

УДК 579.22:579.25

DOI: 10.17072/1994-9952-2018-4-393-401.

Е. А. Хаова^{a,b}, Н. М. Кашеварова^a, М. С. Шумков^c, Р. Ю. Сидоров^a, А. Г. Ткаченко^{a,b}

^a Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

^b Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

^c Институт биохимии им. А.Н. Баха, Москва, Россия

РОЛЬ ГЕНОВ ОБЩЕГО СТРЕССОРНОГО ОТВЕТА В ФОРМИРОВАНИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПЕРСИСТЕНЦИИ

Изучена функциональная активность генов общего стрессорного ответа *rpos*, *rmf*, *relA* и *spoT* в формировании бактериальной персистенции в условиях периодического культивирования *Escherichia coli*. Генная экспрессия исследована на транскрипционном уровне с помощью двух методов: репортерных генных слияний и ПЦР в реальном времени с предварительным проведением обратной транскрипции. Полученные результаты представлены в сопоставлении с данными о частоте персистенции родительского штамма и делеционных мутантов по исследованным генам. На основании комплексной оценки показано участие генов *rpoS*, *rmf*, *relA* и *spoT* в персистенции *E. coli* при переходе в стационарную фазу роста и в поздней стационарной фазе.

Ключевые слова: бактериальная персистенция; экспрессия генов; стресс; стационарная фаза.

Е. А. Khaova^{a,b}, N. M. Kashevarova^a, M. S. Shumkov^c, R. Yu. Sidorov^a, A. G. Tkachenko^{a,b}

^a Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch RAS, Perm, Russian Federation

^b Perm State University, Perm, Russian Federation

^c A.N. Bach Institute of Biochemistry of RAS, Moscow, Russian Federation

THE ROLE OF GENES RELATING TO GENERAL STRESS RESPONSES IN BACTERIAL PERSISTENCE

We studied the role of genes *rpoS*, *rmf*, *relA* and *spoT* relating to general stress responses in bacterial persistence on the model organism *Escherichia coli*. Using transcriptional reporter gene fusions and quantitative real-time reverse transcriptase PCR we obtained data on expression of these genes. These results are compared with data on persistenter cell frequency of knockout strains and their parent. On the strength of complex estimate we established that of *rpoS*, *rmf*, *relA* and *spoT* genes are involved in the persistenter cell formation at early and later stationary phase.

Key words: bacterial persistence; gene expression; stress; stationary phase.

Ключевым свойством любой популяции является её генотипическая и фенотипическая гетерогенность. Это свойство обеспечивает выживание популяции при воздействии многочисленных стрессов в меняющихся условиях среды [Тимофеев-Ресовский, Воронцов, Яблоков, 1977; Олескин, 2001; Миркин, Наумова, 2005]. Одним из примеров фенотипической гетерогенности бактериальных популяций являются опубликованные в последнее время данные об их субпопуляционной структуре по признаку персистенции [Rotem et al., 2010; Jong, Nasso, Kuipers, 2011; Maisonneuve, Gerdes, 2014; Bergh, Fauvart, Michiels, 2017].

Персисторы – это бактериальные клетки, которые в относительно небольшом количестве присутствуют в любой популяции и за счет значительного замедления скорости метаболических процессов (дормантное состояние) характеризуются пониженной чувствительностью к стрессорному воздей-

ствию различных внешних физико-химических факторов [Lewis, 2010; Maisonneuve, Gerdes, 2014]. При этом сама субпопуляция персисторов неоднородна и представляет собой континуум микросубпопуляций, качественно и количественно различающихся по отношению к различным типам стрессоров [Tkachenko et al., 2014; Zhang, 2014; Bergh, Fauvart, Michiels, 2017]. Таким образом, персистенция представляет собой инструмент биологической «страховки» (bet hedging) бактериальной популяции от вымирания в условиях изменчивости среды [Carey, Goulian, 2018].

Переход бактериальной клетки из «нормального» состояния в дормантное обеспечивается за счет случайных флуктуаций около некоторого порогового уровня содержания в ней регуляторных молекул, относящихся к механизмам общего стрессорного ответа [Rotem et al., 2010]. Другой механизм представляет собой собственно стрессорный ответ

в виде индукции упомянутых клеточных систем, что приводит к возрастанию количества персистеров и способствует выживанию популяции в целом [Lewis, 2010; Maisonneuve, Gerdes, 2014]. Поскольку в естественных условиях бактерии часто испытывают стрессорные воздействия, можно говорить о значительной роли механизмов общего стрессорного ответа в персистообразовании. Наибольшее количество персистеров при периодическом культивировании образуется в стационарной фазе роста [Lewis, 2010; Bergh, Fauvart, Michiels, 2017], наиболее близкой к естественным условиям [Ленгелер, Дреус, Шлегель, 2005]. Исходя из этого, переход периодической культуры бактерий в стационарную фазу часто используется в качестве экспериментальной модели персистообразования в природной популяции.

