

На правах рукописи

БАЛКИН АЛЕКСАНДР СЕРГЕЕВИЧ

**ПОПУЛЯЦИОННАЯ ДИНАМИКА И ТРАНСКРИПТОМНЫЙ ОТВЕТ
SALMONELLA ENTERICA SEROVAR TYPHIMURIUM ПРИ
ФАГОЦИТОЗЕ СВОБОДНОЖИВУЩИМИ ПРОТИСТАМИ
*ACANTHAMOEBA CASTELLANII***

1.5.11. Микробиология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Оренбург – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Оренбургском федеральном исследовательском центре Уральского отделения Российской академии наук (ОФИЦ УрО РАН), в обособленном структурном подразделении Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук (ИКВС УрО РАН)

Научный руководитель:

Черкасов Сергей Викторович – доктор медицинских наук (03.02.03 - Микробиология), академик РАН.

Официальные оппоненты:

Ермолаева Светлана Александровна, доктор биологических наук (03.02.03 – Микробиология, 03.02.07 – Генетика), заведующая лабораторией экологии возбудителей инфекций Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва.

Скарлато Сергей Орестович, доктор биологических наук (03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология), главный научный сотрудник, заведующий лабораторией цитологии одноклеточных организмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук, г. Санкт-Петербург.

Ведущая организация: Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Москва.

Защита диссертации состоится «__» _____ 2025 г. в ____ часов на заседании совета по защите диссертаций 24.1.445.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Оренбургского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук по адресу: 460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, д. 11.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИКВС УрО РАН - обособленном структурном подразделении ОФИЦ УрО РАН (г. Оренбург, ул. Пионерская, д. 11, каб. 311) и на сайте ОФИЦ УрО РАН <https://orennc.ru/> (в разделе «Диссовет»).

Автореферат разослан: «__» _____ 202__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук, доцент

Перунова Наталья Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.

Сальмонеллы - род грамотрицательных энтеробактерий, которые могут заражать широкий круг хозяев, включая рептилий, птиц и млекопитающих. Сальмонеллы являются ведущей причиной гастроэнтеритов во всем мире [White и др., 2022; EFSA, 2023; Любимова и др. 2023]. В то же время, как и большинство факультативных внутриклеточных патогенов, данные бактерии значительную часть времени проводят во внешней среде. В природных резервуарах сальмонеллы могут делить среду обитания с гетеротрофными протистами, которые используют бактерии в качестве пищи и поглощают их путем фагоцитоза [Amaro и Martín-González, 2021]. Однако сальмонеллы могут выживать и даже размножаться в фагосомах эукариот [Amaro и Martín-González, 2021]. По этой причине некоторые протисты являются резервуаром сальмонелл во внешней среде [Gaze и др., 2003; Douesnard-Malo и Daigle, 2011; Moreno-Mesonero и др., 2020; Tezcan-Merdol и др., 2004; Riquelme и др., 2016]. Сокультивирование сальмонелл с протистами приводит к усилению вирулентности и антибиотикоустойчивости бактерий [Balczun и Scheid, 2017; Molmeret и др., 2005; Carlson и др., 2007; Amaro и Martín-González, 2021], а механизмы защиты от переваривания со стороны протистов могут использоваться при инфекции млекопитающих [Molmeret и др., 2005; Amaro и Martín-González, 2021]. Поэтому изучение взаимодействия между сальмонеллами и простейшими имеет решающее значение для борьбы с сальмонеллезом человека и животных.

На сегодняшний день опубликованы всего два исследования, описывающих глобальную экспрессию генов сальмонелл, поглощенных гетеротрофными протистами, в частности инфузориями *Tetrahymena sp.* и свободноживущими амебами *Acanthamoeba rhysodes* [Rehfuss и др., 2011; Feng и др., 2009]. Однако, они были проведены с использованием технологии секвенирования на микрочипах, что существенно ограничивает полученные результаты и их интерпретацию. Во многом, отсутствие данных по транскриптому и метаболизму сальмонелл в фагосомах простейших объяснимы ограничениями в используемых методах и связанных с ними высокими затратами. Однако, в последние годы были разработаны подходы к получению библиотек для секвенирования [Sharma и др., 2010; Ettwiller и др., 2016], позволяющие эффективно извлекать мРНК бактерий из смеси с РНК эукариот. Исследование глобальной экспрессии генов сальмонелл внутри фагосом протистов помогает лучше понять молекулярные механизмы адаптации бактерий к условиям внутриклеточной среды простейших, населяющих водные и почвенные экосистемы. Таким образом, имеющийся пробел в изучении механизмов взаимодействия патогенных бактерий и свободноживущих протистов, а также появление современных методов для эффективного изучения транскриптомов бактерий внутри различных хозяев, побудил нас провести данное исследование.

Цель исследования: охарактеризовать популяционные взаимодействия и глобальную экспрессию генов энтеропатогенных бактерий *Salmonella enterica* serovar Typhimurium при фагоцитозе свободноживущими протистами *Acanthamoeba castellanii*.

Задачи исследования

1. Охарактеризовать популяционную динамику свободноживущих амёб *A. castellanii* и бактерий *S. Typhimurium*, разработать оптимальную модель взаимодействия *Salmonella-Acanthamoeba*.
2. Оценить экспрессию генов сальмонелл на ранней стадии фагоцитоза *A. castellanii* с применением высокопроизводительного секвенирования и количественной ПЦР в режиме реального времени.
3. Определить динамику экспрессии генов *S. Typhimurium* внутри клеток *A. castellanii* на различных этапах инфекции.

Научная новизна исследования

В данной работе впервые проведен полнотранскриптомный анализ экспрессии генов сальмонелл при фагоцитозе акантамёб с использованием высокопроизводительного секвенирования (NGS). Впервые оценена динамика экспрессии генов сальмонелл, отвечающих за метаболизм, окислительный стресс, системы вирулентности, ингибиторы лизоцима и

хемотаксис сальмонелл внутри *Acanthamoeba castellanii* в ключевых точках их взаимодействия. Кроме того, в исследовании впервые продемонстрирована активация генов первого островка патогенности сальмонелл, а также жгутикового аппарата и хемотаксиса при фагоцитозе простейшими.

Теоретическая и практическая значимость работы

Исследование вносит существенный вклад в фундаментальное понимание экологии, эволюции и механизмов выживания сальмонелл, раскрывая их сложные взаимодействия с простейшими как ключевым фактором экологической устойчивости. Данные о схожести арсенала вирулентности, используемого для противодействия фагоцитоза амебами и профессиональными фагоцитами, поддерживают гипотезу о том, что взаимодействие с простейшими служит «тренировкой» и поддерживает вирулентный потенциал сальмонелл в окружающей среде. Успешное применение метода Capable-Seq для анализа транскриптома внутриклеточных бактерий при взаимодействии с немодельными эукариотами (*A. castellanii*), для которых затруднено удаление рибосомальной РНК хозяина, открывает новые возможности для изучения симбиотических (включая патогенные) взаимодействий бактерий с широким кругом эукариот. Практическая значимость заключается в открытии перспектив для разработки принципиально новых стратегий контроля сальмонелл в окружающей среде, направленных на разрыв звена «патоген-простейшее», что необходимо для повышения безопасности воды и пищевых продуктов и профилактики заболеваний.

Методология и методы исследования

Методология работы была определена поставленной целью и задачами исследования. В работе использовались современные бактериологические, микроскопические, и молекулярно-генетические методы исследования, а также биоинформатический анализ данных высокопроизводительного секвенирования.

Положения, выносимые на защиту

1. *S. Typhimurium*, находящиеся внутри *A. castellanii* в присутствии гентамицина, не проявляют выраженного цитотоксического эффекта в отношении амеб, который регистрируется при совместном культивировании без антибиотика.
2. Транскриптом *S. Typhimurium* на ранней стадии инфекции *A. castellanii* характеризуется уникальными особенностями, включая подавление генов цикла трикарбоновых кислот и окислительного фосфорилирования, активацию генов глиоксилатного цикла, системы хемотаксиса и биосинтеза жгутикового аппарата, что отражает специфичность взаимодействия «патоген-хозяин».
3. Паттерны экспрессии островков патогенности SPI-1, SPI-2, SPI-3, генов ответа на окислительный стресс, транспорта железа у сальмонелл характеризуются схожей динамикой как при инфекции акантамеб, так и профессиональных фагоцитов млекопитающих.

Степень достоверности результатов

Все исследования проводились как минимум в трех биологических повторностях. Для определения оптимального статистического метода проводилась проверка полученных данных на нормальность распределения. Исследования проведены с помощью современных бактериологических, молекулярно-генетических и биоинформатических методов с использованием сертифицированного оборудования. Для проведения биоинформатического и статистического анализов использовались актуальные программы и алгоритмы, рекомендованные для конкретного типа полученных данных.

Апробация работы

Основные положения диссертационной работы были представлены и обсуждены на международной конференции «XVII International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-living Amoebae» (Джерба-Зарзис, 2017) – стендовый доклад, III-ей всероссийской молодежной научной школе-конференции с международным участием «Микробные симбиозы в природных и экспериментальных экосистемах» (Оренбург, 2017) – устный доклад; VIII-ом Европейском конгрессе по протистологии (Рим, 2018) – стендовый доклад; 39-й конференции немецкого протистологического общества (Кайзерслаутерн, 2020) – стендовый доклад; X

Российской научной конференции с международным участием посвященной 300-летию Российской академии наук, Десятилетию науки и технологии (Оренбург, 2023) – устный доклад. Аprobация работы состоялась 5 июня 2025 г. на заседании Ученого совета ФГБУН Оренбургского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук (протокол № 7 от 05.06.2025 г.).

Личный вклад автора

Все этапы диссертационного исследования, включая формулирование основной идеи, планирование работы, формулировка цели и задач, определение методологии и общей концепции, выбор методов исследования, проведение экспериментов, анализ полученных данных, проводились лично или при непосредственном участии автора. Написание и оформление статей проводилось соискателем совместно с научным руководителем. Получение и интерпретация экспериментальных данных, анализ полученных результатов, написание и оформление рукописи диссертации осуществлялось соискателем лично.

Публикации по теме диссертации

По результатам исследований опубликовано 7 печатных научных работ: 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых базами Web of Science или Scopus, 1 работа в научных изданиях из перечня ВАК, 3 работы в научных изданиях, индексируемых в РИНЦ.

