

2
НОМЕР



ISSN 2304-9081

Электронный журнал
On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УрО РАН



2016

УЧРЕДИТЕЛИ

УРАЛЬСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РАН
ОРЕНБУРГСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР УрО РАН

© Коллектив авторов, 2016

УДК 579.25

А.С. Балкин¹, В.Я. Катаев², Н.Е. Гоголева³, А.О. Плотников¹, Ю.В. Гоголев³

ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ *SALMONELLA TYPHIMURIUM* 14028S В УСЛОВИЯХ ГОЛОДАНИЯ ПО УГЛЕРОДУ

¹ Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

² Оренбургский государственный университет, Оренбург, Россия

³ Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, Казань, Россия

Цель. Охарактеризовать изменения экспрессии генов популяции *Salmonella typhimurium* 14028s с исходной высокой плотностью клеток в условиях голодания по углероду.

Материалы и методы. Клетки *Salmonella typhimurium* 14028s помещали в стерильную безуглеродную минеральную среду с исходным титром 10⁹ КОЕ/мл. Образцы для анализа отбирали через 4 и 72 часа после инокуляции. Из отобранных образцов выделяли суммарную РНК. После удаления ДНК и обогащения матричной РНК, препарат РНК использовали для приготовления библиотек. Приготовление библиотек ДНК проводили с помощью набора Superscript (Illumina, США). Качество полученных библиотек оценивали с помощью генетического анализатора Agilent 2100. Секвенирование проводили на платформе Illumina HiSeq. Данные транскриптомного анализа обрабатывали с помощью программного обеспечения CLC Genomics Workbench. Принадлежность генов тому или иному метаболическому пути определяли по базе данных KEGG.

Результаты. Получены данные о более чем 80 дифференциально экспрессирующихся генах. Наибольшую экспрессию через 72 часа после инкубации проявили гены, участвующие в биопленкообразовании (*csgE*, *csgB*, *csgA*). Гены *csgB* и *csgA* увеличили свою экспрессию соответственно в 138 и 25 раз через 72 часа после инокуляции по сравнению с экспрессией через 4 часа. Так же на 3 сутки активировались гены множественной устойчивости к антибиотикам двухкомпонентной регуляторной системы *marA-marR*. Через 4 часа после инокуляции наибольшую экспрессию проявляли гены триптофанового оперона (*trpL*, *mtr*), а также транспорта фосфора. Экспрессия генов, кодирующих двухкомпонентную регуляторную систему PhoR и PhoB, в данной фазе была в 10-30 раз выше, чем через 72 часа инкубации.

Заключение: Адаптация сальмонелл к условиям голодания по углероду приводит к увеличению экспрессии генов, участвующих в более эффективном использовании субстратов, формировании биопленок, а также поринов и транспортных систем.

Ключевые слова: *Salmonella typhimurium*, транскриптомный анализ, голодание по углероду.

A.S. Balkin¹, V.Y. Kataev², N.E. Gogoleva³, A.O. Plotnikov¹, Y.V. Gogolev³

TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF *SALMONELLA TYPHIMURIUM* 14028S UNDER CARBON STARVATION

¹ Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis UrB RAS, Orenburg, Russia

² Orenburg State University, Orenburg, Russia

³ Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Center of RAS, Kazan, Russia

Objective. Characterization of the differentially expressed genes of *Salmonella typhimurium* 14028s at initial high cell density under carbon starvation.

Materials and methods. *Salmonella typhimurium* 14028s was grown in sterile carbon-free

mineral medium AB at initial titer $1 \cdot 10^9$ CFU/ml. The specimens were taken in 4 and 72 h after inoculation. The total RNA was isolated from the specimens. After DNA removal and enrichment the obtained mRNA was used to prepare libraries with the Superscript kit (Illumina). Quality of the prepared libraries was assessed with genetic analyzer Agilent 2100. Sequencing was performed on the HiSeq (Illumina, USA). The transcriptome data were processed using CLC Genomics Workbench software. The determination of genes to particular metabolic pathway was revealed with KEGG database.