С использованием этого подхода нами была изучена роль в бактериальной персистенции генов *rpoS*, *rmf*, *relA* и *spoT*, относящихся к механизмам общего стрессорного ответа. Известно, что ген *rpoS* кодирует σ^S -субъединицу РНК-полимеразы. Гены, промоторы которых имеют сходство к данной σ -субъединице, объединены в структуру *rpoS*-регулона и участвуют в адаптации к стрессам преимущественно при переходе в стационарную фазу роста [Hengge-Aronis, 2002; Ткаченко, 2012]. Гены *relA* и *spoT* кодируют (p)ppGpp-синтетазу и (p)ppGpp-синтетазу/гидролазу соответственно. При этом для SpoT сигналом для синтеза (p)ppGpp является отклонение скорости трансляции от максимальной, тогда как RelA реагирует на истощение в клетках хотя бы одной из аминокислот. Незаряженные тРНК, связываясь с аминокислотным центром рибосом, служат для RelA в качестве сигнала,

индуцирующего синтез (p)ppGpp. Первоначально (p)ppGpp был описан как сигнал стресса голодания и отнесен к категории алармонов, участвующих в адаптации к аминокислотному голоданию. Однако в настоящее время показано его участие в регуляции множества процессов в бактериальной клетке, связанных с ее ростом, адаптацией к стрессам, вторичным метаболизмом, персистенцией, клеточным делением, подвижностью, биопленкообразованием и вирулентностью. Под регуляторным контролем (p)ppGpp находятся около 500 генов, и этот список постоянно пополняется [Haurlyuk et al., 2015; Ткаченко, 2018]. Одним из них является ген стационарной фазы *rmf* [Izutsu, Wada, Wada, 2001]. Продукт его экспрессии, белок RMF, ингибирует трансляцию, превращая рибосомы в неактивную димерную форму [Wada, 1998].

В связи со своей практической значимостью, наиболее полно изученной является персистенция к антибактериальным препаратам. Находясь в дормантном состоянии, персистеры обладают множественной антибиотикотолерантностью, благодаря чему способны возобновлять рост после прекращения воздействия антибиотиков. Это дает основание рассматривать их в качестве основной причины рецидивов инфекционных заболеваний [Lewis, 2010; Maisonneuve, Gerdes, 2014]. Таким образом, изучение персистенции имеет важное значение для разработки новых антибактериальных средств.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования использовали штаммы *Escherichia coli* (табл. 1).

Таблица 1

Штаммы, использованные в работе

Штамм	Генотип	Источник
BW25141	<i>F</i> -, Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(<i>::rrnB-3</i>), Δ (<i>phoB-phoR</i>)580, λ <i>galU95</i> , <i>AuidA3::pir⁺</i> , <i>recA1</i> , <i>endA9(del-ins)::FRT</i> , <i>rph-1</i> , Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR514</i>	Северинов К.В. [Datsenko, Wanner, 2000]
EAT01	как BW25141, но Δ <i>rmf</i>	Tkachenko et. al., 2017
EAT03	как BW25141, но Δ <i>rpoS</i>	
SRY1	как BW25141, но Δ <i>relA</i>	Коллекция лаборатории адаптации микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН
SRY2	как BW25141, но Δ <i>relA</i> Δ <i>spoT</i>	
EAT16	как BW25141, но λ <i>RZ5rpoS742::lacZ</i>	
EAT17	как BW25141, но λ <i>RS45rmf39::lacZ</i>	

Штаммы высевали на 5 мл питательной среды LB («Sigma», США) с добавлением соответствующих антибиотиков: ампициллин 25 мкг/мл («MP Biomedicals», Франция), канамицин 25 мкг/мл («Синтез», Россия). После 7 ч. культивирования в термостате при 37°C бактериальную культуру переносили в соотношении 1:1000 (по объему) на 50 мл LB в колбу Эрленмейера (250 мл) с добавлением антибиотиков. Культивировали 16 ч. в термо-

стативе шейкере («GFL 1092», Германия) при 37°C, 120 об/мин. Далее, для проведения эксперимента культуру переносили в 50 мл свежей среды LB в колбу Эрленмейера (250 мл), доводя оптическую плотность (OD600) культуры до 0.1 (соответствует 0 ч. культивирования). Инкубировали в термостативе шейкере при 37°C, 120 об/мин. Биомассу клеток оценивали по оптической плотно-

сти на спектрофотометре UV1280 («Shimadzu», Япония).

Экспрессию генов определяли на транскрипционном уровне с помощью двух методов: полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени с предварительным проведением обратной транскрипции и репортерных генных слияний. Репортерное слияние *rpos::lacZ* трансдуцировано из штамма RO200 [Muffler et al., 1997]. Репортерное слияние *rmf::lacZ* сконструировано в соответствии с протоколом, предложенным R.W. Simons, F. Nouman, N. Kleckner [1987]. Уровень экспрессии определяли методом Миллера [Миллер, 1976].