Связь работы с научными программами

Исследования выполнялись в рамках тем государственного задания Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уро РАН и грантов научных фондов. Темы государственного задания: «Симбиотические системы эукариот различного эволюционного уровня с прокариотами, и их значение в медицине и экологии» № гос. регистрации АААА-А19-119011890039-8; «Симбиотические системы эукариот различного эволюционного уровня с прокариотами, и их значение в медицине и экологии» № гос. регистрации 0334-2019-0010. Фрагменты исследования выполнены в рамках проектов, поддержанных грантами РФФИ №19–315–50031 и РНФ № 22-14-00317.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 163 страницах машинописного текста, включает 5 таблиц и 16 рисунков. Список литературы содержит 230 источников.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю д.м.н. С.В. Черкасову за неоценимую помощь в проведении исследований на всех этапах работы, ценные советы и рекомендации. Автор выражает глубокую благодарность к.м.н. А.О. Плотникову за постоянную консультацию по вопросам проведения исследований, а также помощь в написании статей; Гоголеву Ю.В. и Гоголевой Н.Е. – за помощь в организации и проведении высокопроизводительного секвенирования; Демченко К.Н. — за помощь в освоении метода конфокальной лазерной микроскопии и обработке изображений.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

1. Объекты исследования и среды культивирования

Бактерии *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028S выращивали на среде LB-Lennox при 37 °C без добавления антибиотика. Культуру амёб *Acanthamoeba castellanii* Neff ATCC® 30010TM выращивали в 10 мл среды PYG при 25 °C.

2. Совместное культивирование сальмонелл и акантамёб

Аксеническую культуру *Acanthamoeba castellanii* выращивали в течение 7 дней в вентилируемых колбах в 50 мл среды PYG до концентрации $4-5 \times 10^5$ клеток в 1 мл. Клетки трижды отмывали стерильной средой PAS [Douesnard-Malo и Daigle, 2011] с помощью центрифугирования. После последней отмывки осадок суспендировали в 10 мл свежей среды

1/5 PYG (среда PYG разбавленная средой PAS в соотношении 1:4), 1/10 PYG (среда PYG разбавленная средой PAS в соотношении 1:9), и 10 мл среды PAS. Затем клетки инкубировали в течение 1 ч при 25 °C, чтобы дать им возможность осесть на дно и адаптироваться к новым условиям.

Культуру *S. Typhimurium* 14028S выращивали без перемешивания на жидкой среде LB при 37°C в течение 10 ч. Клетки собирали центрифугированием при 3000×g и 25°C в течение 5 минут, дважды отмывали стерильной средой PAS, затем суспендировали в свежей среде PAS и инкубировали в течение 30 минут при 25°C для адаптации к условиям среды. Сальмонелл добавляли к культуре акантамеб в соотношении бактерий к амебам 100:1. Совместную культуру инкубировали в течение 1 ч. Через 1 ч после заражения среду культивирования заменяли на соответствующую (1/5 PYG, 1/10 PYG или PAS) с добавлением гентамицина в конечной концентрации 100 мкг/мл и инкубировали в течение 1 ч для избавления от внеклеточных бактерий. Клетки амеб отмывали дважды от внеклеточных сальмонелл центрифугированием при 1100×g в течение 5 минут при 25°C. Затем среду меняли на соответствующую (1/5 PYG, 1/10 PYG или PAS), содержащую 10 мкг/мл гентамицина для оставшейся части эксперимента. Все эксперименты проводили в трех независимых биологических повторах. Каждая биологическая реплика включала не менее трех технических повторов.

3. Оценка общего числа и доли жизнеспособных клеток амеб

Общее количество амеб и процент их жизнеспособных (включая цисты) оценивали с помощью прямого подсчета окрашенных трипановым синим клеток под микроскопом Nikon Eclipse Ts2 (Nikon, Япония). Процент погибших амеб определяли путем подсчета числа клеток амеб, окрашенных синим, по отношению к общему числу амеб, по ранее описанной методике [Steenbergen и др., 2001]. Жизнеспособность амеб также оценивали с использованием автоматического счетчика клеток NucleoCounter NC-200 (Chemometec, Дания) в присутствии красителей Acridine Orange и DAPI.

4. Оценка динамики численности сальмонелл

При оценке численности жизнеспособных внутриклеточно локализованных сальмонелл при культивировании с *A. castellanii* в среде с добавлением гентамицина, к культуре амеб добавляли сальмонелл в соотношении 1:100, спустя час совместного культивирования добавляли в среду гентамицин в финальной концентрации 100 мкг/мл для элиминации внеклеточных сальмонелл. Спустя 30 мин отмывали клетки амеб стерильной средой PAS и помещали отмытые клетки в соответствующую среду (1/5 PYG, 1/10 PYG или PAS) с гентамицином в концентрации 10 мкг/мл для предотвращения размножения сальмонелл в среде. Осадки культур после центрифугирования лизировали с помощью 0,5% раствора натрия додецилсульфата (SDS). Последовательные серийные разведения полученных лизатов высевали на агаризованную среду LB для подсчета КОЕ внутриклеточных сальмонелл. Чашки с LB инкубировали при 37°C в течение 72 ч, после чего производили подсчет выросших колоний. Контрольные культуры сальмонелл выращивали в средах 1/5 PYG, 1/10 PYG и PAS при 25°C в отсутствие акантамеб и гентамицина. В экспериментах по оценке динамики численности сальмонелл при росте на средах в отсутствие акантамеб антибиотик не использовался. Культуры сальмонелл вносили в 50 мл пробирки с 10 мл соответствующей среды (1/5 PYG, 1/10 PYG и PAS) при исходном титре $5-6,87 \times 10^6$ КОЕ/мл. Динамику численностью отслеживали с помощью высевок последовательных серийных разведений на агаризованную среду LB с дальнейшим подсчетом КОЕ сальмонелл, выросших на следующие сутки.

5. Получение флуоресцентно меченного штамма *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028S и оценка численности внутриклеточных сальмонелл методом конфокальной лазерной микроскопии

Трансформацию клеток *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028S осуществляли методом электропорации плазмидой eGFP-pBAD, кодирующей гены зеленого флуоресцентного белка eGFP и β-лактамазы, обеспечивающей устойчивость к ампициллину. Для этого, клетки *E. coli* M17, несущие плазмиду eGFP-pBAD, выращивали в течение ночи при 37° C в жидкой LB среде и выделяли плазмиду набором Plasmid miniprep KIT (Евроген, Россия) по протоколу

производителя. Далее плазмиды, содержащие целевые вставки, трансформировали в компетентные клетки *Salmonella Typhimurium* 14028S с помощью электропорации. Культуру выращивали в течение 15–18 ч при 37° С на твердой среде LB с добавлением ампицилина и арабинозы. Изображения инфицированных рекомбинантным штаммом клеток амёб получали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 780 («Zeiss», Германия) с использованием объективов серии Plan-Apochromat 40×/1,3 и 63×/1,4 Oil с масляной иммерсией и дифференциально-интерференционным контрастом (DIC) («Zeiss», Германия). Для получения и обработки изображений использовали программу ZEN 2012 Black версии 2.3 («Zeiss», Германия).

6. Подготовка образцов для выделения РНК в экспериментах по оценке транскриптома сальмонелл на ранней стадии взаимодействия с акантамебами

Культуру *S. Typhimurium* 14028S выращивали без перемешивания на жидкой среде LB при 37°С до поздней логарифмической фазы роста. Клетки собирали центрифугированием при 3000×g в течение 5 минут при 25°С, дважды отмывали стерильной средой PAS, затем суспендировали в свежей среде PAS и инкубировали в течение 30 минут при 25°С для адаптации к условиям среды. Сальмонелл добавляли к культуре акантамеб в пропорции бактерий к амёбам 100:1. Через 1 ч после заражения совместную культуру центрифугировали при 800×g, 25 °С в течение 10 мин, осторожно удаляли супернатант. Затем проводили три цикла отмывки. Каждый цикл включал следующие шаги: осадки ресуспендировали в стерильной среде PAS в течение 1 мин и инкубировали в течение 4 мин при 25 °С; инфицированные клетки амёб центрифугировали при 800×g в течение 10 мин при 25 °С, осторожно удаляли супернатант. Осадки культур после финальной отмывки фиксировали в 1 мл реагента ExtractRNA (Евроген, Россия) ровно через 2 ч с момента начала инфекции. Контрольную культуру сальмонелл культивировали в аналогичных условиях с некоторыми модификациями. Бактерии выращивали в течение 2 ч при 25 °С в стерильной среде PAS в отсутствие акантамеб, затем трижды отмывали стерильной средой PAS с помощью центрифугирования при 1200×g в течение 5 мин при 25 °С.

7. Контроль внеклеточных сальмонелл

Изображения, полученные с использованием конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, использовали для подтверждения внутриклеточной локализации сальмонелл. Для контроля внеклеточных сальмонелл супернатанты после каждого раунда отмывки оценивали с помощью высевов и ПЦР со специфичными к сальмонеллам праймерами. Для этого, 100 мкл супернатанта высевали на чашки Петри с агаризованной средой LB и распределяли по поверхности стерильным стеклянным шпателем. Чашки Петри инкубировали при 37°С в течение 72 ч, после чего производили подсчет КОЕ. Контроль внеклеточных сальмонелл также проводили с помощью ПЦР. ПЦР проводили с использованием амплификатора T100 Thermal Cycler. Продукты ПЦР визуализировали с помощью капиллярного электрофореза в системе QIAxcel Advanced System (Qiagen, Германия) с картриджем для быстрого анализа ДНК QIAxcel DNA Fast Analysis.

8. Выделение тотальной РНК и оценка качества полученных препаратов

Тотальная РНК была выделена с помощью реагента ExtractRNA (Евроген, Россия) по протоколу производителя. Образцы тотальной РНК были обработаны набором TURBO DNA-free™ kit (Thermo Fisher Scientific, США) для удаления геномной ДНК согласно протоколу производителя. Концентрацию РНК определяли с помощью флуориметра Qubit (Thermo Fisher Scientific, США). Качество, чистоту и концентрацию РНК также оценивали с помощью спектрофотометра NanoPhotometer NP80 (Implen, Германия), а также биоанализатора нуклеиновых кислот Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, США) и набора RNA 6000 Pico kit (Agilent Technologies, США).

9. Подготовка библиотек для секвенирования

Подготовку библиотек кДНК проводили по ранее описанному протоколу [Ettwiller и др., 2016]. Коротко, тотальная РНК контрольной культуры сальмонелл (5 мкг) и РНК сальмонелл и акантамеб (10 мкг) подвергалось экспириванию 3'-биотин-ГТФ с помощью фермента Vaccinia

capping system (New England Biolabs, США). Затем РНК очищали с помощью колонок RNA Clean and Concentrator-5 column (Zymo Research, США) и элюировали в 30 мкл воды свободной от нуклеаз. 3'-биотин-ГТФ - кэпированную РНК фрагментировали с помощью добавления полинуклеотидкиназного буфера и прогреванием в течение 5 мин при 94 °С. 3'-фосфаты были удалены из фрагментированной РНК с помощью обработки Т4-полинуклеотидкиназой при 37 °С в течение 15 минут. После этого 40 мкл элюированной РНК добавляли к 40 мкл гидрофильных стрептавидиновых магнитных частиц (New England Biolabs, США). Смесь РНК-частицы инкубировали при 25 °С в течение 20 минут. Затем РНК отмывали дважды на магнитном штативе в буфере А (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM ЭДТА, 500 mM NaCl), а затем дважды в буфере В (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM ЭДТА, 50 mM NaCl). РНК была собрана путем помещения пробирок на магнитный штатив. Элюированную РНК очищали с помощью магнитных частиц AMPure XP (Beckman Coulter, США).

