova,  
e-mail: akkuzina-elena510@mail.ru

### ABSTRACT

**Background.** Indole and polyamines are involved in the regulation of physiological processes in bacteria associated with adaptation to stress, biofilm formation, antibiotic tolerance, and bacterial persistence. However, the molecular targets and mechanisms of action of these metabolites are still poorly understood. In this work, we studied the effect of polyamines and indole on the expression of such genes as: *rpoS*, *relA*, and *spoT*, encoding regulators of the general stress responses and starvation; *hns* and *stpA*, encoding global regulators of gene expression; *rmf*, *yqjD*, *hpf*, *raiA*, *rsfS*, *sra*, *ettA*, encoding ribosome hibernation factors.

**The aim.** To study the regulatory effects of polyamines and indole on the expression of these genes, which are responsible for the adaptation of *Escherichia coli* to stress.

**Materials and methods.** We used strains of *E. coli* in this study. The amount of polyamines was studied by thin layer chromatography. The indole concentration was determined by high performance liquid chromatography. Gene expression was studied using real-time RT-PCR.

**Results.** The addition of polyamines putrescine, cadaverine and spermidine to the medium stimulated the expression of all the studied genes. The maximal stimulation was observed at the stationary phase mostly. Putrescine and spermidine had the most significant effect.

At 24 h of cultivation, an equimolar conversion of exogenous tryptophan into indole was showed. At this time, the expression of two genes – *rmf* and *raiA* – increased.

**Conclusions.** We have shown that polyamines upregulate the expression of all the studied genes at the transcriptional level. The stimulating effect is specific for the phase of the batch culture and the type of polyamine. Indole has a positive effect on the expression of the *rmf* and *raiA* genes.

**Key words:** polyamines, indole, gene expression, real-time RT-PCR

Received: 16.03.2022  
Accepted: 22.04.2022  
Published: 05.07.2022

**For citation:** 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

## ВВЕДЕНИЕ

В естественных условиях, в том числе в макроорганизме-хозяине, бактерии испытывают воздействие различных неблагоприятных факторов: голодание, неоптимальные значения температуры и pH, окислительный стресс, воздействие антибиотиков. Для выживания в таких условиях бактериям необходимо адаптироваться, в том числе посредством изменения генно-экспрессионного профиля клетки [1]. Значительную роль в этом процессе играют полиамины, представляющие собой биогенные поликатионы, которые участвуют в адаптации бактерий к стрессу, регуляции пролиферации и генной экспрессии [2, 3, 4]. Описаны различные механизмы стимуляции генной экспрессии полиаминами на трансляционном уровне. Такие гены объединены в «полиаминовый модулон» [5, 6], многие из которых ответственны за синтез соединений, участвующих в механизмах адаптации. Исходя из этого полиамины можно отнести к категории бактериальных адаптогенов. Бактерии способны самостоятельно продуцировать полиамины, а также импортировать их из внешней среды, где они образуются как продукты распада белков или секретируются клетками макроорганизма-хозяина [2, 7, 8].

Наряду с полиаминами, другим важным соединением, обладающим регуляторной функцией для жизнедеятельности бактерий, является индол. Этот метаболит продуцируется многими представителями грамположительных и грамотрицательных бактерий, включая *Escherichia coli*, а также в значительных количествах присутствует в кишечном тракте млекопитающих, в том числе человека. Индол функционирует в качестве сигнальной молекулы, которая запускает каскад реакций, направленных на адаптацию бактерий к условиям окружающей среды [9].

В литературе появляются данные о том, что экзогенный индол способен повышать содержание путресцина и спермидина в клетках *E. coli* [10], что может свидетельствовать о перекрёстном взаимодействии регуляторных сетей, контролируемых полиаминами и индолом. Известно, что как индол, так и полиамины участвуют в регуляции физиологических процессов у бактерий, в адаптации к стрессу, биоплёнообразованию, антибиотикоустойчивости и бактериальной персистенции, что имеет важное клиническое значение [3, 4, 9, 11–16]. Однако молекулярные мишени и механизм действия данных метаболитов до сих пор недостаточно изучены.

В данной работе нами проведены исследования по влиянию индола и полиаминов на экспрессию генов, участвующих в адаптации *E. coli* к стрессу. Среди них *relA*, кодирующий (p)ppGpp-синтазу, и *spoT*, кодирующий (p)ppGpp-синтазу/гидролазу. (p)ppGpp (гуанозинтетра(пента)фосфат) относят к классу алармонов, сигналов стресса, который выполняет функции глобального регулятора стринджен-ответа. RelA реагирует на связывание с рибосомой незаряженной тРНК при аминокислотном голодании, тогда как SpoT – на отклонение скорости трансляции от максимальной при голодании и других видах стресса. (p)ppGpp участвует в регуляции множества клеточных процессов, при этом его действие направлено на избежание на-

правной траты ресурсов в стрессорных условиях, что может сопровождаться формированием дормантного состояния [17, 18]. Под контролем (p)ppGpp находится экспрессия гена *rpoS* [19], который кодирует альтернативную  $\sigma^S$ -субъединицу РНК-полимеразы. Гены, промоторы которых имеют родство к данной  $\sigma$ -субъединице, объединены в *rpoS*-регулон, ответственный за адаптацию энтеробактерий к комплексному стрессорному воздействию в стационарной фазе [20, 21]. Кроме того, в данной работе исследованы уровни экспрессии генов-паралогов *hns* и *stpA*, которые кодируют ДНК-связывающие белки, выполняющие функции глобальных транскрипционных регуляторов [22, 23]. Также изучены гены *rmf*, *hpf*, *raiA*, *rsfS*, *sra*, *yajD*, *ettA*, кодирующие факторы гибернации рибосом, ответственные за ингибирование трансляции в условиях нехватки ресурсов [24].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Объекты исследования и условия культивирования.** В качестве объектов исследования в работе использованы следующие штаммы *E. coli*: штамм дикого типа BW25141 (F-,  $\Delta$ (*araD-araB*)567,  $\Delta$ (*lacZ4787::rrnB-3*),  $\Delta$ (*phoB-phoR*)580,  $\lambda$ -*galU95*,  $\Delta$ (*uidA3::pir+*), *recA1*, *endA9*(*del-ins*)::*FRT*, *rph-1*,  $\Delta$ (*rhaD-rhaB*)568, *hsdR514*) [25], а также полиамин-дефицитные штаммы HT306A (F-, *thr-1*, *araC14*,  $\Delta$ (*speD98*,  $\Delta$ (*gpt-proA*)62, *lacY1*, *glnX44*(AS), *galk2*(Oc),  $\lambda$ - $\Delta$ (*speB-speA*)97,  $\Delta$ (*speC-glcB*)63, *rpsL25*(*strR*), *xyIA5*, *mtl-1*, *thiE1*, *ampCp-1*, *cadA2*, *lacZ-*) [26] и SHT03 (как HT306A, но  $\lambda$ RZ5 *rpoS::lacZ*) (коллекция Лаборатории адаптации микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН). Штаммы *E. coli*, сохраняемые на скошенном LB-агаре («Sigma», США), высевали на полноценную среду LB («Amresco», США) и культивировали в термостате при температуре 37 °С. После суточного культивирования клетки пересевали на LB-бульон или на синтетическую минеральную среду M9 (+ 0,4 % глюкоза). После 16 ч культивирования при температуре 37 °С культуру использовали в качестве инокулята. В экспериментах с полиамин-дефицитными штаммами на минеральной среде культуру предварительно истощали по полиаминам посредством трёх последовательных пересевов на среде M9 (+ 0,4 % глюкоза), в итоге разводили до оптической плотности 0,45 (ОП<sub>600</sub>), что соответствует 0 ч культивирования. В это время производили добавки полиаминов путресцина, кадавери-на и спермидина («Sigma», США) до конечной концентрации 0,1 мМ. В экспериментах по изучению динамики накопления полиаминов и индола в периодических культурах использовали штамм *E. coli* BW25141. При этом инокулят разводили свежей питательной средой, LB или M9 (+ 0,4 % глюкоза) соответственно, до оптической плотности 0,1 (ОП<sub>600</sub>) в конечном объёме 50 мл и культивировали в термостатируемом шейкере GFL-1092 (GFL, Германия) при температуре 37 °С с перемешиванием (120 об./мин). Оптическую плотность бактериальных культур измеряли по величине абсорбции при 600 нм (ОП<sub>600</sub>) с использованием спектрофотометра UV-1650PC (Shimadzu, Япония). В экспериментах по изучению накопления индола на 0 ч культивирования использовали триптофан 2 мМ (AppliChem, Германия) в качестве экзогенной добавки.