РНК выделяли из бактериальной культуры родительского штамма BW25141 (табл. 1) с помощью коммерческого набора «GeneJET Purification Kit» («Thermo Fisher Scientific», США) согласно протоколу. Концентрацию РНК в полученных пробах измеряли при OD260, качество проб оценивали по OD260/OD280 и OD260/OD230 при помощи спектрофотометра NanoDrop 2000 («Thermo Fisher Scientific», США) и методом электрофореза в 1%-ном агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием [Кузнецов, Кузнецов, Романов, 2012; Великов, 2013]. Пробы обрабатывали ДНКазой, входящей в состав коммерческого набора «Turbo™ DNase» (2U/мкл) («Thermo Fisher Scientific», США). В качестве матрицы для обратной транскрипции использовали 100 нг суммарной РНК. Также в состав реакционной смеси входили: праймеры Random 9 («Евроген», Россия) 5мкМ, смесь dNTPs («Thermo Fisher Scientific», США) 1 мМ, ревертаза 200U «Thermo Scientific RevertAid Reverse Transcriptase» с буфером («Thermo Fisher Scientific», США). Реакцию проводили при 42°C 1 ч. с предварительной инкубацией при комнатной температуре 10 мин. и с последующей инактивацией при 70°C 10 мин. Синтезированную кДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР в реальном времени. Праймеры подобраны с помощью программы PrimerSelect версия 7.1.0 (DNASTAR, Inc.) и представлены в табл. 2. Реакцию проводили при помощи коммерческого набора «qPCRmix-HS SYBR» («Евроген», Россия) на амплификаторе «CFX96 RT Systems C1000 Thermal Cycler» («BioRad», США). Процедура ПЦР включала начальную денатурацию 95°C 5 мин., далее следовали 40 циклов из последовательно повторяющихся шагов: денатурация – 95°C 15 сек., отжиг праймеров – 60°C 15 сек., элонгация – 72°C 15 сек. После завершения ПЦР строили кривую диссоциации для оценки наличия димеров праймеров и других артефактов. Эффективность реакций и пороговые циклы устанавливали при помощи программы LinRegPCR (2014.x) [Ruijter et al., 2009]. Полученные данные нормализованы с использованием геномной ДНК [Demidenok, Kaprelyants, Gon-

charenko, 2014].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета стандартных программ STATISTICA 5.0 (StatSoft, Inc.). Повторность экспериментов 3-кратная.

Таблица 2
Праймеры, использованные для ПЦР в реальном времени

ген	Последовательность праймеров
<i>rpoS</i>	5' – TGAAGATGCGGAATTTGATGAGAA – 3' 5' – TCGGCCGTTAACAGTGGTGAA – 3'
<i>rmf</i>	5' – CGCGCACATCAACGTGGTTATCA – 3' 5' – GCCAGCCTCCCAGCCATTGT – 3'
<i>relA</i>	5' – GCTGAAGGCGTTAAAGCGGAAGTGT – 3' 5' – CGGCAGGTGGCGATAGTGAGTGT – 3'
<i>spoT</i>	5' – GCGCACGCTGGGCTCACTT – 3' 5' – GCGCGGCTTTCACCACTTCTTT – 3'

Результаты

Для выяснения роли генов *rpoS*, *rmf*, *relA* и *spoT* в бактериальной персистенции нами определена экспрессия каждого из них на транскрипционном уровне. Полученные результаты представлены в сопоставлении с данными о частоте персистенции родительского штамма и делеционных мутантов по исследуемым генам. Нокаутные штаммы в целом демонстрируют более низкие значения частоты персистенции по сравнению с контролем при переходе бактериальной культуры в стационарную фазу роста и собственно в стационарной фазе.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что экспрессия гена *rpoS* на транскрипционном уровне достигает максимума при переходе в стационарную фазу на 8 ч. культивирования, а также в глубоком стационарном состоянии на 72 ч. Эти результаты согласуются с данными о частоте персистенции нокаутного штамма $\Delta rpoS$, демонстрирующего наибольшее снижение частоты персистенции по сравнению с родительским штаммом также при переходе культуры в стационарную фазу роста (8–24 ч.). После 24 ч. различие в значениях частоты персистенции между мутантом и родителем снижается, однако уровень персистеров в культуре нокаутного штамма $\Delta rpoS$ остается сравнительно низким (рис. 1).

Наиболее высокие значения экспрессии генов *relA* и *spoT* наблюдаются в экспоненциальной фазе и при переходе в стационарную фазу (рис. 3). Ген *rmf* демонстрирует максимум экспрессии также при переходе в стационарную фазу (8–24 ч.) (рис. 2). Однако мутанты Δrmf , $\Delta relA$ и $\Delta relA\Delta spoT$ показывают максимальное снижение частоты персистенции в поздней стационарной фазе (48–72 ч.). Наиболее вероятно, что активация экспрессии генов *relA* и *spoT* в стационарной фазе происходит преимущественно на трансляционном уровне, как

ранее нами показано в отношении *rmf* [Tkachenko et al., 2017].

Полученные нами результаты показали, что исследуемые гены *rpoS*, *rmf*, *relA* и *spoT* вовлечены в

регуляцию формирования персистентных клеток *E. coli* при переходе в стационарную фазу и особенно в стационарной фазе.