Results. Data on more than 80 differentially expressed genes have been obtained. The highest expression in 72 h of incubation was marked for genes involved in biofilms formation (*csgE*, *csgB*, *csgA*). In 72 h compared to 4 h after inoculation the *csgB* and *csgA* genes increased their expression by 138 and 25 times, respectively. Also, on the 3rd day genes of two-component regulatory system *marA-marR* encoding multiple antibiotic resistance were activated. In 4 h after inoculation the expression of tryptophan operon genes (*trpL*, *mtr*), as well as of the phosphorus transport was the highest. The expression of genes encoding two-component regulatory system PhoR and PhoB at this stage was 10-30 times more than in 72 h of incubation.

Conclusion. Adaptation of *Salmonella* to carbon starvation leads to increased expression of genes involved in more efficient use of substrates, formation of biofilms as well as porins and transport systems.

Keywords: *Salmonella typhimurium*, transcriptome analysis, carbon starvation.

Введение

Жизненный цикл многих бактерий зачастую связан с периодом переживания неблагоприятных условий, включая дефицит питательных веществ, таких как углерод, фосфор и другие [3]. Некоторые энтеробактерии, в том числе и виды, вызывающие заболевания человека, обладают способностью выживать в условиях низкой концентрации питательных веществ в течение длительного периода времени [1, 2]. В частности, *Salmonella enterica* в условиях голодания по углероду претерпевает ряд генетических и физиологических изменений, рассматриваемых как ответ на стресс, вызванный голоданием [4, 5]. Голодание по углероду сопровождается резким изменением метаболизма сальмонелл для того, чтобы клетки могли более эффективно использовать питательные вещества, доступные в окружающей среде, выдерживать длительное голодание, а также противостоять многим другим стрессам [3]. Эти метаболические изменения влияют на биосинтез белков, ферментов, РНК, липидов, а также широкий спектр других компонентов клетки [6]. Экспрессия некоторых генов может изменяться более чем в 10 раз в клетках, испытывающих голодание по углероду по сравнению с клетками, растущими в питательной среде. Интересно, что приблизительно для 20% генов, индуцированных в ответ на голодание, функции либо вообще не известны, либо только предполагаются [3].

В настоящее время накоплены обширные данные об экспрессии генов сальмонелл в стрессовых условиях, в том числе с использованием секвенирования нового поколения. Так, установлены гены, активирующиеся в условиях инкубации сальмонелл в арахисовом масле, имитирующем условия голодания и высушивания [7]. Несмотря на то, что более 95% генов были репрессированы, в арахисовом масле бактерии индуцировали экспрессию генов, кодирующих белок теплового шока GrpE, сигма фактор теплового шока RpoH, сигма фактор экстремального теплового шока и «стресса клеточной мембраны» RpoE, а также главный протеин холодового шока CspA.

Получены данные о малых некодирующих РНК сальмонелл, участвующих в ответе на стресс, вызванный голоданием по углероду. В частности, обнаружены 58 новых малых РНК, которые изменяли свою экспрессию более чем в 100 раз при голодании, что указывает на их вероятную регуляторную роль в ответе на стресс, вызванный голоданием [8]. Такие sРНК регулируют экспрессию генов, участвующих в работе альтернативных источников углерода, системе ABC-транспортеров. Таким образом, транскриптомный анализ оказался довольно эффективным для оценки адаптивных изменений метаболизма и активности генов сальмонелл в условиях голодания с возможностью установления связей между конкретными генами и условиями среды, механизмов активации генов и регулирующего эффекта продуктов отдельных генов, включая малые некодирующие РНК.

В связи с этим целью данного исследования стала характеристика экспрессии генов *Salmonella typhimurium* 14028s в популяции с исходной высокой плотностью клеток в условиях голодания по углероду.

Материалы и методы

В экспериментах использовали культуру *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* 14028s (*S. typhimurium* 14028S), которая представляет собой патогенный штамм, вызывающий гастроэнтериты у людей и тифоидные инфекции у мышей [11].