Дестиобиотиновый кэп был удален с помощью буфера Thermopol (New England Biolabs, США) и фермента RppH (New England Biolabs, США) при 37 °С в течение 60 минут. Реакция была остановлена добавлением 0,5 мкл 0,5 М ЭДТА и прогреванием при 94 °С в течение 2 минут. РНК собирали на магнитных частицах AMPure (Beckman Coulter, США) как описано ранее, затем промывали и элюировали в 6 мкл буфера TE (10 mM Tris-HCl (pH-8,0), 0,1 mM ЭДТА).

Библиотеки для секвенирования подготавливали с помощью набора NEBNext small RNA library prep kit (New England Biolabs, США), которые затем амплифицировали в течение 15 циклов ПЦР. Все библиотеки секвенировали на приборе Illumina HiSeq 2000 в лаборатории Рикен-КФУ в Казанском Федеральном Университете, Казань, Россия.

Все данные РНК-секвенирования, обсуждаемые в данной диссертации, были внесены в базу данных NCBI Gene Expression Omnibus и доступны по идентификатору GSE173638 (PRJNA726515).

10. Количественная ПЦР в режиме реального времени

Для валидации результатов транскриптного анализа была проведена оценка экспрессии одиннадцати генов (*glnA*, *sitA*, *entS*, *prgH*, *sipC*, *phoP*, *sseC*, *grxA*, *katG*, *agp*, *aceB*) методом количественной ПЦР в режиме реального времени. Праймеры были разработаны с использованием программы Vector NTI 9.1.0 (Thermo Fisher Scientific, США). Синтез олигонуклеотидов проводила фирма Евроген, Россия.

Выделение тотальной РНК производили аналогичным методом из культуры, помещенной в те же условия, что и в экспериментах по анализу транскриптома. кДНК была синтезирована из 1 мкг тотальной РНК контрольной культуры сальмонеллы и 3 мкг тотальной РНК культуры акантамеб, зараженных сальмонеллам, с использованием обратной транскриптазы M-MuLV (New England Biolabs, США) по стандартному протоколу производителя. Постановку реакции ПЦР выполняли в трех биологических и трех технических репликах. Количественная ПЦР в режиме реального времени была выполнена на приборе CFX connect (Bio-Rad, США). В качестве референсных использовались гены *rpoD* (кодирует сигма-фактор РНК-полимеразы) и *gyrA* (кодирует субъединицу ДНК-гиразы). Эффективность ПЦР оценивали на основе значения S_q для логарифмических разведений стандартного образца. Дифференциальную экспрессию генов оценивали с помощью программного обеспечения REST 2009 (<https://www.gene-quantification.de/rest-2009.html>).

11. Биоинформатический анализ данных

Качество полученных в результате секвенирования прочтений оценивали с помощью программы FastQC версия 0.11.9. Исходные риды фильтровали от последовательностей адаптеров для секвенирования. Программу SortMeRNA версия 2.1 [Kopylova и др., 2012] использовали для удаления ридов, принадлежащих про- и эукариотической рРНК. Очищенные риды вначале картировали на последовательность генома *A. castellanii* (идентификатор генбанк GCF_000313135.1) с помощью Bowtie2 [Langmead и Salzberg., 2012] в режиме локального выравнивания (L -16), затем картировали на геном *S. Typhimurium* 14028S (GCA_000022165.1) с аналогичными параметрами.

Покрытие ридов на ген/оперон рассчитывали с помощью функции `featureCounts`, входящей в пакет R «Rsubread» [Liao и др., 2014]. Для аннотации генов по оперонам использовали базу данных Door2 [Mao и др., 2014]. Дифференциальную экспрессию оценивали с помощью пакета R «DESeq2» [Love и др., 2014]. Анализ обогащения по функциональной принадлежности (GSEA) метаболических путей выполняли с помощью пакета `fgsea` [Korotkevich и др., 2016] с использованием базы данных KEGG (Киотская энциклопедия генов и геномов) для аннотации метаболических путей (<https://www.kegg.jp/>). Функциональную аннотацию генов также проводили с помощью базы данных eggNOG v. 4.5 [Huerta-Cepas и др., 2016].

Результаты исследований и обсуждение

1. Подбор оптимальной среды культивирования и определение параметров заражения амёб для оценки экспрессии генов на ранних этапах взаимодействия

Нами оценена динамика численности сальмонелл и амёб, растущих при температуре 25°C в обедненной питательными веществами среде PYG (1/5-PYG и 1/10-PYG) и в среде без углерода (PAS). В результате было выявлено, что при инокуляции сальмонелл в среды 1/10 PYG и 1/5 PYG в первые 2 ч численность не меняется, после чего наблюдается резкое возрастание численности сальмонелл в среде (Рисунок 1). В свою очередь, при инкубировании на среде PAS, концентрация жизнеспособных сальмонелл в течение первых суток остается практически на уровне исходной (Рисунок 1).

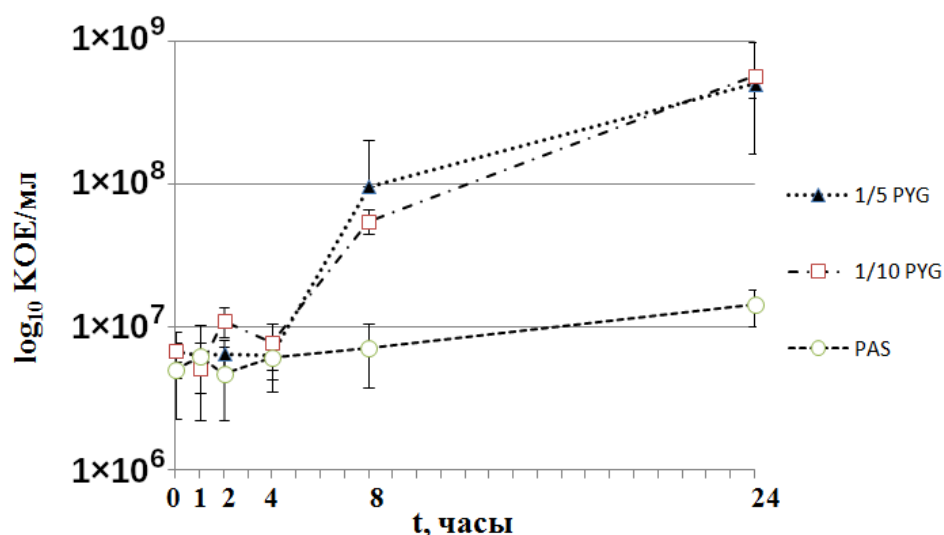


Рисунок 1 – Динамика численности сальмонелл при росте на средах PYG и PAS с различным содержанием органического углерода при 25°C. Ось абсцисс – количество сальмонелл, ось ординат – время инкубации

Для определения исходного оптимального соотношения клеток амёб и сальмонелл в среде жизнеспособность амёб была оценена после 2 ч сокультивирования с сальмонеллами в различных исходных концентрациях, а также оценивалась численность внутриклеточных и внеклеточных сальмонелл (Таблица 1).

В результате было выявлено, что соотношение сальмонелл к амёбам достоверно не влияет на жизнеспособность последних в первые 2 ч эксперимента. Процент жизнеспособных амёб варьировал от 81,9±5,45% при соотношении амёб к сальмонеллам 1:100, до 88,57±4,36% при соотношении 1:1000, тогда как в контрольных культурах амёб доля жизнеспособных клеток была равна 87,43±3,68%.

Таблица 1 - Жизнеспособность амёб и численность сальмонелл в среде после 2 ч совместного культивирования при различной исходной плотности бактерий

Соотношение клеток амёб:сальмонелл при заражении	Количество жизнеспособных амёб, %	Lg КОЕ/мл внутриклеточно локализованных сальмонелл	Lg КОЕ/мл сальмонелл в супернатанте
1:0 (Контроль)	87,43±3,68	-	-
1:10	82,27±1,78	3,36	-
1:100	81,9±5,45	4,56	-
1:1000	88,57±4,36	5,72	4,66
1:10000	86,3±1,89	6,75	5,66

Результаты высевок показали, при количественном соотношении клеток сальмонелл и амёб, превышающем 100 к 1, невозможно полностью избавиться от сальмонелл, находящихся в среде даже после 4 и 5 центрифугирования. По-видимому, данный эффект связан с тем, что при многократных центрифугированиях часть амёб лизируется, и сальмонеллы выходят в среду. Таким образом, было подобрано оптимальное для заражения соотношение сальмонелл к амёбам равное 1:100.

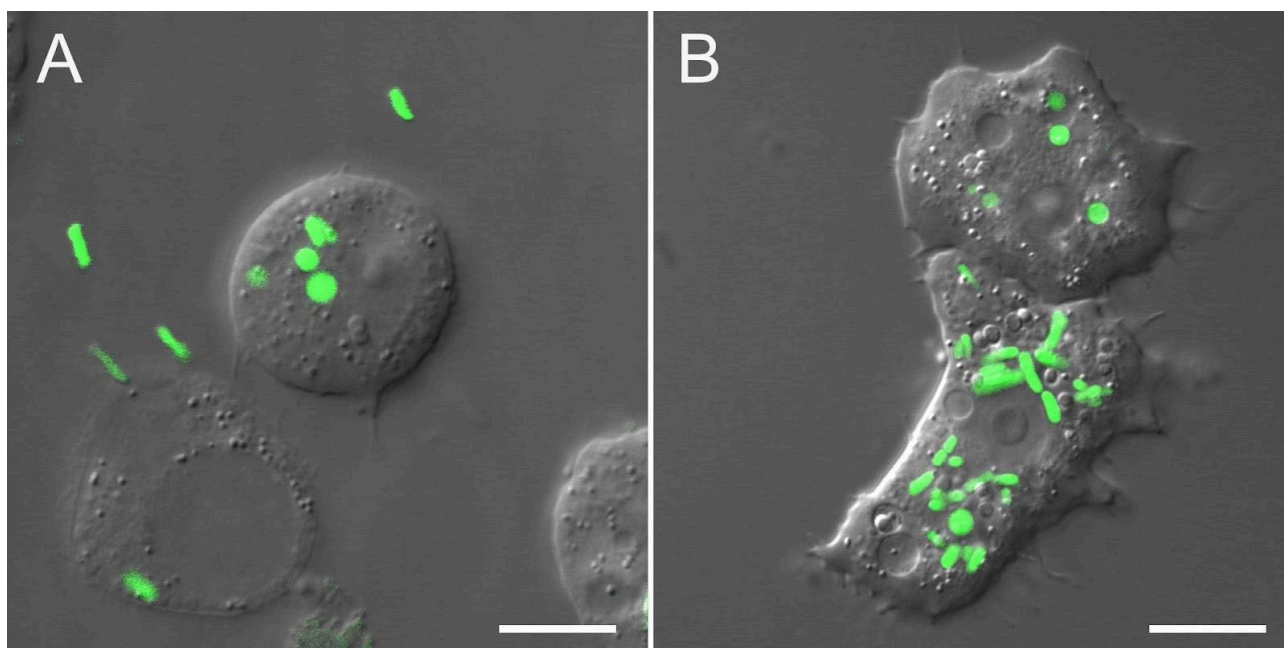


Рисунок 2 – Изображения *A. castellanii* инфицированных *S. Typhimurium* 14028S (GFP) до (А) и после (Б) процедуры промывки. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия: дифференциально-интерференционный контраст наложен на одноканальные оптические изображения GFP-флуоресценции в зеленом канале. Масштабные линейки - 10 мкм

Изображения, полученные с использованием конфокальной микроскопии, подтверждают, что после трехкратной отмывки, большинство клеток акантамеб содержат внутри сальмонеллы (Рисунок 2).