**Определение содержания полиаминов.** Концентрацию полиаминов определяли методом тонкослойной хроматографии их дансил-производных согласно ранее описанному протоколу [12].

**Количественное определение индола.** Концентрацию индола в среде определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии согласно ранее описанному протоколу [10].

**ПЦР в реальном времени, сопряжённая с обратной транскрипцией.** Генную экспрессию исследовали методом ПЦР в реальном времени, сопряжённой с обратной транскрипцией. Суммарную РНК выделяли с помощью коммерческого набора «GeneJET RNA Purification Kit» (Thermo Fisher Scientific, Литва) согласно протоколу. Концентрацию РНК в полученных пробах измеряли при ОП<sub>260</sub> (ОП – оптическая плотность), качество проб оценивали по соотношению ОП<sub>260</sub>/ОП<sub>280</sub> и ОП<sub>260</sub>/ОП<sub>230</sub> при помощи спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Литва). Интактность проб РНК оценивали методом электрофореза в 1%-ном агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием. Пробы обрабатывали ДНКазой, входящей в состав коммерческого набора «TurboTM DNase» (2 У/мкл) (Thermo Fisher Scientific, Литва). Для синтеза кДНК в ходе обратной транскрипции в качестве праймеров использовали случайные наномерные олигонуклеотиды. Все реактивы, использованные для проведения реакции обратной транскрипции, произведены «Thermo Fisher Scientific» (Литва). Праймеры для ПЦР в реальном времени подобраны с помощью программы PrimerSelect версия 7.1.0 (DNASTAR Inc.) (табл. 1). ПЦР в реальном времени проводили с использованием коммерческого набора «qPCRMix-HS SYBR» (Евроген, Россия) на амплификаторе «CFX96 RT Systems C1000 Thermal Cycler» (BioRad, США). После завершения ПЦР строили кривые диссоциации для оценки отсутствия димеров праймеров и других артефактов. Данные обработаны при помощи программы LinRegPCR (2014.x) [27], нормализованы по суммарной РНК, представлены относительно контроля.

**Статистическую обработку** полученных результатов проводили с использованием пакета стандартных программ Statistica 5.0 (StatSoft Inc., США). Повторность экспериментов – трёхкратная.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Регуляторный эффект полиаминов на экспрессию генов адаптации к стрессу у *E. coli*

Стимулирующий эффект полиаминов на экспрессию некоторых исследуемых нами генов ранее показан на трансляционном уровне [5, 6, 14]. Однако их влияние на транскрипционном уровне экспрессии остаётся недостаточно изученным. Аминогруппы полиаминов при физиологических условиях протонируются, что делает эти соединения способными взаимодействовать с отрицательно заряженными биомолекулами, в первую очередь с РНК и ДНК. Большая часть внутриклеточного пула полиаминов находится в комплексе с РНК. С этим связана регуляторная роль полиаминов в регуляции генной экспрессии

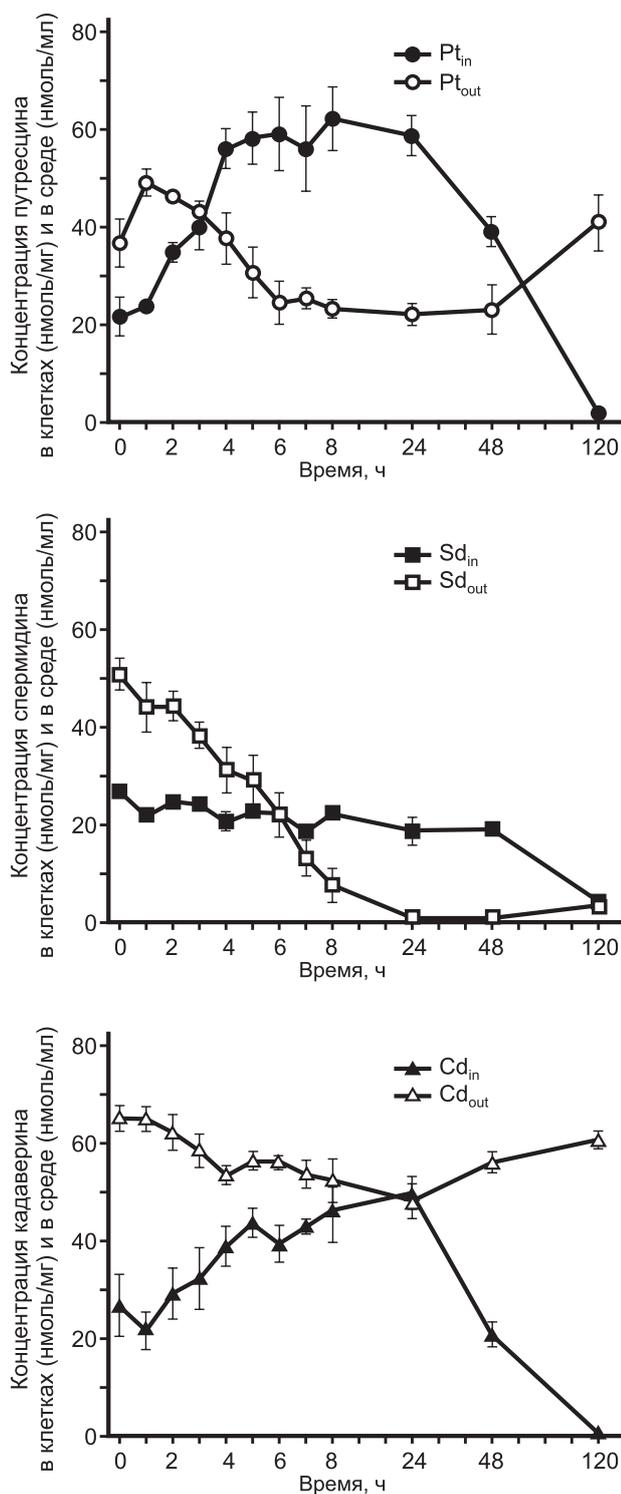
**ТАБЛИЦА 1**  
**ПРАЙМЕРЫ, ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ В ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ**