Клетки *S. typhimurium* 14028S культивировали 12 часов в мясо-пептонном бульоне при 37°C, затем дважды отмывали стерильной безуглеродной минеральной средой АВ (NH₄Cl 1 г/л; MgSO₄×7H₂O 0,62 г/л; KCl 0,15 г/л; CaCl₂×2H₂O 0,013 г/л; pH 7,5). Отмытые от среды клетки помещали в такую же среду в условия голодания по углероду и фосфору, с высокой на-

чальной плотностью популяции (10^9 КОЕ/мл) и инкубировали при 28°C в течение 12 суток. Образцы для транскриптомного анализа отбирали через 4 и 72 часа после инокуляции. Для выделения суммарной РНК использовали реагент Extract RNA согласно протоколу производителя (Евроген). Полученную РНК очищали от геномной ДНК с помощью набора TURBO DNA-free kit (Ambion). Далее проводили удаление рибосомальной РНК с помощью набора Ribo-Zero™ rRNA Removal Kits (Gram-Negative Bacteria) (Epicentre).

РНК, обогащенную матричной РНК, использовали для приготовления библиотек с помощью набора Superscript (Illumina, США). Качество полученных библиотек оценивали с помощью генетического анализатора Agilent 2100. Секвенирование производили на платформе Illumina HiSeq. Контроль качества секвенирования осуществляли с помощью программы FAST QC.

Данные транскриптомного анализа обрабатывали с помощью пакетов программ анализа на платформе (<http://biominavm-galaxy.biomina.be/galaxy/>). Принадлежность наиболее часто встречаемых ридов проверяли в электронном каталоге BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), загрязняющие риды удаляли. После удаления ридов, принадлежащих рибосомальной РНК, библиотеки картировали на геном *S. typhimurium* 14028s. Экспрессия картированных генов оценивалась с помощью метода RPKM (Reads Per Kilobase per Million) [12]. Принадлежность генов тому или иному метаболическому пути определялась по базе данных KEGG.

Результаты и обсуждение

В условиях голодания *S. typhimurium* 14028s на жидкой безуглеродной минеральной среде в течение первых 3 суток наблюдалось резкое падение численности клеток, способных формировать колонии на агаре, после чего их численность относительно стабилизировалась (рисунок).

В результате высокопроизводительного секвенирования кДНК, синтезированной с иРНК, было получено порядка 20 миллионов ридов на каждый образец. На первом этапе было необходимо очистить полученные данные от загрязняющих ридов. Для этого наиболее встречаемые последовательности проверялись в электронном каталоге BLAST на предмет принадлежности к геному сальмонеллы. Посторонние риды были включены в лист удаления последовательностей, как и риды, принадлежащие адаптерам, лигированных в ходе приготовления библиотек. В результате удалось существенно повысить

качество данных.