В результате нами была разработана оптимальная модель сокультивирования аксеничной культуры амёб *A. castellanii* Neff (ATCC 30010) с вирулентным штаммом сальмонеллы *S. enterica* serovar Typhimurium 14028s, характеризующейся следующими параметрами:

- 1) Условия сокультивирования приближены к условиям природных и искусственных водных экосистем;
- 2) Наблюдается стабильная численность сальмонелл и амёб в течение эксперимента;

3) Достигается достаточное количество внутриклеточно локализованных сальмонелл для транскриптомного анализа, при этом внеклеточные сальмонеллы после трехкратной отмывки амёб не выявляются.

2. Динамика численности амёб и оценка соотношения жизнеспособных и мертвых клеток при длительном сокультивировании с сальмонеллами

На первом этапе нами была разработана модель сокультивирования сальмонелл и акантамёб, оптимальная для изучения экспрессии генов бактерий на ранней стадии взаимодействия с амёбами. Однако, из-за отсутствия антибиотика, на длительных сроках сокультивирования наблюдалось значительное увеличение численности сальмонелл в среде культивирования, что приводило к массовой гибели амёб через 12-16 ч после начала инфекции. В связи с чем, на следующем этапе было необходимо определить оптимальные параметры совместного культивирования с контролем численности внеклеточных сальмонелл для экспериментов по оценке экспрессии генов бактерий внутри акантамёб на различных сроках инфекции.

Для оценки влияния состава среды на численность и жизнеспособность амёб контрольные культуры *A. castellanii* выращивали при температуре 25°C в обедненной среде PYG (1/5-PYG и 1/10-PYG) и в среде без углерода (PAS) в присутствии гентамицина. Общая численность клеток амёб, а также соотношение трофозоитов к цистам оставались стабильными в течение первых 24 ч эксперимента (Рисунок 3А, В). Общее количество жизнеспособных (включая трофозоиты и цисты) неинфицированных амёб постепенно снижалось в процессе культивирования, однако изменения были статистически незначимыми.

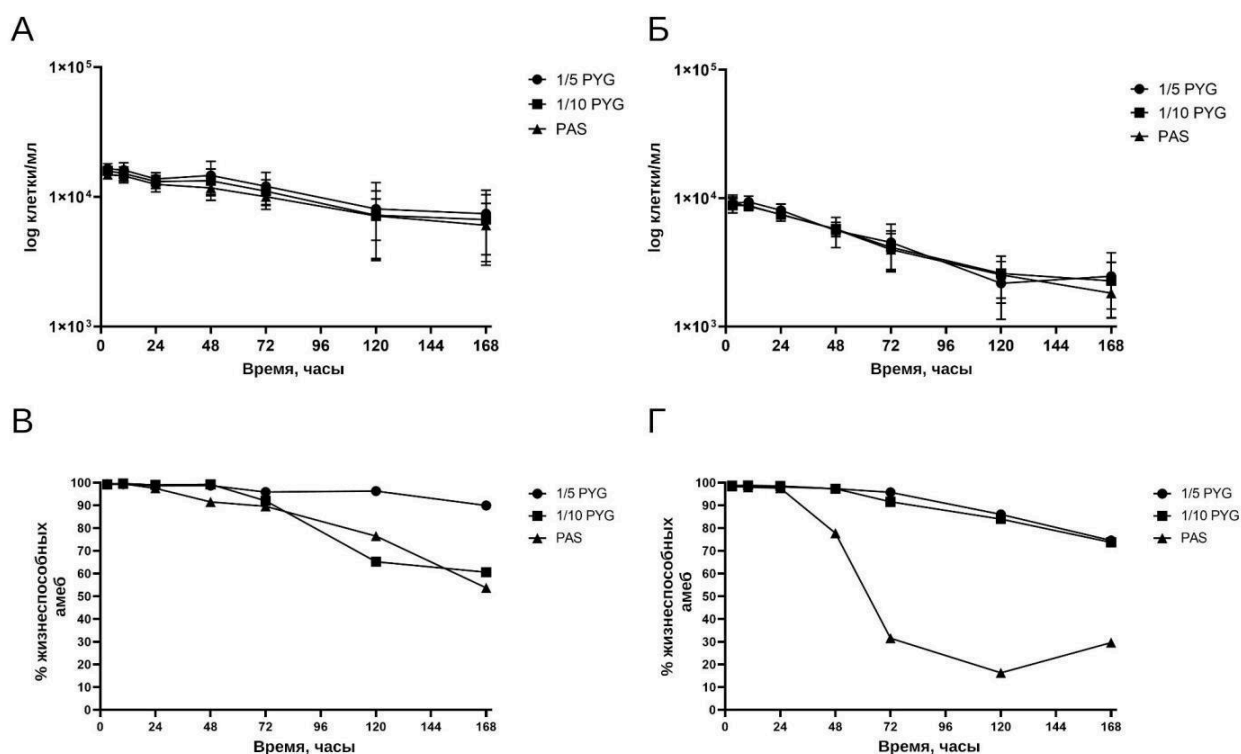


Рисунок 3 – Динамика численности жизнеспособных клеток (трофозоитов и цист) *A. castellanii* в контрольных (А, В) и инфицированных сальмонеллами (Б, Г) культурах на средах с различной концентрацией органических соединений: 1/5 PYG, 1/10 PYG и PAS в присутствии гентамицина. Приведены количество жизнеспособных клеток (А, Б) и доля в процентах от общего числа клеток (В, Г). Значения представляют собой среднее значение $\pm$ стандартные ошибки средних значений в девяти повторностях

В культурах, зараженных сальмонеллами, общее количество жизнеспособных амёб снижалось более быстрыми темпами, чем в контрольных культурах. При исходном количестве жизнеспособных амёб $8,79-9,19 \times 10^3$ кл/мл, на 7-й день культивирования количество жизнеспособных амёб снизилось до $2,47 \pm 2,24 \times 10^3$ кл/мл, $2,27 \pm 1,55 \times 10^3$ кл/мл и $1,82 \pm 1,13 \times 10^3$ кл/мл на средах 1/5 PYG, 1/10 PYG и PAS соответственно (Рисунок 3Б). Соотношение жизнеспособных и погибших клеток амёб в контрольной и инфицированной культурах на средах 1/5 и 1/10 PYG было схожим (Рисунок 3), в то время как в культуре, выращенной на среде PAS, доля жизнеспособных клеток резко снизилась на третий день наблюдения до 31%, достигнув минимального значения в 16% на пятый день (Рисунок 3Г). Статистически значимого влияния среды культивирования на динамику численности жизнеспособных амёб в контрольных и инфицированных культурах выявлено не было. Однако на среде PAS обнаружено заметное снижение доли жизнеспособных амёб, инфицированных сальмонеллой, которое происходило через 72 ч культивирования.

3. Динамика численности жизнеспособных сальмонелл при совместном культивировании с амёбами на различных сроках инфекции

На данном этапе оценивалась численность жизнеспособных внутриклеточно локализованных сальмонелл при культивировании с *A. castellanii* в среде с добавлением гентамицина. Максимальная концентрация внутриклеточных сальмонелл наблюдалась в начальной точке эксперимента (через 2 ч после заражения) и составила $4,7 \times 10^4$ КОЕ/мл. В дальнейшем наблюдалось постепенное снижение численности внутриклеточных сальмонелл, которое ускорилось после 10 ч культивирования. Через 21 ч после начала эксперимента количество сальмонелл снизилось до $1,95 \times 10^3$ КОЕ/мл и $5,69 \times 10^3$ КОЕ/мл в средах 1/5 PYG и PAS соответственно. Численность внутриклеточных сальмонелл на среде 1/10 PAS снижалась с постоянной скоростью в течение всего периода наблюдения и достигла минимальной концентрации $7,4 \times 10^2$ КОЕ/мл через 21 ч после начала инфекции (Рисунок 4). Таким образом, через 21 ч совместного культивирования на средах 1/5 PYG и PAS численность внутриклеточных сальмонелл снизилась более чем в 30 раз, а на среде 1/10 PYG — более чем в 80 раз.

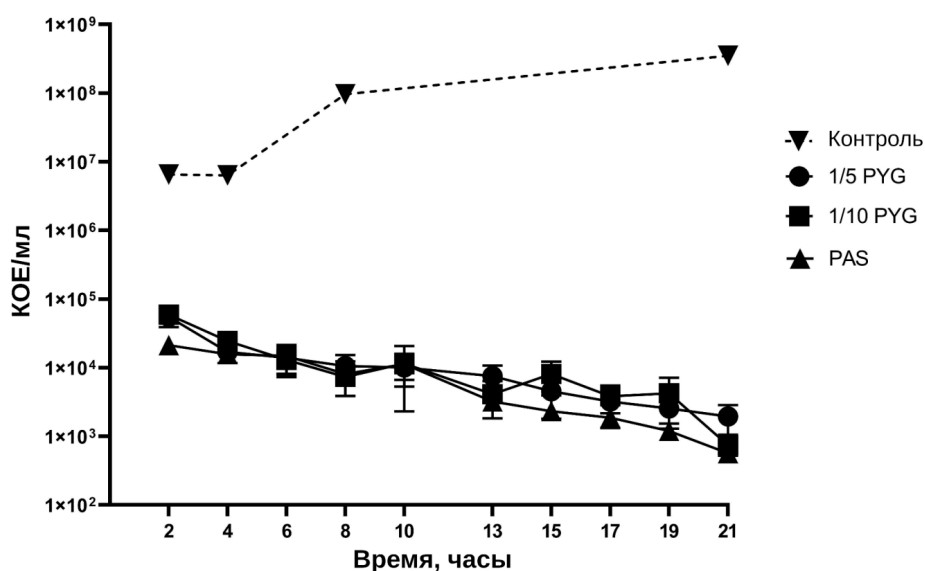


Рисунок 4 – Динамика численности внутриклеточных *S. Typhimurium* 14028S и контрольной культуры в отсутствии акантамёб и антибиотика. Точки на графике представляют собой среднее значение $\pm$ стандартные ошибки среднего, рассчитанные по 9 повторностям

По результатам проведенных исследований можно сделать вывод, что в течение первых суток количество жизнеспособных амёб, при исключении внеклеточно размножающихся

сальмонелл в среде, достоверно не изменяется. В отношении сальмонелл установлено, что количество внутриклеточных бактерий постоянно снижалось в течение эксперимента. По истечению 21 ч после начала эксперимента количество сальмонелл достигло значений $7,4 \times 10^2$ – $5,69 \times 10^3$ КОЕ/мл, при которых сложно выделить достаточное количество РНК для оценки экспрессии генов. В связи с этим, нами было принято решение оценивать экспрессию генов сальмонелл на раннем (2 ч) и поздних (8 и 15 ч) сроках взаимодействия с *A. castellanii*.