**TABLE 1**  
**PRIMERS USED IN REAL-TIME RT-PCR**

| Ген         | Последовательность праймеров  |
|-------------|---|
| <i>relA</i> | 5'-GCTGAAGGCGTTAAAGCGGAAGTGT-3'<br>5'-CGGCAGGTGGCGATAGTGAGTGT-3'    |
| <i>spoT</i> | 5'-GCGCACGCTGGGCTCACTT-3'<br>5'-GCGCGGCTTTCACCACTTCTTT-3'           |
| <i>rpoS</i> | 5'-TGAAGATGCGGAATTTGATGAGAA-3'<br>5'-TCGGCCGTTAACAGTGGTAA-3'        |
| <i>stpA</i> | 5'-GAAGAAGAACAGCAGCAGCGTGAA-3'<br>5'-CGTGACCGGTCCAGTTTTAGTTTT-3'    |
| <i>hns</i>  | 5'-GTATTGACCCGAACGAACTGCT-3'<br>5'-TACCTTGCTCATCCATTGCTTTTT-3'      |
| <i>rmf</i>  | 5'-CGCGCACATCAACGTGGTTATCA-3'<br>5'-GCCAGCTCCCAGCCATTGT-3'          |
| <i>hpf</i>  | 5'-AGTGTTCATCTGAGGTGTGGGTGA-3'<br>5'-CCGGTCTATGTTGTTCTGAAAGTGGAG-3' |
| <i>raiA</i> | 5'-GACGGGAAGACAAGAGGTAA-3'<br>5'-GTGGCGTCAGCAACAAC-3'               |
| <i>ettA</i> | 5'-ATTACCCACGACCGTACTTCCTC-3'<br>5'-GTACCCATTCCAGCTCTTCTCAA-3'      |
| <i>rsfS</i> | 5'-GACGTTCCAGGGCAAATCCAGCATC-3'<br>5'-GACAATCACATCGCCCAAATCCAC-3'   |
| <i>yqjD</i> | 5'-GCGCGTCCCGATGAGTAT-3'<br>5'-GCGACGCGACAGCAGA-3'                  |
| <i>sra</i>  | 5'-AGGCACGTCATATTCTGGACTGGA-3'<br>5'-CGGTTGGGTTATTTACTACGCTGGAT-3'  |

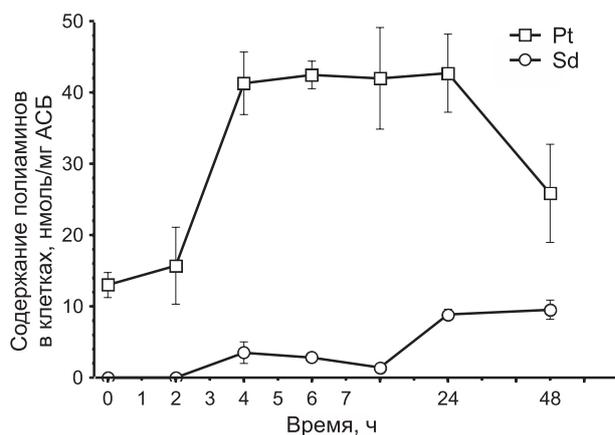
на уровне трансляции. Тем не менее часть полиаминов находится во взаимодействии с ДНК, влияя на её топологические свойства и, соответственно, на транскрипцию генов [2, 3, 28, 29]. Эти данные послужили основанием для исследования регуляторных эффектов полиаминов на генную экспрессию на транскрипционном уровне.

В данной работе получены данные относительно накопления полиаминов в клетках и в среде. Согласно результатам исследования, внутриклеточное содержание полиаминов у полиамин-дефицитного штамма SHT03 при добавлении путресцина, кадаверина и спермидина в концентрации 0,1 мМ на 0 ч постепенно возрастало к стационарной фазе и достигало максимальных значений на 24 ч культивирования, что сопровождалось снижением содержания полиаминов в среде (рис. 1). Кроме того, установлено, что при физиологических условиях (без добавления полиаминов) у штамма дикого типа BW25141, выращенного на LB бульоне, внутриклеточное содержание путресцина и спермидина также увеличивается и достигает максимальных значений к стационарной фазе. При этом содержание путресцина значительно превышает концентрацию спермидина. Кадаверин же обнаружен лишь в следовых количествах (рис. 2).



**РИС. 1.**  
Содержание путресцина, спермидина и кадаверина в клетках и в среде полиамин-дефицитного штамма SHT03 при добавлении путресцина, кадаверина и спермидина по 0,1 мМ на 0 ч: Pt – путресцин; Cd – кадаверин; Sd – спермидин; in – внутриклеточное содержание; out – содержание в среде

**FIG. 1.**  
The amount of putrescine, spermidine and cadaverine in cells and in the medium of the polyamine-deficient strain SHT03 with the addition of putrescine, cadaverine and spermidine at 0.1 mM at 0 h: Pt – putrescine; Cd – cadaverine; Sd – spermidine; in – the intracellular amount; out – the amount in the medium