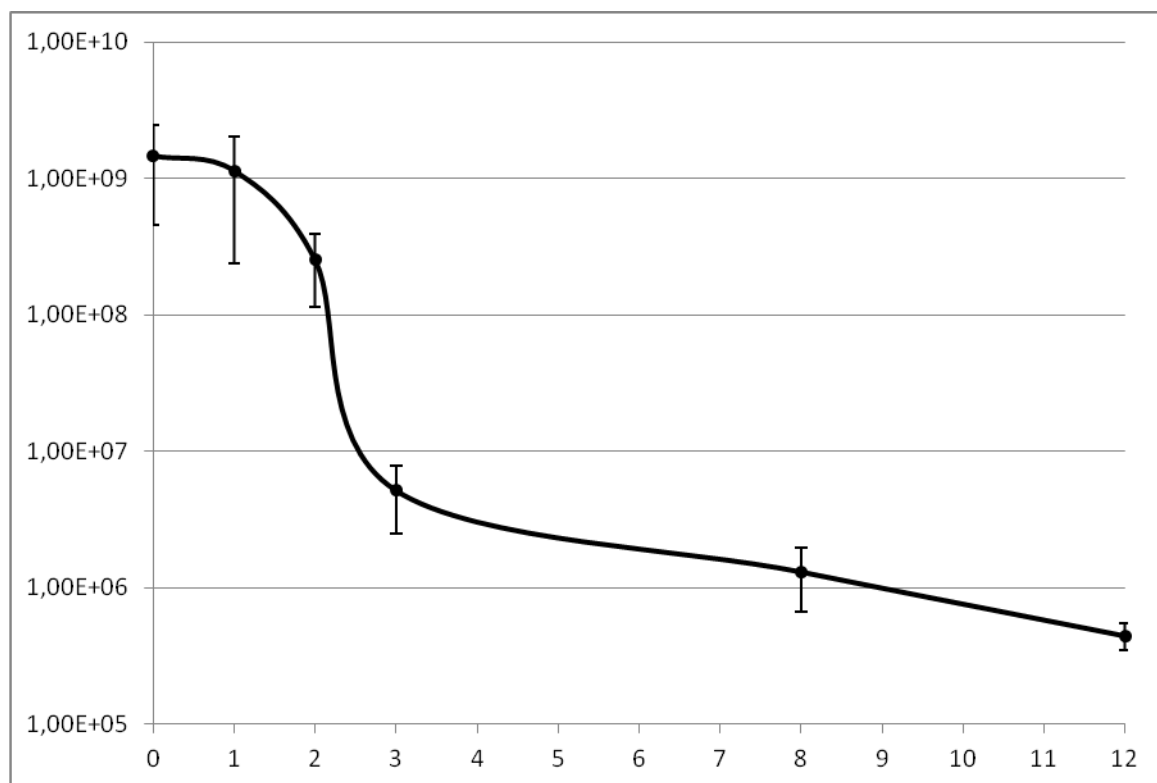


Рис. Динамика жизнеспособных клеток (lg КОЕ/мл) *S. typhimurium* 14028s в течение 12 суток инкубации в жидкой минеральной среде АВ.

На следующем этапе была произведена очистка ридов, принадлежащих рибосомальной РНК. После картирования очищенных от рибосомальной РНК ридов на геном *S. typhimurium* 14028s (электронная база данных <http://ensemblgenomes.org>) нами получены данные об экспрессии порядка 5413 генов.

Используя t-критерий ($p \leq 0,005$) и отсортировав гены, экспрессия которых различалась менее чем в 4 раза (4-fold cutoff) [13], было обнаружено по крайней мере 89 генов, дифференциально экспрессирующихся через 4 и 72 часа после инокуляции в минеральную среду. Из них 62 гена проявляли наибольшую экспрессию через 4 часа после инокуляции, а 25 генов экспрессировались на высоком уровне через 72 часа.

Наибольшую разницу в экспрессии показали гены, участвующие в основных метаболических путях, биосинтезе аминокислот, транспортных систем, а также в обработке генетической информации (таблица).

Таблица. Распределение дифференциально экспрессирующихся генов по основным метаболическим путям. Цифры указывают отношение значения RPKM для данного гена через 72 ч к значению RPKM через 4 ч после инкубации

Ген	Описание	Дифференциальная экспрессия	
Биопленкообразование			положительная регуляция
<i>csgA</i>	cryptic curlin major subunit	25,12	
<i>csgB</i>	curlin minor subunit	138,21	
Неклассифицированные гены			
<i>pspA</i>	phage shock protein PspA	8,80	
<i>fliF</i>	flagellar MS-ring protein	13,27	
Множественная устойчивость к антибиотикам			
<i>ydgE</i>	multidrug efflux system protein MdtI	6,88	
<i>emrR</i>	transcriptional repressor MprA	17,10	
<i>marA</i>	DNA-binding transcriptional activator MarA	15,85	
<i>marR</i>	DNA-binding transcriptional repressor MarR	32,26	
Гены триптофанового оперона			отрицательная регуляция
<i>trpL</i>	trp operon leader peptide	-82,96	
<i>mtr</i>	tryptophan permease	-21,85	
Транспорт фосфора			
<i>pstS</i>	phosphate transporter subunit	-67,61	
<i>pstA</i>	phosphate transporter permease subunit	-9,55	
<i>aceK</i>	bifunctional isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase protein	-9,12	
<i>pstC</i>	phosphate transporter permease subunit	-8,52	
<i>pstB</i>	phosphate transporter subunit	-5,97	
Pho-регулон			
<i>phoR</i>	phosphate regulon sensor protein	-12,60	
<i>phoB</i>	transcriptional regulator PhoB	-30,07	
<i>phoU</i>	transcriptional regulator PhoU	-12,57	
III тип секреции сальмонелл			
<i>ssaU</i>	secretion system apparatus protein SsaU	-7,83	
<i>ssaV</i>	secretion system apparatus protein SsaV	-6,97	
<i>ssaN</i>	type III secretion system ATPase	-7,37	
<i>ssaL</i>	type III secretion system apparatus protein	-6,22	
<i>ssaK</i>	type III secretion system apparatus protein	-5,96	
Система ABC-транспорта			
<i>glnH</i>	glutamine ABC transporter periplasmic protein	-6,07	
<i>glnQ</i>	glutamine ABC transporter ATP-binding protein	-5,28	
σ-субъединица РНК-полимеразы RpoS			
<i>rpoS</i>	RNA polymerase sigma factor RpoS	-5,47	