В результате проведенных исследований нами разработана оптимальная модель взаимодействия *S. enterica* serovar Typhimurium 14028S и свободноживущих амёб *A. castellanii*, которая характеризуется минимумом (в отсутствие антибиотика в среде) или отсутствием (при использовании гентамицина) внеклеточных сальмонелл, а также достаточным количеством внутриклеточно локализованных сальмонелл для оценки экспрессии генов на протяжении всего эксперимента. Таким образом, разработанная модель оптимальна для оценки экспрессии генов сальмонелл на различных сроках взаимодействия с амёбами методами транскриптомного анализа и ПЦР в режиме реального времени. Кроме того, отсутствие источников углерода в среде культивирования позволяет применять данную модель для анализа взаимодействия сальмонелл и амёб в условиях, аналогичных водным экосистемам с низким содержанием питательных веществ.

4. Транскриптом сальмонелл на ранней стадии взаимодействия с *A. castellanii*

Большинство оперонов, экспрессия которых усиливалась у сальмонелл внутри акантамёб, относилось к хемотаксису бактерий и сборке жгутиков, биосинтезу ЛПС, метаболизму глицерофосфолипидов, биосинтезу аминокислот и метаболизму гликозилатов и дикарбоксилатов (Рисунок 5).

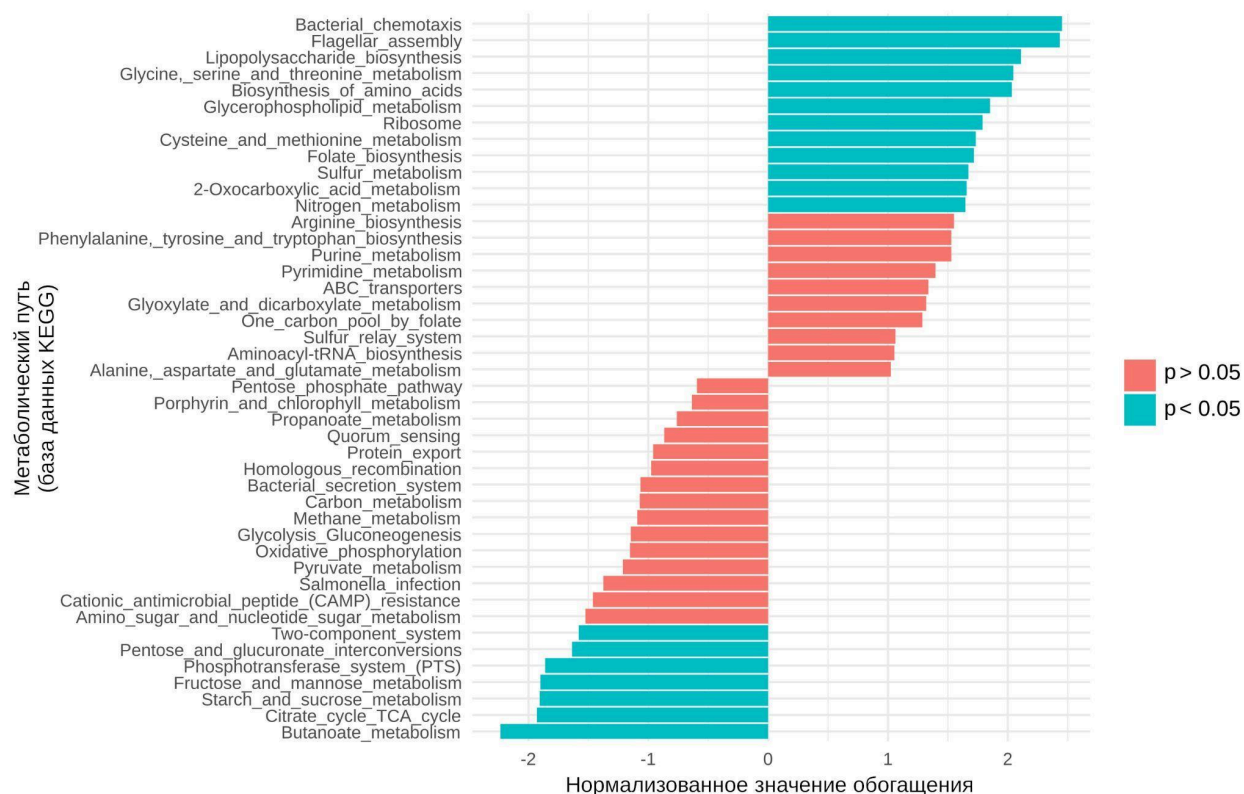


Рисунок 5 – Анализ обогащения по функциональной принадлежности (GSEA) метаболических путей сальмонелл (в соответствии с базой данных KEGG). Положительные значения обогащения свидетельствуют об усилении экспрессии генов, входящих в данные метаболические пути у внутриклеточных сальмонелл по сравнению с контрольной культурой. Отрицательные значения свидетельствуют об обратном - гены, входящие в данные метаболические пути подавлены у внутриклеточных сальмонелл.

Напротив, экспрессия оперонов, относящихся к циклу трикарбоновых кислот (ЦТК), метаболизму фруктозы и маннозы, метаболизму пирувата и бутаноата, окислительному фосфорилированию и системе фосфотрансферазы, снижалась (Рисунок 5).

Экспрессия многочисленных оперонов, относящихся к категории «транспорт и метаболизм углеводов» согласно базе данных COG (Cluster of Orthologous Groups of proteins), усиливалась у сальмонелл внутри акантамеб. Экспрессия оперонов, участвующих в процессах внутриклеточного обмена, секреции, везикулярного транспорта, репликации, рекомбинации и репарации, также была значительно повышена. Экспрессия генов, контролирующих трансляцию, структуру рибосом и биогенез, посттрансляционную модификацию, обмен белками, синтез шаперонов, а также производство и конверсию энергии, была снижена.

Экспрессия генов, кодирующих захват железа, значительно усиливалась у сальмонелл внутри акантамеб. Так, экспрессия оперонов *sitABCD*, *sufABCDSE*, *fepAE*, *entS*, *entD*, *fepB*, и *ybdA* усиливалась более чем в 2 раза внутри клеток хозяев по сравнению с контрольной культурой (Таблица 2), как и алюминий-зависимого гена STM14_2833 (*ais*). Стоит отметить, что экспрессия некоторых генов, участвующих в захвате железа была подавлена у внутриклеточных сальмонелл. Так, экспрессия транспортера железа *feoAB*, флавопротеина *frdABCD*, отвечающего за фумаратредуктазу, а также гена, отвечающего за хранение и детоксикацию железа *bfr* достоверно снижалась.

Таблица 2 – Отдельные опероны и гены, дифференциально-экспрессирующиеся у сальмонелл внутри акантамеб

Оперон/ген	log2 изменения экспрессии	Описание функции
Транспорт ионов		
<i>sufABCDSE</i>	2,76	сборка железо-серных белков
<i>fhu</i>	2,65	захват гидроксамата железа
<i>ent</i>	3,55	энтеробактин
<i>fep</i>	1,23	транспортный белок энтеробактина железа
<i>fes</i>	2,73	эстераза энтеробактина железа
<i>corA</i>	1,65	транспортер магния, никеля кобальта
Ответ на окислительный стресс		
<i>ahpCF</i>	3,67	алкилгидропероксид-редуктаза
<i>grxA</i>	2,40	глутаредоксин
<i>katG</i>	1,89	каталаза-пероксидаза
<i>sodA</i>	2,18	супероксиддисмутаза (марганец)
<i>sodB</i>	-3,20	супероксиддисмутаза (железо)
SPI-1		
<i>sitABCD</i>	1,13	транспорт марганца/железа
<i>prgKJIH-orgABC</i>	1,27	комплекс иглы
<i>hilA-iagB</i>	1,56	инвазин
<i>spaPOL-invJI</i>	2,17	комплекс иглы
<i>invABEFG</i>	1,20	инвазины
<i>invH</i>	2,46	участвует в синтезе системы T3SS

SPI-2		
<i>ssaBCDE</i>	-2,36	аппарат системы секреции II типа
<i>sseABCDE</i>	-2,47	компоненты аппарата транслокации
<i>ssaGHIJ</i>	-1,88	система секреции III типа
<i>ssaMVN</i>	-2,66	система секреции III типа
<i>ssaRSTU</i>	-1,88	система секреции III типа
<i>ydhC</i>	1,68	внутри мембранный транспорт
Подвижность и хемотаксис		
<i>flh</i>	1,70	биосинтез жгутиков
<i>fli</i>	1,48	биосинтез жгутиков
<i>mot</i>	1,70	белок мотора жгутиков
<i>che</i>	1,70	хемотаксис

Экспрессия генов, кодирующих ответ на окислительный стресс (глутаредоксин *grxA*, гидропероксидаза *katG*, предполагаемые оксидоредуктазы STM14_4644, STM14_4645 и *yieEF*, супероксиддисмутаза *sodA*, тиоалкилгидропероксидредуктаза STM14_0476, алкилгидропероксидредуктаза *ahpCF*, и предполагаемые железо-зависимые пероксидазы STM14_3004 и STM14_3005), увеличивалась у сальмонелл внутри акантамеб (Таблица 2). Напротив, экспрессия генов супероксиддисмутаз *sodB* и *sodC*, а также оксидоредуктазы STM14_2022 была снижена. Кроме того, экспрессия генов пероксидаз увеличивалась у внутриклеточных сальмонелл. Так, экспрессия генов *ahpCF* внутри акантамеб была в 25 раз выше, чем в контрольной культуре (Таблица 2).

У сальмонелл внутри акантамеб была снижена экспрессия генов, кодирующих белки теплового шока (*dnaKJ*, *ibpAB*, *hslJ*, STM14_1509), малую регуляторную РНК RprA, универсальные стрессовые белки (*uspB* и *uspE*) и белок холодового шока (*cspE*). Также, внутри акантамеб была снижена экспрессия гена *yjeY*, который кодирует реакцию на голодание по углероду.