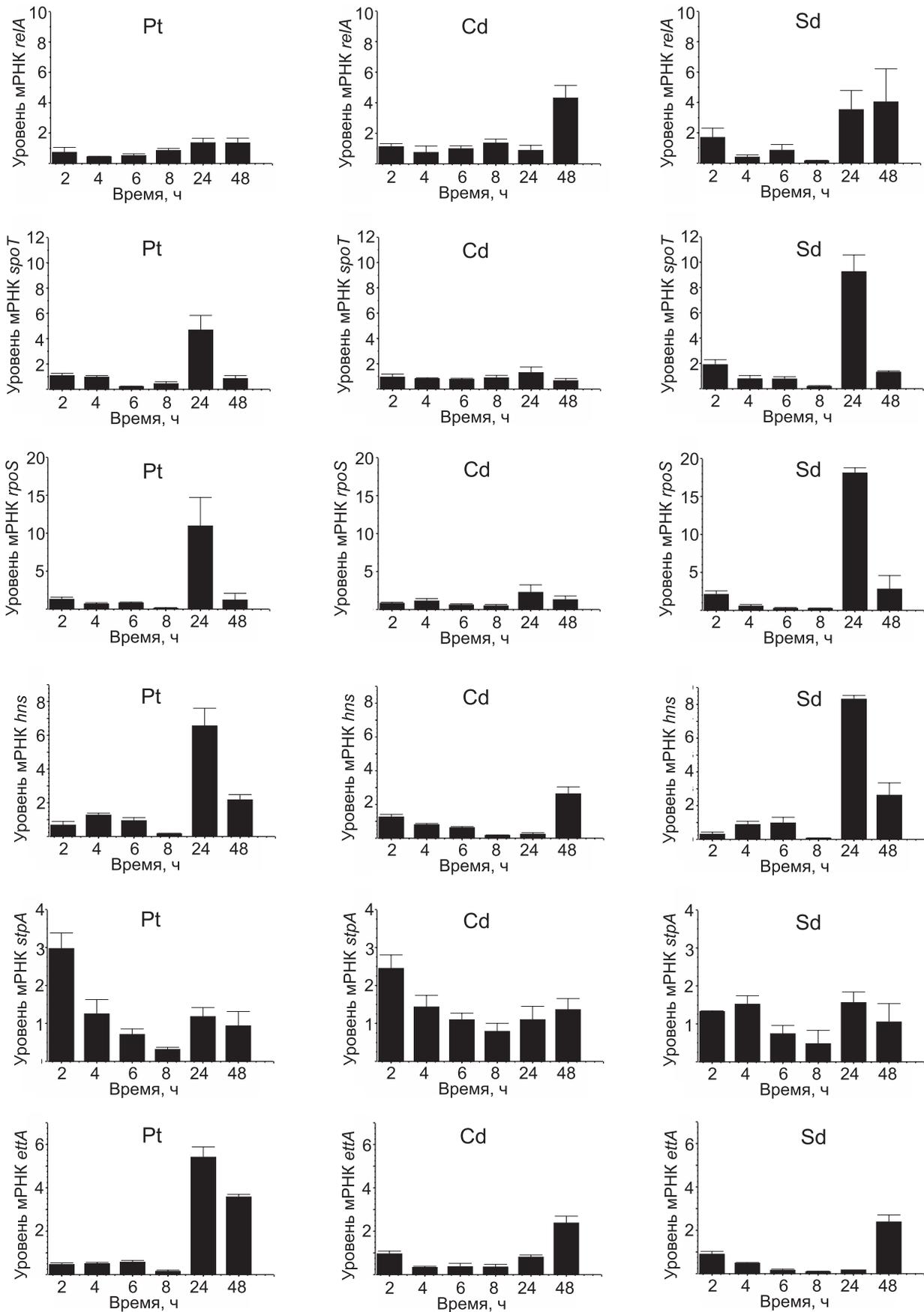
**РИС. 2.**  
Внутриклеточное содержание полиаминов при физиологических условиях (без добавления полиаминов) у штамма дикого типа BW25141: Pt – путресцин; Sd – спермидин; АСБ – абсолютная сухая биомасса

**FIG. 2.**  
The intracellular amount of polyamines under physiological conditions (without the addition of polyamines) in the wild-type strain BW25141: Pt – putrescine; Sd – spermidine; ACB – absolute dry biomass

Нами показано, что при добавлении полиаминов в среду увеличивается уровень экспрессии всех исследуемых генов (рис. 3, 4). При этом наибольший стимулирующий эффект полиаминов на экспрессию большинства из них наблюдается в стационарной фазе. Исключение составили гены *stpA* и *raiA*, максимальная стимуляция экспрессии которых показана в экспоненциальной фазе роста. При этом наибольший эффект на уровень их транскрипции оказывали путресцин и кадаверин.

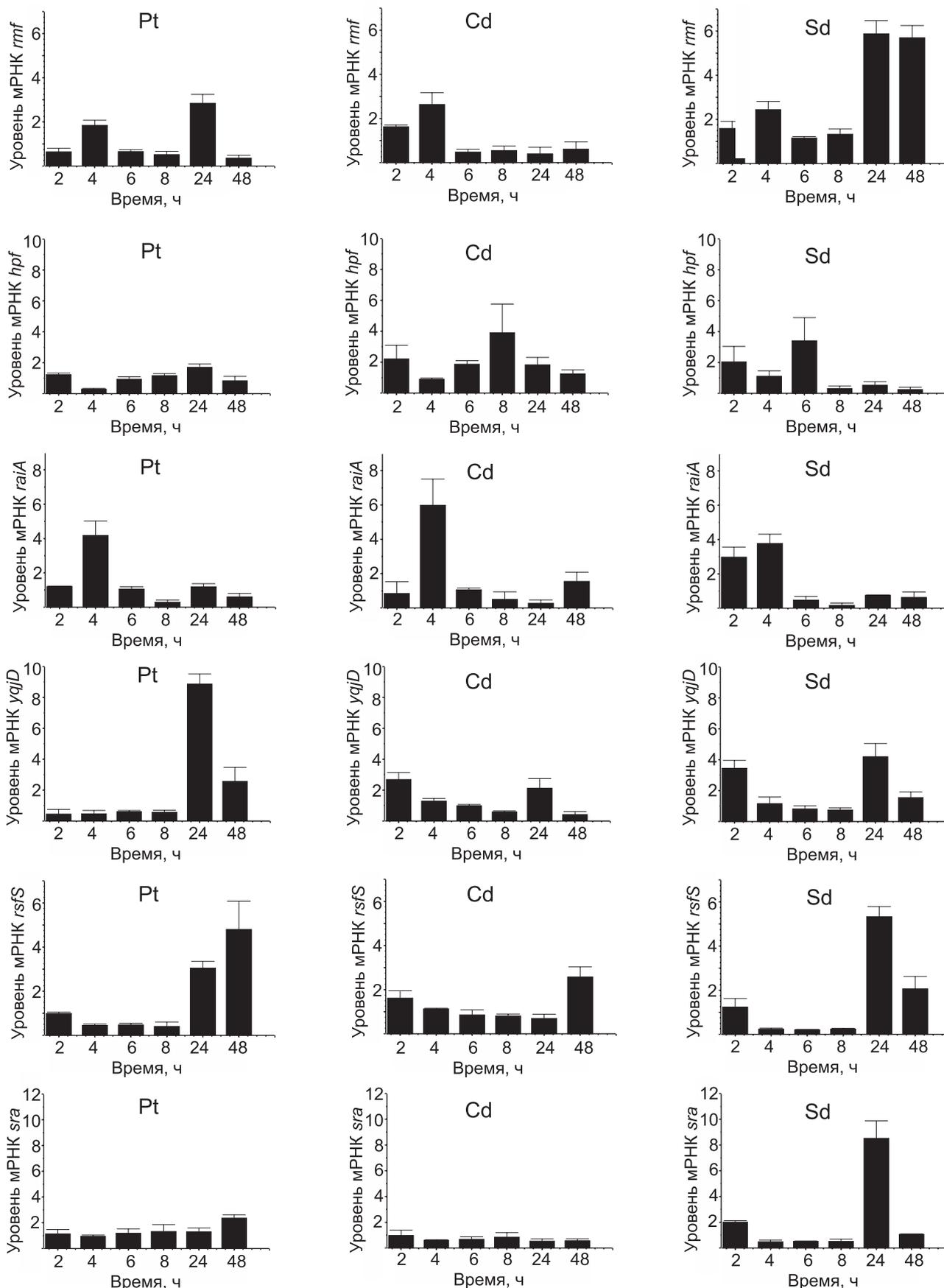
Показано, что экспрессия генов *rpoS*, *relA* и *spoT*, кодирующих регуляторы общего стрессорного ответа и голодания, стимулируется преимущественно спермидином в стационарной фазе, когда клетки подвержены воздействию ряда стрессов.