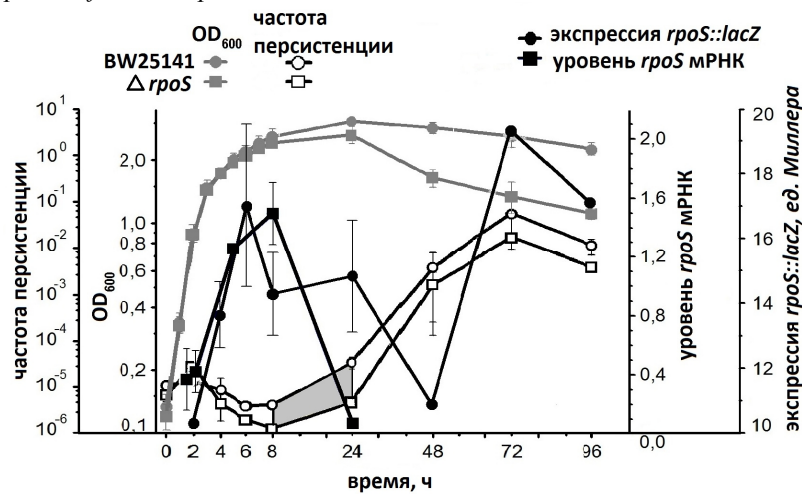


Рис. 1. Роль гена *rpoS* в персистенции *E. coli*

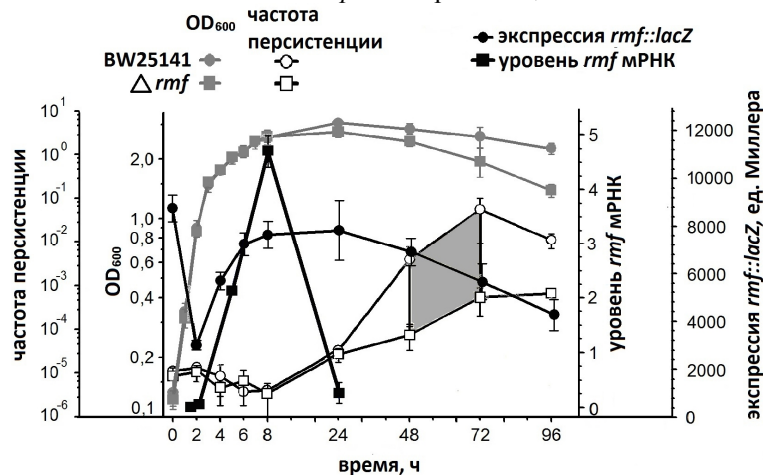


Рис. 2. Роль гена *rmf* в персистенции *E. coli*

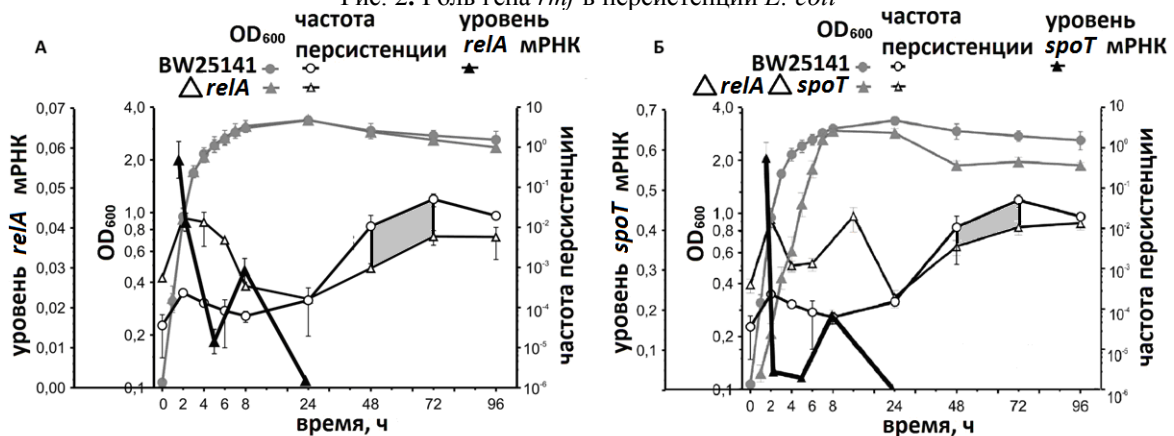


Рис. 3. Роль генов *relA* (А) и *spoT* (Б) в персистенции *E. coli*

Обсуждение

Участие генов *rpoS*, *rmf*, *relA* и *spoT* в регуляции бактериальной персистенции связано с ком-

плексным воздействием на клетки в этот период различных стрессоров, включая голодание, накопление метаболитов, закисление среды, недостаток кислорода и др. В этом отношении стационарная фаза сходна с естественными условиями обитания

[Ленгелер, Древис, Шлегель, 2005], активирующими механизмы общего стрессорного ответа [Ткаченко, 2012].