Большинство генов SPI-1, включая кодирующие CCTT-1, имели повышенную экспрессию у сальмонелл внутри акантамеб. Экспрессия таких генов, как *invH*, *invABEFG*, *prgKJLH* и *orgABC*, отвечающих за инвазию сальмонелл в клетки хозяина, а также гена *sptP*, участвующего в реорганизации цитоскелета хозяина после вторжения, была значительно повышена у внутриклеточных сальмонелл (Таблица 2). Экспрессия гена *sopE*, кодирующего эффекторный белок SopE, транслоцированный SPI-1 CCTT, также была повышена у внутриклеточных сальмонелл. В тоже время, экспрессия оперона *spaSRQ*, кодирующего гены комплекса иглы, значительно снижалась у внутриклеточных сальмонелл. Экспрессия закодированных в SPI-5 генов *pipC* и *sopB* усиливалась внутри акантамеб.

Экспрессия большинства генов SPI-2, включая *ssaBCDE*, *sseABCDE*, *ssaA*, *ssaMVN*, и *ssaRSTU* была подавлена у сальмонелл внутри акантамеб (Таблица 2). Экспрессия шести оперонов, закодированных в плазмиде вирулентности и участвующих в конъюгативном переносе, включая *traJYALEKBP*, *trbD* и *traV*, была подавлена у сальмонелл внутри акантамеб.

Несколько генов, расположенных не в островах патогенности, но участвующих в инфекции, имели повышенную экспрессию у внутриклеточных сальмонелл. Например, экспрессия *ybdA*, кодирующего экспортер энтеробактина EntS, была более чем в 16 раз выше в опытной культуре по сравнению с контролем. Экспрессия некоторых генов, отвечающих за множественную устойчивость к антибиотикам, например оперона *mdlAB*, усиливалась у сальмонелл внутри акантамеб.

Экспрессия оперонов *fliLMNOPQR*, *fliDST* и *flhCD*, участвующих в биосинтезе жгутиков, а также *motAB* и *cheAWM*, ответственных за подвижность и хемотаксис соответственно, усиливалась внутри акантамеб (Таблица 2). В данной работе впервые был получен и проанализирован полный транскриптом сальмонелл при сокультивировании с акантамебами с

использованием высокопроизводительного секвенирования. Результаты проведенного анализа явно демонстрируют, что сальмонеллы в контрольной культуре и находящиеся внутри клеток акантамеб имеют различный профиль экспрессии генов.

Мы также сравнили особенности экспрессии генов сальмонелл, поглощённых акантамебами, с экспрессией генов сальмонелл внутри различных типов клеток млекопитающих. Транскрипционный профиль сальмонелл внутри акантамеб имел определенное сходство с профилем экспрессии для сальмонелл в макрофагах, эпителиальных клетках и фибробластах (Рисунок 6).

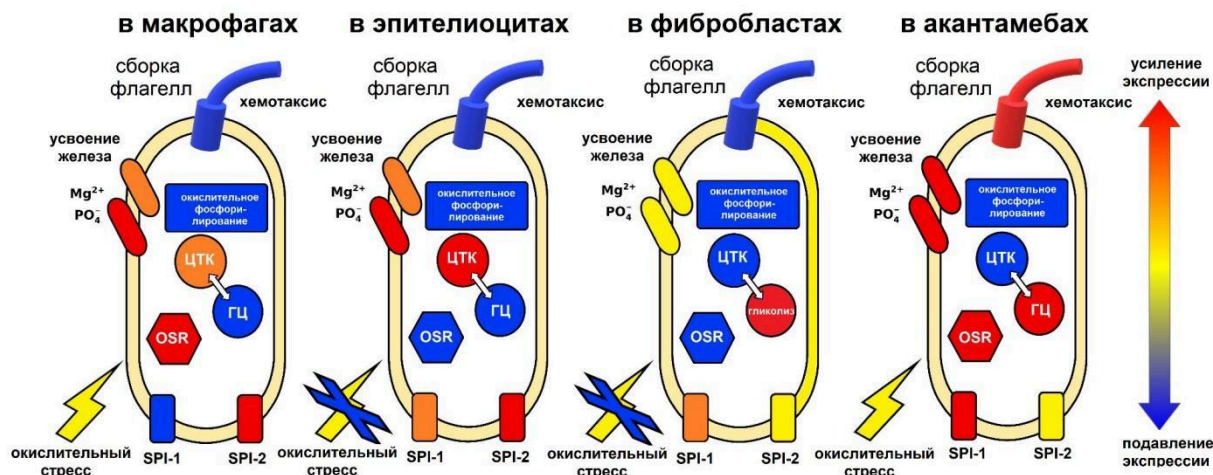


Рисунок 6 – Особенности транскриптома сальмонелл при взаимодействии с макрофагами [Hautefort и др., 2008, Srikumar и др., 2015], эпителиоцитами [Hautefort и др., 2008], фибробластами [Núñez-Hernández и др., 2013], и *A. castellanii*. Каждый элемент представляет функциональную группу генов. Цвета отражают уровни экспрессии соответствующих генов. В данной работе впервые был получен и проанализирован полный транскриптом сальмонелл при сокульвующих генов при каждом условии. Реакция на окислительный стресс, ОСР; глиоксидатный цикл, ГЦ; цикл трикарбоновых кислот, ТСА

Сальмонеллы подвергаются воздействию АФК как в макрофагах, так и в акантамебах, но не в эпителиальных клетках и фибробластах. Также, сальмонеллы испытывают дефицит железа как в макрофагах, так и в акантамебах. В ответ на условия внутри фагосом бактерии индуцируют транспорт железа, системы оксидоредуктаз и биосинтез ЛПС. Транскриптом сальмонелл внутри акантамеб имеет сходство с паттернами экспрессии в фибробластах [Núñez-Hernández и др., 2013] отсутствием индукции SPI-2 и снижением экспрессии генов ЦТК. В отличие от инфекции макрофагов, экспрессия SPI-1 усиливалась при взаимодействии с акантамебами, а также в эпителиальных клетках и фибробластах. Таким образом, это может быть свидетельством того, что сальмонелла способствует проникновению в данные типы клеток с помощью секреции эффекторов SPI-1.

Таким образом, в отличие от известных моделей бактериальной инфекции макрофагов и эпителиальных клеток, сальмонеллы внутри акантамеб характеризуются специфическими паттернами экспрессии генов, включая переключение с цикла ЦТК и окислительного фосфорилирования на глиоксидатный шунт, а также активацию системы хемотаксиса и биосинтез жгутикового аппарата (Рисунок 6). Результаты нашего исследования предоставили теоретические и эмпирические доказательства специфических для сальмонелл паттернов метаболизма и вирулентности для внутриклеточного выживания в одноклеточных и многоклеточных эукариотах.

5. Динамика экспрессии генов *Salmonella Typhimurium* на различных этапах инфекции *A. castellanii*

При оценке взаимодействия *Salmonella Typhimurium* с *A. castellanii* на ранней стадии инфекции (2 ч) были выявлены некоторые специфические особенности транскриптома бактерий, такие как снижение экспрессии генов гликолиза и повышение экспрессии генов глиоксилатного цикла, SPI-1, системы хемотаксиса и жгутикового аппарата, а также отсутствие активации генов SPI-2. Однако эти результаты характеризуют только раннюю стадию инфекции, что осложняет интерпретацию роли данных генов в патогенезе сальмонеллезной инфекции амёб. Это побудило нас изучить экспрессию генов сальмонелл в динамике на различных стадиях взаимодействия с *A. castellanii*.

Для этого мы проанализировали динамику экспрессии генов, кодирующих ферменты путей метаболизма углерода, захвата железа, ответ на окислительный стресс, факторы вирулентности, ингибиторы лизоцима и хемотаксис, используя количественную ПЦР в реальном времени (Таблица 3). Метаболизм углерода оценивали с помощью гена *agp*, который кодирует ключевой фермент гликолиза глюкозо-1-фосфатазу, а также гена малатсинтазы *aceB*, который является ферментом глиоксилатного цикла. Гены, представляющие островки патогенности сальмонелл SPI-1, SPI-2 и SPI-3, были выбраны для оценки динамики экспрессии генов патогенности и вирулентности. Реакция на окислительный стресс и поглощение железа играют решающую роль в адаптации сальмонелл к условиям внутри фагосом клетки-хозяина, поэтому мы выбрали некоторые гены, участвующие в этих процессах. Кроме того, гены, ответственные за хемотаксис и ингибиторы лизоцима, были выбраны на основе результатов их возможной роли в инфекции сальмонеллы [Hautefort et al., 2008, Nan et al., 2024].

Таблица 3 - Результаты оценки экспрессии генов сальмонелл через 2, 8 и 15 ч после заражения акантамёб. Уровни экспрессии всех генов нормализованы относительно уровня экспрессии референсного гена *rpoD*, за исключением генов *entS* и *mgtC*, для которых *gyrA* был выбран в качестве референсного гена. Статистически значимые отличия от контроля отмечены звездочкой, где (*) $p \leq 0,05$

Ген	Описание функции	Изменение экспрессии через 2 ч	Изменение экспрессии через 8 ч	Изменение экспрессии через 15 ч
<i>agp</i>	гликолиз	-1,20	-1,27	-5,81*
<i>aceB</i>	глиоксилатный цикл	1,55	1,92	-1,87
<i>grxA</i>	окислительный стресс	13,59*	5,52*	1,73
<i>katG</i>	окислительный стресс	3,80*	2,94*	-5,26*
<i>sitA</i>	импорт железа	5,47*	6,90*	2,99*
<i>entS</i>	импорт железа	9,52*	172,11*	49,36*
<i>hilA</i>	SPI-1	3,50*	6,48*	4,5*
<i>invF</i>	SPI-1	1,72*	1,25	-1,02
<i>sipC</i>	SPI-1	-1,16	-1,34	-1,33
<i>phoP</i>	SPI-2	-1,37	25,77*	5,46*
<i>sseC</i>	SPI-2	-4,98*	3,45*	1,05
<i>mgtC</i>	SPI-3	9,53*	1069*	485,5*
<i>cheA</i>	хемотаксис	26,79*	36,68*	1,46
<i>mliC</i>	ингибитор лизоцима	11,18*	30,76*	5,01*
<i>pliC</i>	ингибитор лизоцима	5,47*	8,92*	2,01*

Экспрессия гена глюкозо-1-фосфатазы (*agp*) подавлялась в течение всего периода внутриклеточной инфекции сальмонелл (Таблица 3). Более того, через 15 ч с начала инфекции наблюдался наименьший уровень экспрессии данного гена. Экспрессия гена *aceB*, кодирующего

фермент глиоксилатного цикла, достоверно не изменялась в течение наблюдаемого периода (Таблица 3).