Регуляторный эффект полиаминов на гены-паралоги *hns* и *stpA*, кодирующие ДНК-связывающие белки, дифференцирован во времени и характеризуется специфичностью по отношению к различным полиаминам. За наибольшую стимуляцию транскрипции *stpA*, наблюдаемую в экспоненциальной фазе, ответственны путресцин и кадаверин, тогда как на экспрессию *hns* наибольший эффект оказывает спермидин в стационарной фазе. По-видимому, это связано с тем, что H-NS является глобальным репрессором и действует преимущественно в этот период [30, 31]. StpA и H-NS являются паралогами и функционируют совместно в виде гетеродимеров. Кроме того, StpA может существовать и самостоятельно в виде гомодимеров [22, 23]. Ранее считалось, что StpA играет лишь роль резервной копии H-NS, однако по мере накопления исследований, уточняющих функции StpA, данному фактору стала отводиться более самостоятельная



**РИС. 3.**  
 Полиамины стимулируют экспрессию генов *relA*, *spoT*, *rpoS*, *hns*, *strA*, *ettA*: Pt – путресцин; Cd – кадаверин; Sd – спермидин

**FIG. 3.**  
 Polyamines upregulate the expression of genes *relA*, *spoT*, *rpoS*, *hns*, *strA*, *ettA*: Pt – putrescine; Cd – cadaverine; Sd – spermidine



**РИС. 4.**  
Полиамины стимулируют экспрессию генов *rmf*, *hpf*, *raiA*, *yajD*, *rsfS*, *sra*: Pt – путресцин; Cd – кадаверин; Sd – спермидин

**FIG. 4.**  
Polyamines upregulate the expression of genes *rmf*, *hpf*, *raiA*, *yajD*, *rsfS*, *sra*: Pt – putrescine; Cd – cadaverine; Sd – spermidine

роль [32], что подтверждается данными, полученными в настоящей работе.

Стимулирующий эффект на экспрессию генов *rmf* и *hpf* преимущественно оказывает добавка спермидина, что наблюдается в стационарной фазе. В этот период факторы RMF и HPF функционируют совместно, формируя неактивные 100S димеры рибосом [33, 34]. Их антагонист, фактор RaiA, стабилизирует и инактивирует 70S мономеры рибосом [35]. На транскрипцию гена *raiA*, в отличие от *rmf* и *hpf*, наибольшее влияние оказывают путресцин и кадаверин в экспоненциальной фазе. Регуляторные эффекты на экспрессию остальных генов, кодирующих факторы гибернации рибосом, наблюдаются в стационарной фазе и обладают специфичностью по отношению к различным полиаминам: *ettA* и *yqjD* – к путресцину, *rsf5* – к путресцину и спермидину, *sra* – к спермидину. Факторы гибернации рибосом посредством различных механизмов ингибируют трансляцию. «Биологическая целесообразность» их активности в первую очередь обусловлена необходимостью избежать непроизводительных затрат энергии на синтез белка, один из самых энергоёмких процессов, в условиях голодания и других неблагоприятных воздействий [24]. В соответствии с этим, каждая из рибосом, присутствующих в бактериальной клетке в данный момент времени, может находиться как в активном, так и неактивном состоянии, благодаря действию различных механизмов гибернации рибосом, формирующих, таким образом, гетерогенный набор их неактивных форм. Специфическая зависимость генной экспрессии от полиаминов также может указывать на разделение функций между факторами гибернации рибосом.

### Регуляторный эффект индола на экспрессию генов адаптации к стрессу у *E. coli*

Полученные нами результаты показывают, что экзогенный триптофан конвертируется в эквивалентное количество индола на 24 ч культивирования во время стационарной фазы (рис. 5). Согласно полученным данным, в течение 7 ч культивирования концентрация индола в среде с добавкой триптофана находится на низком уровне, сходном с контролем, однако резко возрастает на 24 ч культивирования. Известно, что реакция образования индола из триптофана у *E. coli* катализируется ферментом триптофаназой TnaA. Экспрессия *tnaA* находится под строгим контролем RpoS и происходит в стационарной фазе [36]. Это согласуется с данными о том, что внутриклеточная концентрация индола *E. coli*, культивируемой на полноценной среде, также значительно возрастает при переходе в стационарную фазу роста, достигая 60 мМ («пульс» индола) [37], и может быть ответственной за индукцию экспрессии факторов адаптации к стрессу.

Выявлено, что через 24 ч культивирования, когда происходит накопление индола в клетках с последующим его выходом в среду, наблюдается стимуляция экспрессии генов *raiA* и *rmf*, тогда как на экспрессию остальных генов индол влияния не оказывал (рис. 6).

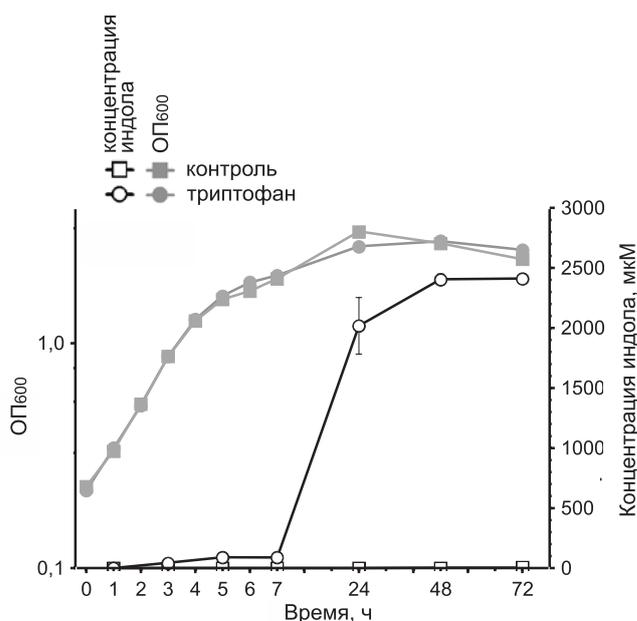


РИС. 5.