Результатом действия этих механизмов, к которым относятся действия изученных нами генов, может быть формирование состояния замедления скорости метаболических процессов (дормантного состояния), способствующего развитию персистенции [Lewis, 2010; Maisonneuve, Gerdes, 2014]. В частности, это может происходить под регуляторным контролем (p)ppGpp, который, согласно литературным данным, ингибирует транскрипцию генов *rrn* и тем самым снижает количество рибосом в клетке. Это, в свою очередь, приводит к уменьшению интенсивности процесса трансляции [Ткаченко, 2012]. Помимо этого, (p)ppGpp, опосредованно активируя Lon-протеазы, высвобождает токсины, входящие в состав токсин-антитоксиновых систем [Maisonneuve, Castro-Camargo, Gerdes, 2013]. Токсины ингибируют различные клеточные процессы и способствуют формированию дормантного состояния клеток [Wen, Behiels, Devreese, 2013; Hall, Gollan, Helaine, 2017]. Токсин-антитоксиновые системы впервые были описаны как факторы персистенции [Maisonneuve, Gerdes, 2014], в регуляции которых принимает участие (p)ppGpp. Его регуляторные функции распространяются также на *rpoS*-регулон, играющий значительную роль в адаптации к стрессам, формируемым при переходе в стационарную фазу роста. При этом (p)ppGpp индуцирует транскрипцию гена *rpoS* и повышает стабильность продукта его экспрессии [Ткаченко, 2012].

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что максимальный уровень транскрипции гена *rpoS* совпадает по стадии культивирования с наибольшим снижением частоты персистенции мутанта $\Delta rpoS$ по сравнению с контролем и наблюдается при переходе в стационарную фазу. Таким образом, ген *rpoS* участвует в регуляции персистенции преимущественно при переходе в стационарную фазу роста.

Под регуляторным контролем (p)ppGpp находится также исследованный нами ген *rmf*. Основываясь на полученных результатах и ранее опубликованных данных [Tkachenko et al., 2017], можно прийти к заключению, что ген *rmf* вовлечен в регуляцию персистенции в поздней стационарной фазе, когда происходит активация его экспрессии преимущественно на трансляционном уровне. Участие *rmf* в персистенции согласуется с его функциональной активностью, направленной на ингибирование трансляции. При этом, продукт данного гена – белок RMF – способствует остановке роста клеток, блокируя функции рибосом. На основании описанных выше данных можно говорить о значительной роли (p)ppGpp в форми-

ровании персисторных клеток, что объясняет значительное снижение частоты персистенции нокаутных штаммов $\Delta relA$ и $\Delta relA \Delta spoT$ в поздней стационарной фазе. Вместе с тем в экспоненциальной фазе мутанты демонстрируют более высокий уровень персистенции по сравнению с родительским штаммом. Это связано с мнимым завышением частоты персистенции нокаутных штаммов в этот период. При помощи фазово-контрастной микроскопии и LIVE/DEAD-окрашивания обнаружены значительные изменения морфологических свойств клеток мутантов в виде формирования нитей, состоящих из нескольких не разделившихся клеток (рис. 4). Это приводит к занижению данных при подсчете числа живых клеток методом высева и, следовательно, мнимому завышению значений частоты персистенции, определяемой методом I. Keren et al. [2004]. Последующее разделение нитей на отдельные клетки при переходе в стационарную фазу дает возможность объективно выявить снижение частоты персисторных клеток в нокаутных штаммах по сравнению с контрольным. Согласно ранее опубликованным данным [Shan et al., 2015], низкая внутриклеточная концентрация (p)ppGpp приводит к повышению активности полифосфатазы Ppx. В результате снижения концентрации полифосфатов ингибируется активность Lon-протеазы, для которой эти соединения являются коферментами. Это приводит к недостаточному гидролизу ингибитора клеточного деления SulA и проявляется в фенотипе в виде не до конца разделившихся клеток. Исходя из этого, гены *relA* и *spoT*, согласно результатам мутационного анализа, осуществляют регуляцию персистообразования преимущественно в поздней стационарной фазе, хотя этот вывод не нашел прямого подтверждения при анализе экспрессии *relA* и *spoT* на транскрипционном уровне, что требует проведения дополнительных исследований.

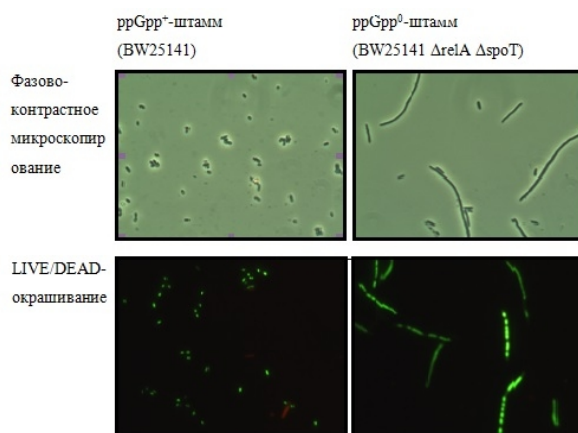


Рис. 4. Фенотип клеток штаммов BW25141 и BW25141 $\Delta relA \Delta spoT$ в экспоненциальной фазе роста (6 ч. культивирования)

Таким образом, на основании комплексной оценки данных определения уровня генной экспрессии методами репортерных генных слияний и ПЦР в реальном времени, сопряженной с обратной транскрипцией, в сопоставлении с результатами мутационного анализа показано участие генов стационарной фазы *rpoS*, *rmf*, *relA* и *spoT* в формировании персистерного состояния клеток *E. coli*.

Работа выполнена в рамках государственного задания (номер госрегистрации темы: 01201353249, а также при финансовой поддержке РФФИ и Администрации Пермского края (проект №16-44-590279 p_a).

Библиографический список

- Великов В.А. Молекулярная биология: практ. руководство. Саратов: Саратовский источник, 2013. 84 с.
- Кузнецов Вл.В., Кузнецов В.В., Романов Г.А. Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. 487 с.
- Ленгелер Й., Дреус Г., Шлегель Г. Современная микробиология. Прокариоты. М.: Мир, 2005. Т. 2. 656 с.
- Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976. 437 с.
- Миркин Б.М., Наумова Л.Г. Основы общей экологии. М.: Университетская книга, 2005. 240 с.
- Олескин А.В. Экологически важные свойства популяций микроорганизмов // Соросовский образовательный журнал. 2001. Т. 7, № 8. С. 7–12.
- Тимофеев-Ресовский Н.В., Воронцов Н.Н., Яблоков А.В. Краткий очерк теории эволюции. М.: Наука, 1977. 303 с.
- Ткаченко А.Г. Молекулярные механизмы стрессорных ответов у микроорганизмов. Екатеринбург, 2012. 268 с.
- Ткаченко А.Г. Стрессорные ответы бактериальных клеток как механизм развития толерантности к антибиотикам // Прикладная биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. С. 110–133
- Bergh B., Fauvart M., Michiels J. Formation, physiology, ecology, evolution and clinical importance of bacterial persistence // FEMS Microbiology Reviews. 2017. Vol. 41, № 3. P. 219–251.
- Carey J.N., Goulian M. A bacterial signaling system regulates noise to enable bet hedging // Current Genetics. 2018. P. 1–6.
- Datsenko K.A., Wanner B.L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products // PNAS. 2000. Vol. 97, № 12. P. 6640–6645.
- Demidenok O.I., Kaprelyants A.S., Goncharenko A.V. Toxin-antitoxin vapBC locus participates in formation of the dormant state in *Mycobacterium smegmatis* // FEMS Microbiology Letters. 2014. Vol. 352. P. 69–77.
- Hall M.J., Gollan B., Helaine S. Toxin-antitoxin systems: reversible toxicity // Current Opinion in Microbiology. 2017. Vol. 36. P. 102–110.
- Haurlyuk V. et al. Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology // Nature Reviews Microbiology. 2015. Vol. 13, № 5. P. 1–12.
- Hengge-Aronis R. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma (S) (RpoS) subunit of RNA polymerase // Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2002. Vol. 66, № 3. P. 373–395.
- Izutsu K., Wada A., Wada C. Expression of ribosome modulation factor (RMF) in *Escherichia coli* requires ppGpp // Genes Cells. 2001. Vol. 6, № 8. P. 665–676.
- Jong I., Haccou P., Kuipers O. Bet hedging or not? A guide to proper classification of microbial survival strategies // BioEssays. 2011. Vol. 33, № 3. P. 215–223.
- Keren I. et al. Persister cells and tolerance to antimicrobials // FEMS Microbiology Letter. 2004. Vol. 230, № 1. P. 13–18.
- Lewis K. Persister cells // The Annual Review of Microbiology. 2010. P. 357–372.
- Maisonneuve E., Castro-Camargo M., Gerdes K. (p)ppGpp controls bacterial persistence by stochastic induction by toxin – antitoxin activity // Cell. 2013. Vol. 154, № 5. P. 1140–1150.
- Maisonneuve E., Gerdes K. Molecular mechanisms underlying bacterial persisters // Cell. 2014. Vol. 157, № 3. P. 539–548.
- Muffler A. et al. Heat shock regulation of σ^S turnover: a role of DnaK and relationship between stress responses mediated by σ^S and σ^{32} in *Escherichia coli* // Journal of Bacteriology. 1997. Vol. 179, № 2. P. 445–452.
- Rotem E. et al. Regulation of phenotypic variability by a threshold-based mechanism underlies bacterial persistence // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2010. Vol. 107, № 28. P. 12541–12546.
- Ruijter J.M. et al. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data // Nucleic Acids Research. 2009. Vol. 37, № 6. P. 1–12.
- Shan Y. et al. Genetic basis of persister tolerance to aminoglycosides in *Escherichia coli* // mBio. 2015. Vol. 6, № 2. P. 1–10.
- Simons R.W., Houman F., Kleckner N. Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions // Gene. 1987. Vol. 53, № 1. P. 85–96.
- Tkachenko A.G. et al. Putrescine controls the forma-

- tion of *Escherichia coli* persister cells tolerant to aminoglycoside netilmicin // *FEMS Microbiology Letters*. 2014. Vol. 361, № 1. P. 1–9.
- Tkachenko A.G. et al. Stationary-phase genes upregulated by polyamines are responsible for formation of *Escherichia coli* persister cells tolerant to netilmicin // *FEMS Microbiology Letters*. 2017. Vol. 364, № 9. P. 1–9.
- Wada A. Growth phase coupled modulation of *Escherichia coli* ribosomes // *Genes Cells*. 1998. Vol. 3, № 4. P. 203–208.
- Wen Y., Behiels E., Devreese B. Toxin – antitoxin systems: their role in persistence, biofilm formation, and pathogenicity // *Pathogens and disease*. 2013. Vol. 70, № 3. P. 240–249.
- Zhang Y. Persisters, persistent infections and the Yin-Yang model // *Emerging microbes and infections*. 2014. Vol. 3, № 1. P. 1–10.
- ### References
- Bergh B., Fauvart M., Michiels J. Formation, physiology, ecology, evolution and clinical importance of bacterial persistence. *FEMS Microbiology Reviews*. V. 41, N 3 (2017): pp. 219-251.
- Carey J.N., Goulian M. A bacterial signaling system regulates noise to enable bet hedging. *Current Genetics*. (2018): pp. 1-6.
- Datsenko K.A., Wanner B.L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *PNAS*. V. 97, N 12 (2000): pp. 6640-6645.
- Demidenok O.I., Kaprelyants A.S., Goncharenko A.V. Toxin-antitoxin vapBC locus participates in formation of the dormant state in *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiology Letters*. V. 352 (2014): pp. 69-77.
- Hall M.J., Gollan B., Helaine S. Toxin-antitoxin systems: reversible toxicity. *Current Opinion in Microbiology*. V. 36 (2017): pp. 102-110.
- Hauryliuk V., Atkinson G., Murakami K., Tenson T., Gerdes K. Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. *Nature Reviews Microbiology*. V. 13, N 5 (2015): pp. 1-12.
- Hengge-Aronis R. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma (S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. V. 66, N 3 (2002): pp. 373-395.
- Izutsu K., Wada A., Wada C. Expression of ribosome modulation factor (RMF) in *Escherichia coli* requires ppGpp. *Genes Cells*. V. 6, N 8 (2001): pp. 665-676.
- Jong I., Haccou P., Kuipers O. Bet hedging or not? A guide to proper classification of microbial survival strategies. *BioEssays*. V. 33, N 3 (2011): pp. 215-223.
- Kuznetsov V.I., Kuznetsov V.V., Romanov G.A. *Molekuljarno-genetičeskie i biohimičeskie metody v sovremennoj biologii rastenij* [The molecular genetic and biochemical methods in modern plant biology]. Moscow, BINOM. Laboratorija znaniy Publ., 2012. 487 p. (In Russ.).
- Keren I., Kaldalu N., Spoering A., Wang Y., Lewis K. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiology Letter*. V. 230, N 1 (2004): pp. 13-18.
- Lengeler J., Drews G., Shlegel G. *Sovremennaja mikrobiologija* [The modern microbiology]. Moscow, Mir Publ., 2005. 656 p. (In Russ.).
- Lewis K. Persister cells. *The Annual Review of Microbiology*. (2010): pp. 357-372.
- Maisonneuve E., Castro-Camargo M., Gerdes K. (p)ppGpp controls bacterial persistence by stochastic induction by toxin – antitoxin activity. *Cell*. V. 154, N 5 (2013): pp. 1140-1150.
- Maisonneuve E., Gerdes K. Molecular mechanisms underlying bacterial persisters. *Cell*. V. 157, N 3 (2014): pp. 539-548.
- Miller J. *Ėksperimenty v molekuljarnoj genetike* [The experiments in molecular genetics]. Moscow, Mir Publ., 1976. 437 p. (In Russ.).
- Mirkin B.M., Naumova L.G. *Osnovy obščej ėkologii* [The foundation of basic ecology]. Moscow, Universitetskaja kniga Publ., 2005. 240 p. (In Russ.).
- Muffler A., Barth M., Marschall C., Hengge-Aronis R. Heat shock regulation of σ^S turnover: a role of DnaK and relationship between stress responses mediated by σ^S and σ^{32} in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. V. 179, N 2 (1997): pp. 445-452.
- Oleskin A.V. [The ecological properties of microbial populations]. *Sorosovskij obrazovatelnyj žurnal*. N 8 (2001): pp. 7-12. (In Russ.).
- Rotem E., Loinger A., Ronin I., Levin-Reisman I., Gabay C., Shoshitashvili N., Biham O., Balaban N. Regulation of phenotypic variability by a threshold-based mechanism underlies bacterial persistence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. V. 107, N 28 (2010): pp. 12541-12546.
- Ruijter J.M., Ramakers C., Hoogaars W.M.H., Karlen Y., Bakker O., Hoffl M.J.B., Moorman A.F.M. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research*. V. 37, N 6 (2009): pp. 1-12.
- Shan Y., Lazinski D., Rowe S., Camilli A., Lewis K. Genetic basis of persister tolerance to aminoglycosides in *Escherichia coli*. *mBio*. V. 6, N 2 (2015): pp. 1-10.
- Simons R.W., Houman F., Kleckner N. Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene*. V. 53, N 1 (1987): pp. 85-96.

- Timopheev-Resovskiy N.V., Vorontsov N.N., Yablokov A.V. *Kratkij očerk teorii ėvoljucii* [The brief essay on evolution]. Moscow, Nauka Publ., 1977. 303 p. (In Russ.).
- Tkachenko A.G. *Molekuljarnye mehanizmy stressornyx otvetov u mikroorganizmov* [The molecular mechanisms of stress responses in microorganisms]. Ekaterinburg, 2012. 268 p. (In Russ.).
- 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 Microbiology Letters*. V. 361, N 1 (2014): pp.1-9.
- Tkachenko A.G., Kashevarova N.M., Tyuleneva E.A., Shumkov M.S. Stationary-phase genes upregulated by polyamines are responsible for formation of *Escherichia coli* persister cells tolerant to netilmicin. *FEMS Microbiology Letters*. V. 364, N 9 (2017): pp. 1-9.
- Tkachenko A.G. [The stress response of bacterial cells as a mechanism for the development of tolerance to antibiotics]. *Prikladnaja biochimija i mikrobiologija*. V. 54 (2018): pp. 110-133. (In Russ.).
- Wada A. Growth phase coupled modulation of *Escherichia coli* ribosomes. *Genes Cells*. V. 3, N 4 (1998): pp. 203-208.
- Wen Y., Behiels E., Devreese B. Toxin – antitoxin systems: their role in persistence, biofilm formation, and pathogenicity. *Pathogens and disease*. V. 70, N 3 (2013): pp. 240-249.
- Zhang Y. Persisters, persistent infections and the Yin-Yang model. *Emerging microbes and infections*. V. 3, N 1 (2014): pp. 1-10.

Поступила в редакцию 21.10.2018

Об авторах

Хаова Елена Александровна, студент биологического факультета ФГБОУВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»
ORCID: 0000-0003-4457-2652
 614099, Пермь, ул. Букирева, 15;
 akkuzina-elena510@mail.ru; (342)2122159
 лаборант лаборатории адаптации микроорганизмов
 Филиал ФГБУН ПФИЦ УрО РАН «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН»
 614081, Пермь, ул. Голева, 13

Кашеварова Наталья Михайловна, младший научный сотрудник лаборатории адаптации микроорганизмов
 Филиал ФГБУН ПФИЦ УрО РАН «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН»
ORCID: 0000-0003-3751-8156
 614081, Пермь, ул. Голева, 13;
 nkashev@mail.ru; (342)2122159

Шумков Михаил Сергеевич, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биохимии стрессов микроорганизмов
 Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН»
ORCID: 0000-0001-5671-5724
 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2; shumkovm@gmail.com

Сидоров Роман Юрьевич, аспирант лаборатории адаптации микроорганизмов

About the authors

Khaova Elena Alexandrovna, student of biological faculty
 Perm State University.
ORCID: 0000-0003-4457-2652
 15, Bukirev str., Perm, Russia, 614990;
 akkuzina-elena510@mail.ru; (342)2122159
 Laboratory assistant of the laboratory of microorganisms adaptation
 Institute of Ecology and Genetics of microorganisms UB RAS
 13, Golev str., Perm, Russia, 614081

Kashevarova Natalya Michailovna, junior scientist of the laboratory of microorganisms adaptation
 Institute of Ecology and Genetics of microorganisms UB RAS.
ORCID: 0000-0003-3751-8156
 13, Golev str., Perm, Russia, 614081;
 nkashev@mail.ru; (342)2122159

Shumkov Mikhail Sergeyevich, candidate of biology, researcher of Laboratory of Biochemistry of Stresses in Microorganisms
 Federal State Institution «Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences».
ORCID: 0000-0001-5671-5724
 Leninsky prospect, 33, build. 2, 119071 Moscow, Russian Federation; shumkovm@gmail.com

Sidorov Roman Yuryevich, postgraduate of the laboratory of microorganisms adaptation

Филиал ФГБУН ПФИЦ УрО РАН «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН»

ORCID: 0000-0002-9707-5302
614081, Пермь, ул. Голева, 13;
sidorowr@gmail.com; (342)2122159

Ткаченко Александр Георгиевич, доктор медицинских наук, зав. лабораторией адаптации микроорганизмов

Филиал ФГБУН ПФИЦ УрО РАН «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН»

ORCID: 0000-0002-8631-8583
614081, Пермь, ул. Голева, 13;
agtkachenko@iegm.ru; (342)2122159

профессор кафедры микробиологии и иммунологии

ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»
614990, Пермь, ул. Букирева, 15

Institute of Ecology and Genetics of Microorganism UB RAS.

ORCID:
13, Golev str., Perm, Russia, 614081;
sidorowr@gmail.com; (342)2122159

Tkachenko Alexander Georgievich, doctor of medicine, head of the laboratory of microbial adaptation Institute of Ecology and Genetics of Microorganism UB RAS.

ORCID: 0000-0002-8631-8583
13, Golev str., Perm, Russia, 614081;
agtkachenko@iegm.ru; (342)2122159

Professor of the Department of microbiology and immunology

Perm State University.
15, Bukirev str., Perm, Russia, 614990

Информация для цитирования:

Роль генов общего стрессорного ответа в формировании бактериальной персистенции / Е.А. Хаова, Н.М. Кашеварова, М.С. Шумков, Р.Ю. Сидоров, А.Г. Ткаченко // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2018. Вып. 4. С. 393–401. DOI: 10.17072/1994-9952-2018-4-393-401.

Khaoва Е.А., Kashevarova N.M., Shumkov M.S., Sidorov R.Yu., Tkachenko A.G. [The role of genes relating to general stress responses in bacterial persistence]. *Vestnik Permskogo universiteta. Biologija*. Iss. 4 (2018): pp. 393-401. (In Russ.). DOI: 10.17072/1994-9952-2018-4-393-401.