Мы проанализировали экспрессию генов, отвечающих за импорт железа в клетку сальмонелл двумя основными способами: либо в виде соединения с сидерофорами, хелатирующими железо (энтеробактин, сальмохелин), либо в виде свободного катиона через ABC-транспортёры (*sitABCD*) [Cunrath, Palmer., 2021]. Оказалось, что экспрессия генов импорта железа обоих типов (*entS* и *sitA*) значительно усиливалась у сальмонелл внутри акантамеб в течение всего периода наблюдения (Рисунок 7). Максимальный уровень экспрессии данных генов наблюдался через 2 ч (*sitA*) или 8 ч (*entS*) с начала заражения, а на позднем сроке (15 ч) снижался. Максимальный уровень экспрессии генов ответа на окислительный стресс (*grxA* и *katG*) наблюдался через 2-8 ч после заражения (Рисунок 7), а через 15 ч после заражения экспрессия *katG* подавлялась более чем в 5 раз по сравнению с контрольной культурой.

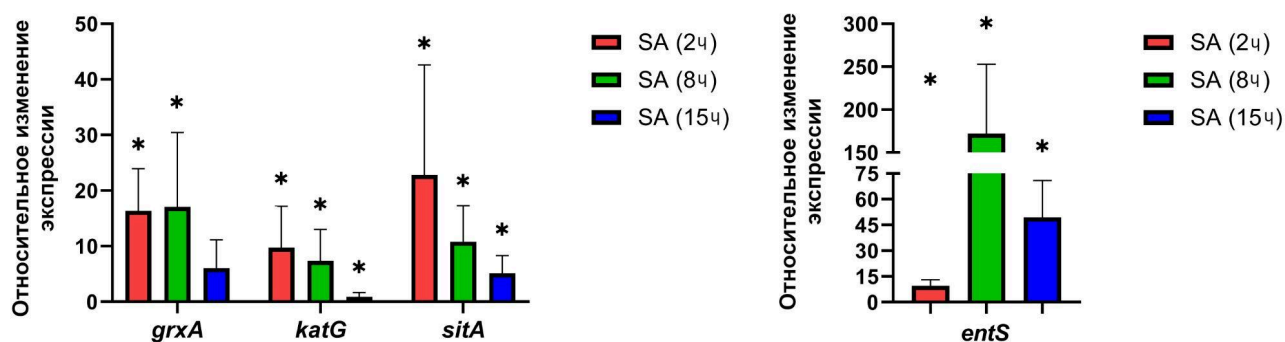


Рисунок 7 – Относительная экспрессия генов окислительного стресса и захвата железа сальмонелл через 2, 8 и 15 ч после заражения акантамеб по сравнению с экспрессией контрольной культуры. Уровни экспрессии генов *grxA*, *katG*, и *sitA* нормализованы относительно уровня экспрессии референсного гена *rpoD*. Ген *gyrA* был выбран в качестве референсного для *entS*. Статистически значимые отличия от контроля отмечены звездочкой, где (*) $p \leq 0,05$

Была определена экспрессия островков патогенности сальмонелл SPI-1 и SPI-2, включающих множество генов, кодирующих белки системы секреции III типа, экспрессия которых регулируется скоординированно. В частности, экспрессия гена *hilA*, кодирующего главный регулятор SPI-1 [Ellermeier и Slauch, 2007; Dieye et al., 2007], была повышена в течение всего периода наблюдения (Рисунок 8). Экспрессия *invF* (кодирующего транскрипционный регулятор семейства AraC, который активирует экспрессию SPI-1 [Lou et al., 2019]) повышалась на ранней стадии инфекции, а затем снижалась до уровня контрольной культуры через 15 ч после начала эксперимента (Рисунок 8). Изменения в экспрессии *sipC* (SPI-1) были статистически незначимыми (Рисунок 8). Экспрессия генов SPI-2 не активировались на ранней стадии инфекции, но затем значительно возросла, достигнув максимума через 8 ч после заражения (Рисунок 8). В нашем исследовании экспрессия SPI-1 усиливалась, тогда как экспрессия SPI-2 не активировалась на ранней стадии инфекции (2 ч) акантамеб. Усиление экспрессии SPI-2 происходило на более поздних стадиях инфекции (8 и 15 ч). Такая противоположная регуляция SPI-1 и SPI-2, вероятно, является общей стратегией взаимодействия сальмонелл с эукариотическими хозяевами. Экспрессия гена *mgtC*, расположенного в SPI-3 и отвечающего за поглощение катионов Mg^{2+} и фосфата, была повышена в течение всего периода наблюдения. Кроме того, ген *mgtC* имел самый высокий уровень экспрессии среди всех анализируемых генов. В целом, представленные результаты свидетельствуют о том, что регуляция генов патогенности *S. Typhimurium* в клетках амёб и млекопитающих демонстрирует схожие закономерности и зависит от стадии инфекции [Riquelme et al., 2016, Amaro, Martín-González, 2021].

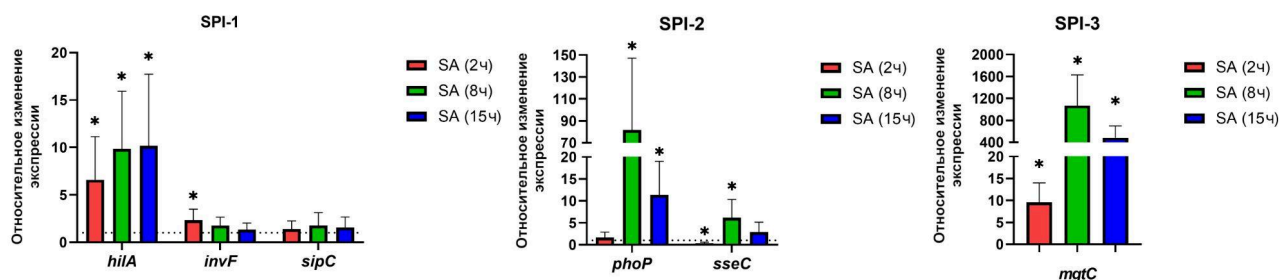


Рисунок 8 – Относительная экспрессия генов вирулентности сальмонелл через 2, 8 и 15 ч после заражения акантамеб по сравнению с экспрессией контрольной культуры. Уровни экспрессии генов *hilA*, *invF*, *sipC*, *phoP* и *sseC* нормализованы относительно уровня экспрессии референсного гена *rpoD*. Ген *gyrA* был выбран в качестве референсного для *mgtC*. Статистически значимые отличия отмечены звездочкой, где (*) $p \leq 0,05$

Экспрессия ингибиторов лизоцима *pliC* и *mliC* была повышена в течение всего периода наблюдения (Рисунок 9). Более того, максимум экспрессии данных генов наблюдался через 8 ч после заражения, после чего снижался (Рисунок 9). Экспрессия гена *cheA*, отвечающего за хемотаксис достоверно повышалась в течение первых 8 ч сокультивирования, после чего падала до уровня экспрессии в контрольной культуре через 15 ч после заражения (Рисунок 9). В данном исследовании впервые была оценена динамика экспрессии генов, кодирующих мембраносвязанные и периплазматические ингибиторы лизоцимов С-типа MliC и PliC соответственно. Значительное усиление регуляции как *mliC*, так и *pliC* было зарегистрировано на всех стадиях совместного культивирования сальмонелл с акантамебами с максимальной экспрессией через 8 ч после начала инфекции.

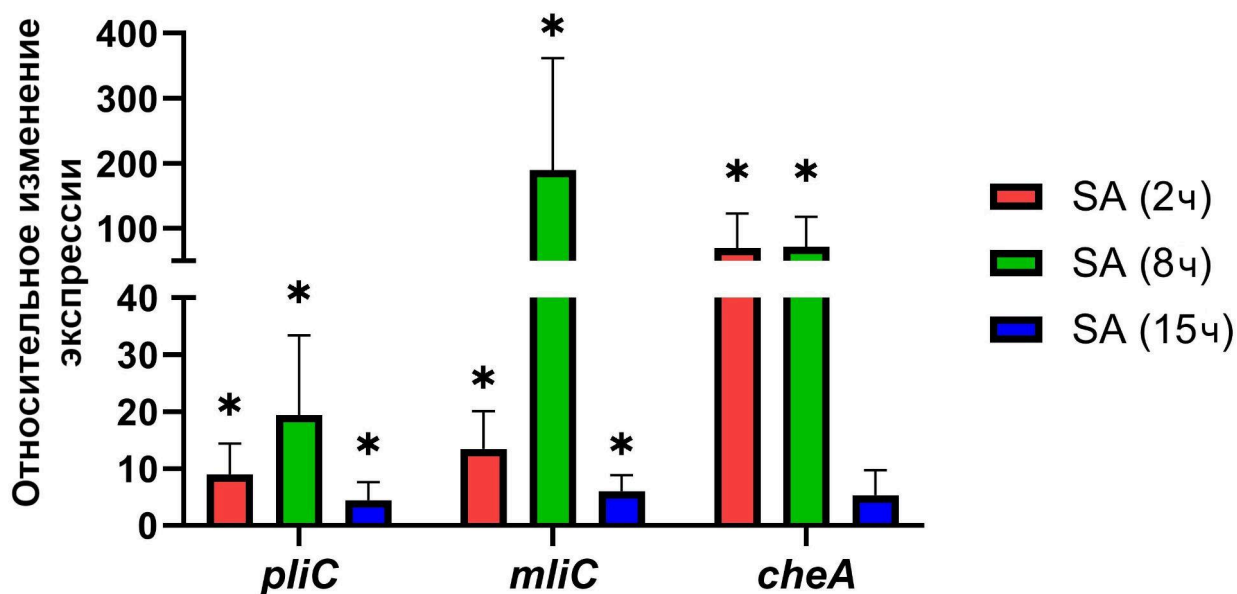


Рисунок 9 – Относительная экспрессия генов ингибиторов лизоцима и хемотаксиса сальмонелл через 2, 8 и 15 ч после заражения акантамеб по сравнению с экспрессией контрольной культуры. Уровни экспрессии генов *pliC*, *mliC*, и *cheA* нормализованы относительно уровня экспрессии референсного гена *rpoD*. Статистически значимые отличия отмечены звездочкой, где (*) $p \leq 0,5$

Анализ динамики экспрессии генов позволил нам предложить модель сальмонеллезной инфекции *Acanthamoeba castellanii* (Рисунок 10). Ранняя стадия инвазии характеризуется максимальным ответом на окислительный стресс, повышением регуляции хемотаксиса и сопровождается активацией генов SPI-1, необходимых для успешной инвазии в клетку хозяина. На второй стадии наблюдается повышение экспрессии генов вирулентности (SPI-2 и SPI-3), сопровождающееся максимальной экспрессией генов поглощения железа и ингибиторов лизоцима. Участие этих генов, вероятно, определяет успешность выживания сальмонелл в клетках акантамеб. На третьей стадии наблюдается снижение регуляции метаболизма углерода и генов ответа на окислительный стресс, а также снижение экспрессии всех остальных генов, что может быть свидетельством адаптации сальмонелл к внутриклеточным условиям. Эта стадия может предшествовать последующему размножению бактерий и их выходу в окружающую среду. Было обнаружено, что гены, кодирующие вирулентность, поглощение железа и реакцию на окислительный стресс, активируются в клетках амеб, и их экспрессия зависит от стадии инфекции, как это было показано ранее на других фагоцитах млекопитающих и простейших. Кроме того, в этом исследовании впервые было продемонстрировано участие ингибиторов лизоцима в инфицировании сальмонеллой *Acanthamoeba*.