Триптофан эквивалентно превращается в индол на 24 ч культивирования: ОП – оптическая плотность

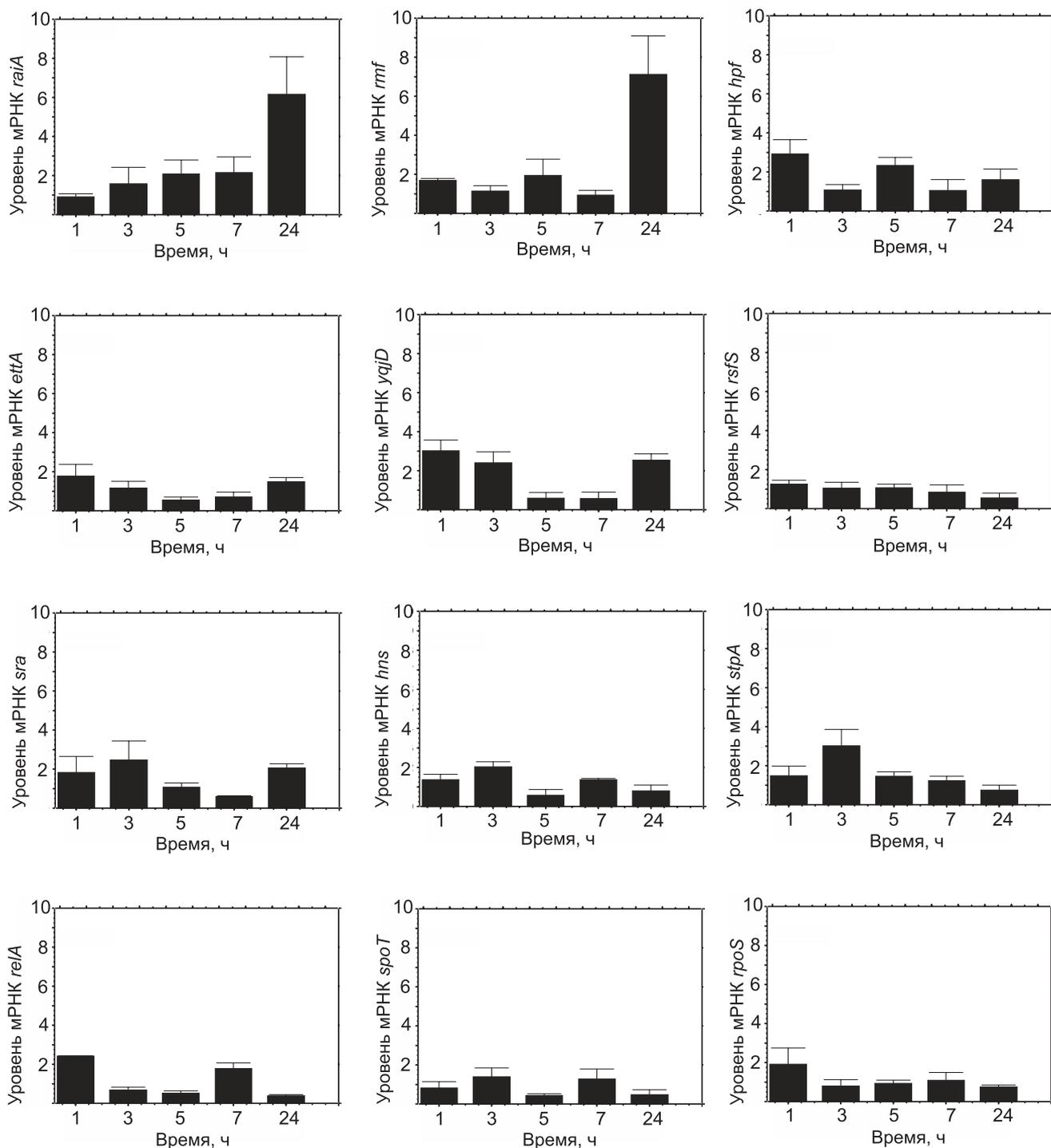
FIG. 5.

Tryptophan is equivalently converted to indole at 24 h: ОП – optical density

Таким образом, при переходе клеток *E. coli* в стационарную фазу происходит эквимольная конвертация экзогенного триптофана во внутриклеточный индол за счёт активности триптофаназы. Возрастание содержания индола в клетках впоследствии сменяется его выходом в среду. В этот период происходит стимуляция экспрессии факторов гибернации рибосом, основным предназначением которых является снижение активности трансляционных процессов в условиях стресса [24].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе исследовано влияние полиаминов и индола – продуктов метаболизма *E. coli* – на экспрессию генов, ответственных за адаптацию к стрессу. Выявлено, что полиамины в той или иной степени стимулируют экспрессию всех исследованных в данной работе генов. При этом стимулирующий эффект полиаминов на их транскрипционную активность специфичен по фазе культивирования и типу полиамина. В то же время индол влияет на экспрессию лишь двух генов из всех изученных нами в данной работе, а именно *raiA* и *rmf*. Выживание бактериальных клеток в неблагоприятных условиях обеспечивается функционированием различных механизмов стрессорного ответа, организованных в виде сложных, перекрещивающихся регуляторных сетей, которые осуществляют тонкую настройку генно-экспрессионного профиля клетки и её физиологического состояния адекватно условиям среды [1].



**РИС. 6.**  
Регуляторный эффект индола на генную экспрессию

**FIG. 6.**  
The regulatory effect of indole on gene expression

Полученные данные служат основанием для предположения, что основные факторы гибернации рибосом RMF и RaiA могут играть роль точки пересечения регуляторных сетей, контролируемых полиаминами и индолем. Это даёт перспективу для дальнейших исследований в данном направлении.