Наибольшую экспрессию через 72 ч проявили гены, участвующие в биопленкообразовании, что подтверждается данными о формировании биопленок у сальмонелл в ответ на стрессы различного происхождения, например высушивание или голодание [14]. Экспрессия генного ансамбля *csgA*, *csgB*, *csgE*, ответственного за синтез курлина – основы биопленок сальмонелл, существенно возростала на третьи сутки эксперимента. Гены *csgB* и *csgA* увеличили свою экспрессию соответственно в 138 и 25 раз в стационарной фазе (72 часа) по сравнению с логарифмической фазой (4 часа). Наши данные свидетельствуют о том, что при начальной высокой плотности популяции сальмонелл, синтез биопленок начинается после стабилизации титра, в начальной фазе после инокуляции (4 часа) экспрессия генов, ответственных за синтез курлина, была на незначительном уровне.

Так же через 72 часа после инокуляции активировались гены множественной устойчивости к антибиотикам двухкомпонентной регуляторной системы *marA-marR* [15], ген множественной устойчивости *ydjE*. По-видимому, активация этих генов может иметь значение для выживания в условиях воздействия антибиотиков.

В первые часы инкубации наибольшую экспрессию проявляли гены триптофанового оперона (*trpL*, *mtr*), а также транспорта фосфора. В условиях пониженного содержания фосфора клетки сальмонелл стараются восполнить эту потерю, экспрессируя гены, позволяющие более эффективно использовать весь доступный в среде фосфат. Ключевая роль в этом процессе принадлежит Pho-регулону, который состоит более чем из 35 генов. Контроль экспрессии осуществляется, прежде всего, белками PhoR и PhoB, формирующими двухкомпонентную регуляторную систему [16, 17]. Экспрессия генного ансамбля *phoBRU* через 4 часа после инокуляции была в 12-30 раз более выраженной, чем экспрессия данных генов через 72 часа после инокуляции.

Одним из последствий голодания по источнику углерода, а также признаком перехода в стационарную фазу является активация глобальной системы ответа на различные факторы стресса, в регуляции которой задействована альтернативная σ -субъединица РНК-полимеразы RpoS [15]. Когда клетка сталкивается с рядом стрессовых ситуаций, видимым признаком ответа на стресс, связанным с глобальным регулятором RpoS, является снижение скорости роста вплоть до вхождения в стационарную фазу. В наших исследова-

ниях экспрессия гена *groS* находилась на высоком уровне в течение всего эксперимента, причем через 4 часа после инокуляции экспрессия данного гена была в 5 раз выше, чем на стадии стабилизации титра (72 часа).

Заключение

В результате транскриптомного анализа экспрессии генов *Salmonella typhimurium* 14028s получены данные о 89 генах, дифференциально экспрессирующихся в ответ на голодание по углероду. Данные гены участвуют в многочисленных процессах жизнедеятельности клетки – передаче генетической информации, энергетическом метаболизме, метаболизме аминокислот и липидов, биопленкообразовании и множестве других.

Полученные данные позволяют предположить, что при высокой начальной плотности популяции сальмонелл в среде с отсутствием источника углерода происходит активная перестройка метаболизма клетки, направленная на более эффективное расходование субстрата. Формирование биопленки начинается после стабилизации титра сальмонелл. Экспрессия некоторых генов изменялась более чем 50 раз в процессе адаптации к условиям голодания по углероду.

В результате проведенных исследований мы можем сделать вывод о том, что начальная плотность популяции играет важную роль в формировании стрессового ответа. Формирование биопленок с активацией транспортных систем и более эффективным использованием доступного субстрата является наиболее выраженным ответом популяции *Salmonella typhimurium* 14028s с исходной высокой плотностью на голодание по углероду.

(Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 14-04-01796_а).

ЛИТЕРАТУРА

1. Finn S., Condell O., McClure P., Amezquita A., Fanning S. Mechanisms of survival, responses, and sources of *Salmonella* in low-moisture environments. *Front Microbiol.* 2013.doi.org/10.3389/fmicb.2013.00331
2. Ермилова Е. В. Молекулярные аспекты адаптации прокариот. – Спб.: ХИМИЗДАТ, 2012. – 344 с. ISBN 978-5-93808-205-2
3. Spector M., Kenyon W. Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. *Food Research International.* 2012. 455-481.
4. Spector M. and Cubitt C. Starvation-inducible loci of *Salmonella typhimurium*, regulation and roles in starvation survival. *Molecular Microbiology.* 1992. 6: 1467-1476.
5. Foster J. and Spector M. How *Salmonella* survive against the odds. *Annual Review of Microbiol.* 1995. 49: 145-174.
6. Reeve C., Bockman A., Matin A. Role of protein degradation in the survival of carbon-starved *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriol.* 1984. 157: 758-763.

7. Deng X., Li Z., Zhang W. Transcriptome sequencing of *Salmonella enteric* serovar *enteritidis* under desiccation and starvation stress in peanut oil. *Food Microbiol.* 2012. 30: 311-315.
8. Amin S., Roberts J., Patterson D.G., Coley A., Allred J., Denner J., Johnson J., Mullen G., O'Neal T., Smith J., Cardin S., Carr H., Carr S., Cowart H., DaCosta D., Herring B., King V., Polska C., Ward E., Wise A., McAllister K., Chevalier A., Spector M., Borchert G. Novel small RNA (sRNA) landscape of the starvation-stress response transcriptome of *Salmonella enteric* serovar *typhimurium*. *RNA Biol.* 2016. 13(3):331-342.
9. Jarvik T., Smillie C., Groisman E., Ochman H. Short-term signatures of evolutionary change in the *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* 14028 genome. *Journal of Bacteriol.* 2010. 192: 560-567.
10. Wagner G., Kin K., Lynch V. Measurement of mRNA abundance using RNA-seq data: RPKM measure is inconsistent among samples. *Theory in Bioscience.* 2012. 131: 281-285.
11. Solano C., García B., Valle J., Berasain C., Ghigo J. M., Gamazo C., et al. Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Molecular Microbiol.* 2002. 43: 793–808 doi:10.1046/j.1365-2958.2002.02802.x
12. Randall L. and Woodward M. Multiple Antibiotic Resistance (mar) Locus in *Salmonella enteric* serovar *typhimurium* DT104 *Appl. and Environ. Microbiol.* 2001. 67(3): 1190–1197.
13. van Veen H. Phosphate transport in prokaryotes: molecules, mediators and mechanisms. *Antonie van Leeuwenhoek.* 1997. 72: 299-315.
14. Hsieh Y., Wanner B. Global regulation by the seven-component Pi signaling system. *Current Opinion of Microbiol.* 2010. 13:198-203.
15. Yildiz F. and Schoolnik G. Role of *rpoS* in stress survival and virulence of *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriol.* 1998. 180: 773-784.

Поступила 24.05.2016

(Контактная информация: **Плотников Андрей Олегович** - к.м.н., заведующий ЦКП ИКВС УрО РАН; адрес: 460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, д. 11; E-mail: protoz@mail.ru)

Образец ссылки на статью:

Балкин А.С., Катаев В.Я., Гоголева Н.Е., Плотников А.О., Гоголев Ю.В. Транскриптомный анализ *Salmonella typhimurium* 14028S в условиях голодания по углероду. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2016. 2: 9с. (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Articles/BAS-2016-2.pdf>).