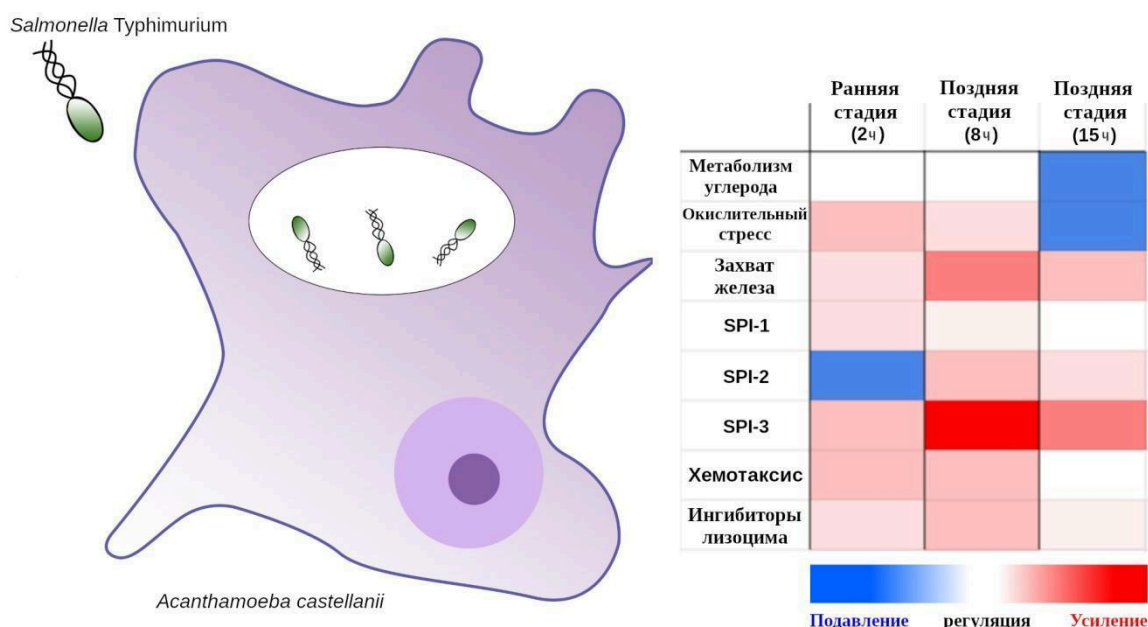


Рисунок 10 – Предлагаемая модель динамики экспрессии генов *Salmonella Typhimurium* 14028S на разных стадиях инфекции *Acanthamoeba castellanii*. Тепловая карта показывает относительную экспрессию ключевых функциональных групп генов сальмонелл через 2 ч, 8 ч и 15 ч после инфекции

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами данные позволяют впервые оценить полный транскриптом сальмонелл при фагоцитозе свободноживущими простейшими *A. castellanii* с использованием высокопроизводительного секвенирования. Полученный результат продемонстрировал успешное применение подхода Cappable-Seq для оценки транскриптома внутриклеточно локализованных бактерий.

Данные наших исследований явно показывают, что экспрессия островков патогенности SPI-1, SPI-2, SPI-3, генов ответа на окислительный стресс, транспорта железа у сальмонелл имеет схожую динамику как при инфекции акантамеб, так и профессиональных фагоцитов млекопитающих. Наряду с этим, существуют специфические особенности экспрессии генов сальмонелл, находящихся внутри клеток *A. castellanii*. Так, мы впервые увидели активацию генов первого островка патогенности, подвижности и хемотаксиса на ранней стадии инфекции амёб. Кроме того, мы зафиксировали переключение с ЦТК и окислительного фосфорилирования на глиоксилатный шунт. Детальный анализ ранее опубликованных данных, а также наши исследования демонстрируют, что способность сальмонелл к репликации, их цитотоксичность в отношении хозяев, экспрессия различных групп и систем генов существенно различаются в зависимости от конкретного типа клеток хозяина, а также ряда дополнительных факторов, включая наличие источников углерода и антибиотиков в среде, а также стадию инфекции.

Полученные результаты могут быть использованы в дальнейшем для поиска факторов, снижающих устойчивость патогенов, таких как сальмонеллы, в окружающей среде.

ВЫВОДЫ

1) На модели сокультивирования *S. Typhimurium* с *A. castellanii* в присутствии гентамицина установлена резистентность бактерий к фагоцитозу амёбами, которая не определяется концентрацией органических веществ в среде.

2) Выявлено незначительное цитотоксическое действие *S. Typhimurium* в отношении *A. castellanii*, которое не зависит от концентрации источников углерода, но усиливается при размножении внеклеточных сальмонелл в среде, не содержащей антибиотик.

3) Методом транскриптомного анализа с применением подхода Cappable-Seq выполнена реконструкция основных метаболических и функциональных систем *S. Typhimurium*, участвующих в инфекции *A. castellanii*. Показано подавление экспрессии генов ЦТК, гликолиза, и пентозо-фосфатного пути, активация генов глиоксилатного шунта, что в отличие от условий внутри фагоцитов млекопитающих, отражает переключение сальмонелл внутри клеток амёб на альтернативные источники углерода (ацетат, жирные кислоты).

4) Установлено, что транскрипционный профиль сальмонелл на ранней стадии инфекции *Acanthamoeba* имеет сходство с транскриптомом сальмонелл в различных типах клеток млекопитающих. Как и в макрофагах, сальмонеллы внутри акантамеб испытывают воздействие кислого pH, окислительного стресса, а также дефицита железа, что подтверждается усилением экспрессии генов, кодирующих биосинтез ЛПС, глицерофосфолипидов, аргинина и лизина, систем оксидоредуктаз, и транспорта железа соответственно. Сходство сальмонеллезной инфекции амёб и фибробластов определяется отсутствием индукции SPI-2 и подавлением экспрессии генов ЦТК.

5) Транскриптом *S. Typhimurium* на ранней стадии инфекции *A. castellanii* характеризуется специфическими особенностями, а именно подавлением генов ЦТК и окислительного фосфорилирования, активацией глиоксилатного цикла, системы хемотаксиса и биосинтеза жгутикового аппарата. Указанные особенности отличают сальмонеллезную инфекцию акантамеб от инфекции других протистов и клеток млекопитающих различных типов.

6) Показана схожая динамика регуляции генов островков патогенности сальмонелл внутри акантамеб с моделями инфекции клеток млекопитающих. На ранней стадии происходит активация SPI-1, необходимого для проникновения в клетку хозяина, после чего происходит

активация генов SPI-2 и SPI-3, отвечающих за внутриклеточное выживание и репликацию сальмонелл.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Дальнейшее продолжение работ по данной тематике исследования может проводится по следующим направлениям:

- Выявление источника углерода для сальмонелл внутри пищеварительных вакуолей акантамеб. В связи с чем необходимо оценить участие метаболизма жирных кислот при инфекции.
- Исследование полного транскриптома сальмонелл на поздних стадиях взаимодействия с акантамебами.
- Подтверждение полученных данных по транскриптому сальмонелл с помощью мутантов по отдельным генам.
- Исследования взаимодействия сальмонелл с акантамебами с целью оценки ответа акантамеб на инвазию сальмонелл.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

CSTT — система секреции третьего типа

ЛПС — липополисахариды

SPI — *Salmonella* pathogenicity island

COG — кластеры ортологичных групп белков

NGS — секвенирование следующего поколения

ЦТК — цикл трикарбоновых кислот

ГЦ — глиоксилатный цикл

SCV — вакуоли содержащие сальмонелл

ПЦР — полимеразная цепная реакция

PYG — peptone-yeast-glucose medium

PAS — Page's Amoeba Saline

KOE — Колониеобразующие единицы

GSEA — Анализ обогащения по функциональной принадлежности

KEGG — Киотская энциклопедия генов и геномов

OSR — Реакция на окислительный стресс

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых научных изданиях

1. Балкин А.С., Черкасов С.В. Модель взаимодействия *Acanthamoeba castellanii* с бактериями *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028S // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2017. – № 9 (209). – С. 47-50. [РИНЦ]
2. Balkin A.S., Plotnikov A.O., Gogoleva N.E., Gogolev Y.V., Demchenko K.N., Cherkasov S.V. Cappable-Seq Reveals Specific Patterns of Metabolism and Virulence for *Salmonella* Typhimurium Intracellular Survival within *Acanthamoeba castellanii* // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – V. 22. – № 16. – P. 9077. [Scopus Q1, WOS Q1, РИНЦ]
3. Balkin A.S., Cherkasov S.V., Gogolev Y.V., Plotnikov A.O. The Phase-Specific Dynamics in Gene Expression of *Salmonella* Typhimurium During *Acanthamoeba castellanii* Infection // Current Microbiology. – 2025. – V. 82. – P. 270. [Scopus Q2, WOS Q3, РИНЦ]
4. Balkin A., Plotnikov A., Konnova T., Shagimardanova E., Hamo H., Gogolev Y., Gogoleva N. Cappable-seq RNA-sequencing data sets of *Escherichia coli* K-12 MG1655 treated with novobiocin, tetracycline, and rifampicin // Microbiology Resource Announcements. – 2025. – V. 14. – № 2. – P. e01194-24. [Scopus Q3, WOS Q4, РИНЦ]

Публикации в сборниках материалов конференций

5. Гоголев Ю.В., Гоголева Н.Е., Исмаилов Т.Т., Осипова Е.В., Балкин А.С., Севастьянов А.С. Транскриптомное профилирование бактерий в растительно-микробных и протисто-бактериальных патосистемах / II объединенный научный форум. VI съезд физиологов СНГ. VI съезд биохимиков России. IX российский симпозиум "Белки и пептиды" (Сочи, Дагомыс, 01–06 октября 2019) // Acta Naturae (русскаяязычная версия). – 2019. – Т. 11, № S2. – С. 12. [РИНЦ]
6. Балкин А.С., Плотников А.О., Гоголева Н.Е., Гоголев Ю.В., Черкасов С.В. Особенности метаболизма и вирулентности *Salmonella* Typhimurium в условиях фагоцитоза *Acanthamoeba castellanii* // Микробные симбиозы в природных и экспериментальных экосистемах: сборник тезисов, Оренбург, 04–08 октября 2021 // Оренбург: Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук, 2021. – С. 43-44. [РИНЦ]
7. Гоголев Ю.В., Коннова Т.А., Осипова Е.В., Гоголева Н.Е., Хамо Хамза Х.Х., Балкин А.С. Структура транскриптомов бактерий и метатранскриптомика патосистем / Международный Конгресс "VIII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 300-летию российской науки и высшей школы" : Сборник тезисов, Саратов, 14–19 июня 2024. // Санкт-Петербург: ООО Издательский дом "Петрополис", 2024. – С. 68. [РИНЦ]