**Финансирование**  
Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 18-73-10156.

**Конфликт интересов**  
Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Ткаченко А.Г. *Молекулярные механизмы стрессорных ответов у микроорганизмов*. Екатеринбург, 2012.
2. Tabor CW, Tabor H. Polyamines in microorganisms. *Microbiol Rev*. 1985; 49(1): 81-99. doi: 10.1128/mr.49.1.81-99.1985
3. 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
4. Miller-Fleming L, Olin-Sandoval V, Campbell K, Ralsler 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
5. Igarashi K, Kashiwagi K. Modulation of cellular function by polyamines. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010; 42(1): 39-51. doi: 10.1016/j.biocel.2009.07.009
6. 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
7. Igarashi K, Ito K, Kashiwagi K. Polyamine uptake systems in *Escherichia coli*. *Res Microbiol*. 2001; 152(3-4): 271-278. doi: 10.1016/s0923-2508(01)01198-6
8. Agostinelli E, Marques MP, Calheiros R, Gil FP, Tempera G, Viceconte N, et al. Polyamines: Fundamental characters in chemistry and biology. *Amino Acids*. 2010; 38(2): 393-403. doi: 10.1007/s00726-009-0396-7
9. Zarkan A, Liu J, Matuszewska M, Gaimster H, Summers DK. 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
10. Нестерова Л.Ю., Ахова А.В., Ткаченко А.Г. Влияние индола на содержание клеточных полиаминов и антибиотикочувствительность *Escherichia coli*. *Вестник Московского университета. Серия 16. Биология*. 2021; 76(4): 219-224.
11. Tkachenko AG, Nesterova LY. Polyamines as modulators of gene expression under oxidative stress in *Escherichia coli*. *Biochemistry (Mosc)*. 2003; 68(8): 850-856. doi: 10.1023/a:1025790729797
12. Tkachenko AG, Shumkov MS, Akhova AV. Putrescine as a modulator of the level of RNA polymerase sigma S subunit in *Escherichia coli* cells under acid stress. *Biochemistry (Mosc)*. 2006; 71(2): 185-193. doi: 10.1134/s0006297906020118
13. Tkachenko AG, Kashevarova NM, Karavaeva EA, Shumkov MS. 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
14. Tkachenko AG, Kashevarova NM, Tyuleneva EA, Shumkov MS. 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): fnx084. doi: 10.1093/femsle/fnx084
15. 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
16. Lang M, Krin E, Korlowski C, Sismeiro O, Varet H, Coppée JY, et al. Sleeping ribosomes: Bacterial signaling triggers RaiA mediated persistence to aminoglycosides. *iScience*. 2021; 24(10): 103128. doi: 10.1016/j.isci.2021.103128
17. Magnusson LU, Farewell A, Nyström T. ppGpp: A global regulator in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol*. 2005; 13(5): 236-242. doi: 10.1016/j.tim.2005.03.008
18. Haurlyuk V, Atkinson GC, Murakami KS, 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
19. Bougdour A, Gottesman S. ppGpp regulation of RpoS degradation via anti-adaptor protein IraP. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104(31): 12896-12901. doi: 10.1073/pnas.0705561104
20. Hengge-Aronis R. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002a; 66(3): 373-395. doi: 10.1128/MMBR.66.3.373-395.2002
21. Hengge-Aronis R. Stationary phase gene regulation: What makes an *Escherichia coli* promoter sigmaS-selective? *Curr Opin Microbiol*. 2002b; 5(6): 591-595. doi: 10.1016/s1369-5274(02)00372-7
22. Williams RM, Rimsky S. Molecular aspects of the *E. coli* nucleoid protein, H-NS: A central controller of gene regulatory networks. *FEMS Microbiol Lett*. 1997; 156(2): 175-185. doi: 10.1111/j.1574-6968.1997.tb12724.x
23. Johansson J, Eriksson S, Sondén B, Wai SN, Uhlin BE. Heteromeric interactions among nucleoid-associated bacterial proteins: localization of StpA-stabilizing regions in H-NS of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2001; 183(7): 2343-2347. doi: 10.1128/JB.183.7.2343-2347.2001
24. Prossliner T, Skovbo Winther K, Sørensen MA, Gerdes K. Ribosome hibernation. *Annu Rev Genet*. 2018; 52: 321-348. doi: 10.1146/annurev-genet-120215-035130
25. Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(12): 6640-6645. doi: 10.1073/pnas.120163297
26. Tabor H, Hafner EW, Tabor CW. Construction of an *Escherichia coli* strain unable to synthesize putrescine, spermidine, or cadaverine: Characterization of two genes controlling lysine decarboxylase. *J Bacteriol*. 1980; 144(3): 952-956. doi: 10.1128/jb.144.3.952-956.1980
27. Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WM, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJ, et al. Amplification efficiency: Linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37(6): e45. doi: 10.1093/nar/gkp045
28. Rhee HJ, Kim EJ, Lee JK. Physiological polyamines: Simple primordial stress molecules. *J Cell Mol Med*. 2007; 11(4): 685-703. doi: 10.1111/j.1582-4934.2007.00077.x
29. Lightfoot HL, Hall J. Endogenous polyamine function – the RNA perspective. *Nucleic Acids Res*. 2014; 42(18): 11275-11290. doi: 10.1093/nar/gku837
30. Dorman CJ. H-NS: A universal regulator for a dynamic genome. *Nat Rev Microbiol*. 2004; 2(5): 391-400. doi: 10.1038/nrmicro883
31. Fang FC, Rimsky S. New insights into transcriptional regulation by H-NS. *Curr Opin Microbiol*. 2008; 11(2): 113-120. doi: 10.1016/j.mib.2008.02.011
32. Free A, Dorman CJ. The *Escherichia coli* stpA gene is transiently expressed during growth in rich medium and is induced in minimal medium and by stress conditions. *J Bacteriol*. 1997; 179(3): 909-918. doi: 10.1128/jb.179.3.909-918.1997
33. Wada A. Growth phase coupled modulation of *Escherichia coli* ribosomes. *Genes Cells*. 1998; 3(4): 203-208. doi: 10.1046/j.1365-2443.1998.00187.x

34. Polikanov YS, Blaha GM, Steitz TA. How hibernation factors RMF, HPF, and YfiA turn off protein synthesis. *Science*. 2012; 336(6083): 915-918. doi: 10.1126/science.1218538

35. Agafonov DE, Kolb VA, Nazimov IV, Spirin AS. A protein residing at the subunit interface of the bacterial ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(22): 12345-12349. doi: 10.1073/pnas.96.22.12345

36. Li G, Young KD. Indole production by the tryptophanase TnaA in *Escherichia coli* is determined by the amount of exogenous tryptophan. *Microbiology (Reading)*. 2013; 159(Pt 2): 402-410. doi: 10.1099/mic.0.064139-0

37. Gaimster H, Cama J, Hernández-Ainsa S, Keyser UF, Summers DK. The indole pulse: A new perspective on indole signaling in *Escherichia coli*. *PLoS One*. 2014; 9(4): e93168. doi: 10.1371/journal.pone.0093168

## REFERENCES

1. Tkachenko AG. *Molecular mechanisms of stress responses of microorganisms*. Ekaterinburg, 2012. (In Russ.).

2. Tabor CW, Tabor H. Polyamines in microorganisms. *Microbiol Rev*. 1985; 49(1): 81-99. doi: 10.1128/mr.49.1.81-99.1985

3. 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

4. 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

5. Igarashi K, Kashiwagi K. Modulation of cellular function by polyamines. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010; 42(1): 39-51. doi: 10.1016/j.biocel.2009.07.009

6. 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

7. Igarashi K, Ito K, Kashiwagi K. Polyamine uptake systems in *Escherichia coli*. *Res Microbiol*. 2001; 152(3-4): 271-278. doi: 10.1016/s0923-2508(01)01198-6

8. Agostinelli E, Marques MP, Calheiros R, Gil FP, Tempera G, Viceconte N, et al. Polyamines: Fundamental characters in chemistry and biology. *Amino Acids*. 2010; 38(2): 393-403. doi: 10.1007/s00726-009-0396-7

9. Zarkan A, Liu J, Matuszewska M, Gaimster H, Summers DK. 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

10. Nesterova LY, Akhova AV, Tkachenko AG. Influence of indole on intracellular polyamines and antibiotic susceptibility of *Escherichia coli*. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 16. Biologiya*. 2021; 76(4): 219-224. (In Russ.).

11. Tkachenko AG, Nesterova LY. Polyamines as modulators of gene expression under oxidative stress in *Escherichia coli*. *Biochemistry (Mosc)*. 2003; 68(8): 850-856. doi: 10.1023/a:1025790729797

12. Tkachenko AG, Shumkov MS, Akhova AV. Putrescine as a modulator of the level of RNA polymerase sigma S subunit in *Escherichia coli* cells under acid stress. *Biochemistry (Mosc)*. 2006; 71(2): 185-193. doi: 10.1134/s0006297906020118

13. Tkachenko AG, Kashevarova NM, Karavaeva EA, Shumkov MS. 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

14. Tkachenko AG, Kashevarova NM, Tyuleneva EA, Shumkov MS. 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): fnx084. doi: 10.1093/femsle/fnx084

15. 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

16. Lang M, Krin E, Korlowski C, Sismeiro O, Varet H, Coppée JY, et al. Sleeping ribosomes: Bacterial signaling triggers RaiA mediated persistence to aminoglycosides. *iScience*. 2021; 24(10): 103128. doi: 10.1016/j.isci.2021.103128

17. Magnusson LU, Farewell A, Nyström T. ppGpp: A global regulator in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol*. 2005; 13(5): 236-242. doi: 10.1016/j.tim.2005.03.008

18. Haurlyuk V, Atkinson GC, Murakami KS, 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

19. Bougdour A, Gottesman S. ppGpp regulation of RpoS degradation via anti-adaptor protein IraP. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104(31): 12896-12901. doi: 10.1073/pnas.0705561104

20. Hengge-Aronis R. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002a; 66(3): 373-395. doi: 10.1128/MMBR.66.3.373-395.2002

21. Hengge-Aronis R. Stationary phase gene regulation: What makes an *Escherichia coli* promoter sigmaS-selective? *Curr Opin Microbiol*. 2002b; 5(6): 591-595. doi: 10.1016/s1369-5274(02)00372-7

22. Williams RM, Rimsky S. Molecular aspects of the *E. coli* nucleoid protein, H-NS: A central controller of gene regulatory networks. *FEMS Microbiol Lett*. 1997; 156(2): 175-185. doi: 10.1111/j.1574-6968.1997.tb12724.x

23. Johansson J, Eriksson S, Sondén B, Wai SN, Uhlin BE. Heteromeric interactions among nucleoid-associated bacterial proteins: localization of StpA-stabilizing regions in H-NS of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2001; 183(7): 2343-2347. doi: 10.1128/JB.183.7.2343-2347.2001

24. Prossliner T, Skovbo Winther K, Sørensen MA, Gerdes K. Ribosome hibernation. *Annu Rev Genet*. 2018; 52: 321-348. doi: 10.1146/annurev-genet-120215-035130

25. Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(12): 6640-6645. doi: 10.1073/pnas.120163297

26. Tabor H, Hafner EW, Tabor CW. Construction of an *Escherichia coli* strain unable to synthesize putrescine, spermidine, or cadaverine: Characterization of two genes controlling lysine decarboxylase. *J Bacteriol*. 1980; 144(3): 952-956. doi: 10.1128/jb.144.3.952-956.1980

27. Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WM, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJ, et al. Amplification efficiency: Linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37(6): e45. doi: 10.1093/nar/gkp045

28. Rhee HJ, Kim EJ, Lee JK. Physiological polyamines: Simple primordial stress molecules. *J Cell Mol Med*. 2007; 11(4): 685-703. doi: 10.1111/j.1582-4934.2007.00077.x

29. Lightfoot HL, Hall J. Endogenous polyamine function – the RNA perspective. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(18): 11275-11290. doi: 10.1093/nar/gku837
30. Dorman CJ. H-NS: A universal regulator for a dynamic genome. *Nat Rev Microbiol.* 2004; 2(5): 391-400. doi: 10.1038/nrmicro883
31. Fang FC, Rimsky S. New insights into transcriptional regulation by H-NS. *Curr Opin Microbiol.* 2008; 11(2): 113-120. doi: 10.1016/j.mib.2008.02.011
32. Free A, Dorman CJ. The *Escherichia coli* stpA gene is transiently expressed during growth in rich medium and is induced in minimal medium and by stress conditions. *J Bacteriol.* 1997; 179(3): 909-918. doi: 10.1128/jb.179.3.909-918.1997
33. Wada A. Growth phase coupled modulation of *Escherichia coli* ribosomes. *Genes Cells.* 1998; 3(4): 203-208. doi: 10.1046/j.1365-2443.1998.00187.x
34. Polikanov YS, Blaha GM, Steitz TA. How hibernation factors RMF, HPF, and YfiA turn off protein synthesis. *Science.* 2012; 336(6083): 915-918. doi: 10.1126/science.1218538
35. Agafonov DE, Kolb VA, Nazimov IV, Spirin AS. A protein residing at the subunit interface of the bacterial ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(22): 12345-12349. doi: 10.1073/pnas.96.22.12345
36. Li G, Young KD. Indole production by the tryptophanase TnaA in *Escherichia coli* is determined by the amount of exogenous tryptophan. *Microbiology (Reading).* 2013; 159(Pt 2): 402-410. doi: 10.1099/mic.0.064139-0
37. Gaimster H, Cama J, Hernández-Ainsa S, Keyser UF, Summers DK. The indole pulse: A new perspective on indole signaling in *Escherichia coli*. *PLoS One.* 2014; 9(4): e93168. doi: 10.1371/journal.pone.0093168

#### Сведения об авторах

**Хаова Елена Александровна** – аспирант, лаборант лаборатории адаптации микроорганизмов, «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ФГБНУ Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН; младший научный сотрудник лаборатории органического синтеза, ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», e-mail: akkuzina-elena510@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4457-2652>

**Кашеварова Наталья Михайловна** – младший научный сотрудник лаборатории адаптации микроорганизмов, «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ФГБНУ Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, e-mail: nkashev@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3751-8156>

**Ткаченко Александр Георгиевич** – доктор медицинских наук, заведующий лабораторией адаптации микроорганизмов, «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ФГБНУ Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН; профессор кафедры микробиологии и иммунологии, ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», e-mail: agtkachenko@iegm.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8631-8583>

#### Information about the authors

**Elena A. Khaova** – Postgraduate, Laboratory Assistant at the Laboratory of Microbial Adaptation, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch Russian Academy of Sciences; Junior Research Officer at the Laboratory of Organic Synthesis, Perm State National Research University, e-mail: akkuzina-elena510@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4457-2652>

**Natalya M. Kashevarova** – Junior Research Officer at the Laboratory of Microbial Adaptation, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch Russian Academy of Sciences, e-mail: nkashev@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3751-8156>

**Alexander G. Tkachenko** – Dr. Sc. (Med.), Head of the Laboratory of Microbial Adaptation, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch Russian Academy of Sciences; Professor at the Department of Microbiology and Immunology, Perm State National Research University, e-mail: agtkachenko@iegm.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8631-8583>

Статья опубликована в рамках Второй Всероссийской научной конференции с международным участием «Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания».