

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ОРЕНБУРГСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ИНСТИТУТ КЛЕТОЧНОГО И ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО СИМБИОЗА
УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

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)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Черкасов Сергей Викторович
доктор медицинских наук,
академик РАН

Оренбург – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. САЛЬМОНЕЛЛЫ КАК ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ ПАТОГЕНЫ: ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СИСТЕМ ПАТОГЕННОСТИ ПРИ ИНФЕКЦИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	13
1.1. Метаболизм сальмонелл внутри клеток-хозяев при инфекции	14
1.1.1. Метаболизм углерода	15
1.1.2. Метаболизм липидов	16
1.1.3. Метаболизм аминокислот	17
1.2. Участие систем секреции и плазмид вирулентности сальмонелл во внутриклеточном паразитировании	19
1.2.1. Система секреции III типа первого островка патогенности сальмонелл (ССТТ-1).....	20
1.2.2. Система секреции III типа второго островка патогенности сальмонелл (ССТТ-2).....	22
1.2.3. Система секреции I типа.....	24
1.2.4. Система секреции IV типа.....	25
1.2.5. Система секреции VI типа.....	25
1.2.5. Плазмиды вирулентности и секреции.....	26
1.3. Функциональные системы и клеточные структуры, участвующие во взаимодействии сальмонелл с клеткой хозяина	27
1.3.1. Экспрессия регуляторных генов.....	27
1.3.2. Транспорт ионов.....	29
1.3.3. Ответ на окислительный стресс.....	31
1.3.2. Жгутики, филаменты и ворсинки	33
1.4. Экспрессия генов сальмонелл при взаимодействии с макрофагами, эпителиоцитами и фибробластами.....	34
1.5 Взаимодействие сальмонелл со свободноживущими простейшими при внутриклеточной локализации	41
1.5.1. Простейшие как природный резервуар патогенных бактерий.....	41
1.5.2. Ассоциация сальмонелл со свободноживущими простейшими	44
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	51
2.1 Объекты исследования и среды культивирования	51
2.2 Методы исследования.....	51
2.2.1 Совместное культивирование сальмонелл и акантамеб	51
2.2.2 Оценка общего числа и доли жизнеспособных клеток амёб.....	52

2.2.3 Оценка динамики численности сальмонелл.....	53
2.2.4 Получение флуоресцентно меченного штамма <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium 14028S и оценка численности внутриклеточных сальмонелл методом конфокальной лазерной микроскопии	54
2.2.5 Подготовка образцов для выделения РНК в экспериментах по оценке транскриптома сальмонелл на ранней стадии взаимодействия с акантамебами	54
2.2.6 Контроль внеклеточных сальмонелл	55
2.2.7 Выделение тотальной РНК и оценка качества полученных препаратов	56
2.2.8 Подготовка библиотек для секвенирования.....	57
2.2.9 Количественная ПЦР в режиме реального времени.....	58
2.2.10 Биоинформатический анализ данных	60
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ <i>ACANTHAMOEBA CASTELLANII</i> С БАКТЕРИЯМИ <i>SALMONELLA ENTERICA</i> SEROVAR TYPHIMURIUM 14028S	62
3.1 Динамика жизнеспособности и численности сальмонелл и акантамеб в чистой культуре и при модельной инфекции.....	62
3.1.1 Подбор оптимальной среды культивирования и определение параметров заражения амёб для оценки экспрессии генов на ранних этапах взаимодействия.....	63
3.1.2 Динамика численности амёб и оценка соотношения жизнеспособных и мертвых клеток при длительном сокультивировании с сальмонеллами	68
3.1.3 Динамика численности жизнеспособных сальмонелл при совместном культивировании с амёбами на различных сроках инфекции.....	72
3.2. Обсуждение полученных результатов	73
ГЛАВА 4. ТРАНСКРИПТОМ САЛЬМОНЕЛЛ НА РАННЕЙ СТАДИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С <i>ACANTHAMOEBA CASTELLANII</i>	77
4.1 Характеристика транскриптомных библиотек и результаты картирования прочтений.....	77
4.2 Транскрипционный профиль сальмонелл внутри фагосом акантамеб	79
4.2.1 Особенности экспрессии генов метаболических путей и функциональных групп генов сальмонелл	79
4.2.2 Экспрессия генов сальмонелл, кодирующих захват железа и ответ на стресс	81
4.2.3 Экспрессия генов патогенности и вирулентности.....	84
4.2.4 Анализ экспрессии отдельных генов сальмонелл при инфекции <i>Acanthamoeba castellanii</i> методом ПЦР в режиме реального времени.....	85
4.3 Обсуждение полученных результатов	86

4.3.1 Регуляция метаболизма углерода и аминокислот сальмонелл на ранней стадии инфекции акантамеб.....	88
4.3.2 Поглощение железа и окислительный стресс при инфекции.....	91
4.3.3 Регуляция систем патогенности и подвижности на ранней стадии инфекции акантамеб	94
4.3.4 Воспроизводимость данных, полученных методом Cappable-Seq по сравнению с результатами ПЦР в режиме реального времени	96
4.3.5 Особенности транскрипционного профиля <i>S. Typhimurium</i> 14028S на ранней стадии взаимодействия с <i>A. castellanii</i>	97
ГЛАВА 5. ДИНАМИКА ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ <i>SALMONELLA</i> TYPHIMURIUM НА РАЗЛИЧНЫХ ЭТАПАХ ИНФЕКЦИИ <i>ACANTHAMOEBA CASTELLANII</i>	101
5.1 Анализ динамики экспрессии генов метаболизма углерода, захвата железа, ответа на окислительный стресс, факторов патогенности, ингибиторов лизоцима и хемотаксис методом количественной ПЦР в реальном времени.....	101
5.1 Обсуждение полученных результатов	106
5.1.1 Динамика экспрессии генов гликолиза и глиоксилатного цикла	106
5.1.2 Регуляция генов захвата железа и ответа на окислительный стресс на различных сроках инфекции акантамеб	107
5.1.3 Особенности экспрессии генов патогенности и вирулентности сальмонелл на различных сроках инфекции акантамеб	110
5.1.4 Экспрессия генов хемотаксиса и ингибиторов лизоцима при инфекции акантамеб	112
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	116
ВЫВОДЫ	121
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	122
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	122
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	124
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	161

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Сальмонеллы – род грамотрицательных энтеробактерий, которые могут заражать широкий круг хозяев, включая рептилий, птиц и млекопитающих. Сальмонеллы являются ведущей причиной гастроэнтеритов во всем мире [efsa, 2023, White et al., 2022, Любимова и соавт., 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, Martín-González, 2021]. Однако сальмонеллы могут выживать и даже размножаться в фагосомах эукариот [Amaro, Martín-González, 2021]. Для этого бактерии выработали стратегии адаптации, такие как морфологические изменения, повышенная подвижность, образование биопленки, выработка токсичных метаболитов и устойчивость к лизосомальному перевариванию [Matz, Kjelleberg 2005; Zhang et al. 2014]. По этой причине некоторые протисты являются резервуаром сальмонелл во внешней среде [Gaze et al., 2003, Douesnard-Malo, Daigle, 2011, Moreno-Mesonero et al., 2020, Tezcan-Merdol et al., 2004, Riquelme et al., 2016]. Более того, сокультивирование сальмонелл с протистами приводит к усилению вирулентности и антибиотикоустойчивости бактерий [Balczun, Scheid, 2017, Molmeret et al., 2005, Carlson et al., 2007, Amaro, Martín-González, 2021], а механизмы защиты от переваривания со стороны протистов могут использоваться при инфекции млекопитающих [Molmeret et al., 2005, Amaro, Martín-González, 2021]. Поэтому изучение взаимодействия между сальмонеллами и простейшими имеет решающее значение для борьбы с сальмонеллезом человека и животных.

В последние годы изучению взаимодействия сальмонелл с гетеротрофными протистами уделяется большое внимание. Появляется все

больше сообщений об обнаружении сальмонелл при изучении микробиомов протистов, выделенных из водных биотопов [Liu et al., 2018; Moreno-Mesonero et al., 2020; Vingataramin et al., 2025], а также в клинических изолятах акантамеб [Rayamajhee et al., 2022; Iovieno et al., 2010; Rayamajhee et al., 2024]. Но несмотря на большую экологическую и эпидемиологическую значимость сальмонелл, молекулярно-генетические аспекты их взаимодействия с простейшими изучены недостаточно. Большая часть опубликованных работ посвящена системам патогенности и вирулентности, либо отдельным генам. Так, по данным количественной ПЦР известно, что экспрессия генов островков патогенности сальмонелл (SPI) демонстрирует схожую динамику как внутри фагосом простейших, так и в макрофагах млекопитающих [Bleasdale et al., 2009]. Анализ взаимодействий различных мутантов *S. Typhimurium* и социальных амёб *Dictyostelium discoideum* показал, что для выживания сальмонеллы внутри протистов также необходимы гены, отвечающие за биосинтез ароматических соединений, липополисахаридов, системы секреции типа III (T3SS), кодируемые в SPI-1 и SPI-2, систему секреции типа VI (T6SS) и двухкомпонентную систему PhoP/PhoQ [Riquelme et al., 2016]. Целлюлозосинтаза BcsA, продуцируемая *S. typhimurium*, подавляет ассоциацию сальмонелл с *A. castellanii* [Gill et al., 2018]. Пили первого типа способствуют адгезии и поглощению сальмонелл, но не влияют на выживаемость внутри акантамеб [Mannan et al., 2020].

На сегодняшний день опубликованы всего два исследования, описывающих глобальную экспрессию генов сальмонелл, поглощенных гетеротрофными протистами, в частности инфузориями *Tetrahymena sp.* и свободноживущими амёбами *Acanthamoeba rhysodes* [Rehfuss et al., 2011; Feng et al., 2009]. В данных работах продемонстрировано, что множество генов, необходимых для выживания и репликации сальмонелл в фагоцитах млекопитающих, также активируются в клетках простейших [Rehfuss et al., 2011; Feng et al., 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 высоких затрат. Однако, в последние годы были разработаны подходы к получению библиотек для секвенирования [Sharma et al., 2010; Ettwiller et al., 2016], позволяющие эффективно извлекать транскрипты бактерий из смеси с РНК эукариот. Исследование глобальной экспрессии генов сальмонелл внутри фагосом протистов помогают 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 был применен метод Carrable-Seq для селективного обогащения первичных транскриптов мРНК сальмонелл, позволивший существенно снизить долю рибосомальной РНК бактерий и акантамеб в смеси тотальной РНК. Впервые проведен полнотранскриптомный анализ экспрессии генов сальмонелл при фагоцитозе акантамеб 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. 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).

Теоретическая и практическая значимость работы

Исследование вносит существенный вклад в фундаментальное понимание экологии, эволюции и механизмов выживания сальмонелл, раскрывая их сложные взаимодействия с простейшими, являющиеся ключевым фактором сохранения патогенов в окружающей среде. Данные о схожести факторов вирулентности, используемых для преодоления фагоцитоза амёбами и профессиональными фагоцитами, поддерживают гипотезу о том, что взаимодействие с простейшими служит «тренировкой» и поддерживает вирулентный потенциал сальмонелл в окружающей среде. Успешное применение метода Carrable-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 взаимодействий бактерий (включая патогенных) с широким кругом эукариот. Практическая значимость работы заключается в разработке модели взаимодействия «сальмонелла-амеба», которая открывает перспективы для разработки принципиально новых стратегий контроля сальмонелл в окружающей среде, направленных на разрыв связи «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 амёб, 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 «Персистенция и симбиоз микроорганизмов» с международным участием, посвященной 300-летию Российской академии наук, Десятилетию науки и технологии (Оренбург, 2023) – устный доклад. Апробация 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., академику РАН С.В. Черкасову за неоценимую помощь в проведении исследований на всех этапах работы, ценные советы и рекомендации, а также слова поддержки в моменты, когда я сомневался в своих данных. Автор выражает глубокую благодарность к.м.н., доценту А.О. Плотникову за постоянную консультацию по вопросам проведения исследований, помощь в написании статей, закупку аксеничной культуры *A. castellanii* и возможность участвовать в международных конференциях и стажировках; д.б.н. Гоголеву Ю.В. и к.б.н. Гоголевой Н.Е. за помощь в организации и проведении высокопроизводительного секвенирования, введение в мир биоинформатики и теплое, дружеское отношение; научному сотруднику лаборатории молекулярной биологии, к.б.н., Конновой Татьяне Анатольевне, за помощью в проведении исследований в казанском институте биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН; д.б.н. Демченко К.Н. — за помощь в проведении конфокальной лазерной микроскопии и обработки изображений. Отдельные благодарности моей жене, Наде, за то, что прошла со мной весь этот путь и всегда с пониманием относилась к задержкам на работе и длительным командировкам, а также моей семье, которая терпеливо ждала моей защиты и всегда в меня верила.

ГЛАВА 1. САЛЬМОНЕЛЛЫ КАК ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ ПАТОГЕНЫ: ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СИСТЕМ ПАТОГЕННОСТИ ПРИ ИНФЕКЦИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Сальмонеллы – большая группа грамотрицательных, факультативно анаэробных, неспорообразующих бактерий, относящихся к семейству Enterobacteriaceae. Род *Salmonella* включает два вида, *Salmonella bongori* и *Salmonella enterica*, последний в свою очередь делится на 6 подвидов: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, и *indica* [Guibourdenche et al. 2010; Cobo-Simón et al., 2023]. Среди всех подвидов *S. enterica* subsp. *enterica* является единственным, который может инфицировать млекопитающих и связан с заболеваниями человека. Штаммы, относящиеся к *S. enterica* subsp. *enterica* вызывают около 99% сальмонеллезных инфекций человека и теплокровных животных [McClelland et al., 2001]. Сальмонеллез остается вторым наиболее распространенным зоонозом после кампилобактериоза, несмотря на значительное снижение подтвержденных случаев в Европе с 2008 года [efsa, 2023]. В 2022 году было зафиксировано 65 208 подтвержденных случаев сальмонеллеза в Европе [efsa, 2023], а во всем мире детектируются миллионы случаев инфекции и сотни тысяч смертельных случаев [Lamichhane et al., 2024]. Сальмонеллы являются основной причиной гастроэнтеритов и серьезной проблемой общественного здравоохранения во всем мире [Feasey et al., 2012, White et al., 2022, Любимова и соавт., 2023], при этом растет озабоченность по поводу появления и распространения штаммов, устойчивых к противомикробным препаратам [Yang et al., 2020], в том числе в промышленно развитых странах [Yang et al., 2020, Tacconelli et al., 2018].

Различают тифоидные и нетифоидные сальмонеллы. Высокоспецифичные к человеку тифоидные серовары, такие как *S. Typhi*, *S. Paratyphi* и *S. Sendai*, вызывают системную инфекцию, известную как брюшной тиф или паратиф [Parry et al., 2002]. Эти серовары могут передаваться через воду, молоко, сырые овощи, морепродукты и зараженные

яйца. Нетифоидные серовары, такие как *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium имеют широкий круг хозяев, и у людей они чаще всего вызывают самокупирующийся гастроэнтерит [Acheson, Hohmann, 2001]. Эти серовары в основном передаются через продукты животного происхождения, такие как говядина, свинина, птица и зараженные сырые яйца, хотя переносчиками могут также служить морепродукты и растения (фрукты и овощи) [Berger et al., 2010, Ferrari et al., 2019]. Некоторые серовары способны инфицировать растения, вызывая, многочисленные вспышки сальмонеллеза [Nygard et al. 2008; Wiedemann et al., 2015]. Серовары других подвидов были чаще выделены от холонокровных животных или из внешней среды, нежели от людей [Uzzau et al. 2000]. Кроме того, некоторые серовары сальмонелл способны выживать и размножаться внутри свободноживущих протистов [Gaze et al., 2003, Douesnard-Malo, Daigle, 2011, Moreno-Mesonero et al., 2020, Tezcan-Merdol et al., 2004, Riquelme et al., 2016].

Сальмонеллы отличаются способностью хорошо расти в различных условиях на многих питательных средах, в том числе в анаэробных условиях [Бухарин и соавт., 2000]. Чтобы выживать и размножаться в таком широком спектре условий окружающей среды сальмонеллам необходимо иметь не только развитые системы патогенности, системы защиты от стрессовых факторов, но и хорошо адаптировать метаболизм к доступным источникам углерода [Rosenkrantz et al., 2013]. Геном сальмонелл включает более 4000 генов, кодирующих широкое разнообразие систем патогенности, вирулентности, метаболических путей, что позволяет им успешно колонизировать доступные ниши.

1.1. Метаболизм сальмонелл внутри клеток-хозяев при инфекции

Чтобы выжить и эффективно размножаться в клетках-хозяевах, внутриклеточные патогены вынуждены адаптировать свой метаболизм к доступным питательным веществам и встречающимся физическим условиям (главным образом к рН, доступности кислорода и осмотическому давлению)

[Ray et al., 2009; Brown et al., 2008; Smith, 2020]. Пролиферация сальмонелл *in vivo* требует синтеза таких компонентов биомассы, как белки, углеводы, липиды и нуклеиновые кислоты из низкомолекулярных предшественников. Сальмонеллы могут получать эти предшественники из собственных запасов, таких как гликоген и липиды (для ограниченного числа делений), или непосредственно из микроокружения хозяина (аминокислоты) и/или синтезировать их из нескольких основных источников углерода (ацетат, глицерин и глюкоза), азота (аммоний), серы (сульфаты) и фосфора (фосфаты). В многочисленных нишах, которые бактерии могут заселить в телах позвоночных, существует более 100 доступных источников углерода, а также различные источники азота, фосфора и серы [Brown et al., 2008, Eisenreich et al., 2010].

1.1.1. Метаболизм углерода

На различных моделях было показано, что глюкоза является основным источником углерода при сальмонеллезной инфекции [Eisenreich et al., 2010; Eriksson et al., 2003; Tchawa Yimga et al., 2006, Bowden et al., 2009]. Тем не менее, успешность колонизации сальмонелл зависит от доступности глицерина, жирных кислот, N-ацетилглюкозамина, глюконата, глюкозы, лактата и аргинина [Steeb et al., 2013]. На сегодняшний день нет устоявшегося мнения о том, какой именно метаболический путь катаболизма глюкозы более предпочтителен. Наиболее вероятными путями метаболизма глюкозы является путь Энтнера-Дудорова и гликолиз [Eisenreich et al., 2010, Eriksson et al., 2003]. Мутанты, дефектные по гликолизу и транспорту глюкозы, сильно аттенуированы при репликации в мышинных макрофагах линии RAW 264.7 [Bowden et al., 2009]. Было также высказано предположение, что при инфекции мышей линии BALB/c *S. Typhimurium* штамм SR-11 растет в смешанном режиме с использованием лимитированных гликолитических сахаров, а также либо аминокислот, либо промежуточных продуктов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), что обеспечивает непрерывное образование пирувата из малата [Mercado-Lubo et al., 2009]. Таким образом, основным путем метаболизма

доступных углеводов у сальмонелл является гликолиз, после чего включается цикл трикарбоновых кислот в сочетании с аэробным дыханием, включающим убихинон как основной путь обеспечения энергии.

Ранее считалось, что глиоксилатный шунт необходим для персистенции сальмонелл *in vivo*, но не для острой фазы инфекции [Fang et al., 2005]. Однако в исследовании инфекции мышинных макрофагов RAW 264.7 обнаружено, что экспрессия генов глиоксилатного шунта *aceBA* усиливается с первых часов инфекции у мышей, и остается высокой в течение 16 часов после заражения даже в присутствии повышенной концентрации глюкозы. Затем, через 24 часа после заражения, наблюдалось резкое снижение процента бактерий, экспрессирующих эти гены [Diacovich et al., 2016]. Кроме того, в средах без глюкозы с добавлением олеиновой кислоты была обнаружена низкая популяция сальмонелл, экспрессирующих *aceBA*. Это позволяет предположить, что ферменты, участвующие в глиоксилатном цикле, могут иметь меньшее значение для длительной инфекции в макрофагах [Diacovich et al., 2016].

1.1.2. Метаболизм липидов

В то время как потребность сальмонелл в глюкозе во время системной инфекции не вызывает сомнений, данные об использовании липидов неоднозначны. Некоторые исследования мутантных штаммов, лишенных ключевых ферментов в метаболизме липидов, не сообщают о снижении вирулентности [Tchawa Yimga et al., 2006, Kim et al., 2006, Spector et al., 1999], однако другие демонстрируют ее ослабление [Steeb et al., 2013, Fang et al., 2005]. В то время как транскриптомные и протеомные данные не указывают на значительную индукцию генов метаболизма липидов во время заражения макрофагов или мышей [Becker et al., 2006, Eriksson et al., 2003, Shi et al., 2006, Li et al., 2019], недавняя работа, выполненная на отдельных клетках (single-cell) с применением флуоресцентных репортеров, продемонстрировала, что сальмонеллы используют липиды внутри макрофагов и дендритных клеток человека [Xu et al., 2019]. *Salmonella*, как и *Escherichia coli*, содержит полный

набор генов бета-окисления для катаболизма жирных кислот (*fad*) и способна расти в фосфатидил-серине и олеиновой кислоте в качестве единственных источников углерода [Zhang, Rock, 2009; Iram, Cronan, 2006]. Кроме того, сообщалось, что экспрессия гена ацил-кофермента альфа-дегидрогеназы (*fadE*) из цикла бета-окисления индуцируется во время инфекции в эпителиальных клетках [Spector et al., 1999], что позволяет предположить, что среда внутри вакуолей содержит жирные кислоты, которые используются как источники углерода и энергии. В соответствии с этой гипотезой в данной модели была выявлена ограниченная концентрация глюкозы внутри клеток. Эти результаты позволяют предположить, что доступность различных метаболитов в вакуолях, содержащих сальмонеллы (*salmonella-containing vacuoles*, SCV), может изменяться в ходе инфекции, увеличивая зависимость от жирных кислот и утилизации ацетата при длительной инфекции [Diacovich et al., 2016, Reens et al., 2019].

1.1.3. Метаболизм аминокислот

Помимо метаболизма углерода, важную роль в инфекции сальмонелл занимают процессы метаболизма аминокислот. Сальмонеллы используют различные аминокислоты в клетках хозяев, включая аргинин, глутамин, аспарагиновая кислота, аспарагин, аланин и пролин [Popp et al. 2015]. Репликация ауксотрофов по данным аминокислотам заметно снижалась внутри клеток линии HeLa и макрофагов линии RAW264.7 [Popp et al. 2015]. На модельной инфекции мышей установлено, что сальмонеллы имеют доступ к практически всем аминокислотам за исключением пролина [Steeb et al., 2013]. В то же время, было показано, что количество получаемых от клетки-хозяина аминокислот, вероятно, недостаточно для обеспечения размножения сальмонелл [Popp et al. 2015]. Так, сальмонеллам требуется самостоятельно синтезировать по крайней мере аспарагин и пролин для выживания и репликации.

L-аргинин – единственная аминокислота, которая идентифицирована как одно из семи ключевых питательных веществ, поддерживающих полную вирулентность сальмонеллы у мышей [Steeb et al., 2013]. Кроме того, аргинин, по-видимому, служит дополнительным источником углерода и азота [Steeb et al., 2013]. Сальмонеллы способны снижать содержание клеточного аргинина в клетке хозяина за счет индукции экспрессии аргиназы II клетки-хозяина [Bumann, Schothorst, 2017], а также с помощью «кражи» путем транспорта с использованием аргининпермеазы ArgT. Оба процесса могут лишить клетки-хозяина предшественника для выработки активных форм азота [Das et al., 2010], тем самым способствовать успешному выживанию сальмонелл.

Цистеин является ключевой аминокислотой во время окислительного стресса у сальмонелл. В исследовании биосинтеза цистеина во время окислительного стресса его регуляция у мутантов была заблокирована, в результате чего факторы защиты от окислительного стресса, кодируемые генами *katG* и *soxS*, активизировались по сравнению со штаммом дикого типа [Turnbull, Surette, 2010]. Следовательно, цистеин и его производные, такие как тиоредоксин, играют важную роль для выживания и репликации внутриклеточных сальмонелл. Это дополнительно подтверждается тем, что оксидоредуктаза тиоредоксин 1 (TrxA) также индуцируется и необходима для активности системы секреции второго островка патогенности в условиях, симулирующих среду внутри вакуолей хозяина [Negrea et al., 2009].

Известно, что продукция лизина у сальмонелл усиливается в ответ на кислотный стресс. Далее происходит декарбоксилирование лизина и образование кадаверина, который подвергается протонированию в кислой среде и повышает внешний pH [Slonczewski, 2009]. На модели желудочно-кишечной инфекции мышей наблюдалось усиление активности декарбоксилазы CadA, что позволяет сальмонеллам противостоять внутриклеточному закислению и высокими концентрациями антимикробных короткоцепочечных жирных кислот [Radlinski et al., 2024].

Сальмонеллы имеют доступ к широкому спектру различных питательных веществ в организме хозяина. Однако количественное моделирование всей метаболической сети сальмонелл, основанное на всех доступных экспериментальных данных, показало серьезное общее ограничение роста сальмонелл питательными веществами [Claudi et al., 2014]. Это свидетельствует о том, что, хотя микросреда организма-хозяина содержит разнообразные питательные вещества, они доступны в ограниченных количествах, что приводит к замедлению роста со средним временем генерации около 6 часов [Becker et al., 2006; Claudy et al., 2014]. Кроме того, высокие концентрации глюкозы, содержащиеся в среде для выращивания клеток-хозяев, обычно используемой для экспериментов, могут маскировать тонкую метаболическую настройку патогена во время инфекции [Diasovich et al., 2016]. Недавние исследования выявили существенные различия в метаболизме сальмонелл и механизмах вирулентности в зависимости от конкретных типов клеток-хозяев и экспериментальных условий [Bumann, Schothorst, 2017], в связи с чем необходимо изучать поведение патогена при взаимодействии с различными хозяевами в широком спектре условий.

1.2. Участие систем секреции и плазмид вирулентности сальмонелл во внутриклеточном паразитировании

Способность сальмонелл занимать внутриклеточную нишу определяется наличием двух систем секреции III типа (ССТТ). ССТТ — это системы доставки белков, которые играют ключевую роль в кишечной инвазии и патогенезе бактерий. Гены, кодирующие ССТТ, расположены в пределах нескольких островков патогенности сальмонелл (SPI). Островки патогенности (PI) — это отдельные генетические элементы, которые обычно отсутствуют в геномах непатогенных репрезентативных штаммов того же вида или близкородственных видов, которые, как известно, вызывают заболевания [Gal-Mor, Finlay, 2006]. В настоящее время у сальмонелл идентифицировано 24 SPI. Недавно исследование показало [Zhao et al., 2020],

что восемь SPI (SPI-1 – SPI-6, SPI-9 и SPI-11) присутствуют во всех 450 штаммах *S. enterica* из 49 сероваров, оцененных в их исследовании, в то время как остальные SPI были по-разному распределены между различными штаммами/сероварами [Zhao et al., 2020]. ССТТ-1, кодируемая первым островком патогенности сальмонелл (SPI-1), необходима для эффективного проникновения внутрь нефагоцитирующих клеток. Напротив, кодируемая в SPI-2 система ССТТ-2 активируется после проникновения сальмонелл внутрь клетки-хозяина и требуется для процессов, следующих за инвазией. В последние годы отчетливое разделение функций между ССТТ-1 и ССТТ-2 постепенно уменьшается, поскольку несколько эффекторов ССТТ-1 играют роль во внутриклеточном выживании бактерий [Lou et al., 2019]. Эффекторы обеих систем участвуют в биогенезе SCV — модифицированной фагосомы, которая является внутриклеточной нишей для сальмонелл.

1.2.1. Система секреции III типа первого островка патогенности сальмонелл (ССТТ-1)

SPI-1 представляет собой регион размером 40 Кб, кодирующий ССТТ-1, и преимущественно связан с ранними стадиями взаимодействия сальмонеллы с клеткой-хозяином. ССТТ-1 представляет собой секреторный аппарат, который проникает через бактериальную оболочку с помощью инъектисомы, которая простирается от цитоплазматической поверхности внутренней мембраны бактерии до мембраны клетки-хозяина [Han et al., 2024a]. Эффекторы ССТТ-1 выполняют очень разные функции и участвуют на разных стадиях инфекции сальмонеллы, включая перестройку цитоскелета хозяина и вторжение в эпителиальные клетки, манипуляцию иммунным ответом хозяина и воспалительными реакциями, а также метаболизм клеток [Brawn et al., 2007; Collier-Hyams et al., 2002; Miold et al., 2001; Khoo et al., 2015]. Другие эффекторы ССТТ-1 вносят вклад в различные процессы после интернализации, такие как выживание внутри клеток хозяина и изменение

воспалительного ответа. SopA, SopB, SopD, SopD2, SopE и SopE2 являются секретируемыми эффекторами и кодируются вне SPI-1.

Экспрессия SPI-1 запускается под контролем двух активаторов транскрипции, InvF и HilA. HilA, закодированный в SPI-1, является активатором транскрипции семейства *ompR/toxR* и функционирует как центральный регулятор CCTT-1. Он напрямую активирует транскрипцию промоторов *prg/org* и *inv/spa* [Bajaj et al., 1995; Thijs et al., 2007]. Экспрессия HilA напрямую контролируется тремя AraC-подобными регуляторами: HilC, HilD и RtsA, которые активируют HilA [Ellermeier, Slauch, 2003; Schechter, Lee, 2001; Olekhnovich, Kadner, 2002]. HilE функционирует как ключевой негативный регулятор экспрессии *hilA*, связываясь с HilD и инактивируя его, что впоследствии предотвращает активацию и экспрессию HilA [Paredes-Amaya et al., 2018].

InvF — это транскрипционный активатор семейства AraC, который активирует экспрессию нескольких эффекторов CCTT-1 [Thijs et al., 2007, Darwin et al., 1999]. HilA и InvF действуют совместно, регулируя экспрессию CCTT-1 и его секретируемых белков на разных стадиях [Thijs et al., 2007]. Регуляторная сеть CCTT-1 очень сложна, и в дополнение к HilA и InvF, несколько других регуляторов влияют на экспрессию CCTT-1, взаимодействуя с основной регуляторной сетью.

Вскоре после эндоцитоза эффекторы CCTT-1 обращают вспять физиологические изменения в клетке-хозяине, которые способствовали вторжению, и сальмонелла активирует механизмы, способствующие их выживанию и размножению внутри клетки-хозяина. Эффекторы, введенные CCTT-1 в цитоплазму клетки-хозяина, вызывают интенсивное ремоделирование актинового цитоскелета и плазматической мембраны, что приводит к образованию мембранных выступов вокруг места контакта клетки-хозяина с бактериями [LaRock et al., 2015]. После попадания сальмонеллы в клетки-мишени образуются SCV, которые представляют собой модифицированные фагосомы, слияние которых с лизосомами

предотвращается посредством активности эффекторов ССТТ-1 и ССТТ-2 [Han et al., 2024a]. После того, как сальмонеллы проникают в нефагоцитарные клетки-хозяева, бактерия может размножаться внутри SCV, что имеет решающее значение для вирулентности сальмонеллы. Эта репликация инициируется через 4–6 часов после вторжения и позволяет SCV играть ключевую роль в выживании бактерий в фагоцитарных клетках, таких как дендритные клетки и макрофаги [Han et al., 2024a].

1.2.2. Система секреции III типа второго островка патогенности сальмонелл (ССТТ-2)

Эффекторы ССТТ-1 играют ключевую роль на ранних стадиях биогенеза SCV, тогда как ССТТ-2 необходима для более поздних этапов активации SCV, таких как инициация бактериальной репликации и образование индуцированных сальмонеллами филаментов [Waterman, Holden, 2003]. Выживание и репликация сальмонелл в эпителиальных клетках и макрофагах разных хозяев напрямую зависит от ССТТ-2. Активность ССТТ-2 индуцируется внутри SCV клетки-хозяина и необходима как для модуляции внутриклеточной среды, так и поддержания целостности SCV. ССТТ-2 также участвует в контроле различных функций клетки-хозяина, позволяя уклоняться от антибактериальных стратегий и способствовать внутриклеточной пролиферации [Han et al., 2024a].

Существует по крайней мере 28 эффекторных белков, которые могут быть транслоцированы через ССТТ-2. Гены, кодирующие эти эффекторы, индуцируются, когда бактерия находится в SCV или фагосоме клетки-хозяина. В целом, гены, расположенные в SPI-2, можно разделить по их функциям: гены, кодирующие эффекторы ССТТ-2, которые включают *sseABCDEF*; гены, кодирующие их специфические шапероны, такие как *sscA* и *sscB*; и гены, кодирующие регуляторные белки SPI-2, включая *ssrA* и *ssrB* [Hensel, 2000]. Не все сальмонеллы содержат полный набор эффекторов ССТТ-2. Ряд эффекторов, включая PipB, PipB2, SseF, SifA, SseG, SteA и SteD, являются

основными эффекторами, которые обычно присутствуют во всех сероварах, что указывает на их важную роль в вирулентности сальмонелл у различных хозяев. Напротив, гены для SifB, SlrP, SopD2, SseJ, SseK2, SseL, SteB и SteC кодируются спорадически и распространены в сероварах, связанных с кишечными инфекциями [Jennings et al., 2017]. Дополнительная группа эффекторов, включая GogB, GtgA, GtgE, SpvBCD, SrfJ, SseI, SseK1, SseK3, SspH1, SspH2 и SteE, являются дополнительными эффекторами, которые кодируются на мобильных генетических элементах и спорадически связаны с различными сероварами [Jennings et al., 2017].

С точки зрения биохимических функций эффекторы CCTT-2 очень разнообразны. Различают эффекторы, которые участвуют в поддержании SCV. К ним можно отнести PipB2, SifA, SopD2 и SseJ, которые участвуют в поддержании целостности вакуолярной мембраны. Эффекторы CCTT-2, которые контролируют позиционирование SCV вблизи комплекса Гольджи. К ним можно отнести эффекторы SseF и SseG. Эффекторы CCTT-2 SopA, SlrP, SspH1 и SspH2 участвуют в посттрансляционных модификациях, что является важной стратегией, используемой сальмонеллой для обеспечения ее внутриклеточного выживания [Han et al., 2024a]. Эффекторы SteC, SspH2, SrfH и SpvB воздействуют на цитоскелет хозяина после бактериального поглощения. Посредством данных эффекторов сальмонеллы умело манипулируют клеткой-хозяином посредством сборки F-актина на мембране SCV, чтобы обеспечить специализированную нишу для своего собственного внутриклеточного выживания и репликации [Meresse et al., 2001]. Эффекторы SteA и SifA регулируют разделение мембраны SCV во время деления бактерий. Эффекторы, которые регулируют врожденную иммунную сигнализацию, включают GogA, GogB, GtgA, PipA, SpvC, SpvD, SseK1, SseK2, SseK3 и SspH1, которые демонстрируют способность ингибировать сигнальные пути врожденной иммунной системы [Chakravorty et al., 2005]. К эффекторам, модулирующим адаптивную иммунную сигнализацию, можно отнести PipB2, SifA, SlrP, SopD2 и SspH2, которые участвуют в ингибировании

презентации антигена в дендритных клетках [Halici et al., 2008; Cerny и Holden, 2019]. Кроме того, существует еще ряд эффекторов CCTT-2 (SpiC/SSaB, GtgE, SteE, SteE, SrfT et al.), имеющих специфические функции.

Гены CCTT-2 экспрессируются только внутри SCV в ответ на низкий уровень железа, низкий pH, низкие концентрации питательных веществ, а также активные формы кислорода и азота (АФК/АФА) [Chakravortty et al., 2005]. Регуляция CCTT-2 осуществляется через двухкомпонентную систему SsrA-SsrB, в которой SsrB является транскрипционным регулятором, а SsrA работает как сенсорная киназа для SsrB [Fàbrega, Vila, 2013]. Экспрессия *ssrAB* в свою очередь регулируется несколькими глобальными регуляторными системами, включая PhoP/PhoQ [Bijlsma, Groisman, 2005], OmpR/EnzV [Lee et al., 2000] и SlyA [Linehan et al., 2005; Navarre et al., 2005].

Помимо системы секреции III типа, на сегодняшний день у сальмонелл описаны еще три системы секреции белков, включая систему секреции типа I (T1SS), систему секреции типа IV (T4SS) и систему секреции типа VI (T6SS). Кроме того, другие факторы, такие как ворсинки, жгутики и плазмиды вирулентности, играют важную роль при инфекции клетки-хозяина.

1.2.3. Система секреции I типа

T1SS была впервые описана в 1985 году у *Escherichia coli* и известна как самая простая среди всех идентифицированных в настоящее время наномашин секреции [Bao et al., 2020], способная доставлять широкий спектр молекул, включая аденилатциклазы, липазы, протеазы и токсины, во внеклеточное пространство [Lenders et al., 2015]. Система секреции I типа *Salmonella Typhimurium* закодирована в SPI-4 и содержит шесть генов *siiABCDEF*. Кроме того, у сальмонелл имеется два нефимбриальных адгезина – VarA и SiiE, секретируемых через T1SS [Wagner et al., 2011]. Установлено, что T1SS необходима на всех этапах инфекции. Взаимодействие SPI-4-T1SS и SPI-1-T3SS необходимо для преодоления эпителиального барьера [Main-Hester et al., 2008]. Гены, кодируемые T1SS, активируются при низком pH [Lawley et al.,

2006; Velasquez et al., 2016] и способствуют выживанию внутри макрофагов [De Keersmaecker et al., 2005]. Более того, также было продемонстрировано участие генов T1SS в системной инфекции мышей [Morgan et al., 2007; Lawley et al., 2006].

1.2.4. Система секреции IV типа

Система секреции типа IV (T4SS) представляет собой мембранный белковый комплекс, который транспортирует различные субстраты, включая ДНК или комплексы ДНК-белок в клетки хозяина [Bao et al., 2020]. У грамотрицательных бактерий чаще всего идентифицируется система VirB/D T4SS, которая состоит из 12 основных компонентов, называемых VirB1-11 и VirD [Christie et al., 2005]. В настоящее время сообщается, что только несколько сероваров *Salmonella enterica* имеют T4SS [Bao et al., 2020]. Из-за более низкой распространенности T4SS у сальмонелл имеется очень мало информации о ее роли в инфекции. При исследовании роли T4SS в штаммах *S. enterica* serovar Heidelberg было выявлено, что экспрессия генов, кодирующих VirB/D4 T4SS, повышается в течении времени при инфекции макрофагов. Трансформация *S. enterica* serovar Heidelberg плазмидами, кодирующими VirB/D4 T4SS, повышает вирулентность и выживаемость бактерий в эпителиальных клетках и макрофагах [Gokulan et al., 2013].

1.2.5. Система секреции VI типа

Система секреции VI типа (T6SS) – это контакт-зависимая система, которая широко распространена почти у 25 % грамотрицательных бактерий [Boyer et al., 2009]. Используя эту систему, бактерии могут доставлять токсины непосредственно в эукариотические или прокариотические клетки [Basler et al., 2013]. Функциональная T6SS состоит из минимального набора из 13 основных компонентов, называемых TssA-TssM [Cianfanelli et al., 2016]. *Salmonella* содержит пять филогенетически различных T6SS, закодированных в разных островках патогенности (SPI-6, SPI-19, SPI-20, SPI-21 и SPI-22)

[Blondel et al., 2009; Fookes et al., 2011]. T6SS является важным фактором, связанным с вирулентностью. Так, SPI-6 участвует в патогенезе нетифоидных сероваров сальмонелл [Haneda et al., 2009], а также напрямую связана с вирулентностью *S. Typhimurium* по отношению к мышам [Liu et al., 2013]. Эта функция SPI-6 T6SS, связанная с вирулентностью, также была доказана в других серотипах *Salmonella enterica*, включая Typhi и Dublin [Wang et al., 2011; Pezoa et al., 2014]. Экспрессия T6SS подавляется глобальными регуляторами (H-NS, Fur) в зависимости от условий среды.

1.2.5. Плазмиды вирулентности и секреции

В дополнение к факторам вирулентности, присутствующим в SPI, несколько генов вирулентности также были обнаружены в плазмидах. Хотя не все штаммы сальмонелл имеют плазмиды вирулентности, они обычно присутствуют у нескольких сероваров, включая такие хозяин-специфичные серовары как Abortusovis (овцы), Choleraesuis (свиньи), Dublin (крупный рогатый скот), Gallinarum и Pullorum (куры), Paratyphi A, Paratyphi B, Paratyphi C (человек) и некоторые штаммы сероваров с широким кругом хозяев, включая Enteritidis и Typhimurium [Dos Santos et al., 2019, Rotger, Casadesús, 1999]. Ключевой особенностью различных плазмид является высококонсервативный оперон *spvRABCD*. Оперон *spvABCD* может усиливать вирулентность сальмонеллы, увеличивая скорость репликации бактерий в клетках хозяина во время инфекции, что может вызывать летальную инфекцию у мышей [Gulig, Doyle, 1993; Guiney et al., 1994]. Этот оперон также способствует тяжелому энтериту и системной инфекции у естественного хозяина. Некоторые серовары *S. enterica* содержат плазмиды вирулентности, несущие дополнительные гены, которые могут способствовать патогенезу, такие как *pef*, *traT*, *rck* и *rsk*. Оперон *pefBACDI* кодирует фимбрии, которые опосредуют адгезию тонкого кишечника [Rotger, Casadesús, 1999]. Ген *rck* кодирует белок внешней мембраны Rck, который может связывать ингибитор альтернативного пути комплемента [Ho et al., 2011]. Ген *rsk* кодирует

регуляторный элемент плазмиды вирулентности Rsk, который связывается с белком репликации RepA, и связан с контролем экспрессии rck [Vandenbosch et al., 1989].

Плазмиды IncFIB у сальмонелл часто несут гены вирулентности, которые позволяют бактериальным патогенам выживать в средах, ограниченных по концентрации железа [Khajanchi et al., 2019]. Среди факторов вирулентности, закодированных в плазмиде IncFIB, есть система получения железа аэробактином (*iucABCD-iutA*) и регулируемый ABC-транспортер железа (*sitABCD*) [Khajanchi et al., 2019]. Эти гены облегчают получение железа от хозяина, что способствует колонизации и персистенции в эпителиальных клетках. В дополнение к генам захвата железа плазмиды IncFIB часто несут гены, кодирующие бактериоцины или колицины, которые играют роль в конкуренции сальмонелл с комменсальной микробиотой [Khajanchi et al., 2019; Stecher et al., 2012]. Некоторые другие плазмиды кодируют систему секреции VirB/D4 и связаны с повышенной персистенцией в макрофагах. Другие потенциальные гены бактериальной вирулентности, связанные с плазмидами, могут кодировать факторы, которые способствуют образованию биопленки [Han et al., 2024a]. Ключевым преимуществом образования биопленки является сильная устойчивость к иммунной системе хозяина и физическому воздействию.

1.3. Функциональные системы и клеточные структуры, участвующие во взаимодействии сальмонелл с клеткой хозяина

1.3.1. Экспрессия регуляторных генов

Участие регуляторных генов у сальмонелл в процессе инфекции играет ключевую роль в адаптации бактерий к условиям внутри клетки хозяина, управлении вирулентностью и взаимодействии с клетками организма.

Сигма-фактор RpoS является одним из ключевых регуляторов при ответе на экологический стресс, включая недостаток питательных веществ,

изменение температуры, гиперосмолярность, окислительный стресс и изменения pH [Franco Meléndez et al., 2022]. RpoS также регулирует экспрессию факторов вирулентности сальмонелл [Franco Meléndez et al., 2022]. Однако внутри различных хозяев наблюдается отсутствие или лишь небольшое усиление его экспрессии [Eriksson et al., 2003; Hautefort et al., 2008; Srikumar et al., 2015; Rehfuß et al., 2011; Feng et al., 2009] что, возможно, компенсируется другими сигма-факторам.

В свою очередь, экспрессия регуляторов SPI-1 (*hilD*, *hilA*, *hilC*, *invF* и *sprB*) и SPI-2 (*ssrB*, *ompR* и *phoP*) коррелирует с экспрессией соответствующих им регулонов [Hautefort et al., 2008; Srikumar et al., 2015]. Двухкомпонентная регуляторная система OmpR/EnvZ также косвенно влияет на экспрессию SPI-2. OmpR/EnvZ в первую очередь участвует в регуляции белков внешней мембраны, но также играет роль в регуляции SPI-2, частично через свое влияние на систему PhoP/PhoQ [Garmendia et al., 2003].

Другим важным глобальным регулятором является гуанозинтетрафосфат (ppGpp) — низкомолекулярная эффекторная молекула, которая накапливается до высоких уровней во время аминокислотного голодания, что приводит к быстрому снижению синтеза РНК, известному как строгий ответ [Pizarro-Cerdá, Tedin, 2004]. Штамм *S. typhimurium* Δ relA Δ spoT, дефектный по синтезу гуанозинтетрафосфата, является сильно ослабленным *in vivo* и неинвазивным *in vitro*. Данный штамм продемонстрировал значительно сниженную экспрессию транскрипционных активаторов SPI-1 *hilA* и *invF* [Pizarro-Cerdá, Tedin, 2004].

РНК-шаперон Hfq играет роль в посттранскрипционной регуляции, модулируя стабильность или трансляцию молекул мРНК, включая те, которые кодируют факторы вирулентности. У сальмонелл Hfq контролирует SPI-1 и несколько эффекторных белков, которые участвуют в инвазии сальмонелл в клетки хозяина [Sittka et al., 2007]. Сальмонеллы с делецией Hfq демонстрируют серьезный дефект в инвазии эпителиальных клеток, а также

роста как в эпителиальных клетках, так и в макрофагах *in vitro* [Sittka et al., 2007].

В регуляции экспрессии генов сальмонелл при инфекции также принимают участие некодирующие молекулы РНК. Так, малая некодирующая РНК PinT при бактериальной интернализации временно контролирует экспрессию как эфффекторов, связанных с вторжением (SPI-1), так и генов вирулентности, необходимых для внутриклеточного выживания (SPI-2) [Westermann et al., 2016].

1.3.2. Транспорт ионов

Одной из стратегий макрофагов млекопитающих по ограничению репликации бактерий внутри SCV является снижение уровней внутриклеточного содержания ионов металлов [Nairz et al., 2015]. В ответ на данные условия *Salmonella* Typhimurium активирует системы захвата металлов, включая активацию оперона *sitABCD* (транспорт Mn/Fe) [Srikumar et al., 2015], генов транспорта железа и биогенеза Fe-S-белков (*ent*, *fep*, *fhu*, *iro*, *sfb*, *sit*, *suf*, регулоны *iscR* (*yhfP*) и *rstA*), а также систем транспорта магния (*mgtCBR*) и захвата цинка (*zur*) [Srikumar et al., 2015].

Магний (Mg) — наиболее распространенный двухвалентный ион металлов в бактериях [Cunrath, Palmer., 2021]. Клетки бактерий содержат относительно высокое содержание магния отражает его важность в физиологии бактерий. Mg играет решающую роль в стабильности липидной мембраны, стабильности и активности рибосом, а также является кофактором для некоторых ферментов. Вскоре после фагоцитоза уровень ионов Mg в фагосомах резко снижается, что может вызвать ограничение роста. Транспорт магния в клетки сальмонелл происходит двумя ABC-транспортерами MgtA и MgtB, или пермеазой CorA. Делеция генов *mgtA/mgtB* значительно снижает или полностью лишает способность сальмонелл вызывать системную инфекцию [Cunrath, Palmer., 2021].

Железо играет ключевую роль в выживании и вирулентности сальмонелл, так как многочисленные гены сальмонелл напрямую или косвенно регулируются ионами железа [Litwin, 1993, Bjarnason et al., 2003; Nairz et al., 2010]. Железо может импортироваться в сальмонеллы одним из двух основных путей: либо в связанном виде с хелатирующим железом сидерофором в виде $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$, либо в виде свободного катиона Fe^{2+} . Для этого сальмонеллы синтезируют собственные сидерофоры (энтеробактин и сальмохелин), а также могут использовать ксеносидерофоры других бактерий. Биосинтез и экспорт энтеробактина (мощнейшего хелатора железа) кодируется кластером генов *entABCDEFHS* [Raymond et al. 2003]. Биосинтез энтеробактина и сальмохелина, а также транспорт и деградация сидерофоров, регулируются транскрипционным регулятором Fur. Свободные катионы Fe^{2+} могут диффундировать из окружающей среды в периплазму через порины, откуда оно затем может транспортироваться в цитоплазму с помощью ряда систем, включая FeoABC, MntH, SitABCD и ZupT.

Цинк играет важную структурную и каталитическую роль в металлоферментах и противодействует окислительному стрессу. Кроме того, сальмонеллы используют Zn^{2+} во многих важных путях, таких как синтез белка и репарация ДНК [Ammendola et al., 2007, Frawley et al. 2018]. В свою очередь, макрофаги используют Zn^{2+} и Cu^{+} для атаки кластеров Fe–S, необходимых для выживания бактерий [Hao et al., 2015]. Предполагается, что данный механизм возник у простейших задолго до возникновения многоклеточной жизни, что подтверждается наличием гомологичных транспортеров цинка и меди в макрофагах, социальных амебах *D. discoideum* и свободноживущих амебах *A. castellanii* [Hao et al., 2015]. Однако фагоцитированные макрофагами сальмонеллы вызывают повышение уровня свободного Zn^{2+} в цитоплазме макрофагов, а также избегают везикулы, содержащие цинк [Festa, Thiele, 2012; Kapetanovic et al., 2016]. В совокупности цинк является важным микроэлементом, и сальмонеллы нуждаются в его транспортерах (например

ZnuABC) чтобы поддерживать гомеостаз во время кишечной и системной пролиферации.

Другими важными ионами металлов, участвующие в нормальном функционировании клеток сальмонелл, являются марганец (Mn), медь (Cu), молибден (Mo) и кобальт (Co). Mn участвует в реакции на окислительный стресс как кофактор супероксиддисмутазы (SodA), а также в метаболических ферментах, таких как L-арабиноизомераза AraA. Cu входит в состав кофактора цитохромоксидаз и супероксиддисмутаз (SodC) [Cunrath, Palmer., 2021]. Однако, высокие концентрации данных металлов могут приводить к повреждению клеток сальмонелл, поэтому транспортеры данных металлов играют ключевую роль при выживании сальмонелл внутри клеток хозяев.

1.3.3. Ответ на окислительный стресс

После попадания в клетку хозяина сальмонеллы формируют SCV. Внутри SCV профессиональных фагоцитов сальмонелла подвергается воздействию активных форм кислорода (АФК) и азота (АФА) [Ezraty et al., 2017]. Эти соединения реагируют с органическими молекулами, вызывая повреждение нуклеиновых кислот, белков, липидов и углеводов [Spector и Kenyon, 2012]. Сальмонеллы выработали несколько сложных молекулярных стратегий для борьбы с окислительным стрессом. У сальмонеллы есть два основных пути реакции, ответственных за борьбу с окислительным стрессом. Регулон OxyR реагирует специфически на присутствие перекиси, тогда как регулон SoxRS воспринимает изменения клеточного редокс-баланса. Хотя несколько генов находятся под контролем обоих регулонов, между путями OxyR и SoxRS наблюдается удивительно ограниченное перекрытие, возможно, отражающее различные типы окислительного повреждения, вызванного перекисью водорода и агентами окислительно-восстановительного цикла [Spector, Kenyon, 2012].

Воздействие H_2O_2 приводит к усиленному синтезу более 40 белков [Spector, Kenyon, 2012]. Экспрессия как минимум десяти из них

контролируется OxyR – транскрипционным регулятором, реагирующим на H_2O_2 [Spector, Kenyon, 2012]. OxyR индуцирует гены, участвующие в разрушении H_2O_2 (*katG*), защите ДНК (*dps*), восстановлении окисленных липидов (*ahpCF*), формировании дисульфидных связей (*gorA*, *grxA*, *trxC*) [Storz, Zheng, 2000]. Кроме того, OxyR активирует экспрессию гена *fur* и регуляторной РНК OxyS [Altuvia et al., 1997]. Белок Fur снижает поглощение железа, предотвращая образование гидроксильных радикалов в процессе реакции Фентона. РНК OxyS защищает от мутагенеза при окислительном стрессе и может связывать регулон OxyR с другими стрессовыми системами [Spector, Kenyon, 2012].

У *S. Typhimurium* под действием окисляющих соединений активируется экспрессия более 100 генов, многие из которых регулируются системой SoxRS [Spector, Kenyon, 2012]. Изначально считалось, что SoxRS защищает от супероксида, поскольку его генерируют редокс-агенты (паракват, пламбагин, менадион и др.), а некоторые гены этого регулона (*sodA*, *nfsA*) участвуют в его детоксикации. Однако оказалось, что SoxRS активируется напрямую редокс-агентами, а не супероксидом, и даже избыток супероксиддисмутазы не блокирует этот процесс [Gu, Imlay, 2011]. SoxR – гомодимер с 2Fe-2S-кластерами, которые окисляются редокс-агентами, что приводит к образованию активной формы SoxR и активации гена *soxS*, который, в свою очередь, усиливает экспрессию множества генов. Эффекторы *sodA* и *nfsA* участвуют в детоксикации и предотвращении выработки супероксида соответственно. Гены *fpr*, *fldA*, *fldB* отвечают за поддержание Fe-S-кластеров. Ген *nfo* отвечает за репарацию поврежденной ДНК, *zwf* – за усиление восстановительного потенциала клетки. Продукты генов *tolC*, *acrAB*, и *micF*

отвечают за выведение токсинов из клетки [Storz, Zheng, 2000]. Как и OxyR, система SoxRS повышает уровень экспрессии *fur*, подавляя образование гидроксильных радикалов [Spector, Kenyon, 2012].

OxyR и SoxRS – не единственные регуляторы, участвующие в ответе на окислительный стресс у сальмонелл. Экспрессия генов устойчивости к нему контролируется и другими факторами. Сигма-фактор RpoS регулирует гены *katE* (гидропероксидаза II), *xthA* (экзонуклеаза III), *sodC* (периплазматическая супероксиддисмутаза), а также частично *katG*, *gorA*, *dps*, *narZYWV* [Spector, Kenyon, 2012]. Другие стрессовые системы (ответ на тепловой шок, SOS-ответ, стресс оболочки) также включают белки, защищающие от окислительного повреждения.

1.3.2. Жгутики, филаменты и ворсинки

Функциональные жгутики необходимы для подвижности сальмонелл и инвазии в клетки хозяина [Elhadad et al., 2015; Horstmann et al., 2017; Misselwitz et al., 2012]. У *S. enterica* более 50 генов участвуют в сборке и движении жгутиков, организованных в один регулон. Многочисленные исследования показали, что гены, кодирующие жгутиковый аппарат, а также многие гены, участвующие в хемотаксисе, сильно репрессируются во время внутриклеточного образа жизни *S. Typhimurium* [Eriksson et al., 2003; Hautefort et al., 2008; Srikumar et al., 2015; Li et al., 2019]. Тем не менее, анализ транскриптома *Salmonella* Paratyphi A продемонстрировал, что по крайней мере 38 из 50 генов хемотаксиса и жгутиков экспрессируются на значительно высоких уровнях. В дополнение к генам жгутиков, *Salmonella* Paratyphi A, находящиеся в клетке-хозяине, демонстрировал гораздо более высокие уровни экспрессии генов хемотаксиса (например, *cheB*, *cheR*, *cheM*, *cheW*, *cheZ* и *cheY*), чем внутриклеточные *S. Typhimurium* [Cohen et al., 2022].

Участие систем подвижности сальмонелл также изучено на модели взаимодействия мутантных штаммов *Salmonella typhimurium* и *Acanthamoeba castellanii* [Mannan et al., 2020]. Было установлено, что фимбрии первого типа играют ключевую роль в прикреплении *S. typhimurium* к поверхности клеток *A. castellanii*. Впоследствии это взаимодействие обеспечивает *S. typhimurium* преимущество в росте. В тоже время, делеция генов, кодирующих субъединицы жгутиков FliC и FljB, повысила способность *S. typhimurium* ассоциироваться с *A. castellanii* [Mannan et al., 2020].

1.4. Экспрессия генов сальмонелл при взаимодействии с макрофагами, эпителиоцитами и фибробластами

Внутриклеточные патогены, такие как *Salmonella*, *Mycobacterium* и *Legionella* вынуждены адаптироваться к условиям внутри клеток хозяев. Переход из внешней среды во внутриклеточную среду организма хозяина ожидаемо влечет за собой глобальные изменения в экспрессии генов бактерий, но точные события, происходящие при этом, сложны для изучения [Eriksson et al., 2003].

Во время инвазии сальмонеллы транскрибируют гены из первого островка патогенности. Когда бактерии оказываются внутри клетки, активность этого островка падает и начинается транскрипция генов из региона SPI-2, которые отвечают за внутриклеточную выживаемость.

Впервые полный транскриптом внутриклеточных сальмонелл был изучен на модели *S. Typhimurium* SL1344 при фагоцитозе макрофагоподобными клетками J774-A.1 [Eriksson et al., 2003]. Профили экспрессии генов внутриклеточных бактерий сравнивались с экспрессией генов бактерий, выращенных в культуральной среде без фагоцитов, что позволило выявить достоверное изменение в экспрессии 919 из 4451 белок-кодирующих генов сальмонелл в течение инфекции. Причем экспрессия большинства из них изменяется в первые часы внутриклеточного пребывания. Экспрессия большинства генов SPI-2 усиливалась через 4 и 12 часов после начала

инфекции, в то время как через 8 часов после начала инфекции наблюдалось небольшое снижение. Активация SPI-2 проявляла три различных паттерна: экспрессия регуляторных генов SPI-2 усиливалась незначительно; экспрессия генов, кодирующих аппарат секреции SPI-2, была умеренно индуцирована; экспрессия генов, кодирующих эффекторы SPI-2, усиливалась значительно. Кроме того, экспрессия генов SPI-3 (*mgtBC*, *cigR*, *marR*, *slsA* и *fidL*) и SPI5 (*pipABD*) также подвергалась активации через 4 часа после инфекции. Экспрессия оперона *sitABCD*, расположенного в SPI-1 и отвечающего за захват марганца и железа, была изначально подавлена, а затем, через 12 ч экспрессия увеличивалась до значений контрольной культуры. Кроме того, экспрессия генов вирулентности *pagCK* усиливалась на более поздних стадиях инфекции. Напротив, экспрессия большинства генов SPI-1 была подавлена во всех временных точках, как и экспрессия генов, связанных с инвазией, генов SPI-4 и *pipC*, а также кодируемых в SPI-5 генов. Полученные данные по экспрессии согласовывались с ранее полученными данными о регуляции островков патогенности внутри клеток хозяина.

Липополисахариды (ЛПС) являются составной частью внешней мембраны грамотрицательных бактерий, и, помимо того, что они являются важным структурным компонентом, они также являются факторами вирулентности. Экспрессия трех основных кластеров генов, кодирующих синтез ЛПС (*wecDE*, *rfa* и *rfb*), достоверно снижалась через 4 часа после начала инфекции.

Неожиданно, но большинство глобальных регуляторных генов сальмонелл не показывали изменений на уровне транскрипции во время инфекции макрофагов [Eriksson et al., 2003]. Гены, кодирующие нуклеоид-ассоциированные белки H-NS, StpA, Fis и Lrp, были подавлены. Напротив, была обнаружена индукция гена *hha* во время инфекции макрофагов. Белок Hha способен связываться с ДНК и с белком H-NS и, участвует в подавлении SPI-1 [Fahlen et al., 2001].

Альтернативные сигма-факторы играют ключевую роль в ответе на экологический стресс. Однако внутри макрофагов наблюдается лишь небольшое усиление экспрессии сигма-фактора RpoS, что, возможно, компенсируется другими сигма-факторами. Например, экспрессия генов, кодирующих RpoE и RpoH, была повышена, как и экспрессия регулируемого RpoE гена *htrA*, который кодирует стресс-индуцированную протеазу. Экспрессия гена *phoP* не повышалась у внутриклеточных бактерий, хотя многие гены, регулируемые PhoPQ, достоверно изменяли уровень экспрессии. Кроме того, наблюдалось сильное подавление экспрессии глобальных регуляторов цАМФ: *суа* (кодирующий фермент аденилатциклазу, который генерирует цАМФ) и *сrp* (кодирующий белок рецептора цАМФ CRP). Комплекс сАМР–CRP регулирует реакцию на стресс голодания, а удаление либо *суа*, либо *сrp* вызывает ослабление вирулентности [Curtiss, Kelly, 1987].

Прочие гены с усиленной экспрессией играют роль в ответе на кислую среду (*adiAY*), а также в антимикробной защите и антибиотикорезистентности (*mar*-RAB, *emrA* и *yddG*). В дополнение, небольшое число генов с усиленной экспрессией участвуют в ответе на осмотический стресс, например *kdpA* и *kdpB*, а также *ompW*. Оперон *kdp* индуцируется в ответ на увеличение осмотического давления, при потере тургора [Balaji et al., 2005], тогда как ген *ompW* кодирует порин, участвующий в осморегуляции.

Исследование транскриптома показало, что *S. Typhimurium* испытывает некоторую степень окислительного стресса в клетках J774-A.1. Только шесть среди порядка 30 генов окислительного стресса (*soxS*, *ibpA*, *ycfR*, *trxC*, *ibpB* и *sbp*) индуцируются во время инфекции. Тот факт, что большинство генов в регулоне окислительного стресса не были активированы, вероятно, отражает быструю индукцию генов SPI-2 после заражения [Eriksson et al., 2003]. Сальмонеллы адаптировались к кислой среде в клетках J774-A.1 и использовали галактонат или глюконовую кислоту в качестве источника углерода. Данный факт, в сочетании с наблюдаемым снижением регуляции жгутикового аппарата и экспрессии H⁺/АТФазы, предполагает, что после

заражения макрофагами сальмонелла полагается на протонный градиент, чтобы помочь импорту своего основного источника углерода, одновременно снижая регуляцию других протонных каналов, чтобы предотвратить чрезмерный приток протонов и поддерживать внутриклеточный pH, необходимый для активного роста [Eriksson et al., 2003].

Обнаружено, что экспрессия генов *mgtBC*, участвующих в транспорте Mg^{2+} , усиливалась в клетках J774-A.1. Гены *pst*, участвующие в транспорте неорганического фосфата, также были сильно активированы через 4 часа после заражения. Кроме того, было обнаружено, что гены, участвующие в импорте железа, не индуцируются во время заражения макрофагов J774-A.1. Таким образом, подтверждено, что внутриклеточная среда макрофагов ограничена по Mg^{2+} и фосфату, но не ограничена по железу [Eriksson et al., 2003].

В последующих работах данные по экспрессии генов сальмонелл были расширены и исследован транскриптом бактерий внутри как макрофагов, так и эпителиальных клеток линии HeLa [Hautefort et al., 2008; Srikumar et al., 2015]. В результате было обнаружено, что транскриптом сальмонелл значительно отличается в различных типах клеток. Было обнаружено, что экспрессия генов *mgtBC*, *pstACS* и *iro*, отвечающих за поглощение магния, фосфата и железа соответственно, а также генов SPI-2, значительно усиливалась внутри эпителиальных клеток [Hautefort et al., 2008]. Удивительно, в отличие от макрофагоподобных клеток J774-A.1, у сальмонелл внутри эпителиальных клеток, наблюдалось усиление экспрессии генов SPI-1 и биосинтеза жгутиков на более поздних стадиях инфекции. В данном исследовании впервые было зарегистрирована одновременная транскрипция всех трех систем секреции третьего типа (T3SS) в пределах внутриклеточной популяции сальмонелл [Hautefort et al., 2008].

С помощью высокопроизводительного секвенирования получены данные об экспрессии генов сальмонелл внутри мышинных макрофагов [Srikumar et al., 2015]. В результате выявлено, что более 3500 генов сальмонелл

активно экспрессируются внутри макрофагов. Также большая часть (88%) малых некодирующих РНК была активна в данной модели инфекции. Подтверждена роль второго и тринадцатого островков патогенности при инфекции. Экспрессия генов данных островков патогенности значительно усиливалась на протяжении всего времени эксперимента. Напротив, экспрессия генов первого и четвертого островков патогенности, отвечающих за проникновение внутрь клетки хозяина, значительно подавлялась внутри клеток макрофагов [Srikumar et al., 2015]. Экспрессия оперона *mgtCBR*, расположенного в SPI-3, усиливалась более чем в 15 раз внутри макрофагов, в то время как другие гены SPI-3 (*slsA*, *marT* и *rhuM*) усиливались не столь значительно. SPI-5 кодирует эффекторы, транслоцируемые как SPI-1, так и SPI-2 ССТТ [Han et al., 2024a]. Экспрессия ген *sopB* кодирует эффектор, транслоцируемый SPI1, и его активность в макрофагах снижалась в 50 раз. Напротив, экспрессия гена *pipB*, значительно усиливалась. PipB локализуется в мембране SCV и вызывает образование филаментов, индуцированных сальмонеллой (SIF). Было отмечено, что у сальмонелл внутри макрофагов активируются гены, участвующие в деградации дезоксирибонуклеотидов, жирных кислот, галактозы, глюкозы, глюконовой кислоты, глицерина, лактата, N-ацетилглюкозамина и сиаловой кислоты, в то время как регулоны, контролирующие метаболизм глюконовой кислоты, мальтозы, мио-инозитола и ксилозы, показали значительное подавление внутри макрофагов [Srikumar et al., 2015]. Предполагается, что SCV макрофагов содержат относительно низкие уровни магния, марганца, железа и цинка [Röder et al., 2021]. Это косвенно подтверждается активацией оперона *sitABCD* (отвечает за транспорт марганца и железа), генов *ent*, *fer*, *fhu*, *iro*, *sfb*, *sit* и *suf*, а также регуляторов *yhfP* и *rstA* (ответственных за транспорт железа и биогенез железо-серных белков (Fe-S)), оперона *mgtCBR* (отвечает за транспорт магния), и *zur* (поглощение цинка) [Srikumar et al., 2015].

Большинство исследований транскриптома бактерий было проведено с использованием клеточных культур. До недавнего времени изучение

экспрессии генов внутриклеточных бактерий, таких как *Listeria monocytogenes*, *Legionella pneumophila* или *S. Typhimurium*, требовало лизиса клеток хозяина и отделения внутриклеточных бактерий от клеток-хозяев до выделения РНК и дальнейшего анализа экспрессии генов с использованием микрочипов или высокопроизводительного секвенирования [Hautefort et al., 2008; Srikumar et al., 2015]. Увеличенная глубина секвенирования позволила одновременно секвенировать как прокариотические, так и эукариотические транскрипты в подходе, называемом Dual RNA-Seq. В исследовании dRNA-Seq инфекции *S. Typhimurium* клеток человеческого эпителия линии HeLa [Westermann et al., 2016] инфицированные и неинфицированные клетки были разделены с использованием проточной цитофлуориметрии с последующим выделением тотальной РНК (прокариотической и эукариотической) и секвенированием общего пула РНК. Разделение про- и эукариотических транскриптов проводилось уже на этапе биоинформатического анализа. Значительные изменения в экспрессии генов наблюдались как у хозяина, так и у патогена, была идентифицирована высокоэкспрессирующаяся малая РНК PinT (STnc440), которая служит в качестве триггера для переключения программ вирулентности *S. Typhimurium*. После удаления PinT *S. Typhimurium* все еще выживала и реплицировалась в эпителиальных клетках, но изменения в экспрессии генов, обнаруженных в клетках *S. Typhimurium* и хозяина, указывали на изменение взаимодействия хозяина и патогена [Westermann et al., 2016]. Например, PinT-опосредованная экспрессия эффекторов островков патогенности SPI-1 и SPI-2 повлияла на сигнальный путь JAK-STAT и секрецию IL-8 в эпителиальных клетках. Таким образом, подход Dual RNA-seq позволил обнаружить молекулярный фенотип для PinT, который не мог наблюдаться в традиционных подходах с использованием клеточных культур, подчеркивая важность данного метода для тестирования и наблюдения реакции клеток-хозяев на мутантные бактериальные штаммы, которые иначе не показывают очевидного фенотипа.

Наконец, совсем недавно был представлен метод scDual-Seq, который позволяет одновременно оценивать транскриптомы как хозяина, так и патогена на уровне единичных клеток [Avital et al., 2017]. В результате, среди инфицированных мышинных макрофагов бактериями *Salmonella typhimurium* было обнаружено три субпопуляции макрофагов, в которых транскрипты самих клеток-хозяев и внутриклеточных бактерий были отличны друг от друга. В целом, способность захватывать как программы транскрипции патогена, так и хозяина на уровне отдельных клеток будет важна для понимания взаимосвязей между различными состояниями инфекции.

Помимо эпителиальных клеток и макрофагов, сальмонеллы способны колонизировать нейтрофилы и дендритные клетки [Mastroeni, Grant, 2011]. Модельные инфекции *in vitro* фибробластов или дендритных клеток показывают ограниченную пролиферацию сальмонелл. Фибробласты являются нефагоцитарными клетками, в которых внутриклеточный рост *S. enterica* серовар Typhimurium заметно снижен. На модели мышинных фибробластов показано, что *S. Typhimurium* сдерживает внутриклеточный рост внутри нефагоцитарных клеток, расположенных в собственной пластинке кишечника. Данные транскриптома показали, что менее 2% генома *S. Typhimurium* дифференциально экспрессируется в нерастущих внутриклеточных бактериях. Изменения включают метаболическое перепрограммирование на микроаэрофильные условия, индукцию генов плазмиды вирулентности, повышение регуляции островов патогенности SPI-1 и SPI-2, а также подавление генов биосинтеза жгутиков и хемотаксиса [Núñez-Hernández et al., 2013].

Таким образом, в работах по взаимодействию сальмонелл с различными типами клеток млекопитающих показано, что экспрессия генов патогенов сильно зависит не только от стадии инфекции, но и от конкретного типа клетки-хозяина.

1.5 Взаимодействие сальмонелл со свободноживущими простейшими при внутриклеточной локализации

1.5.1. Простейшие как природный резервуар патогенных бактерий

Свободноживущие протисты распространены повсеместно в природных экосистемах, где они играют важную роль в уменьшении бактериальной биомассы и восстановлении питательных веществ [Vaerewijck et al., 2014]. Кроме того, было показано, что некоторые виды простейших (*Acanthamoeba* sp., *Tetrahymena* sp., *Hartmannella* sp., *Naegleria* sp.) могут выступать в качестве хозяев для патогенных бактерий [Vaerewijck et al., 2014]. Таким образом, свободноживущие простейшие способствуют сохранению сальмонелл в природных экосистемах. К тому же имеются сведения о возрастании вирулентности и сопротивляемости к антимикробным агентам после пассажа через протистов [Cirillo et al., 1994].

В то время как большинство бактерий погибают при фагоцитозе свободноживущими простейшими, некоторые виды разработали стратегии внутриклеточного выживания после поглощения. Среди них можно выделить две группы:

- 1) облигатные эндобионты;
- 2) транзиторные бактерии.

Транзиторный процесс подразумевает, что пребывание внутри клеток простейших не является частью жизненного цикла, и бактерии в норме живут во внешней среде (почва, вода, биопленки) или других хозяевах (животные, человек). Взаимоотношения между бактериями и простейшими могут варьировать от мутуализма, комменсализма до паразитизма. Причем данные взаимоотношения не статичны, и могут переходить от одного вида к другому под воздействием внешних факторов (температуры или голодания). Облигатные эндобионты чаще всего относятся к таксонам *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Bacteroidetes*, и *Chlamydiae*. В работе

Fritsche et al. [1993] сообщалось, что у 24% исследованных акантамеб присутствовали эндобионты.

Некоторые оппортунистические патогены человека (*Burkholderia cepacia*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis*, *Helicobacter pylori*, *L. pneumophila*, и *Mycobacterium spp.*) способны выживать внутри свободноживущих простейших после поглощения [Greub, Raoult 2004; Thomas et al., 2010]. Бактерии проникают в клетки простейших в результате фагоцитоза, как рецептор-опосредованного, так и независимого. Примечательно, что некоторые бактерии, например *Aeromonas hydrophila* [Rahman et al., 2008] и *Campylobacter jejuni* [Axelsson-Olsson et al., 2005, Bar'e et al., 2010] связываются со специфическими сайтами на поверхности клетки акантамебы. Другие же скапливаются на так называемом уроиде (небольшая область на противоположном направлении движения конце клетки), что характерно для *Listeria monocytogenes*, *S. Typhimurium*, *Bacillus cereus*, и *Cronobacter sakazaki* [Doyscher et al., 2013].

После проникновения бактерии могут покидать или оставаться в фагосоме. Дальнейшие события для поглощенных, но не переваренных бактерий могут развиваться в 3 направлениях:

1. бактерии выживают, но не реплицируются;
2. бактерии реплицируются, но не лизируют простейших;
3. бактерии реплицируются и вызывают лизис клетки простейшего.

Помимо выживания в трофозоидных формах, сохранение жизнеспособности в цистах акантамеб отмечено для *F. tularensis* [El-Etr et al., 2009], *L. pneumophila* [Kilvington, Price, 1990], некоторых представителей *Mycobacterium spp.* [Steinert et al., 1998, Adekambi et al., 2006, Mura et al., 2006, Ben Salah, Drancourt, 2010], *E. coli* [Walochnik et al., 1999], а также для *Staphylococcus aureus* и *Vibrio cholerae*. Некоторые бактерии (*L. pneumophila*) располагаются непосредственно внутри цист, в тоже время микобактерии обнаруживаются в оболочке цист. После выхода простейшего из цисты бактерии освобождаются во внешнюю среду. Пребывание в цистах позволяет

бактериям выживать в течение длительного периода времени в суровых условиях, таких как высыхание и дезинфекция [Kilvington, Price, 1990, Adekambi et al., 2006].

Энтеропатогенные бактерии и свободноживущие простейшие могут сосуществовать в одних и тех же местообитаниях. Например, *C. jejuni*, *Salmonella* и свободноживущие простейшие были обнаружены в куриных фермах [Snelling et al., 2005; Bar'e et al., 2009]. С точки зрения общественного здравоохранения, временное пребывание патогенов в клетках простейших опасно по нескольким причинам. Во-первых, энтеропатогены, такие как *C. jejuni*, *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, и *L. monocytogenes* способны размножаться внутри или в присутствии простейших *Acanthamoeba spp.*, группы амёб, широко распространенных в естественных и антропогенных системах [Rayamajhee et al., 2022]. Таким образом, вместо уменьшения числа бактерий за счет поглощения и переваривания со стороны простейших происходит увеличение численности патогенов. Свободноживущие простейшие могут выступать в качестве резервуара и носителя бактерий, и, вследствие подвижности простейших, бактерии могут распространяться далее во внешней среде [Balczun, Scheid, 2017]. Бактерии внутри простейших защищены от воздействия антимикробных агентов [Carlson et al., 2007; Vingataramin et al., 2025]. Кроме того, наблюдается усиление вирулентных свойств после пассажа через простейших [Carlson et al., 2007]. Наконец, некоторые виды простейших служат своеобразной «генетической фабрикой» [Moliner et al., 2010; Bertelli, Greub 2012], где происходит горизонтальный перенос генов, что приводит к образованию новых бактериальных фенотипов.

Так как энтеропатогены и свободноживущие простейшие делят среду обитания, можно предположить, что простейшие могут выступать в качестве хозяев и способствовать загрязнению и сохранению патогенов в пищевых средах. Например, было обнаружено постоянное присутствие свободноживущих простейших на птицефабриках [Bar'e et al., 2009]. Таким образом, присутствие свободноживущих простейших в водоснабжении

птицефабрик, а также подверженность к колонизации со стороны кампилобактерий, может быть неисследованной и недооцененной частью маршрута передачи *C. jejuni* домашней птице. При исследовании амёб, выделенных с полей, не предназначенных для выпаса скота, были обнаружены бактерии *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* [White et al., 2010].

1.5.2. Ассоциация сальмонелл со свободноживущими простейшими

Большинство исследований взаимодействия сальмонелл и свободноживущих протистов выполнено на аксенических культурах *Acanthamoeba* и *Tetrahymena* (Таблица 1.1). У них есть преимущество в том, что они аксеничны, неприхотливы, легко культивируются и генетически хорошо охарактеризованы.

Таблица 1.1 – Сообщения об ассоциациях между различными сероварами сальмонелл и простейшими.

Хозяин-протист	Вид/серовар сальмонеллы	Источник
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium, <i>S. enterica</i> serovar Dublin, <i>S. enterica</i> serovar Enteritidis	Gaze et al., 2003, Bleasdale et al., 2008, Huws et al., 2008
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	<i>S. enterica</i> serovar Typhi	Frédéric Douesnard-Malo, France Daigle, 2011
<i>A. rhysodes</i>	<i>S. enterica</i> serovar choleraesuis	Tezcan-Merdol et al., 2004
<i>Naegleria Gruberi</i>	<i>Salmonella</i> SARB strains	Hans Wildschutte et al., 2007
<i>Hartmannella sp.</i>	<i>Salmonella</i> SARB strains	Hans Wildschutte et al., 2007
<i>T. pyriformis</i>	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium	King et al., 1988, Hans Wildschutte et al., 2007
<i>Tetrahymena spp.</i>	<i>S. enterica</i> serovar Thompson	Brandl et al., 2005, Rehfuess et al., 2010
<i>Glaucoma sp.</i>	<i>S. enterica</i> serovar Thompson	Gourabathini et al., 2008
<i>Colpoda steinii</i>	<i>S. enterica</i> serovar Thompson	Gourabathini et al., 2008

<i>Entodinium caudatum</i>	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium	de la Fuente et al., 2010
<i>Cercomonas</i>	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium	Bui et al., 2012

Как известно, акантамебы питаются микроорганизмами путем фагоцитоза, некоторые бактерии имеют способность выживать и размножаться внутри фагосом амеб, в некоторых случаях это приводит к гибели хозяина и выходу бактерий в окружающую среду. Обнаружение сальмонелл, выделенных из двух видов акантамеб, обитающих в воде и иле озера Мальта (Польша), позволяет предположить, что амебы могут служить резервуаром для данных бактерий [Hada's et al., 2004]. К сожалению, из исследования не совсем ясно насколько сильно были заражены амебы, когда произошло заражение и содержали ли образцы воды клетки сальмонелл. Выделение патогенных бактерий непосредственно из свободноживущих простейших подтверждает гипотезу, что они могут выступать в качестве природных резервуаров данных бактерий [Vaerewijck et al., 2014].

Амебы способны поддерживать рост и размножение множества сероваров сальмонелл: *S. Typhimurium* [Gaze et al., 2003], *S. Choleraesuis* [Feng et al., 2009], *Salmonella enterica* serovar Dublin [Tezcan-Merdol et al., 2004], *Salmonella enterica* serovar Typhimurium [Tezcan-Merdol et al., 2004, Bleasdale et al., 2009], *Salmonella enterica* serovar Enteritidis [Tezcan-Merdol et al., 2004].

Серовары сальмонелл имеют различную способность к заражению акантамеб [Tezcan-Merdol et al., 2004]. Наибольшую вирулентность демонстрировал штамм *Salmonella enterica* serovar Dublin. В клетках амеб после 2 часов инфекции наблюдалось наибольшее число клеток данного серовара по сравнению с инфекциями другими сероварами [Tezcan-Merdol et al., 2004]. Также было показано, что на эффективность заражения влияют условия, при которых культура бактерий росла до заражения. В частности, сальмонеллы более эффективно заражали амеб, если выращивались на жидкой питательной среде (LB-бульон), чем растущие на твердой питательной среде

(LB-агар) [Tezcan-Merdol et al., 2004]. Установлено, что ген *hilA* не влияет на способность сальмонелл проникать в клетки амёб (в экспериментах с эпителиальными клетками кишечника было установлено существенное снижение способности сальмонелл проникать внутрь клетки хозяина), что, по-видимому, связано с разным механизмом фагоцитоза амёб и эпителиальных клеток. Однако в экспериментах с мутантами *hilA* продемонстрирован меньший цитотоксический эффект в отношении амёб, чем в экспериментах с диким штаммом сальмонелл [Tezcan-Merdol et al., 2004].

На модели взаимодействия *Acanthamoeba polyphaga* и *Salmonella Typhimurium* SL1344 при культивировании на голодном агаре [Gaze et al., 2003] было обнаружено, что сальмонеллы проникают в сократительную вакуоль амёб и могут сохраняться в ней в течение нескольких суток. Сальмонеллы внутри клеток амёб показывают значительное усиление регуляции *fis* относительно внеклеточных бактерий, что указывает на то, что они находились на ранних стадиях логарифмического роста. На четвертый день количество сальмонелл достигало 100-200 клеток на вакуоль. Повышенная регуляция *fis* наблюдалась также в отношении клеток *S. Typhimurium*, содержащихся в пищеварительных вакуолях [Gaze et al., 2003]. Также было показано, что амёбы опосредует бактериальную транслокацию на поверхности агара – колонии бактерий располагаются вдоль траектории передвижения амёб [Gaze et al., 2003]. Таким образом, можно сделать вывод, что простейшие, такие как *A. polyphaga*, могут играть важную роль в экологии *S. Typhimurium* в почве и водной среде.

S. Typhi могут сохраняться до 3 недель при культивировании совместно с *A. castellanii*, но менее 10 дней, при росте в отсутствие амёб в тех же самых условиях [Douesnard-Malo, Daigle, 2011]. Замечено, что скорости роста амёб после 14 дней сокультивирования были сходными в инфицированных и интактных культурах, что позволяет предположить, что *S. Typhi* не цитотоксична для *A. castellanii*. Бактерии, сохранившиеся при сокультивировании, не были внутриклеточными и не нуждались в физическом

контакте с амебами для выживания. Эти результаты свидетельствуют о том, что амёбы могут способствовать сохранению *S. Typhi* в окружающей среде.

Anacarso и соавторы [2012] наблюдали репликацию *S. enterica* serovar Enteritidis внутри клеток *A. polyphaga*. Причем в первые 48 ч сальмонеллы не обнаруживались, но затем демонстрировали логарифмический рост после 72 ч сокультивирования.

Используя мутантов с неработающей системой секреции 3 типа и анализируя транскрипцию выбранных генов, было показано, что экспрессия генов второго островка патогенности сальмонелл усиливается при заражении амёб, что способствует выживанию внутри фагосом простейших [Bleasdale et al., 2009].

Исследование глобальной экспрессии генов внутриклеточно и внеклеточно локализованных *S. choleraesuis* SC-B67 с помощью микрочипов и количественной ПЦР показало, что экспрессия генов островков патогенности сальмонелл значительно усиливалась внутри *A. rhysodes* [Feng et al., 2009]. Причем экспрессия отдельных островков зависела от стадии инфекции, что указывает на роль отдельных островков патогенности в конкретной стадии инфекции [Feng et al., 2009]. Кроме того, обнаружено, что экспрессия генов синтеза жгутиков была подавлена во время всего процесса заражения. Гены данного комплекса ответственны за подвижность внеклеточных сальмонелл и теряют свою необходимость внутри клетки хозяина. В клетках макрофагов млекопитающих наблюдается схожий эффект, однако в эпителиальных клетках наблюдается высокая экспрессия генов синтеза жгутиков [Hautefort et al., 2008]. Рассматривая вместе результаты, полученные при измерении кривой роста и данных микрочипов, можно заметить последовательность всех событий, происходящих после поглощения сальмонелл *A. rhysodes* [Feng et al., 2009]. С 0 до 6 ч после инфицирования сальмонелла пребывает в латентной фазе, а количество сальмонелл и *A. rhysodes* относительно сбалансировано. С 6 ч до 12 ч после инфицирования сальмонеллы начинают размножаться и опосредуют клеточную смерть *A.*

rhysodes. Возможно, потому что *A. rhysodes* все еще сохраняют свою клеточную структуру в это время, количество клеток не уменьшается, тогда как количество сальмонелл быстро увеличивается. Через 12 ч после инфицирования клетки *A. rhysodes* погибают, и сальмонеллы снова выходят в окружающую среду [Feng et al., 2009].

Таким образом, происходит постоянное взаимодействие свободноживущих амёб с сальмонеллами во внешней среде. Результатом данных взаимодействий часто становится проникновение сальмонелл в клетки простейшего и дальнейшая персистенция патогена. Сальмонеллы в клетках простейших могут переживать неблагоприятные условия внешней среды, в том числе воздействие антимикробных веществ [Carlson et al., 2007; Vingataramin et al., 2025]. Постоянное присутствие свободноживущих амёб в водоемах, несущих рекреационную функцию, а также используемых для водоснабжения может способствовать распространению сальмонелл и возникновению сальмонеллезных инфекций.

В исследованиях различных объектов внешней среды сальмонеллы часто обнаруживаются в ассоциациях с инфузориями, в том числе *Salmonella enterica* serovar Typhi. Ассоциации сальмонелл с инфузориями рода *Tetrahymena* способствует выживанию бактерий в хлорированной воде [King et al., 1988].

При совместном культивировании сальмонелл и инфузорий *T. pyriformis* бактерии активно поглощаются в первые часы контакта, а дальнейшее существование сальмонелл лимитируется температурой: при 10°C они высевались в течение недели, тогда как при 25°C сохранялись более 4 месяцев [Sevast'ianova et al., 1998]. Таким образом, возможность существования патогена внутри простейших ставит под сомнение исключительную роль теплокровного хозяина, что требует дополнительного изучения.

Исследования взаимодействия сальмонелл и инфузорий проводились на модели инфекции *S. enterica* serovar Thompson природных изолятов *Tetrahymena* sp. Окрашивание с помощью витальных красителей позволило

установить, что в вакуолях *Tetrahymena* sp. содержится большое количество жизнеспособных клеток сальмонелл. Это отличается от взаимодействия с *L. monocytogenes*, которые перевариваются простейшими и редко обнаруживаются в везикулах [Brandl et al., 2005; Gourabathini et al., 2008]. Впоследствии, сальмонеллы выводятся в везикулах через порошину в окружающую среду. Каждая везикула содержала около 10 бактерий. Сальмонеллы в везикулах сохранялись дольше, чем не поглощенные клетки в той же среде. В частности, при воздействии гипохлоритом кальция в концентрации 0,0002% бактерии, расположенные в везикулах, выживали до 4,6 чаще, чем свободные клетки бактерий. Лизис тетрахимен не наблюдается в течение всего времени сокультивирования.

Исследование экспрессии генов *Salmonella Typhimurium* в фагосомах инфузорий *Tetrahymena* [Rehfuss et al., 2011] с использованием микрочипов показало, что экспрессия 989 и 1282 генов изменялась по меньшей в два раза в фагосомах *Tetrahymena* по сравнению с экспрессией контрольных культур, культивируемых в воде и LB-бульоне соответственно. В целом, больше генов было подавлено (520 и 81), чем активировано (469 и 47), в фагосомах *Tetrahymena* в отличие от воды и LB-бульона, соответственно. Гены, экспрессия которых усиливалась внутри простейших, участвуют в анаэробном метаболизме и использовании альтернативных акцепторов электронов. Множество генов, отвечающих за выживание и репликацию внутри макрофагов и эпителиальных клеток кишечника также активировались в клетках тетрахимен. Например, ген *mgtC*, отвечающий за выживание в среде с низким содержанием ионов магния. Экспрессия генов *adiA* и *adiY*, участвующих в устойчивости к кислой среде, также усиливалась внутри фагосом простейших. Мутантный штамм сальмонелл имел более низкую способность к выживанию при пассаже через тетрахимен [Rehfuss et al., 2011].

Кроме того, довольно большое число дифференциально экспрессирующихся генов участвуют в репликации, рекомбинации и репарации, а также синтезе клеточной стенки/мембраны. Детальное изучение

подробных списков генов показало, что условия внутри фагосомы индуцируют ряд генов, участвующих в анаэробии. Например, гидрогеназные опероны *huc*, *hyd* и *hup*, а также гены редуктазы *dmsAB* и *frdBA* [Rehfuss et al., 2011].

В экспериментах по сокультивированию мутантных штаммов сальмонелл *S. Enteritidis* SDC-11 с инфузориями *T. thermophila* SB210 показана ключевая роль гена *rfbP* в адаптации сальмонелл к инфузориям [Huang et al., 2025]. Мутация в гене *rfbP* блокирует синтез липополисахаридного О-антигена и приводит к повышению регуляции транскрипционного фактора *csgD*, который играет центральную роль в регуляции адаптации *Salmonella* к неблагоприятной среде. В целом, мутация *rfbP* и вызванная этим активация *csgD* в адаптированных к *Tetrahymena* сальмонеллах представляют собой эволюционный компромисс, посредством которого бактерии разрабатывают некоторые стратегии для преодоления неблагоприятных условий окружающей среды, включая снижение подвижности и увеличение образования биопленки.

Таким образом, на сегодняшний день существует множество убедительных доказательств резервуарной роли простейших для патогенных бактерий, включая сальмонелл. Существует единичные работы, позволяющие оценить участие отдельных генов или факторов патогенности при инфекции гетеротрофных протистов. Тем не менее, большая часть механизмов адаптации сальмонелл к условиям внутри клеток простейших остаются неясны. В нашей работе мы оценили глобальный транскриптом *S. Typhimurium* внутри клеток *A. castellanii* на ранней стадии инфекции, а также исследовали динамику экспрессии отдельных функциональных групп генов на различных этапах инфекции, что в конечном итоге позволило как подтвердить участие островков патогенности, факторов ответа на окислительный стресс, транспорта железа при инфекции различных хозяев, так и выявить специфические особенности экспрессии генов сальмонелл внутри акантамеб.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования и среды культивирования

Культуру *Salmonella enterica* subspecies enterica serovar Typhimurium штамм ATCC® 14028, любезно предоставленную к.б.н. Н.Е. Гоголевой (Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН), выращивали на среде LB-Lennox (триптон – 10 г/л, хлорид натрия – 10 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л) при 37°C без добавления антибиотика.

Аксеничная культура свободноживущих амёб *Acanthamoeba castellanii* Neff ATCC® 30010™ была получена из американской коллекции типовых культур (ATCC, США). Культуру амёб выращивали в 10 мл среды PYG (20 г/л пептона, 1 г/л дрожжевого экстракта, 18 г/л глюкозы, 1 г/л цитрат натрия, 4 mM MgSO₄ × 7H₂O, 0,5 mM CaCl₂, 2,5 mM Na₂HPO₄ × 7H₂O, 2,5 mM KH₂PO₄, 0,05 mM Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ × 12H₂O, и 0,1 M глюкоза; pH 7,0) в стерильных 50 мл пластиковых пробирках (Eppendorf, Германия) при 25°C. Пересев культур производился каждые 7 дней.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Совместное культивирование сальмонелл и акантамёб

Аксеническую культуру *Acanthamoeba castellanii* выращивали в течение 7 дней в вентилируемых колбах в 50 мл среды PYG до концентрации 4-5×10⁵ клеток в 1 мл. Клетки трижды отмывали стерильной средой PAS [Douesnard-Malo, Daigle, 2011] с помощью центрифугирования при 800×g в течение 10 минут и ресуспендированием осадка в свежей среде после каждого этапа отмывки. 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. Сальмонеллы добавляли к культуре акантамеб в соотношении бактерий к амебам 100:1. Совместную культуру инкубировали в течение 1 ч, пока большинство бактерий не были поглощены клетками амеб. 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 повторность включала не менее трех технических повторов.

2.2.2 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). Контрольные образцы, а также инфицированные клетки амеб анализировали в трех биологических повторностях через 0, 3, 10, 24, 48, 72, 120 и 168 часов после начала культивирования. В экспериментах по оценке жизнеспособности при длительном культивировании культуры амеб выращивали в 48-луночных планшетах (Nest, Китай). В контрольных точках эксперимента к культуре добавляли раствор красителя трипанового синего в PAS в соотношении 1:10. Процент погибших амеб определяли путем подсчета числа клеток амеб, окрашенных синим, по отношению к общему числу амеб, по ранее описанной

методике [Steenbergen et al., 2001]. Жизнеспособность амёб также оценивали с использованием автоматического счетчика клеток NucleoCounter NC-200 (Chemometec, Дания) в присутствии красителей Acridine Orange и DAPI.

2.2.3 Оценка динамики численности сальмонелл

При оценке численности жизнеспособных внутриклеточно локализованных сальмонелл при культивировании с *A. castellanii* в среде с добавлением гентамицина, к культуре амёб добавляли сальмонеллы 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 амёб стерильной средой PAS и помещали отмывые 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 высевов последовательных серийных разведений на агаризованную среду LB с дальнейшим подсчетом КОЕ сальмонелл, выросших на следующие сутки.

2.2.4 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° С 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 enterica* serovar Typhimurium 14028S с помощью электропорации. Культуру выращивали в течение 15–18 ч при 37° С на твердой среде LB с добавлением антибиотика ампициллина и арабинозы. Изображения инфицированных рекомбинантным штаммом клеток амеб 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). Дифференциальный интерференционный контраст использовался для визуализации живых клеток на детекторе ТРМТ. Для детекции репортерного флуоресцентного белка eGFP использовали лазер с длиной волны 488 нм. Для получения и обработки изображений использовали программу ZEN 2012 Black версии 2.3 («Zeiss», Германия).

2.2.5 Подготовка образцов для выделения РНК в экспериментах по оценке транскрипта 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°C, 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 (предварительно культуру *A. castellanii*, выращенную на среде PYG, трижды отмывали и инкубировали в течение 1 ч при 25°C на среде PAS для адаптации к условиям среды как описано выше) в пропорции бактерий к амебам 100:1. Через 1 ч после заражения совместную культуру центрифугировали при 800×g, 25°C 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°C; инфицированные клетки амеб центрифугировали при 800×g в течение 10 мин при 25°C, 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°C 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°C.

2.2.6 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°C в течение 72 ч, после чего производили подсчет КОЕ. Контроль внеклеточных сальмонелл также проводили с помощью ПЦР.

Для ПЦР супернатант после каждого центрифугирования отбирали в стерильную пробирку объемом 1,5 мл, затем 100 мкл переносили в новую стерильную пробирку объемом 1,5 мл, добавляли лизирующий матрикс Lysing matrix E (Zymo Research, США) в равном объеме. Образцы гомогенизировали с помощью Tissue Lyser LT (QIAGEN, Германия) в течение 5 мин при 50 Гц. Лизаты инактивировали нагреванием при 95°C в течение 5 мин. Для проведения ПЦР использовали реакционную смесь общим объемом 25 мкл: 15,5 мкл воды MQ, 5 мкл Q5 реакционного буфера (New England Biolabs, США), 1,25 мкл 2,5 мМ смеси дезоксинуклеотидтрифосфатов, по 0,5 мкл прямого и обратного праймеров (10 мМ), 0,2 мкл Q5 High-Fidelity ДНК-полимеразы (New England США) и 2 мкл образца. 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 Cartridge и маркером размера ДНК QX 15 п.н. – 3000 п.н. Размеры продуктов ПЦР оценивали с помощью программного обеспечения QIAxcel ScreenGel (Qiagen, Германия).

2.2.7 Выделение тотальной РНК и оценка качества полученных препаратов

Тотальная РНК была выделена с помощью реагента ExtractRNA (Евроген, Россия) по протоколу производителя. После выделения РНК хранили в морозилке при -80°C. Во время последующих манипуляций образцы РНК хранили на льду. 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) с набором для измерения концентрации РНК Qubit RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Качество, чистоту и концентрацию РНК также оценивали с помощью спектрофотометра NanoPhotometer NP80 (Implen,

Германия), а также с помощью биоанализатора нуклеиновых кислот Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, США) и набора RNA 6000 Pico kit (Agilent Technologies, США). Для подготовки библиотек использовали РНК с показателями $OD_{260/280} = 1,9-2,0$ и $OD_{260/230} = 2,2-2,4$.

2.2.8 Подготовка библиотек для секвенирования

Подготовку библиотек кДНК проводили по ранее описанному протоколу [Ettwiller et al., 2016]. Тотальная РНК контрольной культуры сальмонелл (5 мкг) и РНК сальмонелл и акантамеб (10 мкг) подвергалось кэпированию 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°C. 3'-фосфаты были удалены из фрагментированной РНК с помощью обработки Т4-полинуклеотидкиназой при 37°C 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°C 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). В данном исследовании был проведен один раунд обогащения на стрептавидиновых частицах, что позволило снизить процент рРНК до менее 50% от общей РНК. После второго раунда обогащения выход РНК резко снижался, что не позволяло использовать ее для подготовки библиотеки.

Дестиобиотиновый кэп был удален с помощью буфера Thermopol (New England Biolabs, США) и фермента RppH (New England Biolabs, США)

прогреванием при 37°C в течение 60 мин. Реакция была остановлена добавлением 0,5 мкл 0,5 М ЭДТА и прогреванием при 94°C в течение 2 мин. 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 (одноконцевые чтения 50 п.н. Illumina, США) 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).

2.2.9 Количественная ПЦР в режиме реального времени

Для валидации результатов транскриптомного 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) (Таблица 2.1). Синтез олигонуклеотидов проводила фирма Евроген (Россия).

Таблица 2.1 – Список и последовательности праймеров, используемых в данном исследовании.

Название	Последовательность праймера (5' – 3')	Функция гена
katG_F	ATCCAACCGTTCTAACCCGCTG	Каталаза, пероксидаза
katG_R	GCCATACGAATAAACAACCGACATAGC	
grxA_F	GCCCTTATTGCGTGCGTGC	Глутаредоксин А
grxA_R	CTGCGGTACGGTTTCTACAGGTTTAC	
sitA_F	CGCCGATCAACAGGGGACG	транспорт марганца/железа
sitA_R	CGACATACAGCACGCCGCC	

entS_F	ATGAATCGACAATCCTGGCTGCTC	Сидерофор энтеробактин
entS_R	AGGTGGAGTGCATCATTTGG	
aceB_F	TACGCCAAAACGCAATAAACTCCTG	Малатсинтаза
aceB_R	CGGAATACCACGAATCTGCCAATTAC	
agp_F	GCTGTTTTGTTGTCATCCGCCG	Глюкозо-1-фосфатаза
agp_R	CGCCTTTCGTCGTCAGTTGCC	
fliL_F	GTTGATTACCCTCGCCGCCTG	Компонент жгутикового аппарата
fliL_R	GGTCACGCCGATATACAACACGC	
cheA_F	GAGAGCGTAGCCGAAACCGAATC	Хемотаксис
cheA_R	TCCGTCAGAGTAGCCAGATTGCC	
mliC_F	GGAATACCAGTGTGATGAGAAGCCG	Ингибитор лизоцима
mliC_R	GCCTTGCGACCAGAAAACATAAATC	
pliC_F	CGTCAACACCGAGGCTGGAAAC	Ингибитор лизоцима
pliC_R	CGTCAACACCGAGGCTGGAAAC GTCTATGGCTTCGTAATTTGCTCCG	
hilA_F	TGCCGTTCTGGTCATCCTGCTC	Транскрипционный регулятор SPI-1
hilA_R	ACCGATAGCCCTGTCCGTACAGTG	
sipC_F	GCGAAGGGATGAATGCGTTGTC	Инвазия в эпителиоциты
sipC_R	TGTGGCTTTCAGTGGTCAGTTTATCG	
invF_F	TGGGTTTTGCTGAGTCCTGAGTTTC	Транскрипционный регулятор SPI-1
invF_R	CATTCTCATCGTGTGCGCGCTG	
phoP_F	CATCCCGCCGTTCCAGGTG	Транскрипционный регулятор SPI-2
phoP_R	CGAATCTTTGCTGACCACTTACCG	
sseC_F	AATGTCAGTTGCGTTTCCTCGGG	Фактор вирулентности SPI-2
sseC_R	CGGGTACGGCATCAAGCAGTTG	
gyrA_F	TGAGCGACCTTGCGAGAGAAATTAC	ДНК-гираза
gyrA_R	TGTTCCAGTCATTGCCCAATACG	
glnA_F	CTGAACGAGCACGAAGTGAAGTTTG	Глутаминсинтетаза
glnA_R	CCGCCGATAGAGGAGCCGTC	
rpoD_F	GCCGTGCGAAGAAAGAGATGG	Сигма-фактор РНК полимеразы
rpoD_R	GCATAGGTGGAGAATTTGTAGCCG	

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). Анализ кривых плавления (от 55°C до 95°C) был выполнен для анализа специфичности ПЦР-продуктов. Эффективность ПЦР оценивали на основе значения C_q для логарифмических разведений стандартного образца. Дифференциальную экспрессию генов оценивали с помощью программного обеспечения REST 2009 (<https://www.gene-quantification.de/rest-2009.html>).

2.2.10 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 с помощью программы bbdut (<https://sourceforge.net/projects/bbmap/>). Программу SortMeRNA версия 2.1 [Kopylova et al., 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, Salzberg., 2012] в режиме локального выравнивания (L -16), затем картировали на геном *S. Typhimurium* 14028S (GCA_000022165.1) с аналогичными параметрами. Картированные риды конвертировали в формат «bam» с помощью утилиты SAMtools [Li et al., 2009].

Покрываемость ридов на ген/оперон рассчитывали с помощью функции featureCounts, входящей в пакет R «Rsubread» [Liao et al., 2014]. Для аннотации генов по оперонам использовали базу данных Door2 [Mao et al., 2014]. Полученные значения покрытия для генов и оперонов использовали для расчета дифференциальной экспрессии с помощью пакета R «DESeq2» [Love et al., 2014]. Гены со значением $p < 0,05$ (с поправкой на множественную проверку гипотез FDR), минимальным покрытием более 10 ридов, и изменением экспрессии по сравнению с контрольной культурой более чем в 2

раза считали достоверно дифференциально экспрессирующимися. График анализа главных компонент (PCA) был построен на основе логарифмически преобразованных значений экспрессии в R с помощью пакета «DESeq2». Анализ обогащения по функциональной принадлежности (GSEA) метаболических путей выполняли с помощью пакета fgsea [Korotkevich et al., 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 et al., 2016].

Материалы данной главы отражены в публикациях:

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.
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.
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.
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.

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ *ACANTHAMOEBA CASTELLANII* С БАКТЕРИЯМИ *SALMONELLA* *ENTERICA* SEROVAR TYPHIMURIUM 14028S

3.1 Динамика жизнеспособности и численности сальмонелл и акантамеб в чистой культуре и при модельной инфекции

Свободноживущие амёбы *Acanthamoeba castellanii* – гетеротрофные протисты, повсеместно распространённые в окружающей среде, включая природные водоемы и питьевую воду. Известно, что в естественных водоемах *A. castellanii* питаются бактериями, которые, в свою очередь, способны противостоять перевариванию и выживать внутри амёб [Amaro, Martín-González, 2021]. На сегодняшний день сообщается о более чем 20 видах патогенных бактерий, ассоциированных с акантамебами [Rayamajhee et al., 2021], включая сальмонелл.

Необходимым этапом транскриптомного исследования является разработка оптимальной модели взаимодействия *S. Typhimurium* 14028S и *A. castellanii*. Для оценки экспрессии генов сальмонелл на различных сроках взаимодействия с амёбами методами транскриптомного анализа и ПЦР в режиме реального времени разработанная модель должна соответствовать следующим требованиям на протяжении всего срока взаимодействия сальмонелл и амёб:

- 1) Условия сокультивирования (совместного культивирования) максимально приближены к условиям природных и искусственных водных экосистем, где зарегистрированы взаимодействия сальмонелл и амёб;
- 2) Для амёб должны быть обеспечены оптимальные параметры культивирования с минимальной интенсивностью отмирания и перехода в цисты;
- 3) Внутриклеточно локализованные клетки сальмонелл должны максимально сохранять свою жизнеспособность;

- 4) Амебы должны поглощать и сохранять клетки сальмонелл в количестве, достаточном для оценки экспрессии генов;
- 5) Необходимо исключить вклад внеклеточно локализованных сальмонелл в общую экспрессию бактериальных генов в процессе сокультивирования.

3.1.1 Подбор оптимальной среды культивирования и определение параметров заражения амеб для оценки экспрессии генов на ранних этапах взаимодействия

Аксеничную культуру свободноживущих амеб *Acanthamoeba castellanii* выращивали на богатой жидкой питательной среде PYG. Данная среда была взята за основу для создания модели взаимодействия бактерий *S. enterica* serovar Typhimurium 14028S со свободноживущими амебами *A. castellanii*, в которой оценивали влияние количества источников углерода на численность амеб и соотношение трофозоитных форм, цист и мертвых клеток, а также на динамику роста сальмонелл.

Нами оценена динамика численности сальмонелл и амеб, растущих при температуре 25°C в обедненной питательными веществами (разбавленной) среде PYG (1/5-PYG и 1/10-PYG) и в среде без углерода (PAS). Выбор температуры и сред был обусловлен необходимостью приблизить модель к условиям природных и искусственных водных экосистем. 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 3.1). В свою очередь, при инкубировании на среде PAS концентрация жизнеспособных сальмонелл в течение первых суток остается практически на уровне изначально внесенной (Рисунок 3.1).

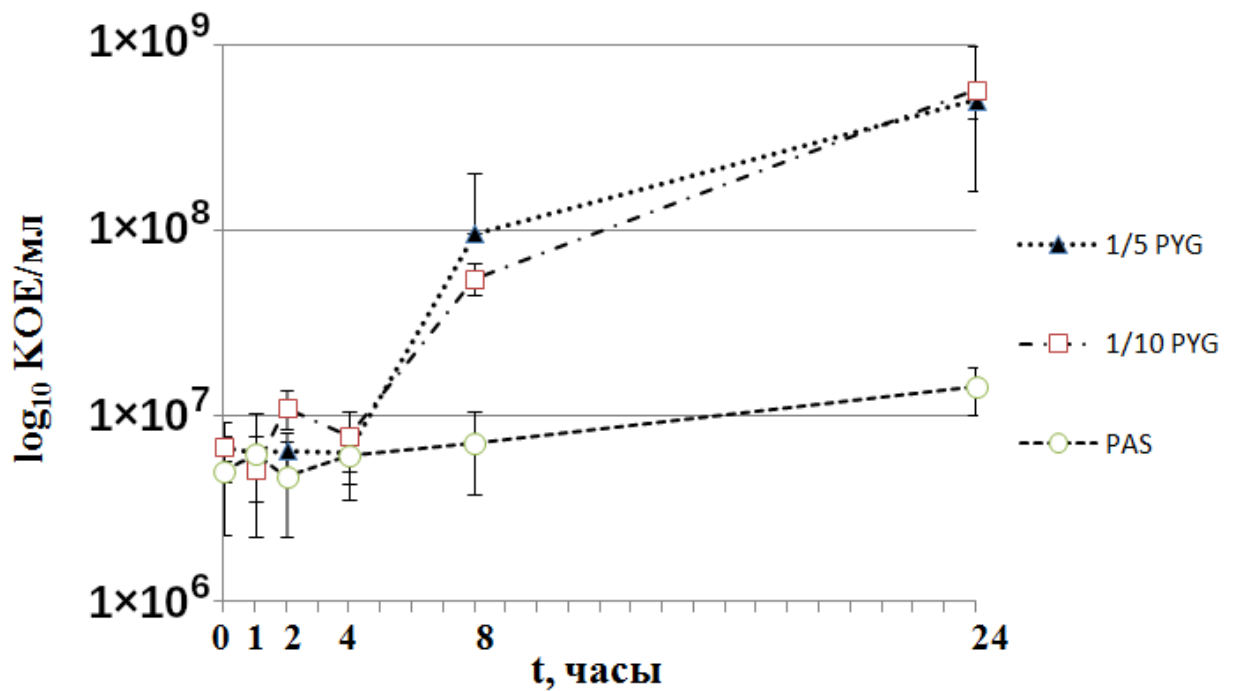


Рисунок 3.1 – Динамика численности сальмонелл при росте на средах PYG и PAS с различным содержанием органического углерода при 25°C. Ось абсцисс – количество сальмонелл, ось ординат – время инкубации

Для амеб наблюдается схожая картина динамики численности жизнеспособных клеток. В первые часы эксперимента, клетки амеб, помещенные в среду PAS сохраняют свою жизнеспособность и численность, морфология клеток не претерпевает изменений. Инцистирование происходит только на 3-5 сутки культивирования.

На следующем этапе было необходимо определить оптимальное время сокультивирования сальмонелл и амеб в начальной фазе эксперимента. Из опубликованных данных известно, что большая часть бактерий поглощается амебами в первые минуты сокультивирования, после чего количество поглощенных клеток растет медленно. Мы наблюдали схожую динамику в экспериментах по сокультивированию *S. enterica* serovar Typhimurium 14028S с *A. castellanii*: большинство сальмонелл было поглощено в первые минуты заражения, а после 1 ч сокультивирования наблюдался максимум поглощенных клеток. В дальнейшем, через 2 ч наблюдался рост популяции внеклеточно локализованных сальмонелл в средах 1/5 PYG и 1/10 PYG. В среде PAS

плотность популяции сальмонелл оставалась на уровне, зафиксированном на старте эксперимента. Кроме того, было установлено, что в первые часы сокультивирования не наблюдается гибели амёб под воздействием сальмонелл (Таблица 3.1). Однако стоит отметить, что на последующих сроках сокультивирования наблюдается размножение сальмонелл в среде, что через 12-16 ч после инфицирования приводит к массовой гибели акантамёб.

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 3.1).

Таблица 3.1 – Определение жизнеспособности амёб после 2 ч совместного культивирования с клетками сальмонелл при различной исходной плотности

Соотношение клеток амёб:сальмонелл при заражении	Количество жизнеспособных амёб, в %	log ₁₀ КОЕ/мл внутриклеточно локализованных сальмонелл	log ₁₀ 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

Жизнеспособность амёб оценивали с помощью автоматического счетчика NucleoCounter NC-200, а также с помощью световой микроскопии с использованием витальных красителей (трипановый синий). 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 $87,43 \pm 3,68\%$.

Результаты высевок показали, что 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.

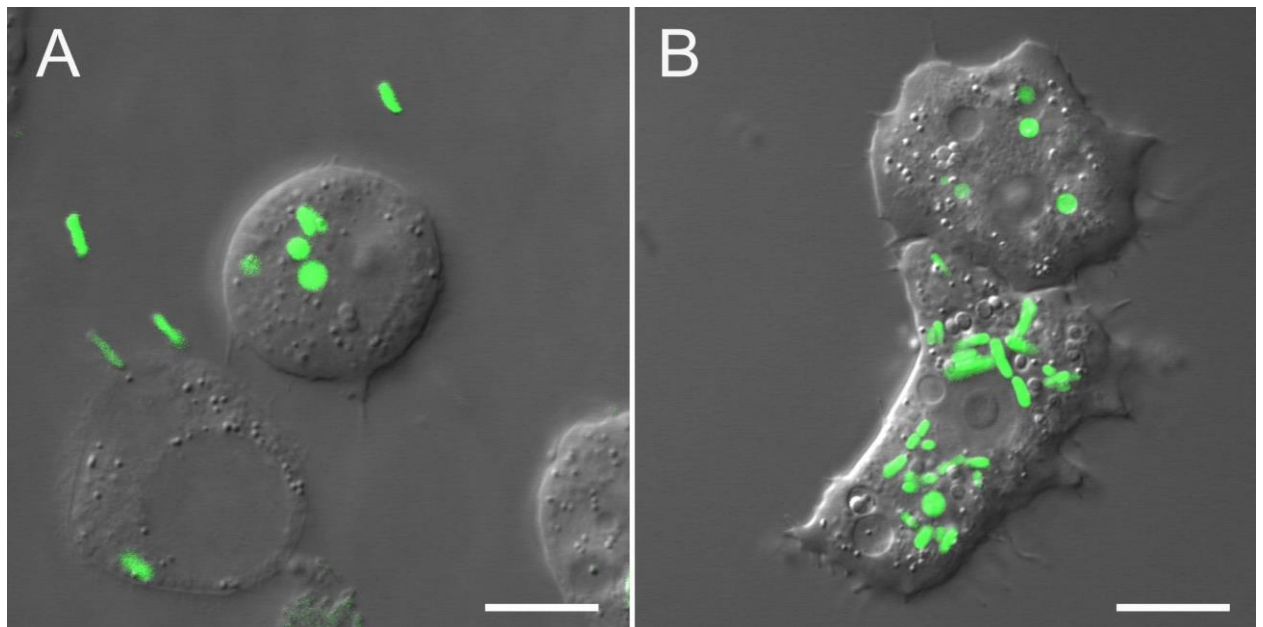


Рисунок 3.2 – Изображения *A. castellanii* инфицированных *S. Typhimurium* 14028S (GFP) до (А) и после (Б) процедуры промывки. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия: дифференциально-интерференционный контраст наложен на одноканальные оптические изображения GFP-флуоресценции в зеленом канале. Масштабные линейки - 10 мкм

Чтобы подтвердить внутриклеточную локализацию сальмонелл, а также проконтролировать отсутствие значительного числа внеклеточных сальмонелл, были получены изображения сальмонелл с помощью конфокальной лазерной микроскопии до и после процедур отмывки (Рисунок 3.2). Изображения, полученные с использованием конфокальной

микроскопии, подтверждают, что после трехкратной отмывки, большинство клеток акантамеб содержат внутри сальмонеллы (Рисунок 3.2Б).

Для контроля отсутствия внеклеточных сальмонелл супернатанты после последнего раунда отмывки высевали на твердую питательную среду LB, а также оценивали ампликоны после ПЦР со специфичными к сальмонелле праймерами.

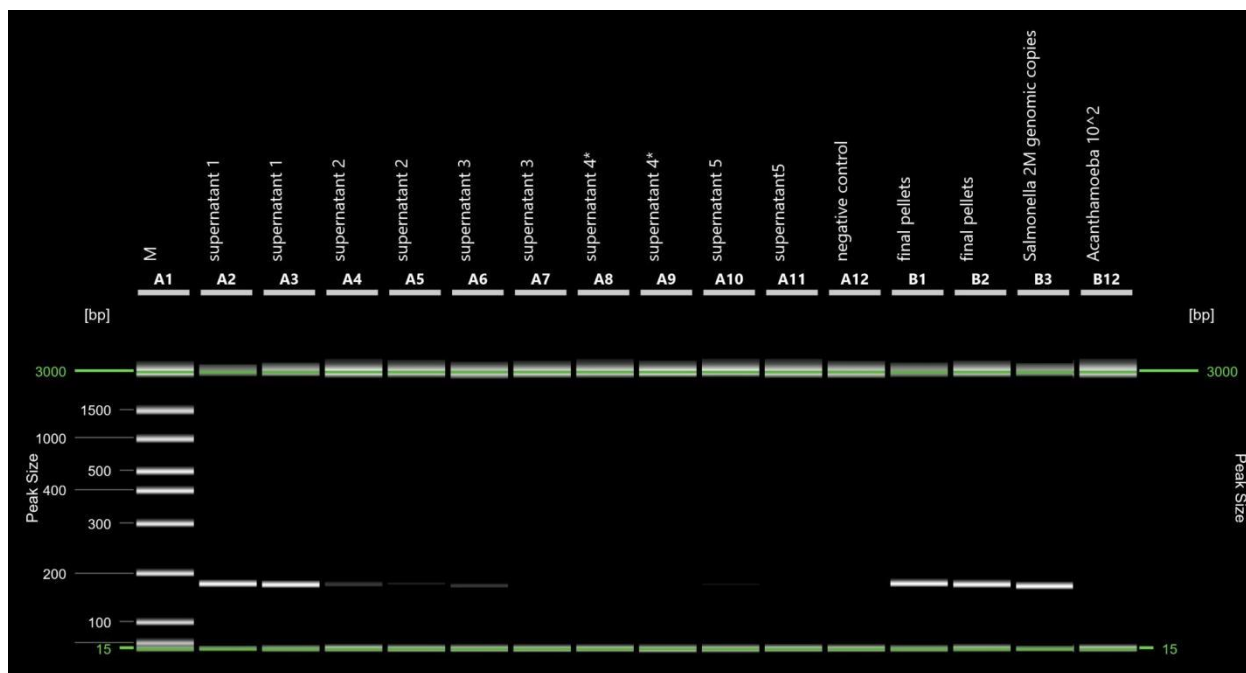


Рисунок 3.3 – Изображения продуктов ПЦР с помощью капиллярного электрофореза в системе QIAxcel Advanced System (Qiagen, Германия) с картриджем для быстрого анализа ДНК QIAxcel DNA Fast Analysis Cartridge и маркером размера фрагментов ДНК QX 15 п.н.–3000 п.н.

Высев 100 мкл супернатанта на агаризованную среду LB с последующим культивированием при 37°C в течение 72 ч не выявил роста бактериальных колоний. Контроль внеклеточных сальмонелл с помощью амплификации лизатов супернатанта с сальмонелл-специфичными праймерами и последующей детекцией с помощью капиллярного электрофореза показал отсутствие ампликона в супернатанатах, полученных после четвертой и пятой отмывки амеб от внеклеточных бактерий с помощью центрифугирования (Рисунок 3.3).

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 при которой:

- 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.

3.1.2 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 трофozoитов к цистам оставались стабильными в течение первых

24 ч эксперимента (Рисунок 3.4А, В, Рисунок 3.4). Общее количество жизнеспособных (включая трофозоиты и цисты) неинфицированных амёб постепенно снижалось в процессе культивирования, однако изменения были статистически незначимыми. Количество жизнеспособных амёб снизилось с $1,65 \pm 0,27 \times 10^4$ кл/мл до $7,4 \pm 6,6 \times 10^3$ кл/мл на 7-й день культивирования на среде 1/5 PYG, с $1,58 \pm 0,21 \times 10^4$ кл/мл до $6,68 \pm 6,42 \times 10^3$ кл/мл на среде 1/10 PYG, и с $1,49 \pm 0,18 \times 10^4$ кл/мл до $6,03 \pm 4,95 \times 10^3$ кл/мл на среде PAS (Рисунок 3.4А).

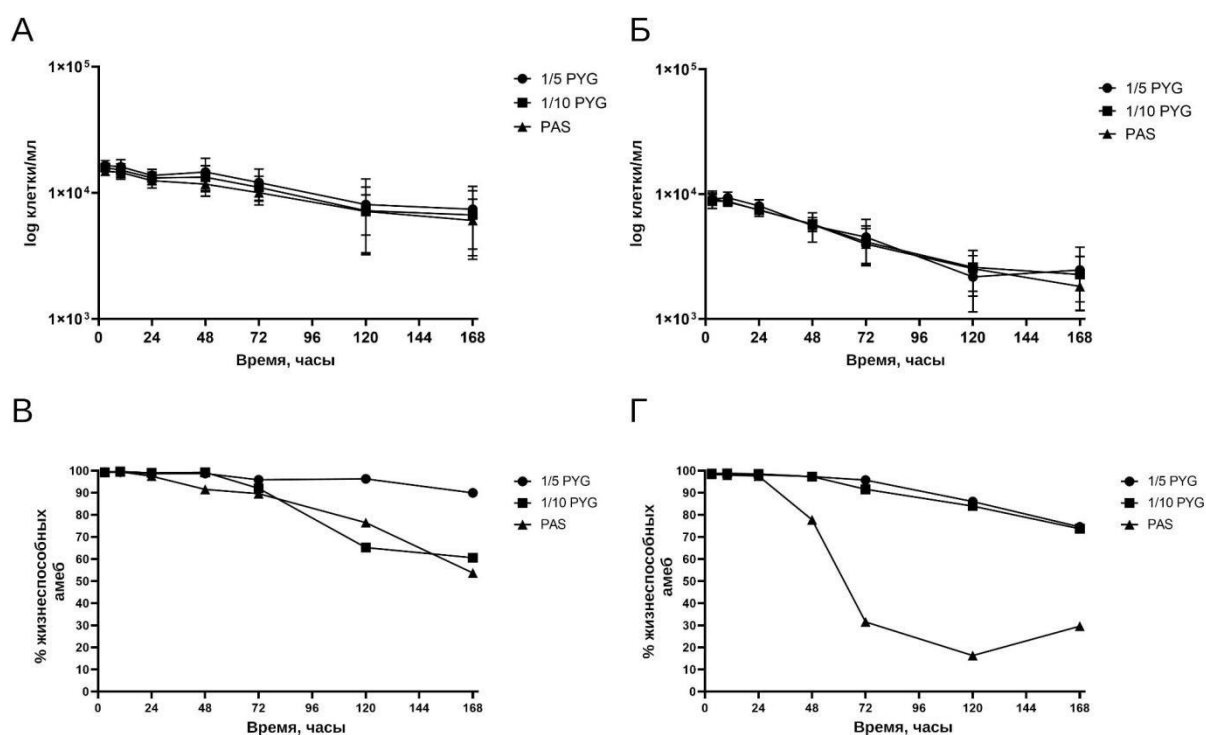


Рисунок 3.4 – Динамика численности жизнеспособных клеток (трофозоитов и цист) *A. castellanii* в контрольных (А, В) и инфицированных сальмонеллами (Б, Г) культурах на средах с различной концентрацией органических соединений: 1/5 PYG, 1/10 PYG и PAS в присутствии гентамицина. Приведены количество жизнеспособных 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

Доля жизнеспособных клеток контрольных культур оставалась стабильной в течение первых 48 ч эксперимента на среде 1/5 PYG (98%) и 1/10 PYG (99%), и незначительно снижалась до 91% на среде PAS. Доля жизнеспособных амёб заметно снизилась через 72 ч после начала культивирования и составила 96%, 92% и 89% на средах 1/5 PYG, 1/10 PYG и PAS соответственно (Рисунок 3.4В). К концу периода наблюдения (7-й день) наибольшая доля жизнеспособных клеток амёб наблюдалась при культивировании на среде 1/5 PYG (90%), в то время как на средах 1/10 PYG и PAS она снижалась до 61% и 54% соответственно.

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 3.4Б).

Соотношение жизнеспособных и погибших клеток амёб в контрольной и инфицированной культурах на средах 1/5 и 1/10 PYG было схожим (Рисунок 3.4), 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 3.4Г). Мы не выявили статистически значимого влияния среды культивирования на динамику численности жизнеспособных амёб ни в контрольных, ни в инфицированных культурах. Однако на среде PAS обнаружено заметное снижение доли жизнеспособных амёб, инфицированных сальмонеллой, которое происходило через 72 ч культивирования. На более богатых средах 1/5 и 1/10 PYG доля жизнеспособных амёб снижалась медленнее. Интересно отметить, что тенденция изменения доли цист была аналогичной в контрольных и инфицированных культурах амёб, независимо от типа среды (Рисунок 3.5).

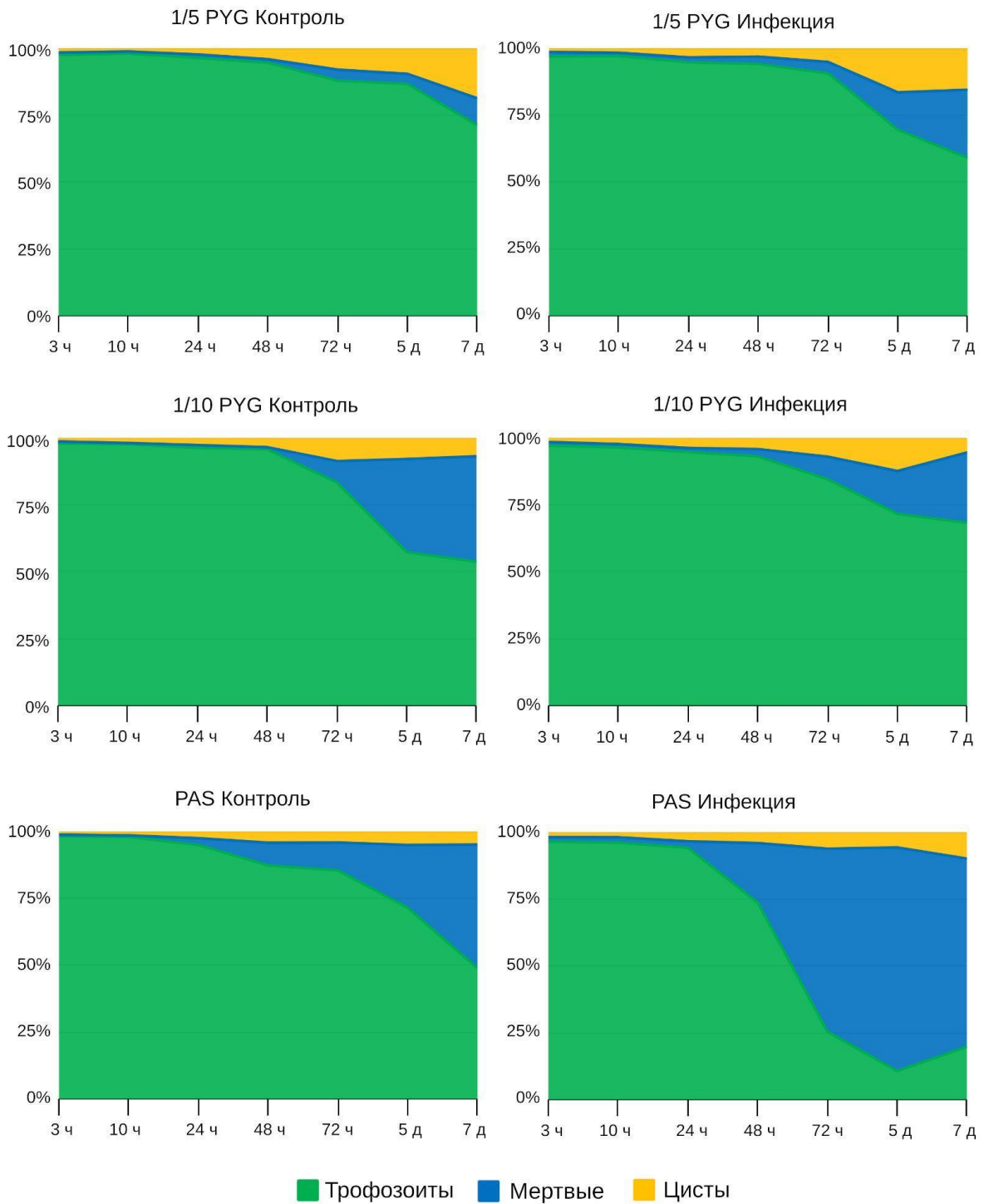


Рисунок 3.5 – Динамика численности трофозоитов, мертвых клеток и цист *Acanthamoeba castellanii* в контрольных культурах (А, В, Д) и культурах, инфицированных *Salmonella Typhimurium* 14028S (Б, Г, Е), на средах 1/5 PYG (А, Б), 1/10-PYG (В, Г) и PAS (Д, Е)

3.1.3 Динамика численности жизнеспособных сальмонелл при совместном культивировании с амебами 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 3.6). 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.

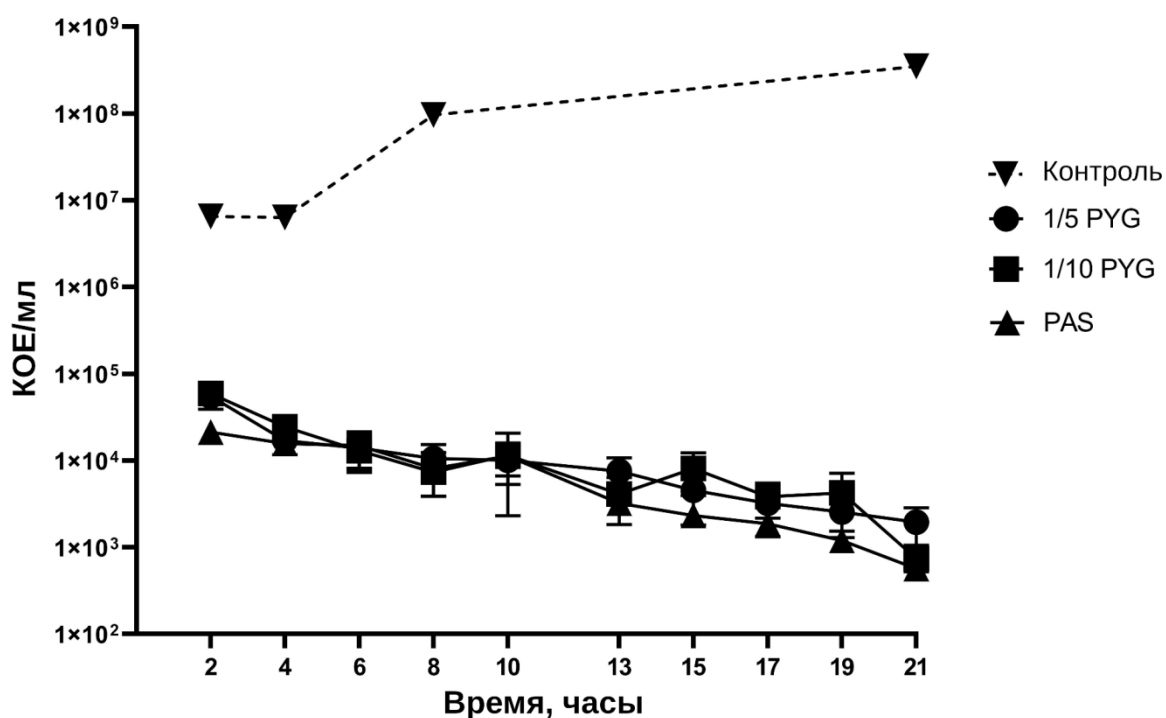


Рисунок 3.6 – Динамика численности внутриклеточных *S. Typhimurium* 14028S и контрольной культуры в отсутствии акантамеб и антибиотика. Точки на графике представляют собой среднее значение $\pm$ стандартные ошибки среднего, рассчитанные по 9 повторностям

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) взаимодействия с *A. castellanii*.

3.2. Обсуждение полученных результатов

В нашем исследовании была выявлена способность *S. Typhimurium* 14028S выживать в клетках *A. castellanii* в течение как минимум 21 ч совместного культивирования. Несмотря на то, что количество жизнеспособных сальмонелл значительно снизилось в 30 – 80 раз к 21 ч совместного культивирования, оно оставалось достаточно высоким (10^3 КОЕ/мл), чтобы обеспечивать внутриклеточную персистенцию бактерий. Таким образом, сальмонеллы, оставшиеся внутри клеток амёбы, были защищены от антибактериального действия гентамицина, содержащегося в среде. Ранее было показано снижение численности бактерий различных сероваров *S. enterica* при сокультивировании с *Acanthamoeba rhysodes* через 16 ч после заражения [Tezcan-Merdol et al., 2004]. Авторы связывают это как с перевариванием бактерий клетками *A. rhysodes*, так и с одновременным высвобождением сальмонелл из погибших клеток амёб в среду, содержащую

гентамицин, с последующей гибелью бактерий. Кроме того, имеются данные об ингибирующей активности бесклеточных супернатантов *Acanthamoeba* в отношении *S. Typhi* [Özcan et al., 2025]. Однако в отношении *S. enterica* ингибирующий эффект не был обнаружен [Özcan et al., 2025]. В нашем исследовании не наблюдалось полной элиминации сальмонелл, но также было зафиксировано значительное снижение их численности. Следует отметить, что скорость снижения численности бактерий не зависела от концентрации питательных веществ в среде. Однако мы не можем исключить, что снижение численности бактерий было вызвано частично постепенным накоплением гентамицина в клетках *Acanthamoeba*, как это было показано ранее для *Y. pestis*, находящихся внутриклеточно в макрофагах [VanCleave et al., 2017]. Было показано, что жизнеспособность внутриклеточных *Y. pestis* снижалась при концентрациях гентамицина в среде, превышающих 4 мкг/мл [VanCleave et al., 2017]. Другие исследования также показали, что сокультивирование с амебами способствует персистенции сальмонелл [Douesnard-Malo, Daigle, 2011, Riquelme et al., 2016, Mannan et al., 2020]. Например, при сокультивировании *S. Typhimurium* 14028S с клетками *D. discoideum* наблюдалось сохранение высокой плотности бактерий по крайней мере в течение 24 ч после заражения, достигая пика к 6 ч [Riquelme et al., 2016]. В другом исследовании было показано, что *S. Typhi* в присутствии *A. castellanii* сохранялись в течение 21 дня [Douesnard-Malo, Daigle, 2011]. Однако в обоих описанных случаях эксперименты проводились в отсутствие антибиотика, что приводило к активному размножению бактерий в среде культивирования. Таким образом, выживание сальмонелл внутри акантамеб свидетельствует об устойчивости бактерий к перевариванию со стороны простейших [Tezcan-Merdol et al., 2004]. Более того, нахождение бактерий внутри клеток хозяев помогает им избегать внешних угроз, таких как воздействие антибиотиков [Mannan et al., 2020]. Применение антибиотика в нашем исследовании помогло избавиться от вклада внеклеточных сальмонелл в экспрессию генов сальмонелл, сокультивируемых с амебами.

В настоящее время имеются противоречивые данные о цитотоксическом воздействии *S. enterica* на клетки амёб. Ранее было показано, что совместное культивирование *S. Typhi* с *A. castellanii* в течение 14 дней не приводит к цитотоксическому действию по отношению к амёбам [Douesnard-Malo, Daigle, 2011]. С другой стороны, штаммы *S. Typhimurium* 14028S и *S. Dublin* вызывали гибель *A. rhysodes* через 16 ч после заражения [Tezcan-Merdol et al., 2004]. В нашем исследовании мы не наблюдали заметного цитотоксического эффекта сальмонелл при культивировании в среде 1/5 и 1/10 PYG. Однако в среде PAS в отсутствии источников углерода наблюдался выраженный цитотоксический эффект на амёб, что привело к значительному снижению доли жизнеспособных клеток до 18,8% на 5 день сокультивирования. Эти результаты хорошо согласуются с недавним исследованием [Mannan et al., 2020], в котором была показана гибель клеток *A. castellanii*, вызванная *S. Typhimurium* при культивировании в фосфатном буферном растворе (PBS). В недавних исследованиях цитотоксический эффект *S. Typhimurium* 14028s объясняется высокой концентрацией бактерий в среде культивирования, размножающихся в отсутствие антибиотиков [Mannan et al., 2020]. Более того, по нашим данным, цитотоксический эффект сальмонелл в отношении амёб не зависел от концентрации питательных веществ и был одинаковым в средах 1/5 PYG, 1/10 PYG и PAS. Таким образом, цитотоксическое действие сальмонелл на амёб не определяется концентрацией источников углерода, но усиливается за счет размножения внеклеточных бактерий в среде, не содержащей антибиотиков.

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 амебами 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 амеб в условиях, аналогичных водным экосистемам с низким содержанием питательных веществ.

Материалы данной главы отражены в публикациях:

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.
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.
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.

ГЛАВА 4. ТРАНСКРИПТОМ САЛЬМОНЕЛЛ НА РАННЕЙ СТАДИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С *ACANTHAMOEBA CASTELLANII*

4.1 Характеристика транскриптомных библиотек и результаты картирования прочтений

Для оценки транскрипционного профиля сальмонелл в условиях сокультивирования с *A. castellanii* нами были исследованы транскриптомы сальмонелл, сокультивируемых с акантамебами в течение 2 ч на среде PAS (опыт), а также сальмонелл, помещенных в среду PAS на 2 ч в отсутствие акантамеб (контроль). В результате секвенирования было получено 71,3 млн. одноконцевых прочтений. Каждая биологическая повторность содержала от 9,9 до 13,3 млн. прочтений. Процент картирования библиотек контрольной культуры сальмонелл на полный геном *S. enterica* serovar Typhimurium 14028S составлял более 99% ридов. В тоже время на геном сальмонелл выравнивалось от 8 до 15% ридов из экспериментальных библиотек. Таким образом, метод Carppable-Seq показал высокую эффективность для изучения экспрессии генов бактерий при взаимодействии с не модельными эукариотами.

Анализ главных компонент позволяет дать первичную оценку полученным данным. В наших экспериментах повторности контрольных библиотек имеют схожий профиль экспрессии и формируют единый кластер данных (Рисунок 4.1). Вариация внутри группы экспериментальных образцов выше, однако в целом они также формируют единый кластер данных. По-видимому, разница в репликах зависит от фазы роста и плотности культуры амёб.

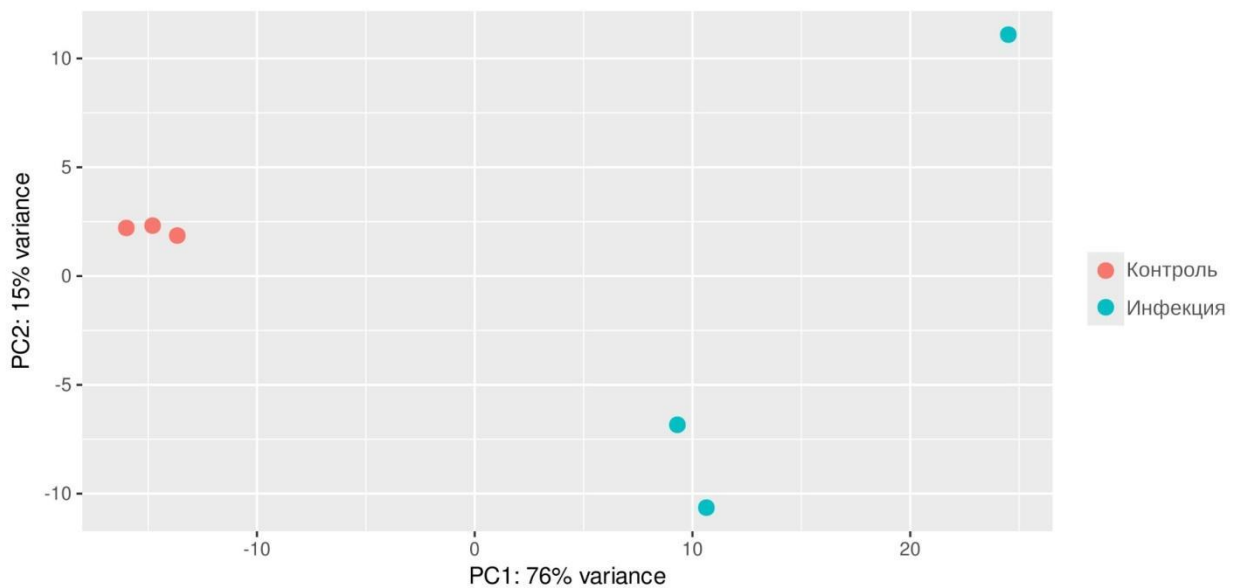


Рисунок 4.1 – Анализ главных компонент контрольных (окрашены красным) и экспериментальных (окрашены голубым) образцов, построенный на основе матрицы дистанций. Кластеризация отражает сходства и различия между повторностями

Метод Capable-Seq дополнительно позволяет снизить долю рибосомальной РНК (рРНК) в образцах за счет обогащения целевой мРНК, путем селекции первичных транскриптов, содержащих 5'-концевые трифосфаты. В наших экспериментах на белок кодирующие регионы картировалось от 30 до 50% всех ридов (Рисунок 4.2). В контрольной культуре на долю рРНК приходилось от 38 до 49% всех ридов (Рисунок 4.2), причем большая часть принадлежала 16S и 23S рРНК. В экспериментальной культуре на долю рибосомальных генов также приходилось не более 50% прочтений, причем большая часть принадлежала 5.8S рРНК эукариот.

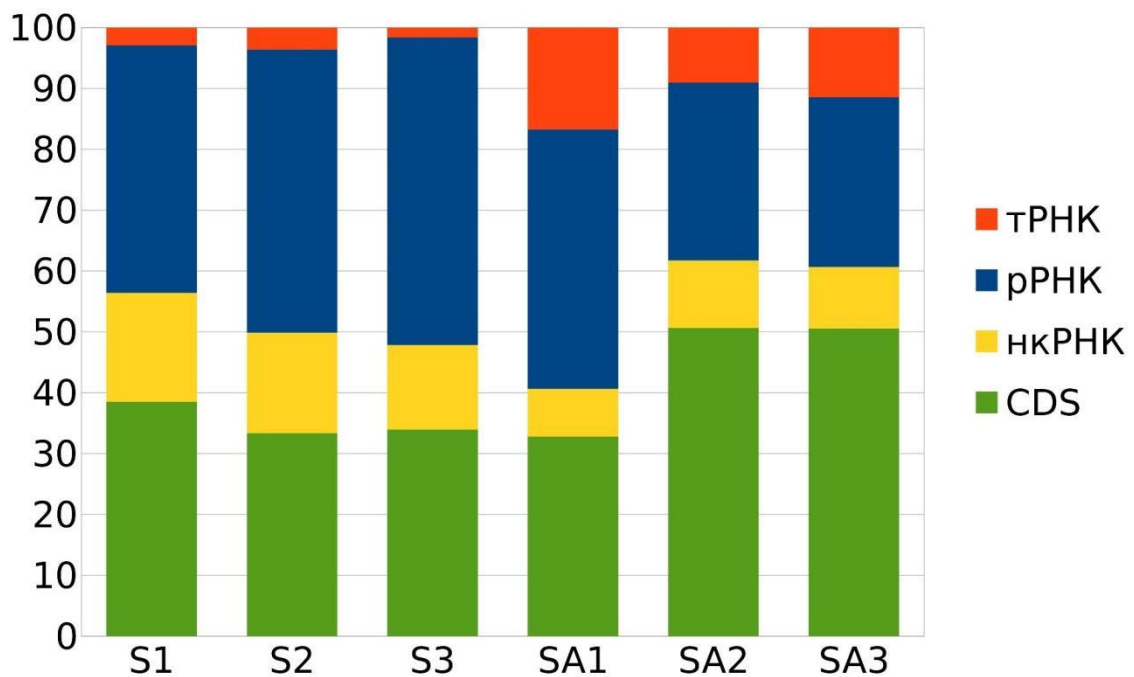


Рисунок 4.2 – Распределение картирования ридов контрольных (S) и экспериментальных (SA) образцов на кодирующие и не кодирующие регионы генома *S. enterica* serovar Typhimurium 14028S. По оси ординат отложена доля картированных ридов в %

4.2 Транскрипционный профиль сальмонелл внутри фагосом акантамеб

4.2.1 Особенности экспрессии генов метаболических путей и функциональных групп генов сальмонелл

Согласно базе данных KEGG (Киотская энциклопедия генов и геномов), большинство оперонов, экспрессия которых усиливалась у сальмонелл внутри акантамеб, относилось к хемотаксису бактерий и сборке жгутиков, биосинтезу ЛПС, метаболизму глицерофосфолипидов, биосинтезу аминокислот и метаболизму глиоксилатов и дикарбоксилатов (Рисунок 4.3). Напротив, экспрессия оперонов, относящихся к циклу трикарбоновых кислот (ЦТК), метаболизму фруктозы и маннозы, метаболизму пирувата и бутаноата,

окислительному фосфорилированию и системе фосфотрансферазы, снижалась (Рисунок 4.3).

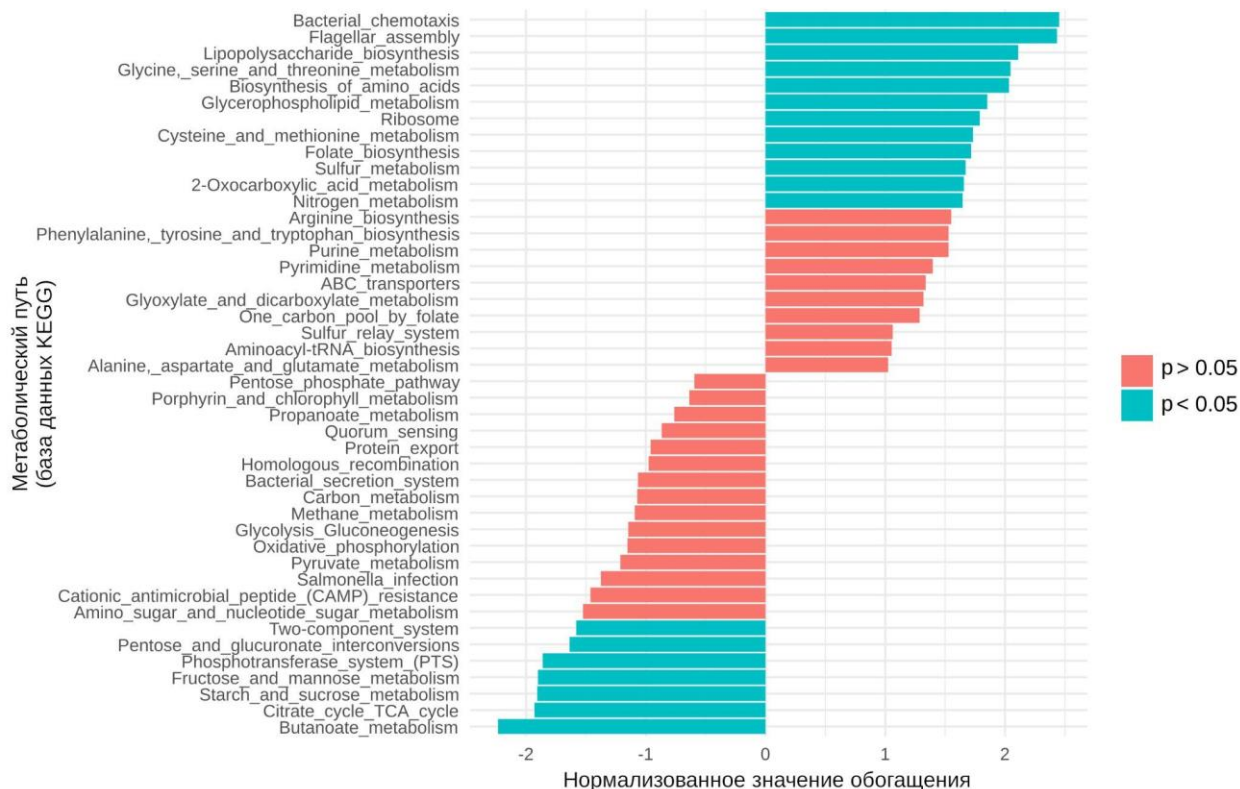


Рисунок 4.3 – Анализ обогащения по функциональной принадлежности (GSEA) метаболических путей сальмонелл. Положительные значения обогащения свидетельствует об усилении экспрессии генов, входящих в данные метаболические пути у внутриклеточных сальмонелл по сравнению с контрольной культурой. Отрицательные значения свидетельствуют об обратном - гены, входящие в данные метаболические пути подавлены у внутриклеточных сальмонелл. Аннотация генов по метаболическим путям выполнена в соответствии с базой данных KEGG

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.

4.2.2 Экспрессия генов сальмонелл, кодирующих захват железа и ответ на стресс

Экспрессия закодированного в SPI-1 оперона *sitABCD*, отвечающего за захват железа, усиливалась у сальмонелл внутри акантамеб (Таблица 4.1). Экспрессия других генов, кодирующих захват железа, также увеличивалась у сальмонелл внутри акантамеб. Так, экспрессия оперонов *sufABCDSE*, *fepAE*, *entS*, *entD*, *fepB*, и *ybdA* усиливалась более чем в 2 раза внутри клеток хозяев по сравнению с контрольной культурой (Таблица 4.1), как и алюминий-зависимого гена STM14_2833 (*ais*), усиление экспрессии которого ранее было показано в условиях дефицита железа [Bjarnason et al., 2003]. Стоит отметить, что экспрессия некоторых генов, участвующих в захвате железа была подавлена у внутриклеточных сальмонелл. Так, экспрессия транспортера железа *fesAB*, флавопротеина *frdABCD*, отвечающего за фумаратредуктазу, а также гена, отвечающего за хранение и детоксикацию железа *bfr* достоверно снижалась.

Таблица 4.1 – 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 III 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

Некоторые гены, участвующие в гомеостазе цинка, дифференциально экспрессировались у сальмонелл внутри амеб по сравнению с контролем. Экспрессия генов транспорта цинка (*zntA*), цинк-зависимого двухкомпонентного регулятора (*zraSR*), и предполагаемой цинк-зависимой пептидазы (*yhjJ*) усиливалась, тогда как экспрессия генов *yggG* (цинк-зависимая протеаза) и *zraP* (двухкомпонентный системный репрессор *zraSR*) была снижена.

Экспрессия генов, кодирующих ответ на окислительный стресс (глутаредоксин *grxA*, гидропероксидаза *katG*, предполагаемые оксидоредуктазы STM14_4644, STM14_4645 и *yieEF*, супероксиддисмутаза *sodA*, тиолалкилгидропероксидредуктаза STM14_0476, алкилгидропероксидредуктаза *ahpCF*, и предполагаемые железо зависимые пероксидазы STM14_3004 и STM14_3005), увеличивалась у сальмонелл внутри акантамеб (Таблица 4.1). Напротив, экспрессия генов супероксиддисмутаза *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 4.1).

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.

Не было выявлено достоверных различий в уровне экспрессии глобального регулятора экспрессии RpoS между контрольной и опытной культур сальмонелл, что ранее также было показано у сальмонелл внутри фагоцитов млекопитающих [Hautefort et al., 2008; Srikumar et al., 2015, Westermann et al., 2016].

4.2.3 Экспрессия генов патогенности и вирулентности

Большинство генов, отвечающих за вирулентность у сальмонелл, располагаются в так называемых островах патогенности сальмонелл (SPI). Среди них, островки SPI-1 и SPI-2 включают наибольшее число генов. Считается, что SPI-1 отвечает за проникновение в эпителиальные клетки. Большинство генов SPI-1, включая кодирующие T3SS-1, имели повышенную экспрессию у сальмонелл внутри акантамеб. Экспрессия таких генов, как *invH*, *invABEFG*, *prgKJIH* и *orgABC*, отвечающих за инвазию сальмонелл в клетки хозяина, а также гена *sptP*, участвующего в реорганизации цитоскелета хозяина после вторжения [Johnson et al., 2017], была значительно повышена у внутриклеточных сальмонелл (Таблица 4.1). Экспрессия гена *sopE*, кодирующего эффекторный белок SopE, транслоцированный SPI-1 T3SS, 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. Ранее было показано, что данные гены критически важны для инвазии в клетки хозяина [Miold et al., 2001].

Экспрессия большинства генов SPI-2, включая *ssaBCDE*, *sseABCDE*, *sscA*, *ssaMVN*, и *ssaRSTU* была подавлена у сальмонелл внутри акантамеб (Таблица 4.1). 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 генов *bssR* и *bssS*, отвечающих за регуляцию синтеза биопленок, а также гена *bsmA*, отвечающего за устойчивость биопленки к воздействию перекиси, была подавлена 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 4.1).

4.2.4 Анализ экспрессии отдельных генов сальмонелл при инфекции *Acanthamoeba castellanii* методом ПЦР в режиме реального времени

Транскрипция одиннадцати генов в контрольных и опытных культурах была оценена в независимой серии экспериментов с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени (qRT-PCR). Было обнаружено, что восемь генов, кодирующих SPI-1, ответ на окислительный стресс (*grxA*, *katG*), поглощение железа и фермент глюкозо-1-фосфатазу (*agp*), экспрессируются таким же образом, как это наблюдалось в анализе данных Cappable-Seq (Рисунок 4.4). Результаты как Cappable-Seq, так и qRT-PCR показали, что экспрессия генов поглощения железа и ответа на окислительный стресс усиливалась, в то время как экспрессия гена *agp* (глюкозо-1-фосфатаза) снижалась у внутриклеточных сальмонелл по сравнению с контрольной культурой. Экспрессия генов *sipC* и *sitA* (оба расположены в SPI-1) усиливалась, тогда как экспрессия другого гена, расположенного в SPI-1 (*prgH*), достоверно не изменилась. Кроме того, экспрессия гена *sseC*, расположенного в SPI-2, достоверно не изменилась в отличие от подавления, наблюдаемого по данным Cappable-Seq. Экспрессия гена малатсинтазы (*aceB*), участвующего в глиоксилатном цикле, была значительно повышена в образцах внутриклеточных сальмонелл на основе данных qRT-PCR, что отличается от результатов Cappable-Seq, по которым экспрессия данных генов осталась стабильной.

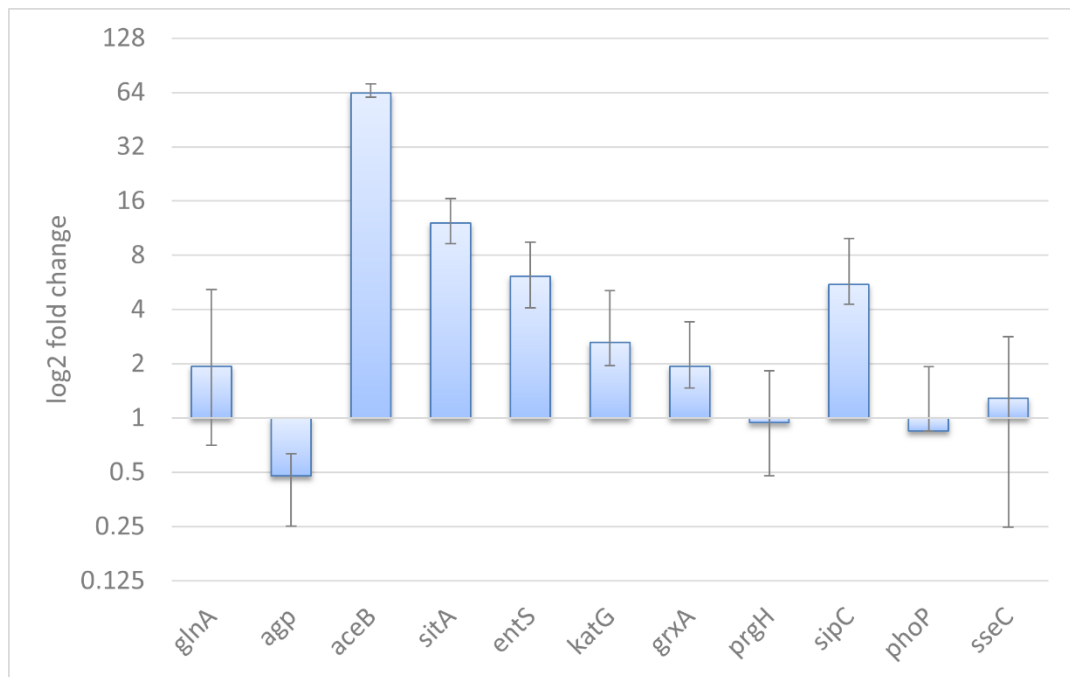


Рисунок 4.4 – Относительные уровни экспрессии генов *S. Typhimurium* при инфекции *A. castellanii*. Отрицательные значения по оси ординат свидетельствуют о снижении экспрессии генов внутриклеточных сальмонелл по сравнению с контролем, положительные значения - об увеличении экспрессии. Значения экспрессии нормализованы на экспрессию референсного гена *rpoD*

4.3 Обсуждение полученных результатов

Препятствием в изучении бактериальной транскрипции внутри эукариотических клеток является то, что бактериальный транскриптом довольно мал по сравнению с очень большим фоном эукариотического транскриптома. Причинами этого являются небольшое количество инфицированных клеток-хозяев, относительно малый вес и высокая скорость деградации бактериальной РНК [Westermann et al., 2012]. Бактериальная РНК может составлять менее 5% от общей РНК бактерии и хозяина, тогда как мРНК обычно составляет только ~1% от бактериального транскриптома [Westermann et al., 2012]. Следовательно, РНК эукариотического хозяина и бактериальная

pРНК должны быть исключены из общей РНК. Подобные исследования стали доступны с изобретением методов dRNA-Seq [Sharma et al., 2010] и Cappable-Seq [Ettwiller et al., 2016]. Данные методы обогащают образцы первичными бактериальными транскриптами (в основном мРНК) [Luck et al., 2017, Boutard et al., 2016] и локализуют их сайты инициации транскрипции [Ettwiller et al., 2016]. Как указано в оригинальной статье [Ettwiller et al., 2016], метод подготовки библиотек Cappable-Seq позволяет практически полностью избавиться от рибосомальных транскриптов (до менее 10% от общего числа ридов) без использования специальных наборов для удаления рРНК. Применение метода Cappable-Seq для обогащения мРНК *E. coli* уменьшает число ридов, приходящихся на рРНК с 85% до 3% [Ettwiller et al., 2016]. Для бактерий рода *Wolbachia* наблюдается удаление 79% 23S рРНК транскриптов, 32% 5S рРНК транскриптов и 76% 16S рРНК транскриптов [Luck et al., 2017]. В наших экспериментах не удалось добиться сопоставимых результатов. Возможно, это связано с модификацией методики, которую нам пришлось использовать с целью увеличить концентрацию РНК-библиотек, а именно отказом от второго раунда обогащения мРНК с помощью стрептавидиновых шариков [Ettwiller et al., 2016]. Тем не менее, полученный процент картирования ридов на белок кодирующие регионы (30-50%), позволяет успешно оценить транскриптом сальмонелл при инфекции акантамеб. Причем использованный подход позволил в равной степени снизить долю рибосомальной РНК про- и эукариот. Более того, данный подход исключает применение дорогостоящих наборов для рибосомальной РНК, причем наиболее эффективные из которых не предназначены для протистов, что позволяет в будущем использовать его для анализа любых взаимодействий бактерий с немодельными хозяевами.

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.

4.3.1 Регуляция метаболизма углерода и аминокислот сальмонелл на ранней стадии инфекции акантамеб

В нашем исследовании у сальмонелл внутри акантамеб наблюдалось подавление генов ЦТК, гликолиза, и пентозо-фосфатного путей (Рисунок 4.3), что отличается от ранее полученных данных для сальмонелл при инфекции макрофагов и эпителиальных клеток [Hautefort et al., 2008; Srikumar et al., 2015]. Считается, что глюкоза — это главный источник углерода для сальмонелл во время инфекции [Eriksson et al., 2003]. Глюкоза, глюконовая кислота и лактат доступны для сальмонелл внутри фагоцитов млекопитающих и участвуют в цикле трикарбоновых кислот и гликолизе [Srikumar et al., 2015, Steeb et al., 2013]. Однако в ряде исследований было показано, что глиоксилатный шунт необходим на определенных стадиях инфекции [Diacovich et al., 2016, Fang et al., 2005]. Экспрессия генов, связанных с глиоксилатным циклом, повышалась у сальмонелл внутри акантамеб (Рисунок 4.5). Глиоксилатный шунт позволяет бактериям использовать ацетат и жирные кислоты в качестве источников углерода в физиологических условиях, требующих глюконеогенеза [Ahn et al., 2016]. Пищеварительные вакуоли акантамеб могут содержать меньше глюкозы, чем макрофаги млекопитающих. Следовательно, быстрое потребление глюкозы в вакуолях простейших может вызвать переключение с ЦТК и гликолиза на глиоксилатный шунт. Снижение экспрессии генов, кодирующих гликолиз, а также усиление экспрессии генов глиоксилатного цикла также были подтверждены с помощью qRT-PCR.

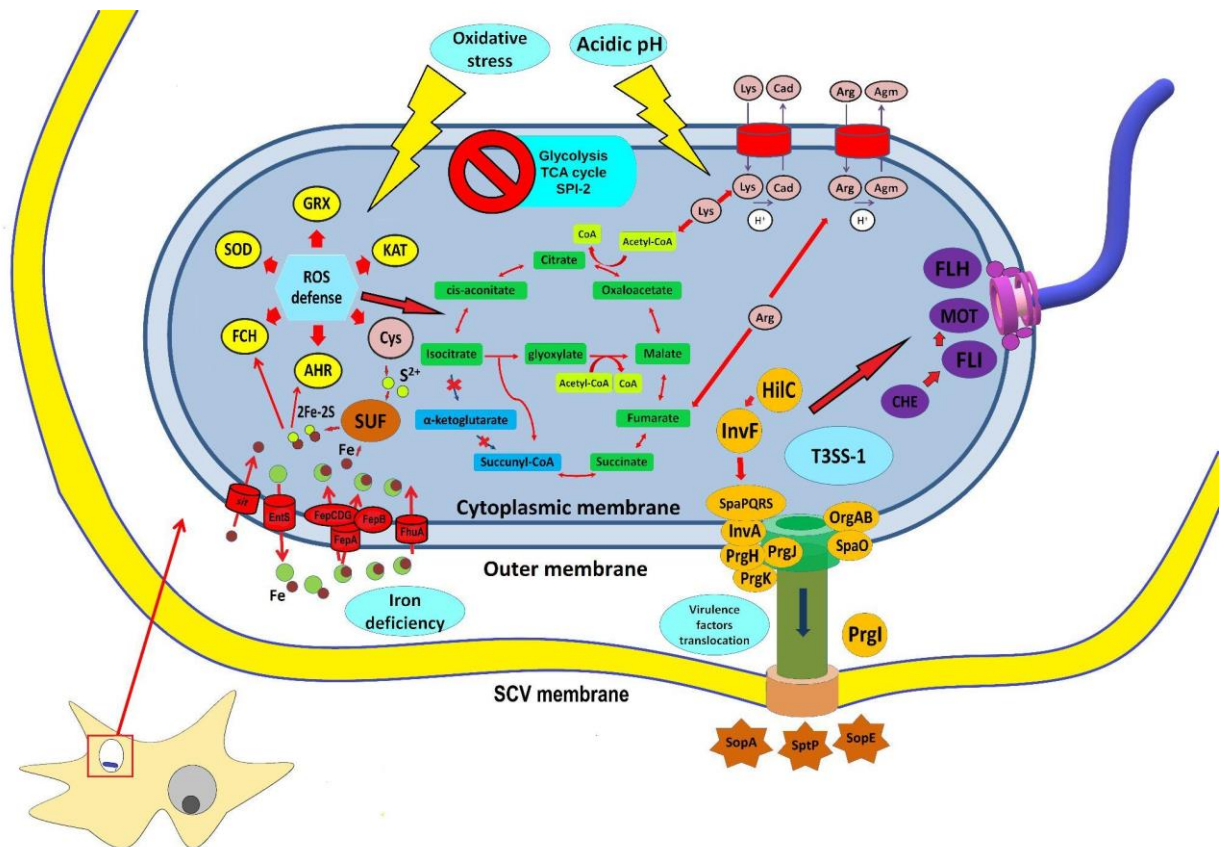


Рисунок 4.5 – Реконструкция основных метаболических и функциональных систем *S. Typhimurium*, участвующих в инфекции *A. castellanii*. Ферменты, участвующие в реакции на окислительный стресс, выделены желтым цветом. Белки, отвечающие за захват железа, выделены красным цветом (*ent*, *fhu* и *fep*). Системы сборки кластеров Fe-S (*SUF*) выделены коричневым цветом. Глиоксилатный цикл (GS) выделен зеленым. тРНК аминокислот аргинина (*Arg*), цистеина (*Cys*), и лизина (*Lys*) отмечены розовым. Гены SPI-1 выделены оранжевым, жгутикового аппарата и хемотаксиса – фиолетовым. GRX, глутаредоксин 1; KAT, каталаза G; AHR, алкилгидропероксидредуктаза; FCH, феррохелатаза; SOD, супероксиддисмутаза; *SUF*, сборка кластера Fe-S; *Cys*, цистеин; *Lys*, лизин; *Cad*, кадаверин; *Arg*, аргинин; *Agm*, агматин; *FLH*, белки сборки жгутиков *flh*; *MOT*, статорные белки *MotAB*; *FLI*, белки сборки жгутиков *fli*; *CHE*, хемотаксис

Усиление экспрессии генов глиоксилатного цикла также может быть связано с реакцией сальмонелл на окислительный стресс [Ahn et al., 2016]. Активная форма азота, образующиеся в фагосомах, ингибируют окислительное фосфорилирование и гены цикла трикарбоновых кислот [Fitzsimmons et al., 2018]. Оксид азота в фагосомах активирует транспортер оттока цитрата железа (IctE), который переправляет цитрат-хелатированное железо из клетки [Frawley et al., 2013]. Цитрат является промежуточным метаболитом в глиоксилатном цикле и поддерживает гомеостаз железа у сальмонелл путем его хелатирования [Dandekar et al., 2014]. Железо является важным кофактором для нескольких ферментов. Однако избыток железа может вызывать повреждение клеток и обычно хелатируется цитратом [Dandekar et al., 2014]. Таким образом, глиоксилатный цикл увеличивает пул цитрата, необходимый для нейтрализации избытка железа и внеклеточного транспорта. Кроме того, у сальмонеллы экспорт цитрата останавливает рост и повышает устойчивость к окислительному стрессу [Frawley et al., 2013; Dandekar et al., 2014].

Экспрессия нескольких оперонов, кодирующих биосинтез аминокислот, усиливалась в сальмонеллах внутри акантамеб. В частности, усиливалась экспрессия метаболических путей цистеина, аргинина и лизина. Промежуточные продукты данных путей могут быть вовлечены в глиоксилатный цикл (Рисунок 4.5). Кроме того, некоторые аминокислоты играют важную роль в адаптации сальмонелл к стрессовым условиям. Например, биосинтез цистеина был индуцирован у сальмонелл, подвергнутых окислительному стрессу [Turnbull, Surette, 2010]. Аргинин-зависимая кислотоустойчивость была выявлена у сальмонелл при взаимодействии с тетрахименами [Rehfuss et al., 2011]. Лизин вырабатывается в ответ на кислотный стресс посредством активации оперона *cadAB*, который обеспечивает декарбоксилирование лизина и синтез кадаверина. Кадаверин подвергается протонированию в кислой среде и повышает внешний pH [Slonczewski, 2009]. Мы предполагаем, что в наших исследованиях пути

аргинина и лизина могли активироваться в ответ на кислую среду внутри пищеварительных вакуолей акантамеб, тогда как путь цистеина был повышен в ответ на окислительный стресс. Очевидно, что сальмонеллы, используют похожие защитные пути от кислотного стресса, как внутри макрофагов млекопитающих, так и в вакуолях акантамеб, что вызывает активацию биосинтеза цистеина и аргинина [Hautefort et al., 2008; Srikumar et al., 2015]. В тоже время, в эпителиальных клетках у сальмонелл снижается экспрессия оперона биосинтеза лизина *cadAB* [Hautefort et al., 2008].

Липополисахарид и его компоненты (липид А, центральный олигосахарид, О-антиген) считаются критически важными для вирулентности сальмонелл, выживания внутри макрофагов и реакции на кислотный стресс [Dalebroux et al., 2014; Karlinsey et al., 2019]. В нашем исследовании наблюдалось усиление экспрессии оперонов, участвующих в биосинтезе ЛПС и глицерофосфолипидов, у сальмонелл внутри акантамеб. Аналогичные результаты были получены для сальмонелл при взаимодействии с амебами *D. discoideum* [Riquelme et al., 2016] и мышами [Karlinsey et al., 2019]. Таким образом, активация биосинтеза ЛПС, глицерофосфолипидов, аргинина и лизина представляет собой сложный ответ сальмонелл на кислый pH внутри вакуолей простейших и млекопитающих.

4.3.2 Поглощение железа и окислительный стресс при инфекции

Железо является критически важным фактором роста патогенных бактерий [Schaible, Kaufmann., 2004] и сигнальным элементом, регулирующим гены, связанные с вирулентностью [Litwin, 1993].

Экспрессия основного оперона, отвечающего за поглощение железа (*sitABCD*), была повышена у сальмонелл внутри акантамеб (Рисунок 4.5). Аналогичные результаты были получены для сальмонелл, фагоцитированных клетками млекопитающих [Hautefort et al., 2008; Srikumar et al., 2015]. Более того, у сальмонелл внутри акантамеб поглощение железа могло быть опосредовано дополнительными путями. Так, мы наблюдали активацию

сидерофора энтеробактина *entS* и транспортеров Fe^{3+} -катехолата (*fepA*, *fepB* и *fepCDG*) и Fe^{3+} -гидроксамата (*fhuACDB*) (Рисунок 4.5). Системы поглощения железа активируются в условиях его дефицита [Khajanchi et al., 2019] и необходимы для вирулентности сальмонелл и их выживания в макрофагах [Crouch et al., 2008; Nairz et al., 2015]. Таким образом, сальмонеллы внутри пищеварительных вакуолей акантамеб могут испытывать значительный дефицит железа.

Железо регулирует активность определенных регуляторных генов, и генов вирулентности [Litwin, 1993., Khajanchi et al., 2019]. Ранее было показано, что экспрессия генов, кодирующих T3SS, флагеллин, белок холодового шока (*cspE*), транспортер энтеробактина (*entS*), а также некоторых других регуляторных генов, усиливалась в условиях недостатка железа [Khajanchi et al., 2019]. В нашем исследовании мы наблюдали схожие изменения в транскриптом сальмонелл внутри акантамеб, а именно усиление экспрессии биосинтеза флагеллина и T3SS (Рисунок 4.5).

Железо критически важно для функционирования оксидоредуктаз, которые нейтрализуют АФК, такие как перекись водорода, супероксид и гидроксильные радикалы [Ray et al., 2012]. Макрофаги млекопитающих и социальные амеба *D. discoideum* используют НАДФН-оксидазу для генерации бактерицидного супероксида [Dunn et al., 2018]. Фагоцитированные бактерии реагируют на окислительный стресс, вырабатывая каталазы, пероксиредоксины и супероксиддисмутазы, которые нейтрализуют АФК [Ezraty et al., 2017]. В нашем исследовании экспрессия нескольких генов оксидоредуктаз усиливалась в ответ на окислительный стресс, включая *grxA*, *katG*, *sodA* (Mn-кофакторная супероксиддисмутаза) и *ahpCF* (система алкилгидропероксидредуктазы). Экспрессия генов *grxA* и *katG* также усиливалась у сальмонелл, фагоцитированных тетрахименами [Rehfuss et al., 2011] и макрофагами [Srikumar et al., 2015]. Напротив, экспрессия *sodB* и *soxR* была подавлена у сальмонелл внутри акантамеб. SodA чувствителен к перекиси водорода, тогда как *sodB* и *soxR* реагируют на соединения,

продуцирующие супероксид [Zheng et al., 2009]. Следовательно, H_2O_2 может быть основным видом АФК, продуцируемым амебами. Кроме того, фермент, кодируемый *katG*, способен инактивировать активные форма азота из-за активности пероксинитритазы [McLean et al., 2010].

Другой механизм уничтожения бактерий основан на накоплении Zn^{2+} и Cu^{2+} в фагосомах млекопитающих [Festa, Thiele, 2012; Kapetanovic et al., 2016] и простейших [НАО et al., 2015]. Zn^{2+} и Cu^{2+} разрушают Fe-S кластеры, критически важные для выживания бактерий [НАО et al., 2015]. В данном исследовании было зафиксировано усиление цинк-зависимой двухкомпонентной системы ZraRS, реагирующей на повреждение клеточной мембраны [Rome et al., 2018]. Возможно, *A. castellanii* накапливает Zn^{2+} в своих пищеварительных вакуолях для уничтожения фагоцитированных бактерий. Белки, содержащие Fe-S кластеры, участвуют во многих важных клеточных процессах, включая преодоление неблагоприятных последствий окислительного стресса [Velayudhan et al., 2014]. У сальмонелл сборка и доставка Fe-S кластеров контролируются в основном оперонами сборки кластера железа и серы (Isc) и мобилизации серы (Suf). Оперон *isc* может регулировать систему сборки Fe-S кластеров, тогда как оперон *suf* контролирует биогенез кластера Fe-S при голодании по железу и окислительном стрессе [Outten et al., 2004]. В нашем исследовании экспрессия оперона *suf* усиливалась у сальмонелл, поглощенных акантамебами. Таким образом, в ответ на окислительный стресс внутри пищеварительных вакуолей амеб, у сальмонелл происходит активация экспрессии генов, кодирующих факторы антиоксидантной защиты, что в конечном итоге защищает сальмонеллу от бактерицидных систем протистов и усиливает бактериальную вирулентность. Дополнительно, внутри акантамеб у сальмонелл индуцируются системы поглощения железа, также участвующие в реакции на окислительный стресс, усиливая бактериальную вирулентность, а также устанавливая и поддерживая гомеостаз железа. Активация поглощения железа

может усилить устойчивость сальмонелл к Zn-зависимым механизмам уничтожения хозяина, за счет увеличения концентрации железа.

В данном исследовании не наблюдалось активации генов сальмонелл *phoPQ*, *rpoE*, *soxS* и *oxyR*, кодирующих факторы, реагирующие на низкую осмолярность, низкие концентрации Ca^{2+} и кислый pH соответственно. Ранее отмечалось усиление экспрессии вышеупомянутых генов внутри макрофагах [Srikumar et al., 2015]. Экспрессия генов, кодирующих тепловой шок (*ibpAB*, *dnaKJ*), холодовой шок (*cspE*), осморегуляцию (*ompW*) и универсальный ответ на стресс (*uspB* и *uspE*), была значительно подавлена у сальмонелл внутри акантамеб. Более того, мы отметили активацию транскрипционного репрессора *crxP* двухкомпонентной системы *crxRA*, регулирующей повреждение клеточной мембраны [De la Cruz et al., 2015]. Таким образом, условия внутри вакуолей акантамеб кажутся более благоприятными для выживания сальмонелл, чем условия внутри макрофагов. В то время как внутри акантамеб сальмонелла подвергается в основном окислительному стрессу, в макрофагах происходит одновременное воздействие многочисленных стрессов.

4.3.3 Регуляция систем патогенности и подвижности на ранней стадии инфекции акантамеб

Известно, что множество генов вирулентности сальмонелл индуцируются при взаимодействии с протистами [Riquelme et al., 2016, Rehfuess et al., 2011, Bleasdale et al., 2009]. Ранее было показано участие данных генов в инфекции эпителиальных клеток, фибробластов и макрофагов млекопитающих [Hautefort et al., 2008, Srikumar et al., 2015, Núñez-Hernández et al., 2013]. Гены, отвечающие за взаимодействие между сальмонеллой и клеткой хозяина, объединены в кластеры под общим названием SPI [Eriksson et al., 2003, Nan et al., 2024a]. В нашем исследовании мы наблюдали повышение уровня экспрессии кодируемых SPI-1 факторов вирулентности *invH*, *invABEFG*, *prgKJIH* и *orgABC* у сальмонелл внутри акантамеб. Работа система

T3SS-1, кодируемой SPI-1, необходима проникновения сальмонелл в эпителиальные клетки [Lou et al., 2019]. В некоторых исследованиях описаны предположения, что сальмонеллы проникают в клетки акантамеб с помощью механизма, аналогичного механизму проникновения в эпителиальные клетки [Hautefort et al., 2008, Feng et al., 2009].

В настоящем исследовании экспрессия некоторых генов сальмонелл, кодирующих факторы вирулентности, усиливалась внутри акантамеб, включая такие гены, как *srfC*, *ybjX*, *hupA* и *msgA*, кодирующие предполагаемый эффектор вирулентности, VirK-подобный белок, ДНК-связывающий домен HU и белок вирулентности MsgA, соответственно. Эти белки участвуют в интернализации и защите сальмонелл в эпителиальных клетках [Mangan et al., 2011; Wang et al., 2018] и макрофагах [Lee et al., 2013].

Следует отметить, что у сальмонелл внутри акантамеб экспрессия генов SPI-2, связанных с долговременной персистенцией, таких как *ssaBCDE*, *sseABCDE*, *sscA*, *ssaMVN* и *ssaRSTU*, оставалась на низком уровне. Известно, что SPI-2 активируется в ответ на дефицит PO_4^{3-} , Mg^{2+} и Ca^{2+} , низкий pH и низкую осмолярность в эпителиальных клетках и макрофагах [Hautefort et al., 2008, Srikumar et al., 2015], фагосомах тетрахимен [Rehfuss et al., 2011] и акантамеб [Feng et al., 2009]. В тоже время, было показано, что гены SPI-2 не требуются для выживания *S. Typhi* на ранних стадиях инфекции мышей и макрофагов [Karlinsey et al., 2019]. Кроме того, было показано, что SPI-2 не активируется в течение первых двух часов при заражении фибробластов *S. Typhimurium* [Núñez-Hernández et al., 2013]. Мы полагаем, что отсутствие активации генов SPI-2 свидетельствует о том, что сальмонеллы не были подвержены влиянию кислого pH, низкой осмолярности и дефицита Mg^{2+} , Ca^{2+} и PO_4^{3-} на ранней стадии инфекции акантамеб. Последние два иона являются основными факторами активации SPI-2 [Löber et al., 2006].

Экспрессия генов сальмонелл, отвечающих за сборку жгутиков и синтез флагеллина, усиливается в условиях, способствующих активному движению и адгезии. Эти гены подавляются в макрофагах и фибробластах [Núñez-

Hernández et al., 2013], однако, по неизвестным причинам, активируются в эпителиальных клетках на ранней стадии инфекции [Hautefort et al., 2008]. В данном исследовании мы обнаружили индукцию оперонов, отвечающих за биосинтез жгутиков (*fliLMNOPQR*, *fliDST* и *flhCD*), работу моторных белков (*motAB*) и хемотаксис (*cheAWM*) у сальмонелл внутри акантамеб. Более того, мы обнаружили усиление экспрессии транскрипционного активатора *tdcA*, управляющем транспортом и метаболизмом треонина и серина во время анаэробного роста [Lim et al., 2010]. Необходимость треонина и серина для биосинтеза флагеллина и вирулентности была продемонстрирована с помощью мутантов *Salmonella* по гену *tdcA*, которые были менее вирулентны, чем штамм дикого типа у мышей [Lim et al., 2010; Kim et al., 2009].

4.3.4 Воспроизводимость данных, полученных методом Cappable-Seq по сравнению с результатами ПЦР в режиме реального времени

Новая серия экспериментов была проведена с теми же условиями для биологической проверки результатов РНК-Seq с помощью qRT-PCR. Хотя большинство генов продемонстрировали одинаковые паттерны экспрессии, следует отметить несколько расхождений в результатах, полученных с помощью Cappable-Seq и qRT-PCR. В частности, экспрессия расположенного в SPI-1 гена *prgH* достоверно не изменялась при оценке qRT-PCR, в то время как была повышена согласно данным Cappable-Seq. Тем не менее, экспрессия двух других генов, кодируемых SPI-1 (*sipC* и *sitA*), значительно усиливалась в соответствии с данными qRT-PCR, что подтверждает активацию SPI-1. Такие противоречивые тенденции в экспрессии генов могут объясняться не одновременной активацией генов SPI-1, о которой ранее сообщали Ibarra et al. [2010]. Согласно данным qRT-PCR, экспрессия кодируемого SPI-2 гена *sseC* не изменялась у сальмонелл внутри акантамеб, в то время как она подавлялась в соответствии с данными Cappable-Seq. Это несоответствие может быть связано с тем, что для экспериментов Cappable-Seq и qRT-PCR были проведены разные серии экспериментов, и профиль экспрессии сальмонелл

мог измениться. В любом случае, отсутствие индукции *sseC*, выявленное на основе обоих методов, хорошо согласуется с тем, что гены SPI-2 не участвуют на ранних стадиях инфекции [Li et al., 2019; Núñez-Hernández et al., 2013]. Экспрессия гена *aceB* значительно не изменялась согласно данным Cappable-Seq, в то время как данные qRT-PCR продемонстрировали значительное усиление экспрессии данного гена. Тем не менее, это хорошо согласуется с данными Cappable-Seq, в которых выявлена активация глиоксилатного цикла в анализе обогащения метаболических путей. За исключением данных трех генов, мы обнаружили строгое соответствие в паттернах экспрессии для других восьми генов при сравнении данных Cappable-Seq и qRT-PCR.

4.3.5 Особенности транскрипционного профиля *S. Typhimurium* 14028S на ранней стадии взаимодействия с *A. castellanii*

Согласно полученным нами данным, транскриптом сальмонелл на ранней стадии взаимодействия с *A. castellanii* значительно отличался как от ранее описанных транскриптомов сальмонелл, взаимодействующих с клетками млекопитающих [Hautefort et al., 2008, Srikumar et al., 2015], так и при взаимодействии с другими простейшими [Rehfuss et al., 2011, Feng et al., 2009]. Известно, цитотоксический эффект одной и той же бактерии в отношении хозяина заметно различается в зависимости от вида организма или типа клеток (для многоклеточных организмов). Например, *S. Typhimurium* не является цитотоксичными в отношении инфузорий рода *Tetrahymena*, тогда как данный серовар вызывает массовую гибель акантамеб *Acanthamoeba rhyzodes* через 24 ч после заражения [Rehfuss et al., 2011, Feng et al., 2009]. Транскриптомные данные также показывают значительные различия в экспрессии генов сальмонелл при взаимодействии с простейшими разных таксонов. Например, экспрессия гораздо большего числа генов SPI-1 усиливалась при взаимодействии с амебами *A. rhyzodes*, чем с инфузориями *Tetrahymena* [Rehfuss et al., 2011, Feng et al., 2009]. Экспрессия генов, отвечающих за трансляцию, рибосомальную структуру и биогенез,

значительно увеличивалась через 3 ч после заражения тетрахимен, и только через 8 ч после заражения акантамеб. Гены SPI-2 оставались неактивными у сальмонелл внутри *A. castellanii*, но активировались при взаимодействии с *A. rhyzodes*. Напротив, экспрессия генов, кодирующих синтез флагелл, усиливалась у сальмонелл внутри *A. castellanii*, но подавлялась внутри *A. rhyzodes* [Feng et al., 2009]. Эти различия могут быть объяснены разными временными точками с момента заражения до фиксации клеток и выделения РНК (5 ч после заражения *A. rhyzodes*, но 2 ч после заражения *A. castellanii* в наших исследованиях), а также разными сероварами сальмонелл (в экспериментах с *A. rhyzodes* использовался штамм *S. choleraesuis* SC-B67). Очевидно, что в ходе долгой эволюционной истории взаимодействия сальмонелл и эукариотических хозяев, бактерии смогли выработать различные механизмы, обеспечивающие их оптимальное выживание и сохранение внутри простейших разных видов, из-за чего последние выступают в роли своеобразных «троянских коней» для бактериальных патогенов.

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 4.6). Сальмонеллы подвергаются воздействию АФК как в макрофагах, так и в акантамебах, но не в эпителиальных клетках и фибробластах (Рисунок 4.6). 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 (Рисунок 4.6). Транскриптом сальмонелл внутри акантамеб имеет сходство с паттернами экспрессии в фибробластах [Núñez-Hernández et al., 2013] отсутствием индукции SPI-2 и снижением экспрессии генов ЦТК (Рисунок 4.6). В отличие от инфекции макрофагов, экспрессия SPI-1 усиливалась при взаимодействии с акантамебами, а также в эпителиальных

клетках и фибробластах (Рисунок 4.6). Таким образом, это может быть свидетельством того, что сальмонелла способствует проникновению в данные типы клеток с помощью секреции эффекторов SPI-1.

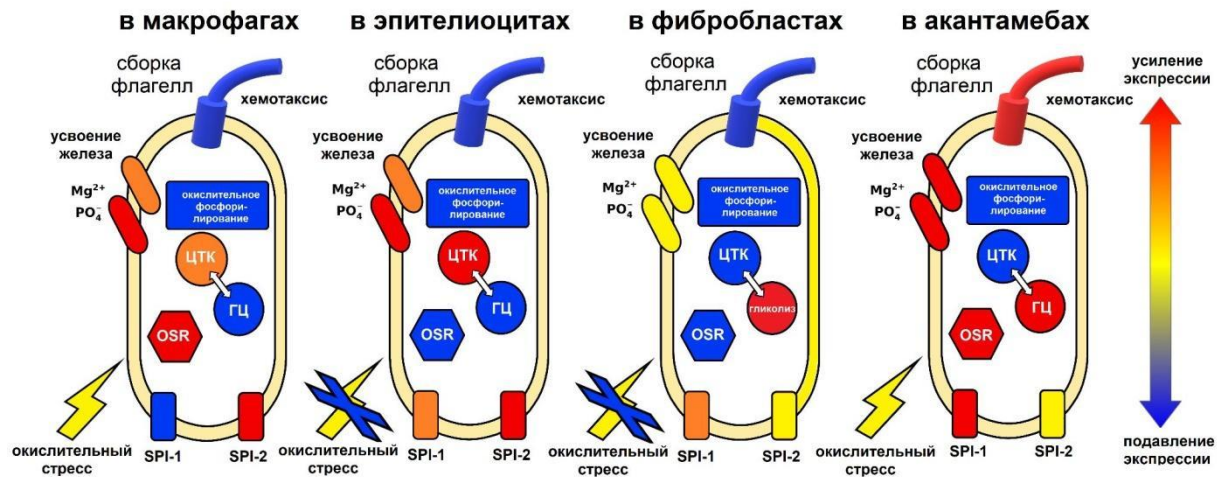


Рисунок 4.6 – Особенности транскриптома сальмонелл при взаимодействии с макрофагами [Hautefort et al., 2008, Srikumar et al., 2015], эпителиоцитами [Hautefort et al., 2008], фибробластами [Núñez-Hernández et al., 2013], и *A. castellanii*. Каждый элемент представляет функциональную группу генов. Цвета отражают уровни экспрессии соответствующих генов при каждом условии. Реакция на окислительный стресс, ОСР; глиоксилатный цикл, ГЦ; цикл трикарбоновых кислот, ТСА

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 глиоксилатный шунт, а также активацию системы хемотаксиса и биосинтез жгутикового аппарата (Рисунок 4.6). Результаты нашего исследования предоставили теоретические и эмпирические доказательства специфичных для сальмонелл паттернов метаболизма и вирулентности для внутриклеточного выживания в одноклеточных и многоклеточных эукариотах.

Материалы данной главы отражены в публикациях:

1. 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.

ГЛАВА 5. ДИНАМИКА ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *SALMONELLA* *TYPHIMURIUM* НА РАЗЛИЧНЫХ ЭТАПАХ ИНФЕКЦИИ *ACANTHAMOEBA CASTELLANII*

5.1 Анализ динамики экспрессии генов метаболизма углерода, захвата железа, ответа на окислительный стресс, факторов патогенности, ингибиторов лизоцима и хемотаксис методом количественной ПЦР в реальном времени

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*. Ранее было показано, что экспрессия множества генов, в частности тех, которые кодируются SPI, значительно изменяется в зависимости от фазы инфекции [Feng et al., 2009, Hautefort et al., 2008]. Кроме того, эти гены дифференциально экспрессируются в модельной сальмонеллезной инфекции амёб и клеток млекопитающих [Srikumar et al., 2015, Hautefort et al., 2008]. Чтобы получить данные, сопоставимые с цитируемыми выше исследованиями, мы выбрали схожие сроки анализа транскриптома в динамике и оценили экспрессию аналогичных кластеров и функциональных групп генов *Salmonella* Typhimurium 14028S на ранних (2 ч) и поздних (8 и 15 ч) стадиях совместного культивирования с *A. castellanii*.

Для этого мы проанализировали динамику экспрессии генов, кодирующих ферменты путей метаболизма углерода, захвата железа, ответ на окислительный стресс, факторы патогенности, ингибиторы лизоцима и

хемотаксис, используя количественную ПЦР в реальном времени. 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., 2024b].

Экспрессия гена глюкозо-1-фосфатазы (*agp*) подавлялась в течение всего периода внутриклеточной инфекции сальмонелл (Таблица 5.1). 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 5.1).

Таблица 5.1 - Результаты оценки экспрессии генов сальмонелл через 2, 8 и 15 ч после заражения акантамеб. 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*

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-транспортеры (*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 5.1). 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 5.1), а через 15 ч после заражения экспрессия *katG* подавлялась более чем в 5 раз по сравнению с контрольной культурой.

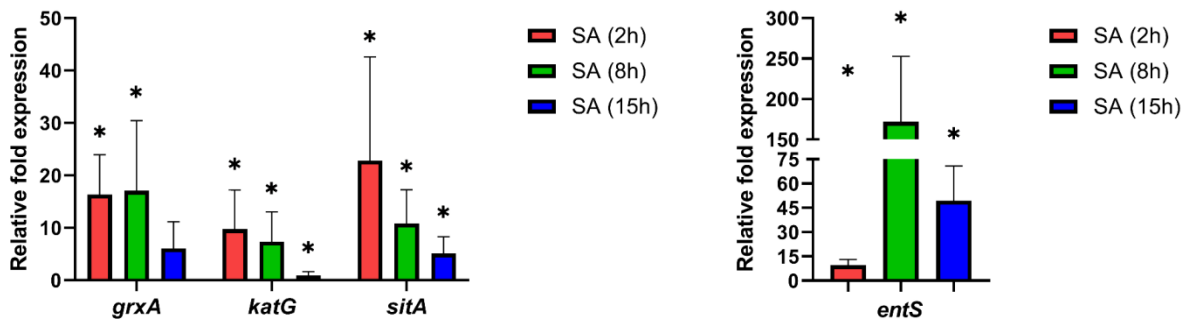


Рисунок 5.1 – Относительная экспрессия генов окислительного стресса и захвата железа сальмонелл через 2, 8 и 15 ч после заражения акантамеб по сравнению с экспрессией контрольной культуры. Уровни экспрессии генов *grxA*, *katG*, и *sitA* нормализованы относительно уровня экспрессии референсного гена *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 5.2). 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 5.2). Изменения в экспрессии *sipC* (SPI-1) были статистически незначимыми (Рисунок 5.2). Экспрессия генов SPI-2 не активировались на ранней стадии инфекции, но затем значительно возросла, достигнув максимума через 8 ч после заражения (Рисунок 5.2). 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.

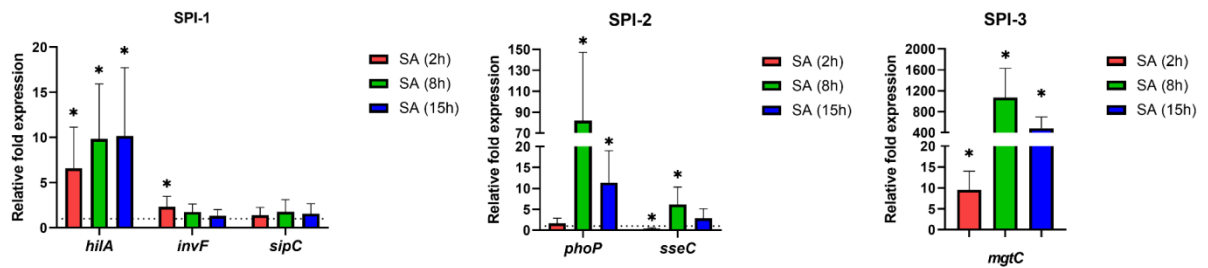


Рисунок 5.2 – Относительная экспрессия генов вирулентности сальмонелл через 2, 8 и 15 ч после заражения акантамеб по сравнению с экспрессией контрольной культуры. Уровни экспрессии генов *hilA*, *invF*, *sipC*, *phoP* и *sseC* нормализованы относительно уровня экспрессии референсного гена *rpoD*. Ген *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 5.3). Более того, максимум экспрессии данных генов наблюдался через 8 ч после заражения, после чего снижался (Рисунок 5.3). 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 5.3).

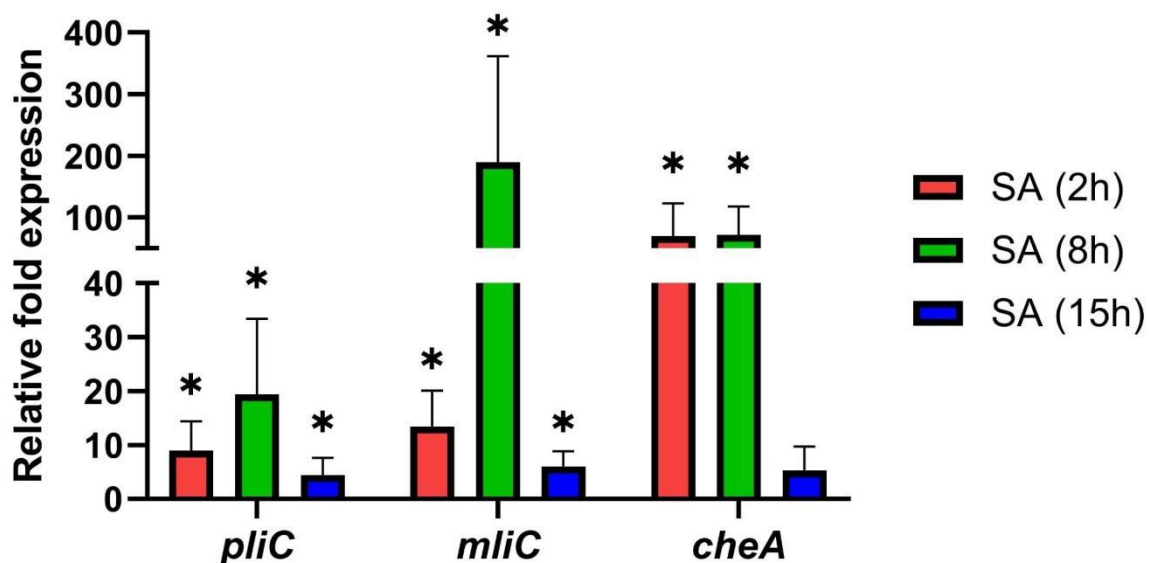


Рисунок 5.3 – Относительная экспрессия генов ингибиторов лизоцима и хемотаксиса сальмонелл через 2, 8 и 15 ч после заражения акантамеб по сравнению с экспрессией контрольной культуры. Уровни экспрессии генов *pliC*, *mliC*, и *cheA* нормализованы относительно уровня экспрессии референсного гена *rpoD*. Статистически значимые отличия отмечены звездочкой, где (*) $p \leq 0,5$

5.1 Обсуждение полученных результатов

5.1.1 Динамика экспрессии генов гликолиза и глиоксилатного цикла

В данной работе мы выявили фазо-специфическую динамику экспрессии некоторых кластеров и функциональных групп генов *Salmonella* Typhimurium 14028S параллельно с динамикой численности бактерий внутри акантамеб. Экспрессия гена *agr*, кодирующего один из ключевых ферментов гликолиза, глюкозо-1-фосфатазу, была ниже, чем в контрольной культуре в течение всего периода наблюдения, а через 15 ч она снижалась достоверно. Данные транскриптомного анализа сальмонелл также подтверждают снижение экспрессии генов гликолиза на ранней стадии инфекции [Balkin et al., 2021]. В различных моделях инфекции было показано [Eisenreich et al., 2010; Eriksson et al., 2003; Tchawa Yimga et al., 2006, Bowden et al., 2009; Eisele

et al., 2013], что для сальмонелл глицерин и глюкоза являются основными источниками углерода, которые метаболизируются в основном через гликолиз и путь Энтнера-Дудорова в макрофагах или через цикл трикарбоновых кислот в эпителиальных клетках [Eisenreich et al., 2010]. Следует отметить, что выявленная в предыдущих исследованиях активация гликолиза может быть связана с высокой концентрацией глюкозы, содержащейся в богатых средах культивирования клеток-хозяев [Eisenreich et al., 2010, Diacovich et al., 2016]. Напротив, безуглеродная среда PAS, использованная в нашем исследовании, лимитирует углеводы для сальмонелл, что приводит к подавлению гликолиза.

Незначительное увеличение экспрессии гена глиоксилатного цикла *aceB* через 2 и 8 ч после начала инфекции согласуется с данными транскриптомного анализа ранней стадии совместного культивирования сальмонелл с акантамебами. Это может быть объяснено использованием сальмонеллой глиоксилатного шунта в качестве альтернативного катаболического пути в определенных условиях, например в макрофагах RAW 264.7, выращенных на богатой глюкозой среде, или на стадии поздней персистенции у мышей [Fang et al., 2005, Diacovich et al., 2016]. Таким образом, селективная активация различных путей катаболизма углерода внутриклеточных сальмонелл определяется различными факторами, включая тип клетки-хозяина, содержание органических веществ в среде культивирования и стадию инфекции. Кроме того, нельзя исключать альтернативные катаболические пути, такие как β -окисление, поскольку они не были оценены в этом исследовании. Например, путь β -окисления не использовался внутриклеточной сальмонеллой в присутствии глюкозы, но он активировался внутри макрофагов RAW 264.7, растущих в среде без глюкозы [Fang et al., 2005].

5.1.2 Регуляция генов захвата железа и ответа на окислительный стресс на различных сроках инфекции акантамеб

Ранее было показано, что макрофагальные клетки и амебы имеют общие механизмы фагоцитоза, включая закисление фагосомы, выработку АФК,

литических ферментов и регуляцию доступности катионов Zn^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{2+} [Amaro, Martín-González, 2021, Dunn et al., 2018]. В связи с чем, некоторые гены демонстрируют схожие паттерны экспрессии у сальмонелл, захваченных амебами и макрофагами. Многочисленные гены сальмонелл напрямую или косвенно регулируются ионами железа, что указывает на его критическую роль в выживании и вирулентности сальмонелл [Litwin, 1993, Bjarnason et al., 2003]. В нашем исследовании экспрессия генов захвата железа (*entS* и *sitA*) значительно усиливалась у сальмонелл в клетках акантамеб, причем максимальная экспрессия наблюдалась через 8 ч после заражения (более чем в 172 раза по сравнению с контрольной культурой для *entS*). Это может свидетельствовать о том, что клетки сальмонелл интенсивно поглощают железо в вакуолях акантамеб. Однако, через 15 ч после заражения, экспрессия данных генов снизилась, но оставалась существенно выше, чем в контрольных культурах. Данный факт указывает на то, что сальмонеллы продолжают интенсивно поглощать железо и на поздних стадиях культивирования. Таким образом, железо может играть важную роль во взаимодействии между внутриклеточными сальмонеллами и акантамебой. Это предположение согласуется с тем фактом, что железо необходимо для поддержания многих биологических процессов и функций в обоих организмах [Nairz et al., 2010; Murdoch, Skaar., 2022]. Активация генов импорта железа сальмонеллами была также продемонстрирована в моделях инфекции макрофагов и эпителиальных клеток [Srikumar et al., 2015; Hautefort et al., 2008]. Однако экспрессия генов захвата железа была существенно подавлена в инфузориях рода *Tetrahymena* [Rehfuss et al., 2011].

Другой важной функцией железа является роль кофактора для ферментов, участвующих в окислительном стрессе, таких как цитохромы, каталазы и пероксидазы. Многие из этих ферментов участвуют в защите бактерий от активных форм кислорода [Sousa Gerós et al., 2020]. Значительное усиление экспрессии генов *grxA* и *katG*, кодирующих глутаредоксин и каталазу соответственно, в течение первых 8 ч после заражения, может быть

вызвано ответом на окислительный стресс внутри пищеварительных вакуолей акантамеб. Эти данные показывают, что сальмонеллы активируют защитные антиоксидантные механизмы для противодействия повреждающему эффекту активных форм кислорода и азота [Ezraty et al., 2017], которые имеют решающее значение для уничтожения бактерий в клетках фагоцитов [Rhen, 2019]. Интересно, что мы наблюдали снижение экспрессии *grxA* через 15 ч после заражения до значений, аналогичных контрольным культурам. Более того, экспрессия *katG* достоверно подавлялась более чем в 5 раз через 15 ч после начала инфекции. Это указывает на возможное снижение активности НАДФН-оксидазы и окислительного стресса в целом в пищеварительных вакуолях амеб через 15 ч после заражения. Реакция на окислительный стресс является общей для сальмонелл внутри различных хозяев. Ранее было обнаружено, что экспрессия генов *grxA* и *katG* усиливается у сальмонелл при поглощении макрофагами, а также протистами *Tetrahymena* и *A. castellanii* [Srikumar et al., 2015; Rehfuess et al., 2011; Balkin et al., 2021]. Кроме того, экспрессия гена *grxA* была повышена в цитозоле эпителиальных клеток HeLa [Powers et al., 2021].

На ранних стадиях заражения сальмонеллами фагоциты резко увеличивают продукцию супероксида, который превращается в перекись водорода. Взаимодействие последней со свободными ионами железа в реакции Фентона приводит к образованию высокотоксичных гидроксильных радикалов [Rhen, 2019, Tan et al., 2021]. Таким образом, железо в фагосомах вносит вклад в механизм окислительного уничтожения [Taylor et al., 2009]. Кроме того, вероятно, усиление экспрессии генов поглощения железа и ответа на окислительный стресс сальмонелл в первые 8 ч инфекции обусловлено необходимостью работы оксидоредуктаз, использующих железо в качестве кофактора.

5.1.3 Особенности экспрессии генов патогенности и вирулентности сальмонелл на различных сроках инфекции акантамеб

В многочисленных исследованиях взаимодействия сальмонелл с различными эукариотическими хозяевами [Feng et al., 2009; Vonaesch et al., 2014; Hautefort et al., 2008; Westermann et al., 2016] и клеточными культурами различных типов [Li et al., 2019] была продемонстрирована зависящая от стадии регуляция генов SPI. В нашем исследовании мы зафиксировали определенный паттерн генов SPI, определяемый стадией взаимодействия с акантамебами. *Salmonella enterica* кодирует два типа белков, ассоциированных с вирулентностью, которые затем транспортируются в клетку-хозяина через две различные системы секреции III типа, расположенные в регионах SPI-1 и SPI-2 соответственно. CCTT-1 участвует в инвазии сальмонелл в клетки хозяина, а также в подавлении ранней экспрессии провоспалительных цитокинов в макрофагах [Choi et al., 2019]. CCTT-2 представляет собой сложную систему вирулентности, которая активируется после интернализации в клетки хозяина различных типов и способствует внутриклеточному сохранению и росту бактерий [Waterman, Holden, 2003]. Она также играет ключевую роль во внутриклеточном выживании сальмонелл в клетках млекопитающих [Srikumar et al., 2015; Hautefort et al., 2008] и свободноживущих амёб [Bleasdale et al., 2009].

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 [Balkin et al., 2021, Bleasdale et al., 2009; Ruby et al., 2012]. Однако, мы наблюдали повышенную экспрессию *hilA* (главного активатора SPI-1), которая сохранялась на поздних стадиях. Известно, что на экспрессию *hilA* влияют такие факторы окружающей среды, как кислый pH, содержание кислорода, концентрация Mg^{2+} , присутствие короткоцепочечных

жирных кислот и ацетата [Lou et al., 2019; Hamed et al., 2021]. Мы предполагаем, что жирные кислоты являются основным источником углерода для бактерий на поздних стадиях взаимодействия с амебами (15 ч), на которой не наблюдается активации гликолиза и глиоксилатного шунта. Таким образом, в нашем исследовании, экспрессия *hilA* может быть вызвана присутствием жирных кислот.

Однако, мы отметили, что экспрессия *sipC* достоверно не изменялась в течение всего периода наблюдения. Эффектор SPI-1 SipC является компонентом ССТТ-1, и вместе с другими эффекторами принимает участие в перестройке актинового цитоскелета клетки хозяина, способствуя интернализации сальмонелл в нефагоцитарные клетки [McGhie et al., 2001; Perrett, Zhou, 2013]. Кроме того, была выявлена необходимость данного гена при персистирующей инфекции у мышей [Lawley et al., 2006]. Ранее была отмечена значительная индукция (6-кратное усиление экспрессии) *sipC* у сальмонелл в клетках *A. polyphaga* через 1 ч после начала инфекции, тогда как через 4 ч экспрессия *sipC* уже не отличалась от значений в контрольных культурах [Bleasdale et al., 2009]. Возможно, это объясняет отсутствие усиления экспрессии *sipC* через 2 ч после начала инфекции в нашем исследовании. Кроме того, различия в экспрессии генов, кодируемых SPI, могут быть связаны с тем, что наше исследование проводилось при более низкой температуре (25°C), что создавало неоптимальные условия для регуляции генов вирулентности [Elpers et al., 2022].

Ген *mgtC* расположен в SPI-3 и кодирует белок вирулентности, который отвечает за транспорт ионов (протонов и фосфатов) внутри фагосомы. Этот белок способствует патогенности сальмонелл, поддерживая цитозольный pH бактерии во время закисления фагосомы [Choi et al., 2019]. Ранее было отмечено увеличение экспрессии данного гена в макрофагах, клетках HeLa и вакуолях инфузорий *Tetrahymena* [Eriksson et al., 2003; Rehfuß et al., 2011; Hautefort et al., 2008], где он был одним из наиболее сильно индуцируемых генов. В нашем исследовании мы наблюдали похожую тенденцию, а именно,

экспрессия *mgtC* была самой сильной среди всех проанализированных генов. Кроме того, динамика экспрессии *mgtC* выявила схожие паттерны с регуляцией генов SPI-2 (*sseC* и *phoP*). Максимальный уровень экспрессии для всех трех генов наблюдался через 8 ч после начала инфекции, после чего экспрессия снижалась через 15 ч, но оставалась достоверно высокой по сравнению с контрольной культурой. Это можно объяснить тем фактом, что экспрессия *mgtC* и генов SPI-2 регулируется двухкомпонентной системой PhoP/PhoQ, которая индуцируется в присутствии низких концентраций Mg^{2+} , кислого pH и антимикробных пептидов в пищеварительных вакуолях [Choi et al., 2019]. В целом, эти результаты свидетельствуют о том, что регуляция генов вирулентности *S. Typhimurium* в клетках амёб и млекопитающих демонстрирует схожие закономерности и зависит от стадии инфекции [Riquelme et al., 2016, Amaro, Martín-González, 2021].

5.1.4 Экспрессия генов хемотаксиса и ингибиторов лизоцима при инфекции акантамеб

Согласно данным полнотранскриптомного анализа экспрессия гистидин-киназы системы хемотаксиса *cheA* усиливалась более чем в 3 раза на ранней стадии инфекции акантамеб. Данные количественной ПЦР подтвердили значительное усиление экспрессии гена *cheA* в течение 8 ч после начала инфекции. Однако через 15 ч экспрессия *cheA* падала до уровня контрольной культуры. Гены, кодирующие флагеллин и хемотаксис *S. Typhimurium*, обычно подавляются внутри фагоцитарных клеток млекопитающих [Srikumar et al., 2015; Eriksson et al., 2003], фибробластов [Núñez-Hernández et al., 2013] и простейших [Feng et al., 2009], но активируется в эпителиальных клетках [Hautefort et al., 2008]. Кроме того, значительно более высокие уровни экспрессии генов подвижности и хемотаксиса наблюдались у серовара *S. Paratyphi A* в клетках HeLa [Cohen et al., 2022]. Причины повышенной экспрессии генов хемотаксиса внутри определенных типов клеток хозяина остаются неясными. Более того, было показано, что делеция

CheA и CheY (основных компонентов сигнальной системы хемотаксиса) не влияет на рост, инвазию и способность к выживанию *S. Typhimurium* 14028S внутри *A. castellanii* [Mannan et al., 2020]. Бактериальный таксис может быть вызван различными стимулами окружающей среды, включая некоторые метаболиты (аминокислоты, дипептиды, сахара и пиримидины), сигнальные молекулы (моноциклические и бициклические ароматические углеводороды, промежуточные продукты цикла трикарбоновых кислот, неорганические фосфаты), температуру, свет, соленость, кислород, магнитное поле и pH [Krell et al., 2011]. Возможно, повышение регуляции генов хемотаксиса является специфической реакцией сальмонеллы на некоторые из этих соединений внутри акантамеб.

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. Имеются немногочисленные доказательства, демонстрирующие защитную роль PliC и MliC для бактерий, расположенных внутри клеток-хозяев. Например, открытая рамка считывания, позднее идентифицированная как *mliC*, была обнаружена среди генов с повышенной регуляцией у *S. Typhi* внутри макрофагов [Daigle et al., 2001]. Более того, мутанты с нокаутом данного гена хуже выживали в макрофагах, чем штамм дикого типа [Daigle et al., 2001]. Полученные данные, вместе с опубликованными исследованиями подтверждают существенную, и очевидно недостаточно изученную роль ингибиторов лизоцима С-типа во внутриклеточной персистенции сальмонелл в фагоцитирующих клетках не только протистов, но и млекопитающих.

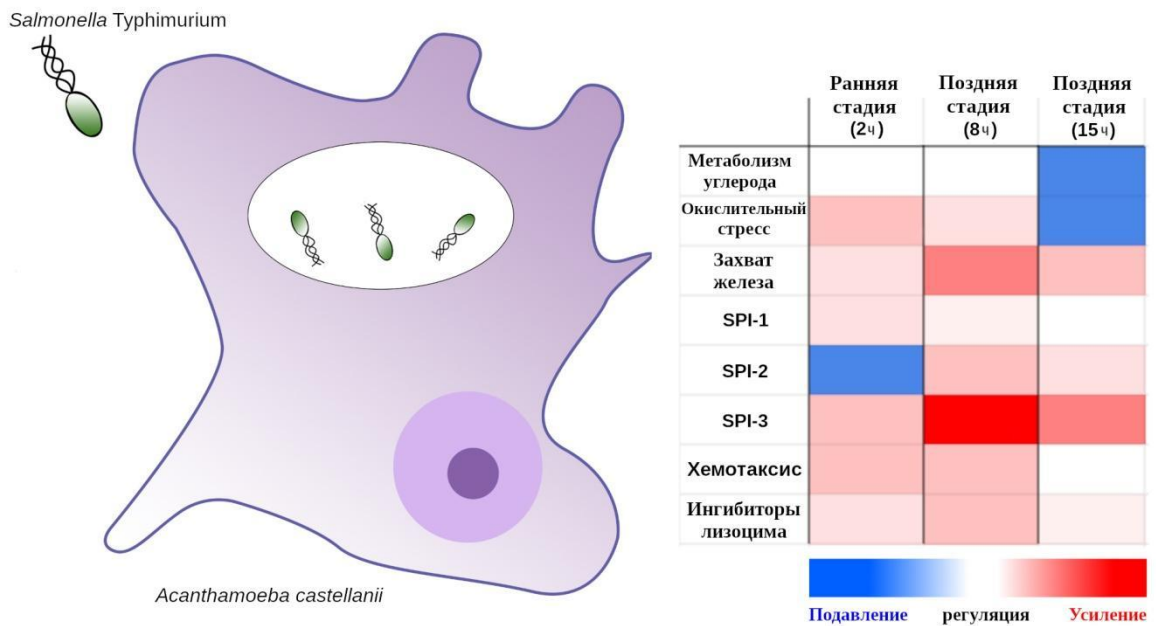


Рисунок 5.3 – Предлагаемая модель динамики экспрессии генов *Salmonella Typhimurium* 14028S на разных стадиях инфекции *Acanthamoeba castellanii*. Тепловая карта показывает относительную экспрессию ключевых функциональных групп генов сальмонелл через 2 ч, 8 ч и 15 ч после инфекции

Анализ динамики экспрессии генов позволил нам предложить модель сальмонеллезной инфекции *Acanthamoeba castellanii* (Рисунок 5.4). 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*.

Материалы данной главы отражены в публикациях:

1. 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.
2. 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

История изучения сальмонелл насчитывает уже более 140 лет, в течение которых подробно изучалась их этиология, эпидемиология, патогенез, а также биохимические и молекулярно-генетические свойства. Однако, сальмонеллез остается серьезной проблемой здравоохранения во всем мире, даже в промышленно развитых странах, становясь причиной более 100 тысяч смертельных случаев ежегодно.

Успех сальмонеллы как патогена определяется разнообразием метаболизма, богатым арсеналом систем патогенности и вирулентности, закодированных в геноме. Разнообразие метаболических путей позволяет сальмонеллам сохраняться в окружающей среде в течение длительного времени, обеспечивая резервуарную функцию, важную для условно-патогенных микроорганизмов, которые как правило, не передаются напрямую от человека к человеку. Фактически, для многих патогенов (например, *Legionella pneumophila*, *Coxiella burnetti*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*) человек представляет собой случайного хозяина или даже эволюционный тупик [Amaro and Martín-González, 2021], что делает маловероятным возникновение вирулентности в результате инфекций человека. В связи с этим высказано предположение, что системы и факторы вирулентности могли появиться для повышения приспособленности бактерий к окружающей среде, а не для вирулентности как таковой [Brown et al. 2012; Martínez 2013; Erken et al. 2013]. Действительно, гены, кодирующие факторы вирулентности (например, системы секреции белков, токсины), также обнаружены в геномах непатогенных бактерий [Amaro, Martín-González, 2021].

В природных экосистемах сальмонеллы обитают совместно с гетеротрофными простейшими. Последние исследования все чаще демонстрируют присутствие данных патогенов в микробиомах свободноживущих амёб [Moreno-Mesonero et al., 2020; Vingataramin et al., 2025]. Взаимодействие сальмонелл с гетеротрофными простейшими

представляет большой интерес для исследователей, поскольку последние выступают в роли «троянских коней», с одной стороны, способствуя сохранению этих бактерий в естественной среде, а с другой — поддерживая их вирулентность. Кроме того, внутри клеток простейших бактерии защищены от воздействия антибиотиков и других факторов внешней среды. Изучению различных аспектов взаимодействия свободноживущих простейших и сальмонелл уделяется все более пристальное внимание [Liu et al., 2018; Moreno-Mesonero et al., 2020; Mannan et al., 2020; Rayamajhee et al., 2024; Vingataramin et al., 2025]. Этому способствует в том числе развитие и удешевление технологий высокопроизводительного секвенирования, а также достижений в области молекулярной биологии.

Современные методы генетических исследований, такие как транскриптомный анализ с использованием секвенаторов нового поколения и применение микрочипов ДНК, позволили значительно продвинуться в раскрытии молекулярных процессов, происходящих при фагоцитозе. Использование транскриптомных методов анализа позволяет выявить группы генов, дифференциально экспрессирующихся в клетках в ответ на воздействие. Основным достоинством технологии является возможность одновременного анализа всей совокупности генов.

Тем не менее, экспрессия генов бактерий при фагоцитозе простейшими в значительной степени остается малоизученной, и требует более детальных исследований. Механизмы фагоцитоза простейших являются отличными от механизмов, происходящих при фагоцитозе макрофагов. Следовательно, и ответ бактерий на фагоцитоз различается в зависимости от природы фагоцита. Работы по сравнению транскриптомных профилей бактерий, фагоцитированных эволюционно отдаленными фагоцитами не опубликованы, либо еще не проводились, хотя анализ литературных данных позволяет сделать предположение о том, что такие различия должны существовать. Также, не известно, существует ли универсальная стратегия персистенции сальмонелл в клетках эукариот. Описанная выше актуальность определила

цель нашего исследования: оценить экспрессию генов сальмонелл при фагоцитозе свободноживущими амёбами *A. castellanii*.

Прежде, чем оценить глобальную экспрессию генов сальмонелл внутри *Acanthamoeba*, мы провели исследование популяционной динамики взаимодействия сальмонелл и амёб с целью разработки оптимальной модели и определения ключевых точек для оценки транскриптома. В результате проведенных исследований установлена резистентность *S. Typhimurium* 14028S к фагоцитозу *A. castellanii* Neff, которая не определяется концентрацией органических веществ в среде. Выявлено, что внутриклеточные *S. Typhimurium* оказывают незначительное цитотоксическое действие в отношении *A. castellanii*, которое не зависит от концентрации источников углерода. Напротив, при размножении внеклеточных сальмонелл в среде, не содержащей антибиотик наблюдался значительный цитотоксический эффект. Таким образом, в очередной раз была подтверждена резервуарная роль акантамеб. Разработанная модель позволяет оценивать экспрессию генов сальмонелл на различных сроках взаимодействия с амёбами различными методами, включая высокопроизводительное секвенирование или 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.

Полученные нами данные позволили впервые оценить полный транскриптом сальмонелл при фагоцитозе свободноживущими простейшими *A. castellanii* с использованием высокопроизводительного секвенирования. Полученный результат продемонстрировал успешное применение подхода Carppable-Seq для оценки транскриптома внутриклеточно локализованных бактерий, что открывает многообещающие перспективы в исследовании симбиотических взаимодействий бактерий и эукариот. Это особенно важно для изучения немодельных эукариот, для которых не существует

эффективных способов удаления рибосомальной РНК перед секвенированием транскриптома.

На основе данных транскриптома сальмонелл на ранней стадии инфекции акантамеб была выполнена реконструкция основных метаболических и функциональных систем *S. Typhimurium*, участвующих в инфекции *A. castellanii*. Установлены подавление экспрессии генов основных путей метаболизма глюкозы и глюконовой кислоты, включая ЦТК, гликолиз, и пентозо-фосфатный путь, и 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). Глиоксилатный шунт также может быть более выгоден в условиях окислительного стресса [Ahn et al., 2016]. Таким образом, обнаруженное перестроение метаболизма сальмонелл может быть вызвано ответом на специфические условия внутри пищеварительных вакуолей акантамеб.

Данные наших исследований явно показывают, что сальмонеллы используют схожий арсенал систем патогенности как для инфекции акантамеб, так и других профессиональных и непрофессиональных фагоцитов. Этот арсенал включает такие консервативные системы как SPI-1, SPI-2, оксидоредуктазы, транспортеры железа. Данные о схожести арсенала вирулентности, используемого для противодействия фагоцитоза амёбами и профессиональными фагоцитами, поддерживают гипотезу о том, что взаимодействие с простейшими служит «тренировкой» и поддерживает вирулентный потенциал сальмонелл в окружающей среде. 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, хотя ранее отмечалось подавление данных генов при инфекции макрофагов и других гетеротрофных протистов. 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. Тот факт, что сальмонеллы не проявляют выраженной цитотоксичности в отношении *A. castellanii*, а также активация SPI-1 (необходимого для проникновения в нефагоцитарные клетки) и жгутивого аппарата (компоненты которого являются сильными антигенами) внутри акантамеб может отражать симбиотическую природу взаимоотношений между этими организмами.

Подводя итог, данное исследование вносит существенный вклад в фундаментальное понимание экологии, эволюции и механизмов выживания сальмонелл, раскрывая их сложные взаимодействия с простейшими как ключевым фактором экологической устойчивости. Стоит отметить, что полученные результаты необходимо дополнительно проверить с использованием протеомных данных или мутантов по ключевым генам. Наши результаты могут быть использованы в дальнейшем для поиска факторов, снижающих устойчивость патогенов, таких как сальмонеллы, в окружающей среде. В частности, пребывание в свободноживущих простейших считается одной из основных причин устойчивости сальмонелл в воде, используемой для полива, что ухудшает микробное качество воды и безопасность пищевых продуктов [Moreno-Mesonero et al., 2020]. Поэтому поиск и синтез веществ, влияющих на молекулярные механизмы персистенции сальмонелл в свободноживущих простейших, был бы полезен для контроля и профилактики вспышек заболеваний, передающихся через воду и пищу.

ВЫВОДЫ

1) На модели сокультивирования *S. Typhimurium* с *A. castellanii* в присутствии гентамицина установлена резистентность бактерий к фагоцитозу амебами, 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 Carrrable-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 амеб 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 амеб 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

гликозилатного 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 проводиться по следующим направлениям:

- 1) Выявление источника углерода для сальмонелл внутри пищеварительных вакуолей акантамеб. В связи с чем необходимо оценить участие метаболизма жирных кислот при инфекции.
- 2) Исследование полного транскриптома сальмонелл на поздних стадиях взаимодействия с акантамебами.
- 3) Подтверждение полученных ранее данных по транскриптому сальмонелл с помощью мутантов по отдельным генам.
- 4) 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

T1SS — система секреции I типа

T4SS — система секреции IV типа

T6SS — система секреции VI типа

NGS — секвенирование следующего поколения

ЦТК — цикл трикарбоновых кислот

SCV — вакуоли содержащие сальмонелл

Nramp1 — natural resistance—associated macrophage protein

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

GRX — глутаредоксин 1

KAT — каталаза G

AHR — алкилгидропероксидредуктаза

FCH — феррохелатаза

SOD — супероксиддисмутаза

SUF — сборка кластера Fe-S

Cys — цистеин

Lys — лизин

Cad — кадаверин

Arg — аргинин

Agm — агматин

FLH — белки сборки жгутиков

MOT — статорные белки MotAB

Fli — белки сборки жгутиков fli

Chem — хемотаксис

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бухарин О. В., Каган Ю. Д., Бурмистрова А. Л. Сальмонеллы и сальмонеллезы. – Екатеринбург, 2000. – 258 с.
2. Любимова А. В., Сатосова Н. В., Кицбабашвили Р. В. Особенности эпидемического процесса сальмонеллёзной инфекции в период пандемии COVID-19. – Текст : электронный // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2023. – Т. 22, № 2. – С. 95–102. – URL: <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2023-22-2-95-102> (дата обращения: 20.07.2023).
3. Adékambi T., Ben Salah S., Khelif M., Raoult D., Drancourt M. Survival of environmental mycobacteria in *Acanthamoeba polyphaga*. – Text : electronic // Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – Vol. 72. – P. 5974–5981. – URL: <https://doi.org/10.1128/AEM.01078-06> (дата обращения: 20.07.2023).
4. Ahn S., Jung J., Jang I. A., Madsen E. L., Park W. Role of Glyoxylate Shunt in Oxidative Stress Response. – Text : electronic // J. Biol. Chem. – 2016. – Vol. 291, № 22. – P. 11928–11938. – URL: <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.708149> (дата обращения: 20.07.2023).
5. Amaro F., Martín-González A. Microbial warfare in the wild-the impact of protists on the evolution and virulence of bacterial pathogens. – Text : electronic // Int. Microbiol. – 2021. – Vol. 24, № 4. – P. 559–571. – URL: <https://doi.org/10.1007/s10123-021-00192-y> (дата обращения: 20.07.2023).
6. Ammendola S., Pasquali P., Pistoia C., Petrucci P., Petrarca P., Rotilio G., Battistoni A. High-affinity Zn²⁺ uptake system ZnuABC is required for bacterial zinc homeostasis in intracellular environments and contributes to the virulence of *Salmonella enterica*. – Text : electronic // Infect. Immun. – 2007. – Vol. 75, № 12.

– P. 5867–5876. – URL: <https://doi.org/10.1128/IAI.00559-07> (дата обращения: 20.07.2023).

7. Anacarso I., de Niederhäusern S., Messi P., Guerrieri E., Iseppi R., Sabia C., Bondi M. *Acanthamoeba polyphaga*, a potential environmental vector for the transmission of food-borne and opportunistic pathogens. – Text : electronic // J. Basic Microbiol. – 2012. – Vol. 52, № 3. – P. 261–268. – URL: <https://doi.org/10.1002/jobm.201100097> (дата обращения: 20.07.2023).

8. Avital G., Avraham R., Fan A. [et al.] scDual-Seq: mapping the gene regulatory program of *Salmonella* infection by host and pathogen single-cell RNA-sequencing. – Text : electronic // Genome Biol. – 2017. – Vol. 18. – P. 200. – URL: <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1340-x> (дата обращения: 20.07.2023).

9. Axelsson-Olsson D., Waldenström J., Broman T., Olsen B., Holmberg M. Protozoan *Acanthamoeba polyphaga* as a potential reservoir for *Campylobacter jejuni*. – Text : electronic // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – Vol. 71. – P. 987–992. – URL: <https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.987-992.2005> (дата обращения: 20.07.2023).

10. Bajaj V., Hwang C., Lee C. A. hilA is a novel ompR/toxR family member that activates the expression of *Salmonella typhimurium* invasion genes. – Text : electronic // Mol. Microbiol. – 1995. – Vol. 18, № 4. – P. 715–727. – URL: https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_18040715.x (дата обращения: 20.07.2023).

11. Balaji B., O'Connor K., Lucas J. R., Anderson J. M., Csonka L. N. Timing of induction of osmotically controlled genes in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, determined with quantitative real-time reverse transcription-PCR. – Text : electronic // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – Vol. 71, № 12. – P. 8273–8283. – URL: <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8273-8283.2005> (дата обращения: 20.07.2023).

12. Balczun C., Scheid P. L. Free-Living Amoebae as Hosts for and Vectors of Intracellular Microorganisms with Public Health Significance. – Text : electronic // Viruses. – 2017. – Vol. 9, № 4. – Art. № 65. – URL: <https://doi.org/10.3390/v9040065> (дата обращения: 20.07.2023).
13. Bao H., Wang S., Zhao J. H., Liu S. L. Salmonella secretion systems: Differential roles in pathogen-host interactions. – Text : electronic // Microbiol. Res. – 2020. – Vol. 241. – Art. № 126591. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126591> (дата обращения: 20.07.2023).
14. Baré J., Sabbe K., Huws S., Vercauteren D., Braeckmans K., van Gremberghe I., Favoreel H., Houf K. Influence of temperature, oxygen and bacterial strain identity on the association of *Campylobacter jejuni* with *Acanthamoeba castellanii*. – Text : electronic // FEMS Microbiol. Ecol. – 2010. – Vol. 74. – P. 371–381. – URL: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00955.x> (дата обращения: 20.07.2023).
15. Baré J., Sabbe K., Van Wichelen J., van Gremberghe I., D'hondt S., Houf K. Diversity and habitat specificity of free-living protozoa in commercial poultry houses. – Text : electronic // Appl. Environ. Microbiol. – 2009. – Vol. 75. – P. 1417–1426. – URL: <https://doi.org/10.1128/AEM.02367-08> (дата обращения: 20.07.2023).
16. Basler M., Ho B. T., Mekalanos J. J. Tit-for-tat: type VI secretion system counterattack during bacterial cell-cell interactions. – Text : electronic // Cell. – 2013. – Vol. 152, № 4. – P. 884–894. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.042> (дата обращения: 20.07.2023).
17. Becker D., Selbach M., Rollenhagen C. [et al.] Robust Salmonella metabolism limits possibilities for new antimicrobials. – Text : electronic // Nature. – 2006. – Vol. 440. – P. 303–307. – URL: <https://doi.org/10.1038/nature04616> (дата обращения: 20.07.2023).

18. Ben Salah I., Drancourt M. Surviving within the amoebal exocyst: the *Mycobacterium avium* complex paradigm. – Text : electronic // BMC Biol. – 2010. – Vol. 10. – Art. № 99. – URL: <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-99> (дата обращения: 20.07.2023).
19. Berger C. N., Sodha S. V., Shaw R. K., Griffin P. M., Pink D., Hand P., Frankel G. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. – Text : electronic // Environ. Microbiol. – 2010. – Vol. 12, № 9. – P. 2385–2397. – URL: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02297.x> (дата обращения: 20.07.2023).
20. Bertelli C., Greub G. Lateral gene exchanges shape the genomes of amoeba-resisting microorganisms. – Text : electronic // Front. Cell. Infect. Microbiol. – 2012. – Vol. 2. – Art. № 110. – URL: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00110> (дата обращения: 20.07.2023).
21. Bijlsma J. J. E., Groisman E. A. The PhoP/PhoQ system controls the intramacrophage type three secretion system of *Salmonella enterica*. – Text : electronic // Mol. Microbiol. – 2005. – Vol. 57, № 1. – P. 85–96. – URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04668.x> (дата обращения: 20.07.2023).
22. Bjarnason J., Southward C. M., Surette M. G. Genomic profiling of iron-responsive genes in *Salmonella enterica* serovar typhimurium by high-throughput screening of a random promoter library. – Text : electronic // J. Bacteriol. – 2003. – Vol. 185, № 16. – P. 4973–4982. – URL: <https://doi.org/10.1128/JB.185.16.4973-4982.2003> (дата обращения: 20.07.2023).
23. Bleasdale B., Lott P. J., Jagannathan A., Stevens M. P., Birtles R. J., Wigley P. The *Salmonella* pathogenicity island 2-encoded type III secretion system is essential for the survival of *Salmonella enterica* serovar typhimurium in free-living amoebae. – Text : electronic // Appl. Environ. Microbiol. – 2009. – Vol. 75, № 6. – P. 1793–1795. – URL: <https://doi.org/10.1128/AEM.02033-08> (дата обращения: 20.07.2023).

24. Blondel C. J., Jiménez J. C., Contreras I., Santiviago C. A. Comparative genomic analysis uncovers 3 novel loci encoding type six secretion systems differentially distributed in *Salmonella* serotypes. – Text : electronic // BMC Genomics. – 2009. – Vol. 10. – Art. № 354. – URL: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-354> (дата обращения: 20.07.2023).

25. Boutard M., Ettwiller L., Cerisy T., Alberti A., Labadie K., Salanoubat M., Schildkraut I., Tolonen A. C. Global repositioning of transcription start sites in a plant-fermenting bacterium. – Text : electronic // Nat. Commun. – 2016. – Vol. 7. – Art. № 13783. – URL: <https://doi.org/10.1038/ncomms13783> (дата обращения: 20.07.2023).

26. Bowden S.D., Rowley G., Hinton J.C., Thompson A. Glucose and glycolysis are required for the successful infection of macrophages and mice by *Salmonella enterica* serovar typhimurium. – Text : electronic // Infect Immun. 2009. – Vol. 77, № 7. – P. 3117–3126. – URL: <https://doi.org/10.1128/IAI.00093-09> (дата обращения: 13.08.2023).

27. Boyer F., Fichant G., Berthod J., Vandenbrouck Y., Attree I. Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: what can be learned from available microbial genomic resources? – Text : electronic // BMC Genomics. – 2009. – Vol. 10. – Art. № 104. – URL: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-104> (дата обращения: 20.07.2023).

28. Brandl M. T., Rosenthal B. M., Haxo A. F., Berk S. G. Enhanced survival of *Salmonella enterica* in vesicles released by a soilborne *Tetrahymena* species. – Text : electronic // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – Vol. 71, № 3. – P. 1562–1569. – URL: <https://doi.org/10.1128/AEM.71.3.1562-1569.2005> (дата обращения: 20.07.2023).

29. Brawn L. C., Hayward R. D., Koronakis V. Salmonella SPI1 effector SipA persists after entry and cooperates with a SPI2 effector to regulate phagosome maturation and intracellular replication. – Text : electronic // Cell Host Microbe. –

2007. – Vol. 1, № 1. – P. 63–75. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.02.001> (дата обращения: 20.07.2023).

30. Brown S., Palmer K., Whiteley M. Revisiting the host as a growth medium. – Text : electronic // Nat. Rev. Microbiol. – 2008. – Vol. 6. – P. 657–666. – URL: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1955> (дата обращения: 20.07.2023).

31. Brown S. P., Cornforth D. M., Mideo N. Evolution of virulence in opportunistic pathogens: generalism, plasticity, and control. – Text : electronic // Trends Microbiol. – 2012. – Vol. 20, № 7. – P. 336–342. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.04.005> (дата обращения: 20.07.2023).

32. Bumann D., Schothorst J. Intracellular *Salmonella* metabolism. – Text : electronic // Cell. Microbiol. – 2017. – Vol. 19, № 10. – e12766. – URL: <https://doi.org/10.1111/cmi.12766> (дата обращения: 20.07.2023).

33. Carlson S. A., Sharma V. K., McCuddin Z. P., Rasmussen M. A., Franklin S. K. Involvement of a *Salmonella* genomic island 1 gene in the rumen protozoan-mediated enhancement of invasion for multiple-antibiotic-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. – Text : electronic // Infect. Immun. – 2007. – Vol. 75, № 2. – P. 792–800. – URL: <https://doi.org/10.1128/IAI.00679-06> (дата обращения: 20.07.2023).

34. Cerny O., Holden D. W. *Salmonella* SPI-2 type III secretion system-dependent inhibition of antigen presentation and T cell function. – Text : electronic // Immunol. Lett. – 2019. – Vol. 215. – P. 35–39. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2019.01.006> (дата обращения: 20.07.2023).

35. Chakravorty D., Rohde M., Jäger L., Deiwick J., Hensel M. Formation of a novel surface structure encoded by *Salmonella* pathogenicity Island 2. – Text : electronic // EMBO J. – 2005. – Vol. 24, № 12. – P. 2043–2052. – URL: <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600676> (дата обращения: 20.07.2023).

36. Choi S., Choi E., Cho Y. J., Nam D., Lee J., Lee E. J. The *Salmonella* virulence protein MgtC promotes phosphate uptake inside macrophages. – Text : electronic // Nat. Commun. – 2019. – Vol. 10. – Art. № 3326. – URL: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11318-2> (дата обращения: 20.07.2023).
37. Christie P. J., Atmakuri K., Krishnamoorthy V., Jakubowski S., Cascales E. Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. – Text : electronic // Annu. Rev. Microbiol. – 2005. – Vol. 59. – P. 451–485. – URL: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.58.030603.123630> (дата обращения: 20.07.2023).
38. Cianfanelli F. R., Monlezun L., Coulthurst S. J. Aim, Load, Fire: The Type VI Secretion System, a Bacterial Nanoweapon. – Text : electronic // Trends Microbiol. – 2016. – Vol. 24, № 1. – P. 51–62. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.10.005> (дата обращения: 20.07.2023).
39. Cirillo J. D., Falkow S., Tompkins L. S. Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. – Text : electronic // Infect. Immun. – 1994. – Vol. 62, № 8. – P. 3254–3261. – URL: <https://doi.org/10.1128/iai.62.8.3254-3261.1994> (дата обращения: 20.07.2023).
40. Claudi B., Spröte P., Chirkova A., Personnic N., Zankl J., Schürmann N. [et al.] Phenotypic variation of *Salmonella* in host tissues delays eradication by antimicrobial chemotherapy. – Text : electronic // Cell. – 2014. – Vol. 158, № 4. – P. 722–733. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.045> (дата обращения: 20.07.2023).
41. Cobo-Simón M., Hart R., Ochman H. Gene flow and species boundaries of the genus *Salmonella*. – Text : electronic // mSystems. – 2023. – Vol. 8, № 4. – Art. № e00292-23. – URL: <https://doi.org/10.1128/msystems.00292-23> (дата обращения: 20.07.2023).
42. Cohen H., Hoede C., Scharte F., Coluzzi C., Cohen E., Shomer I. [et al.] Intracellular *Salmonella* Paratyphi A is motile and differs in the expression of

flagella-chemotaxis, SPI-1 and carbon utilization pathways in comparison to intracellular *S. Typhimurium*. – Text : electronic // PLoS Pathog. – 2022. – Vol. 18, № 6. – Art. № e1010425. – URL: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010425> (дата обращения: 20.07.2023).

43. Collier-Hyams L. S., Zeng H., Sun J., Tomlinson A. D., Bao Z. Q., Chen H., Madara J. L., Orth K., Neish A. S. Cutting edge: *Salmonella* AvrA effector inhibits the key proinflammatory, anti-apoptotic NF-kappa B pathway. – Text : electronic // J. Immunol. – 2002. – Vol. 169, № 6. – P. 2846–2850. – URL: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.6.2846> (дата обращения: 20.07.2023).

44. Crouch M. L. V., Castor M., Karlinsey J. E., Kalhorn T., Fang F. C. Biosynthesis and IroC-dependent export of the siderophore salmochelin are essential for virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. – Text : electronic // Mol. Microbiol. – 2008. – Vol. 67, № 4. – P. 971–983. – URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06089.x> (дата обращения: 20.07.2023).

45. Cunrath O., Palmer J. D. An overview of *Salmonella enterica* metal homeostasis pathways during infection. – Text : electronic // MicroLife. – 2021. – Vol. 2. – Art. № uqab001. – URL: <https://doi.org/10.1093/femsml/uqab001> (дата обращения: 20.07.2023).

46. Curtiss R. 3rd., Kelly S. M. *Salmonella typhimurium* deletion mutants lacking adenylate cyclase and cyclic AMP receptor protein are avirulent and immunogenic. – Text : electronic // Infect. Immun. – 1987. – Vol. 55, № 12. – P. 3035–3043. – URL: <https://doi.org/10.1128/iai.55.12.3035-3043.1987> (дата обращения: 20.07.2023).

47. Daigle F., Graham J. E., Curtiss R. III. Identification of *Salmonella typhi* genes expressed within macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). – Text : electronic // Mol. Microbiol. – 2001. – Vol. 41, № 6. – P. 1211–1222. – URL: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02593.x> (дата обращения: 20.07.2023).

48. Dalebroux Z. D., Matamouros S., Whittington D., Bishop R. E., Miller S. I. PhoPQ regulates acidic glycerophospholipid content of the *Salmonella* Typhimurium outer membrane. – Text : electronic // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2014. – Vol. 111, № 5. – P. 1963–1968. – URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.1316901111> (дата обращения: 20.07.2023).

49. Dandekar T., Fieselman A., Fischer E., Popp J., Hensel M., Noster J. *Salmonella* – how a metabolic generalist adopts an intracellular lifestyle during infection. – Text : electronic // Front. Cell. Infect. Microbiol. – 2014. – Vol. 4. – Art. № 191. – URL: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00191> (дата обращения: 20.07.2023).

50. Darwin K. H., Miller V. L. InvF is required for expression of genes encoding proteins secreted by the SPI1 type III secretion apparatus in *Salmonella typhimurium*. – Text : electronic // J. Bacteriol. – 1999. – Vol. 181, № 16. – P. 4949–4954. – URL: <https://doi.org/10.1128/JB.181.16.4949-4954.1999> (дата обращения: 20.07.2023).

51. Das P., Lahiri A., Lahiri A., Sen M., Iyer N., Kapoor N., Balaji K. N., Chakravorty D. Cationic amino acid transporters and *Salmonella* Typhimurium ArgT collectively regulate arginine availability towards intracellular *Salmonella* growth. – Text : electronic // PLoS One. – 2010. – Vol. 5, № 12. – Art. № e15466. – URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015466> (дата обращения: 20.07.2023).

52. Acheson D., Hohmann E. L. Nontyphoidal Salmonellosis. – Text : electronic // Clin. Infect. Dis. – 2001. – Vol. 32, № 2. – P. 263–269. – URL: <https://doi.org/10.1086/318457> (дата обращения: 20.07.2023).

53. De la Cruz M. A., Pérez-Morales D., Palacios I. J., Fernández-Mora M., Calva E., Bustamante V. H. The two-component system CpxR/A represses the expression of *Salmonella* virulence genes by affecting the stability of the transcriptional regulator HilD. – Text : electronic // Front. Microbiol. – 2015. – Vol.

6. – Art. № 807. – URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00807> (дата обращения: 20.07.2023).

54. Dieye Y., Dyszel J. L., Kader R., Ahmer B. M. Systematic analysis of the regulation of type three secreted effectors in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. – Text : electronic // BMC Microbiol. – 2007. – Vol. 7. – Art. № 3. – URL: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-3> (дата обращения: 20.07.2023).

55. Douesnard-Malo F., Daigle F. Increased persistence of *Salmonella enterica* serovar Typhi in the presence of *Acanthamoeba castellanii*. – Text : electronic // Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – Vol. 77, № 21. – P. 7640–7646. – URL: <https://doi.org/10.1128/AEM.05999-11> (дата обращения: 20.07.2023).

56. Doyscher D., Fieseler L., Dons L., Loessner M. J., Schuppler M. *Acanthamoeba* feature a unique backpacking strategy to trap and feed on *Listeria monocytogenes* and other motile bacteria. – Text : electronic // Environ. Microbiol. – 2013. – Vol. 15, № 2. – P. 433–446. – URL: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02868.x> (дата обращения: 20.07.2023).

57. Dunn J. D., Bosmani C., Barisch C., Raykov L., Lefrançois L. H., Cardenal-Muñoz E. [et al.] Eat prey, live: *Dictyostelium discoideum* as a model for cell-autonomous defenses. – Text : electronic // Front. Immunol. – 2018. – Vol. 8. – Art. № 1906. – URL: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01906> (дата обращения: 20.07.2023).

58. Eisele N. A., Ruby T., Jacobson A., Manzanillo P. S., Cox J. S., Lam L. [et al.] *Salmonella* require the fatty acid regulator PPAR δ for the establishment of a metabolic environment essential for long-term persistence. – Text : electronic // Cell Host Microbe. – 2013. – Vol. 14, № 2. – P. 171–182. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.07.010> (дата обращения: 20.07.2023).

59. Eisenreich W., Dandekar T., Heesemann J. [et al.] Carbon metabolism of intracellular bacterial pathogens and possible links to virulence. – Text : electronic

// Nat. Rev. Microbiol. – 2010. – Vol. 8. – P. 401–412. – URL: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2351> (дата обращения: 20.07.2023).

60. El-Etr S. H., Margolis J. J., Monack D., Robison R. A., Cohen M., Moore E., Rasley A. *Francisella tularensis* type A strains cause the rapid encystment of *Acanthamoeba castellanii* and survive in amoebal cysts for three weeks postinfection. – Text : electronic // Appl. Environ. Microbiol. – 2009. – Vol. 75, № 23. – P. 7488–7500. – URL: <https://doi.org/10.1128/AEM.01829-09> (дата обращения: 20.07.2023).

61. Elhadad D., Desai P., Rahav G., McClelland M., Gal-Mor O. Flagellin Is Required for Host Cell Invasion and Normal *Salmonella* Pathogenicity Island 1 Expression by *Salmonella enterica* Serovar Paratyphi A. – Text : electronic // Infect. Immun. – 2015. – Vol. 83, № 9. – P. 3355–3368. – URL: <https://doi.org/10.1128/IAI.00468-15> (дата обращения: 20.07.2023).

62. Ellermeier C. D., Slauch J. M. RtsA and RtsB coordinately regulate expression of the invasion and flagellar genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. – Text : electronic // J. Bacteriol. – 2003. – Vol. 185, № 17. – P. 5096–5108. – URL: <https://doi.org/10.1128/JB.185.17.5096-5108.2003> (дата обращения: 20.07.2023).

63. Ellermeier J. R., Slauch J. M. Adaptation to the host environment: regulation of the SPI1 type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. – Text : electronic // Curr. Opin. Microbiol. – 2007. – Vol. 10, № 1. – P. 24–29. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.12.002> (дата обращения: 20.07.2023).

64. Elpers L., Deiwick J., Hensel M. Effect of Environmental Temperatures on Proteome Composition of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. – Text : electronic // Mol. Cell. Proteomics. – 2022. – Vol. 21, № 8. – Art. № 100265. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.mcpro.2022.100265> (дата обращения: 20.07.2023).

65. Eriksson S., Lucchini S., Thompson A., Rhen M., Hinton J. C. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. – Text : electronic // Mol. Microbiol. – 2003. – Vol. 47, № 1. – P. 103–118. – URL: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03313.x> (дата обращения: 20.07.2023).

66. Erken M., Lutz C., McDougald D. The rise of pathogens: predation as a factor driving the evolution of human pathogens in the environment. – Text : electronic // Microb. Ecol. – 2013. – Vol. 65, № 4. – P. 860–868. – URL: <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0189-0> (дата обращения: 20.07.2023).

67. Ettwiller L., Buswell J., Yigit E., Schildkraut I. A novel enrichment strategy reveals unprecedented number of novel transcription start sites at single base resolution in a model prokaryote and the gut microbiome. – Text : electronic // BMC Genomics. – 2016. – Vol. 17. – Art. № 199. – URL: <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2539-z> (дата обращения: 20.07.2023).

68. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. – Text : electronic // EFSA J. – 2023. – Vol. 21, № 12. – Art. № e8442. – URL: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8442> (дата обращения: 20.07.2023).

69. Fàbrega A., Vila J. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Skills To Succeed in the Host: Virulence and Regulation. – Text : electronic // Clin. Microbiol. Rev. – 2013. – Vol. 26, № 2. – P. 308–341. – URL: <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-12> (дата обращения: 20.07.2023).

70. Fahlen T. F., Wilson R. L., Boddicker J. D., Jones B. D. Hha is a negative modulator of transcription of hilA, the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion gene transcriptional activator. – Text : electronic // J. Bacteriol. – 2001. – Vol. 183, № 22. – P. 6620–6629. – URL: <https://doi.org/10.1128/JB.183.22.6620-6629.2001> (дата обращения: 20.07.2023).

71. Fang F. C., Libby S. J., Castor M. E., Fung A. M. Isocitrate lyase (AceA) is required for *Salmonella* persistence but not for acute lethal infection in mice. – Text : electronic // Infect. Immun. – 2005. – Vol. 73, № 4. – P. 2547–2549. – URL: <https://doi.org/10.1128/IAI.73.4.2547-2549.2005> (дата обращения: 20.07.2023).

72. Feasey N. A., Dougan G., Kingsley R. A., Heyderman R. S., Gordon M. A. Invasive non-typhoidal salmonella disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. – Text : electronic // Lancet. – 2012. – Vol. 379, № 9835. – P. 2489–2499. – URL: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61752-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61752-2) (дата обращения: 20.07.2023).

73. Feng Y., Hsiao Y. H., Chen H. L., Chu C., Tang P., Chiu C. H. Apoptosis-like cell death induced by *Salmonella* in *Acanthamoeba rhysodes*. – Text : electronic // Genomics. – 2009. – Vol. 94, № 2. – P. 132–137. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2009.05.004> (дата обращения: 20.07.2023).

74. Ferrari R. G., Rosario D. K. A., Cunha-Neto A. [et al.] Worldwide Epidemiology of *Salmonella* Serovars in Animal-Based Foods: a Meta-analysis. – Text : electronic // Appl. Environ. Microbiol. – 2019. – Vol. 85, № 14. – Art. № e00591-19. – URL: <https://doi.org/10.1128/AEM.00591-19> (дата обращения: 20.07.2023).

75. Festa R. A., Thiele D. J. Copper at the Front Line of the Host-Pathogen Battle. – Text : electronic // PLoS Pathog. – 2012. – Vol. 8. – Art. № e1002887. – URL: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002887> (дата обращения: 20.07.2023).

76. Fitzsimmons L., Liu L., Porwollik S. [et al.] Zinc-dependent substrate-level phosphorylation powers *Salmonella* growth under nitrosative stress of the innate host response. – Text : electronic // PLoS Pathog. – 2018. – Vol. 14. – Art. № e1007388. – URL: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007388> (дата обращения: 20.07.2023).

77. Fookes M., Schroeder G. N., Langridge G. C. [et al.] *Salmonella bongori* Provides Insights into the Evolution of the Salmonellae. – Text : electronic // PLoS Pathog. – 2011. – Vol. 7, № 8. – Art. № e1002191. – URL: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002191> (дата обращения: 20.07.2023).

78. Franco Meléndez K., Crenshaw K., Barrila J. [et al.] Role of RpoS in Regulating Stationary Phase *Salmonella* Typhimurium Pathogenesis-Related Stress Responses under Physiological Low Fluid Shear Force Conditions. – Text : electronic // mSphere. – 2022. – Vol. 7, № 4. – Art. № e00210-22. – URL: <https://doi.org/10.1128/msphere.00210-22> (дата обращения: 20.07.2023).

79. Frawley E. R., Crouch M. L. V., Bingham-Ramos L. K. [et al.] Iron and citrate export by a major facilitator superfamily pump regulates metabolism and stress resistance in *Salmonella* Typhimurium. – Text : electronic // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2013. – Vol. 110. – P. 12054–12059. – URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.1218274110> (дата обращения: 20.07.2023).

80. Fritsche T. R., Gautam R. K., Seyedirashti S., Bergeron D. L., Lindquist T. D. Occurrence of bacterial endosymbionts in *Acanthamoeba* spp. isolated from corneal and environmental specimens and contact lenses. – Text : electronic // J. Clin. Microbiol. – 1993. – Vol. 31, № 5. – P. 1122–1126. – URL: <https://doi.org/10.1128/jcm.31.5.1122-1126.1993> (дата обращения: 20.07.2023).

81. Gal-Mor O., Finlay B. B. Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. – Text : electronic // Cell. Microbiol. – 2006. – Vol. 8, № 11. – P. 1707–1719. – URL: <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00794.x> (дата обращения: 20.07.2023).

82. Garmendia J., Beuzón C. R., Ruiz-Albert J., Holden D. W. The roles of SsrA-SsrB and OmpR-EnvZ in the regulation of genes encoding the *Salmonella* typhimurium SPI-2 type III secretion system. – Text : electronic // Microbiology. – 2003. – Vol. 149, Pt 9. – P. 2385–2396. – URL: <https://doi.org/10.1099/mic.0.26397-0> (дата обращения: 20.07.2023).

83. Gaze W. H., Burroughs N., Gallagher M. P., Wellington E. M. H. Interactions between *Salmonella typhimurium* and *Acanthamoeba polyphaga*, and Observation of a New Mode of Intracellular Growth within Contractile Vacuoles. – Text : electronic // Microb. Ecol. – 2003. – Vol. 46. – P. 358–369. – URL: <https://doi.org/10.1007/s00248-003-1001-3> (дата обращения: 20.07.2023).

84. Gill M. A., Rafique M. W., Manan T. [et al.] The cellulose synthase BcsA plays a role in interactions of *Salmonella typhimurium* with *Acanthamoeba castellanii* genotype T4. – Text : electronic // Parasitol. Res. – 2018. – Vol. 117, № 7. – P. 2283–2289. – URL: <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5917-4> (дата обращения: 20.07.2023).

85. Gokulan K., Khare S., Rooney A. W. [et al.] Impact of plasmids, including those encoding VirB4/D4 type IV secretion systems, on *Salmonella enterica* serovar Heidelberg virulence in macrophages and epithelial cells. – Text : electronic // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, № 10. – Art. № e77866. – URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077866> (дата обращения: 20.07.2023).

86. Gourabathini P., Brandi M. T., Redding K. S., Gunderson J. H., Berk S. G. Interactions between food-borne pathogens and protozoa isolated from lettuce and spinach. – Text : electronic // Appl. Environ. Microbiol. – 2008. – Vol. 74, № 8. – P. 2518–2525. – URL: <https://doi.org/10.1128/AEM.02709-07> (дата обращения: 20.07.2023).

87. Greub G., Raoult D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. – Text : electronic // Clin. Microbiol. Rev. – 2004. – Vol. 17, № 2. – P. 413–433. – URL: <https://doi.org/10.1128/CMR.17.2.413-433.2004> (дата обращения: 20.07.2023).

88. Gu M., Imlay J. A. The SoxRS response of *Escherichia coli* is directly activated by redox-cycling drugs rather than by superoxide. – Text : electronic // Mol. Microbiol. – 2011. – Vol. 79, № 5. – P. 1136–1150. – URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07520.x> (дата обращения: 20.07.2023).

89. Guibourdenche M., Roggentin P., Mikoleit M. [et al.] Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. – Text : electronic // Res. Microbiol. – 2010. – Vol. 161, № 1. – P. 26–29. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.10.002> (дата обращения: 20.07.2023).
90. Günzel D., Kucharski L. M., Kehres D. G., Romero M. F., Maguire M. E. The MgtC virulence factor of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium activates Na(+),K(+)-ATPase. – Text : electronic // J. Bacteriol. – 2006. – Vol. 188, № 15. – P. 5586–5594. – URL: <https://doi.org/10.1128/JB.00296-06> (дата обращения: 20.07.2023).
91. Hadaś E., Derda M., Winiecka-Krusnell J., Sulek A. *Acanthamoeba* spp. as vehicles of pathogenic bacteria. – Text : electronic // Acta Parasitol. – 2004. – Vol. 49, № 4. – P. 276–280. – URL: (дата обращения: 20.07.2023).
92. Halici S., Zenk S. F., Jantsch J., Hensel M. Functional analysis of the *Salmonella* pathogenicity Island 2-mediated inhibition of antigen presentation in dendritic cells. – Text : electronic // Infect. Immun. – 2008. – Vol. 76, № 11. – P. 4924–4933. – URL: <https://doi.org/10.1128/IAI.00531-08> (дата обращения: 20.07.2023).
93. Hamed S., Shawky R. M., Emara M., Slauch J. M., Rao C. V. HilE is required for synergistic activation of SPI-1 gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. – Text : electronic // BMC Microbiol. – 2021. – Vol. 21. – Art. № 49. – URL: <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02110-8> (дата обращения: 20.07.2023).
94. Han J., Aljahdali N., Zhao S. [et al.] Infection biology of *Salmonella enterica*. – Text : electronic // EcoSal Plus. – 2024a. – Vol. 12, № 1. – Art. № eesp00012023. – URL: <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0001-2023> (дата обращения: 20.07.2023).
95. Han J., Balasubramanian I., Flores J. A. [et al.] Intestinal lysozyme engagement of *Salmonella* Typhimurium stimulates the release of barrier-impairing

InvE and Lpp1. – Text : electronic // J. Biol. Chem. – 2024b. – Vol. 300. – Art. № 107424. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2024.107424> (дата обращения: 20.07.2023).

96. Haneda T., Ishii Y., Danbara H., Okada N. Genome-wide identification of novel genomic islands that contribute to *Salmonella* virulence in mouse systemic infection. – Text : electronic // FEMS Microbiol. Lett. – 2009. – Vol. 297, № 2. – P. 241–249. – URL: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01686.x> (дата обращения: 20.07.2023).

97. Hao X., Lüthje F. L., Qin Y. [et al.] Survival in amoeba—A major selection pressure on the presence of bacterial copper and zinc resistance determinants? Identification of a «copper pathogenicity island». – Text : electronic // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2015. – Vol. 99. – P. 5817–5824. – URL: <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6729-4> (дата обращения: 20.07.2023).

98. Hautefort I., Thompson A., Eriksson-Ygberg S. [et al.] During infection of epithelial cells *Salmonella enterica* serovar Typhimurium undergoes a time-dependent transcriptional adaptation that results in simultaneous expression of three type 3 secretion systems. – Text : electronic // Cell. Microbiol. – 2008. – Vol. 10, № 4. – P. 958–984. – URL: <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01099.x> (дата обращения: 20.07.2023).

99. Hensel M. Salmonella pathogenicity Island 2. – Text : electronic // Mol. Microbiol. – 2000. – Vol. 36, № 4. – P. 1015–1023. – URL: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01935.x> (дата обращения: 20.07.2023).

100. Horstmann J. A., Zschieschang E., Truschel T. [et al.] Flagellin phase-dependent swimming on epithelial cell surfaces contributes to productive *Salmonella* gut colonisation. – Text : electronic // Cell. Microbiol. – 2017. – Vol. 19, № 8. – e12739. – URL: <https://doi.org/10.1111/cmi.12739> (дата обращения: 20.07.2023).

101. Huerta-Cepas J., Szklarczyk D., Forslund K. [et al.] EGGNOG 4.5: A hierarchical orthology framework with improved functional annotations for eukaryotic, prokaryotic and viral sequences. – Text : electronic // Nucleic Acids Res. – 2016. – Vol. 44. – P. D286–D293. – URL: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1248> (дата обращения: 20.07.2023).
102. Ibarra J. A., Knodler L. A., Sturdevant D. E. [et al.] Induction of *Salmonella* pathogenicity island 1 under different growth conditions can affect *Salmonella*-host cell interactions in vitro. – Text : electronic // Microbiology. – 2010. – Vol. 156, Pt 4. – P. 1120–1133. – URL: <https://doi.org/10.1099/mic.0.032896-0> (дата обращения: 20.07.2023).
103. Iovieno A., Ledee D. R., Miller D., Alfonso E. C. Detection of bacterial endosymbionts in clinical *Acanthamoeba* isolates. – Text : electronic // Ophthalmology. – 2010. – Vol. 117, № 3. – P. 445–452. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.opthta.2009.08.033> (дата обращения: 20.07.2023).
104. Iram S. H., Cronan J. E. The β -Oxidation Systems of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Are Not Functionally Equivalent. – Text : electronic // J. Bacteriol. – 2006. – Vol. 188, № 2. – P. 599–608. – URL: <https://doi.org/10.1128/jb.188.2.599-608.2006> (дата обращения: 20.07.2023).
105. Jennings E., Thurston T. L. M., Holden D. W. Salmonella SPI-2 type III secretion system effectors: molecular mechanisms and physiological consequences. – Text : electronic // Cell Host Microbe. – 2017. – Vol. 22, № 2. – P. 217–231. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.07.009> (дата обращения: 20.07.2023).
106. Johnson R., Byrne A., Berger C. N. [et al.] The Type III Secretion System Effector SptP of *Salmonella enterica* serovar Typhi. – Text : electronic // J. Bacteriol. – 2017. – Vol. 199, № 4. – Art. № e00647-16. – URL: <https://doi.org/10.1128/JB.00647-16> (дата обращения: 20.07.2023).

107. Kapetanovic R., Bokil N. J., Achard M. E. S. [et al.] *Salmonella* employs multiple mechanisms to subvert the TLR-inducible zinc-mediated antimicrobial response of human macrophages. – Text : electronic // FASEB J. – 2016. – Vol. 30, № 5. – P. 1901–1912. – URL: <https://doi.org/10.1096/fj.201500061> (дата обращения: 20.07.2023).

108. Karlinsey J. E., Stepien T. A., Mayho M. [et al.] Genome-wide Analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhi in Humanized Mice Reveals Key Virulence Features. – Text : electronic // Cell Host Microbe. – 2019. – Vol. 26, № 3. – P. 426–434.e6. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.08.001> (дата обращения: 20.07.2023).

109. Khajanchi B. K., Xu J., Grim C. J. [et al.] Global transcriptomic analyses of *Salmonella enterica* in Iron-depleted and iron-rich growth conditions. – Text : electronic // BMC Genomics. – 2019. – Vol. 20. – Art. № 490. – URL: <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5768-0> (дата обращения: 20.07.2023).

110. Khoo C.-H., Sim J.-H., Salleh N. A., Cheah Y.-K. Pathogenicity and phenotypic analysis of sopB, sopD and pipD virulence factors in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Salmonella enterica* serovar Agona. – Text : electronic // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2015. – Vol. 107, № 1. – P. 23–37. – URL: <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0300-7> (дата обращения: 20.07.2023).

111. Kilvington S., Price J. Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. – Text : electronic // J. Appl. Bacteriol. – 1990. – Vol. 68, № 5. – P. 519–525. – URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb02904.x> (дата обращения: 20.07.2023).

112. Kim M., Lim S., Kim D., Choy H. E., Ryu S. A tdcA mutation reduces the invasive ability of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. – Text : electronic // Mol. Cells. – 2009. – Vol. 28, № 5. – P. 389–395. – URL: <https://doi.org/10.1007/s10059-009-0130-z> (дата обращения: 20.07.2023).

113. Kim Y. R., Brinsmade S. R., Yang Z., Escalante-Semerena J., Fierer J. Mutation of phosphotransacetylase but not isocitrate lyase reduces the virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in mice. – Text : electronic // Infect. Immun. – 2006. – Vol. 74, № 4. – P. 2498–2502. – URL: <https://doi.org/10.1128/IAI.74.4.2498-2502.2006> (дата обращения: 20.07.2023).
114. King C. H., Shotts E. B. Jr., Wooley R. E., Porter K. G. Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination. – Text : electronic // Appl. Environ. Microbiol. – 1988. – Vol. 54, № 12. – P. 3023–3033. – URL: <https://doi.org/10.1128/aem.54.12.3023-3033.1988> (дата обращения: 20.07.2023).
115. Kopylova E., Noé L., Touzet H. SortMeRNA: Fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. – Text : electronic // Bioinformatics. – 2012. – Vol. 28, № 24. – P. 3211–3217. – URL: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts611> (дата обращения: 20.07.2023).
116. Korotkevich G., Sukhov V., Budin N., Shpak B., Artyomov M., Sergushichev A. Fast gene set enrichment analysis. – Text : electronic // bioRxiv. – 2016. – URL: <https://doi.org/10.1101/060012> (дата обращения: 20.07.2023).
117. Krell T., Lacal J., Muñoz-Martínez F., Reyes-Darias J. A., Cadirci B. H., García-Fontana C., Ramos J. L. Diversity at its best: bacterial taxis. – Text : electronic // Environ. Microbiol. – 2011. – Vol. 13, № 5. – P. 1115–1124. – URL: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02383.x> (дата обращения: 20.07.2023).
118. Lamichhane B., Mawad A. M. M., Saleh M. [et al.] Salmonellosis: An Overview of Epidemiology, Pathogenesis, and Innovative Approaches to Mitigate the Antimicrobial Resistant Infections. – Text : electronic // Antibiotics. – 2024. – Vol. 13, № 1. – Art. № 76. – URL: <https://doi.org/10.3390/antibiotics13010076> (дата обращения: 20.07.2023).

119. Langmead B., Salzberg S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. – Text : electronic // Nat. Methods. – 2012. – Vol. 9, № 4. – P. 357–359. – URL: <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923> (дата обращения: 20.07.2023).
120. Lee A. K., Detweiler C. S., Falkow S. OmpR regulates the two-component system SsrA-ssrB in *Salmonella* pathogenicity island 2. – Text : electronic // J. Bacteriol. – 2000. – Vol. 182, № 3. – P. 771–781. – URL: <https://doi.org/10.1128/JB.182.3.771-781.2000> (дата обращения: 20.07.2023).
121. Lee Y. H., Kim S., Helmann J. D., Kim B. H., Park Y. K. RaoN, a small RNA encoded within *Salmonella* pathogenicity island-11, confers resistance to macrophage-induced stress. – Text : electronic // Microbiology. – 2013. – Vol. 159, Pt 7. – P. 1366–1378. – URL: <https://doi.org/10.1099/mic.0.068031-0> (дата обращения: 20.07.2023).
122. Li Z., Liu Y., Fu J. [et al.] *Salmonella* Proteomic Profiling during Infection Distinguishes the Intracellular Environment of Host Cells. – Text : electronic // mSystems. – 2019. – Vol. 4, № 1. – Art. № e00314-18. – URL: <https://doi.org/10.1128/msystems.00314-18> (дата обращения: 20.07.2023).
123. Li H., Handsaker B., Wysoker A. [et al.] The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. – Text : electronic // Bioinformatics. – 2009. – Vol. 25, № 16. – P. 2078–2079. – URL: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352> (дата обращения: 20.07.2023).
124. Liao Y., Smyth G. K., Shi W. FeatureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. – Text : electronic // Bioinformatics. – 2014. – Vol. 30, № 7. – P. 923–930. – URL: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656> (дата обращения: 20.07.2023).
125. Lim S., Kim M., Choi J., Ryu S. A mutation in *tdcA* attenuates the virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. – Text : electronic // Mol. Cells. – 2010. – Vol. 29, № 5. – P. 509–517. – URL: <https://doi.org/10.1007/s10059-010-0061-8> (дата обращения: 20.07.2023).

126. Linehan S. A., Rytönen A., Yu X.-J., Liu M., Holden D. W. SlyA regulates function of *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) and expression of SPI-2-associated genes. – Text : electronic // Infect. Immun. – 2005. – Vol. 73, № 7. – P. 4354–4362. – URL: <https://doi.org/10.1128/IAI.73.7.4354-4362.2005> (дата обращения: 20.07.2023).

127. Litwin C. M., Calderwood S. B. Role of iron in regulation of virulence genes. – Text : electronic // Clin. Microbiol. Rev. – 1993. – Vol. 6, № 2. – P. 137–149. – URL: <https://doi.org/10.1128/CMR.6.2.137> (дата обращения: 20.07.2023).

128. Liu H., Whitehouse C. A., Li B. Presence and Persistence of *Salmonella* in Water: The Impact on Microbial Quality of Water and Food Safety. – Text : electronic // Front. Public Health. – 2018. – Vol. 6. – Art. № 159. – URL: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2018.00159> (дата обращения: 20.07.2023).

129. Liu J., Guo J. T., Li Y. G., Johnston R. N., Liu G. R., Liu S. L. The type VI secretion system gene cluster of *Salmonella* Typhimurium: required for full virulence in mice. – Text : electronic // J. Basic Microbiol. – 2013. – Vol. 53, № 7. – P. 600–607. – URL: <https://doi.org/10.1002/jobm.201200047> (дата обращения: 20.07.2023).

130. Löber S., Jäckel D., Kaiser N., Hensel M. Regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 genes by independent environmental signals. – Text : electronic // Int. J. Med. Microbiol. – 2006. – Vol. 296, № 7. – P. 435–447. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.05.001> (дата обращения: 20.07.2023).

131. Lou L., Zhang P., Piao R., Wang Y. *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1) and its complex regulatory network. – Text : electronic // Front. Cell. Infect. Microbiol. – 2019. – Vol. 9. – Art. № 270. – URL: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00270> (дата обращения: 20.07.2023).

132. Love M. I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. – Text : electronic // Genome Biol.

– 2014. – Vol. 15. – Art. № 550. – URL: <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8> (дата обращения: 20.07.2023).

133. Luck A. N., Slatko B. E., Foster J. M. Removing the needle from the haystack: Enrichment of *Wolbachia* endosymbiont transcripts from host nematode RNA by Cappable-seq™. – Text : electronic // PLoS One. – 2017. – Vol. 12, № 3. – Art. № e0173186. – URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173186> (дата обращения: 20.07.2023).

134. Mangan M. W., Lucchini S., Cróinín T. Ó. [et al.] Nucleoid-associated protein HU controls three regulons that coordinate virulence, response to stress and general physiology in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. – Text : electronic // Microbiology. – 2011. – Vol. 157, Pt 4. – P. 1075–1087. – URL: <https://doi.org/10.1099/mic.0.046862-0> (дата обращения: 20.07.2023).

135. Mannan T., Rafique M. W., Bhatti M. H. [et al.] Type 1 Fimbriae and Motility Play a Pivotal Role During Interactions of *Salmonella typhimurium* with *Acanthamoeba castellanii* (T4 Genotype). – Text : electronic // Curr. Microbiol. – 2020. – Vol. 77, № 5. – P. 836–845. – URL: <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01868-5> (дата обращения: 20.07.2023).

136. Mao X., Ma Q., Zhou C. [et al.] DOOR 2.0: Presenting operons and their functions through dynamic and integrated views. – Text : electronic // Nucleic Acids Res. – 2014. – Vol. 42. – P. D654–D659. – URL: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1048> (дата обращения: 20.07.2023).

137. Marlovits T. C., Stebbins C. E. Type III secretion systems shape up as they ship out. – Text : electronic // Curr. Opin. Microbiol. – 2010. – Vol. 13, № 1. – P. 47–52. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.11.001> (дата обращения: 20.07.2023).

138. Martínez J. L. Bacterial pathogens: from natural ecosystems to human hosts. – Text : electronic // Environ. Microbiol. – 2013. – Vol. 15, № 2. – P. 325–

333. – URL: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02837.x> (дата обращения: 20.07.2023).

139. Mastroeni P., Grant A. J. Spread of *Salmonella enterica* in the body during systemic infection: unravelling host and pathogen determinants. – Text : electronic // Expert Rev. Mol. Med. – 2011. – Vol. 13. – Art. № e12. – URL: <https://doi.org/10.1017/S1462399411001840> (дата обращения: 20.07.2023).

140. Matz C., Kjelleberg S. Off the hook--how bacteria survive protozoan grazing. – Text : electronic // Trends Microbiol. – 2005. – Vol. 13, № 7. – P. 302–307. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.05.009> (дата обращения: 20.07.2023).

141. McClelland M., Sanderson K., Spieth J. [et al.] Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. – Text : electronic // Nature. – 2001. – Vol. 413. – P. 852–856. – URL: <https://doi.org/10.1038/35101614> (дата обращения: 20.07.2023).

142. McGhie E. J., Hayward R. D., Koronakis V. Cooperation between actin-binding proteins of invasive *Salmonella*: SipA potentiates SipC nucleation and bundling of actin. – Text : electronic // EMBO J. – 2001. – Vol. 20, № 9. – P. 2131–2139. – URL: <https://doi.org/10.1093/emboj/20.9.2131> (дата обращения: 20.07.2023).

143. McLean S., Bowman L. A. H., Poole R. K. KatG from *Salmonella* Typhimurium is a peroxynitritase. – Text : electronic // FEBS Lett. – 2010. – Vol. 584, № 8. – P. 1628–1632. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.03.015> (дата обращения: 20.07.2023).

144. Mercado-Lubo R., Leatham M. P., Conway T., Cohen P. S. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mutants unable to convert malate to pyruvate and oxaloacetate are avirulent and immunogenic in BALB/c mice. – Text : electronic // Infect. Immun. – 2009. – Vol. 77, № 4. – P. 1397–1405. – URL: <https://doi.org/10.1128/IAI.01335-08> (дата обращения: 20.07.2023).

145. Meresse S., Unsworth K. E., Habermann A. [et al.] Remodelling of the actin cytoskeleton is essential for replication of intravacuolar *Salmonella*. – Text : electronic // Cell. Microbiol. – 2001. – Vol. 3, № 8. – P. 567–577. – URL: <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2001.00141.x> (дата обращения: 20.07.2023).
146. Miold S., Ehrbar K., Weissmüller A. [et al.] *Salmonella* host cell invasion emerged by acquisition of a mosaic of separate genetic elements, including *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1), SPI5, and sopE2. – Text : electronic // J. Bacteriol. – 2001. – Vol. 183, № 7. – P. 2348–2358. – URL: <https://doi.org/10.1128/JB.183.7.2348-2358.2001> (дата обращения: 20.07.2023).
147. Misselwitz B., Barrett N., Kreibich S. [et al.] Near surface swimming of *Salmonella* Typhimurium explains target-site selection and cooperative invasion. – Text : electronic // PLoS Pathog. – 2012. – Vol. 8, № 7. – Art. № e1002810. – URL: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002810> (дата обращения: 20.07.2023).
148. Moliner C., Fournier P.-E., Raoult D. Genome analysis of microorganisms living in amoebae reveals a melting pot of evolution. – Text : electronic // FEMS Microbiol. Rev. – 2010. – Vol. 34, № 3. – P. 281–294. – URL: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00209.x> (дата обращения: 20.07.2023).
149. Molmeret M., Horn M., Wagner M., Santic M., Abu Kwaik Y. Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. – Text : electronic // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – Vol. 71, № 1. – P. 20–28. – URL: <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.20-28.2005> (дата обращения: 20.07.2023).
150. Moreno-Mesonero L., Ferrús M. A., Moreno Y. Determination of the bacterial microbiome of free-living amoebae isolated from wastewater by 16S rRNA amplicon-based sequencing. – Text : electronic // Environ. Res. – 2020. – Vol. 190. – Art. № 109987. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109987> (дата обращения: 20.07.2023).
151. Müller S. I., Valdebenito M., Hantke K. Salmochelin, the long-overlooked catecholate siderophore of *Salmonella*. – Text : electronic // Biometals.

– 2009. – Vol. 22, № 4. – P. 691–695. – URL: <https://doi.org/10.1007/s10534-009-9217-4> (дата обращения: 20.07.2023).

152. Mura M., Bull T. J., Evans H. [et al.] Replication and long-term persistence of bovine and human strains of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* within *Acanthamoeba polyphaga*. – Text : electronic // Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – Vol. 72, № 1. – P. 854–859. – URL: <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.854-859.2006> (дата обращения: 20.07.2023).

153. Murdoch C. C., Skaar E. P. Nutritional immunity: the battle for nutrient metals at the host–pathogen interface. – Text : electronic // Nat. Rev. Microbiol. – 2022. – Vol. 20. – P. 657–670. – URL: <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00745-6> (дата обращения: 20.07.2023).

154. Nairz M., Schroll A., Sonnweber T., Weiss G. The struggle for iron – a metal at the host–pathogen interface. – Text : electronic // Cell. Microbiol. – 2010. – Vol. 12, № 12. – P. 1691–1702. – URL: <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01529.x> (дата обращения: 20.07.2023).

155. Nairz M., Fritsche G., Crouch M. L. [et al.] Slc11a1 limits intracellular growth of *Salmonella enterica* sv. Typhimurium by promoting macrophage immune effector functions and impairing bacterial iron acquisition. – Text : electronic // Cell. Microbiol. – 2009. – Vol. 11, № 9. – P. 1365–1381. – URL: <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01337.x> (дата обращения: 20.07.2023).

156. Nairz M., Ferring-Appel D., Casarrubea D. [et al.] Iron regulatory proteins mediate host resistance to *Salmonella* infection. – Text : electronic // Cell Host Microbe. – 2015. – Vol. 18, № 2. – P. 254–261. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.06.017> (дата обращения: 20.07.2023).

157. Navarre W. W., Halsey T. A., Walthers D. [et al.] Co-regulation of *Salmonella enterica* genes required for virulence and resistance to antimicrobial peptides by SlyA and PhoP/PhoQ. – Text : electronic // Mol. Microbiol. – 2005. –

Vol. 56, № 2. – P. 492–508. – URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04553.x> (дата обращения: 20.07.2023).

158. Negrea A., Bjur E., Puiaș S., Ygberg S. E., Aslund F., Rhen M. Thioredoxin 1 participates in the activity of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenicity island 2 type III secretion system. – Text : electronic // J. Bacteriol. – 2009. – Vol. 191, № 22. – P. 6918–6927. – URL: <https://doi.org/10.1128/JB.00532-09> (дата обращения: 20.07.2023).

159. Núñez-Hernández C., Tierrez A., Ortega A. D. [et al.] Genome expression analysis of nonproliferating intracellular *Salmonella enterica* serovar Typhimurium unravels an acid pH-dependent PhoP-PhoQ response essential for dormancy. – Text : electronic // Infect. Immun. – 2013. – Vol. 81, № 1. – P. 154–165. – URL: <https://doi.org/10.1128/IAI.01080-12> (дата обращения: 20.07.2023).

160. Nygård K., Lassen J., Vold L. [et al.] Outbreak of *Salmonella* Thompson infections linked to imported rucola lettuce. – Text : electronic // Foodborne Pathog. Dis. – 2008. – Vol. 5, № 2. – P. 165–173. – URL: <https://doi.org/10.1089/fpd.2007.0053> (дата обращения: 20.07.2023).

161. Olekhovich I. N., Kadner R. J. DNA-binding activities of the HilC and HilD virulence regulatory proteins of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. – Text : electronic // J. Bacteriol. – 2002. – Vol. 184, № 15. – P. 4148–4160. – URL: <https://doi.org/10.1128/JB.184.15.4148-4160.2002> (дата обращения: 20.07.2023).

162. Outten F. W., Djaman O., Storz G. A suf operon requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli*. – Text : electronic // Mol. Microbiol. – 2004. – Vol. 52, № 3. – P. 861–872. – URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04025.x> (дата обращения: 20.07.2023).

163. Özcan Ş. M., Zeybek Z., Kayabaş Y., Çevikli S., Keskin N. B., Kahraman M. H., Çalış H. Effect of *Acanthamoeba* Spp. Cell-Free Supernatants on Some Bacterial Pathogens. – Text : electronic // J. Basic Microbiol. – 2025. – Vol.

65, № 1. – Art. № e2400537. – URL: <https://doi.org/10.1002/jobm.202400537> (дата обращения: 20.07.2023).

164. Paredes-Amaya C. C., Valdés-García G., Juárez-González V. R., Rudiño-Piñera E., Bustamante V. H. The Hcp-like protein Hile inhibits homodimerization and DNA binding of the virulence-associated transcriptional regulator HilD in *Salmonella*. – Text : electronic // J. Biol. Chem. – 2018. – Vol. 293, № 18. – P. 6578–6592. – URL: <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001421> (дата обращения: 20.07.2023).

165. Parry C. M., Hien T. T., Dougan G., White N. J., Farrar J. J. Typhoid fever. – Text : electronic // N. Engl. J. Med. – 2002. – Vol. 347, № 22. – P. 1770–1782. – URL: <https://doi.org/10.1056/NEJMra020201> (дата обращения: 20.07.2023).

166. Perrett C. A., Zhou D. *Salmonella* type III effector SopB modulates host cell exocytosis. – Text : electronic // Emerg. Microbes Infect. – 2013. – Vol. 2, № 5. – Art. № e32. – URL: <https://doi.org/10.1038/emi.2013.31> (дата обращения: 20.07.2023).

167. Pezoa D., Blondel C. J., Silva C. A. [et al.] Only one of the two type VI secretion systems encoded in the *Salmonella enterica* serotype Dublin genome is involved in colonization of the avian and murine hosts. – Text : electronic // Vet. Res. – 2014. – Vol. 45, № 1. – Art. № 2. – URL: <https://doi.org/10.1186/1297-9716-45-2> (дата обращения: 20.07.2023).

168. Pizarro-Cerdá J., Tedin K. The bacterial signal molecule, ppGpp, regulates *Salmonella* virulence gene expression. – Text : electronic // Mol. Microbiol. – 2004. – Vol. 52, № 6. – P. 1827–1844. – URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04122.x> (дата обращения: 20.07.2023).

169. Popp J., Noster J., Busch K. [et al.] Role of Host Cell-Derived Amino Acids in Nutrition of Intracellular *Salmonella enterica*. – Text : electronic // Infect.

Immun. – 2015. – Vol. 83, № 12. – P. 4476–4485. – URL: <https://doi.org/10.1128/IAI.00624-15> (дата обращения: 20.07.2023).

170. Powers T. R., Haeberle A. L., Predeus A. V. [et al.] Intracellular niche-specific profiling reveals transcriptional adaptations required for the cytosolic lifestyle of *Salmonella enterica*. – Text : electronic // PLoS Pathog. – 2021. – Vol. 17, № 4. – Art. № e1009280. – URL: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009280> (дата обращения: 20.07.2023).

171. Radlinski L. C., Rogers A. W. L., Bechtold L. [et al.] *Salmonella* virulence factors induce amino acid malabsorption in the ileum to promote ecosystem invasion of the large intestine. – Text : electronic // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2024. – Vol. 121, № 47. – Art. № e2417232121. – URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.2417232121> (дата обращения: 20.07.2023).

172. Rahman M., Abd H., Romling U., Sandstrom G., Möllby R. *Aeromonas-Acanthamoeba* interaction and early shift to a viable but nonculturable state of *Aeromonas* by *Acanthamoeba*. – Text : electronic // J. Appl. Microbiol. – 2008. – Vol. 104, № 5. – P. 1449–1457. – URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03688.x> (дата обращения: 20.07.2023).

173. Ray K., Marteyn B., Sansonetti P. [et al.] Life on the inside: the intracellular lifestyle of cytosolic bacteria. – Text : electronic // Nat. Rev. Microbiol. – 2009. – Vol. 7. – P. 333–340. – URL: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2112> (дата обращения: 20.07.2023).

174. Ray P. D., Huang B. W., Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. – Text : electronic // Cell. Signal. – 2012. – Vol. 24, № 5. – P. 981–990. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008> (дата обращения: 20.07.2023).

175. Rayamajhee B., Sharma S., Willcox M. [et al.] Assessment of genotypes, endosymbionts and clinical characteristics of *Acanthamoeba* recovered from ocular infection. – Text : electronic // BMC Infect. Dis. – 2022. – Vol. 22. –

Art. № 757. – URL: <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07741-4> (дата обращения: 20.07.2023).

176. Rayamajhee B., Willcox M. D. P., Henriquez F. L., Petsoglou C., Subedi D., Carnt N. Acanthamoeba, an environmental phagocyte enhancing survival and transmission of human pathogens. – Text : electronic // Trends Parasitol. – 2022. – Vol. 38, № 11. – P. 975–990. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2022.08.007> (дата обращения: 20.07.2023).

177. Rayamajhee B., Willcox M., Sharma S. [et al.] Zooming in on the intracellular microbiome composition of bacterivorous Acanthamoeba isolates. – Text : electronic // ISME Commun. – 2024. – Vol. 4. – Art. № ycae016. – URL: <https://doi.org/10.1093/ismeco/ycae016> (дата обращения: 20.07.2023).

178. Raymond K.N., Dertz E.A., Kim S.S. Enterobactin: an archetype for microbial iron transport // Proc Natl Acad Sci. 2003. – Vol. 100. – P. 3584–8.

179. Reens A. L., Nagy T. A., Detweiler C. S. *Salmonella enterica* Requires Lipid Metabolism Genes To Replicate in Proinflammatory Macrophages and Mice. – Text : electronic // Infect. Immun. – 2019. – Vol. 88, № 1. – Art. № e00776-19. – URL: <https://doi.org/10.1128/IAI.00776-19> (дата обращения: 20.07.2023).

180. Rehfuss M. Y. M., Parker C. T., Brandl M. T. *Salmonella* transcriptional signature in *Tetrahymena* phagosomes and role of acid tolerance in passage through the protist. – Text : electronic // ISME J. – 2011. – Vol. 5, № 2. – P. 262–273. – URL: <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.128> (дата обращения: 20.07.2023).

181. Rhen M. Salmonella and Reactive Oxygen Species: A Love-Hate Relationship. – Text : electronic // J. Innate Immun. – 2019. – Vol. 11, № 3. – P. 216–226. – URL: <https://doi.org/10.1159/000496370> (дата обращения: 20.07.2023).

182. Riquelme S., Varas M., Valenzuela C. [et al.] Relevant Genes Linked to Virulence Are Required for *Salmonella* Typhimurium to Survive Intracellularly in the Social Amoeba *Dictyostelium discoideum*. – Text : electronic // Front. Microbiol. – 2016. – Vol. 7. – Art. № 1305. – URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01305> (дата обращения: 20.07.2023).

183. Röder J., Felgner P., Hensel M. Comprehensive Single Cell Analyses of the Nutritional Environment of Intracellular *Salmonella enterica*. – Text : electronic // Front. Cell. Infect. Microbiol. – 2021. – Vol. 11. – Art. № 624650. – URL: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.624650> (дата обращения: 20.07.2023).

184. Rome K., Borde C., Taher R. [et al.] The Two-Component System ZraPSR Is a Novel ESR that Contributes to Intrinsic Antibiotic Tolerance in *Escherichia coli*. – Text : electronic // J. Mol. Biol. – 2018. – Vol. 430, № 24. – P. 4971–4985. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.10.008> (дата обращения: 20.07.2023).

185. Rosenkrantz J. T., Aarts H., Abee T. [et al.] Non-essential genes form the hubs of genome scale protein function and environmental gene expression networks in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. – Text : electronic // BMC Microbiol. – 2013. – Vol. 13. – Art. № 294. – URL: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-294> (дата обращения: 20.07.2023).

186. Ruby T., McLaughlin L., Gopinath S., Monack D. Salmonella's long-term relationship with its host. – Text : electronic // FEMS Microbiol. Rev. – 2012. – Vol. 36, № 3. – P. 600–615. – URL: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00332.x> (дата обращения: 20.07.2023).

187. Schaible U. E., Kaufmann S. H. E. Iron and microbial infection. – Text : electronic // Nat. Rev. Microbiol. – 2004. – Vol. 2, № 12. – P. 946–953. – URL: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1046> (дата обращения: 20.07.2023).

188. Schechter L. M., Lee C. A. AraC/XylS family members, HilC and HilD, directly bind and derepress the *Salmonella typhimurium* hilA promoter. – Text

: electronic // Mol. Microbiol. – 2001. – Vol. 40, № 6. – P. 1289–1299. – URL: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02462.x> (дата обращения: 20.07.2023).

189. Sevost'ianova E. V., Pushkareva V. I., Goriainov V. B., Gerasimov A. I., Riapis L. A. Dinamika populatsii *Salmonella typhi* i *Tetrahymena pyriformis* pri sovmestnom kultivirovanii [The population dynamics of *Salmonella typhi* and *Tetrahymena pyriformis* during joint cultivation]. – Текст : электронный // Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. – 1998. – № 4. – С. 3–6. – URL: (дата обращения: 20.07.2023).

190. Sharma C., Hoffmann S., Darfeuille F. [et al.] The primary transcriptome of the major human pathogen *Helicobacter pylori*. – Text : electronic // Nature. – 2010. – Vol. 464. – P. 250–255. – URL: <https://doi.org/10.1038/nature08756> (дата обращения: 20.07.2023).

191. Shi L., Adkins J. N., Coleman J. R. [et al.] Proteomic analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from RAW 264.7 macrophages: identification of a novel protein that contributes to the replication of serovar Typhimurium inside macrophages. – Text : electronic // J. Biol. Chem. – 2006. – Vol. 281, № 39. – P. 29131–29140. – URL: <https://doi.org/10.1074/jbc.M604640200> (дата обращения: 20.07.2023).

192. Sittka A., Pfeiffer V., Tedin K., Vogel J. The RNA chaperone Hfq is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. – Text : electronic // Mol. Microbiol. – 2007. – Vol. 63, № 1. – P. 193–217. – URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05489.x> (дата обращения: 20.07.2023).

193. Slonczewski J. Stress Responses: pH. – Текст : электронный // Encyclopedia of Microbiology / Ed. A. Konopka. – 3rd ed. – Cambridge, MA: Academic Press, 2009. – Vol. 3. – P. 477–484. – URL: (дата обращения: 20.07.2023).

194. Smith H. Host factors that influence the behaviour of bacterial pathogens in vivo. – Text : electronic // Int. J. Med. Microbiol. – 2000. – Vol. 290,

№ 3. – P. 207–213. – URL: [https://doi.org/10.1016/S1438-4221\(00\)80117-4](https://doi.org/10.1016/S1438-4221(00)80117-4) (дата обращения: 20.07.2023).

195. Snelling W. J., McKenna J. P., Lecky D. M., Dooley J. S. G. Survival of *Campylobacter jejuni* in waterborne protozoa. – Text : electronic // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – Vol. 71, № 9. – P. 5560–5571. – URL: <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5560-5571.2005> (дата обращения: 20.07.2023).

196. Sousa Gerós A., Simmons A., Drakesmith H., Aulicino A., Frost J. N. The battle for iron in enteric infections. – Text : electronic // Immunology. – 2020. – Vol. 161, № 3. – P. 186–199. – URL: <https://doi.org/10.1111/imm.13236> (дата обращения: 20.07.2023).

197. Spector M. P., DiRusso C. C., Pallen M. J., Del Portillo F. G., Dougan G., Finlay B. B. The medium-/long-chain fatty acyl-CoA dehydrogenase (fadF) gene of *Salmonella typhimurium* is a phase 1 starvation-stress response (SSR) locus. – Text : electronic // Microbiology. – 1999. – Vol. 145, Pt 1. – P. 15–31. – URL: <https://doi.org/10.1099/13500872-145-1-15> (дата обращения: 20.07.2023).

198. Spector M. P., Kenyon W. J. Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. – Text : electronic // Food Res. Int. – 2012. – Vol. 45, № 2. – P. 455–481. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.056> (дата обращения: 20.07.2023).

199. Srikumar S., Kröger C., Hébrard M. [et al.] RNA-seq Brings New Insights to the Intra-Macrophage Transcriptome of *Salmonella Typhimurium*. – Text : electronic // PLoS Pathog. – 2015. – Vol. 11, № 11. – Art. № e1005262. – URL: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005262> (дата обращения: 20.07.2023).

200. Steeb B., Claudi B., Burton N. A. [et al.] Parallel Exploitation of Diverse Host Nutrients Enhances *Salmonella* Virulence. – Text : electronic // PLoS Pathog. – 2013. – Vol. 9, № 4. – Art. № e1003301. – URL: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003301> (дата обращения: 20.07.2023).

201. Steenbergen J. N., Shuman H. A., Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. – Text : electronic // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2001. – Vol. 98, № 26. – P. 15245–15250. – URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.261418798> (дата обращения: 20.07.2023).

202. Steinert M., Birkness K., White E., Fields B., Quinn F. *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls. – Text : electronic // Appl. Environ. Microbiol. – 1998. – Vol. 64, № 6. – P. 2256–2261. – URL: <https://doi.org/10.1128/AEM.64.6.2256-2261.1998> (дата обращения: 20.07.2023).

203. Storz G., Zheng M. Oxidative stress. – Текст : электронный // Bacterial Stress Responses / Eds. G. Storz, R. Hengge-Aronis. – Washington, D.C.: ASM Press, 2000. – P. 47–59. – URL: (дата обращения: 20.07.2023).

204. Tacconelli E., Carrara E., Savoldi A. [et al.] Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. – Text : electronic // Lancet Infect. Dis. – 2018. – Vol. 18, № 3. – P. 318–327. – URL: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3) (дата обращения: 20.07.2023).

205. Tan Z., Lu P., Adewole D., Diarra M. S., Gong J., Yang C. Iron requirement in the infection of *Salmonella* and its relevance to poultry health. – Text : electronic // J. Appl. Poult. Res. – 2021. – Vol. 30. – Art. № 100101. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.japr.2020.09.016> (дата обращения: 20.07.2023).

206. Taylor C. M., Osman D., Cavet J. S. Differential expression from two iron-responsive promoters in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals the presence of iron in macrophage-phagosomes. – Text : electronic // Microb. Pathog. – 2009. – Vol. 46, № 2. – P. 114–118. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2008.11.001> (дата обращения: 20.07.2023).

207. Tezcan-Merdol D., Ljungström M., Winiecka-Krusnell J., Linder E., Engstrand L., Rhen M. Uptake and replication of *Salmonella enterica* in *Acanthamoeba rhysodes*. – Text : electronic // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – Vol. 70, № 6. – P. 3706–3714. – URL: <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3706-3714.2004> (дата обращения: 20.07.2023).
208. Tchawa Yimga M. et al. Role of gluconeogenesis and the tricarboxylic acid cycle in the virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in BALB/c mice // Infection and immunity. – 2006. – T. 74. – №. 2. – C. 1130-1140.
209. Thijs I. M. V., De Keersmaecker S. C. J., Fadda A. [et al.] Delineation of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium HilA regulon through genome-wide location and transcript analysis. – Text : electronic // J. Bacteriol. – 2007. – Vol. 189, № 12. – P. 4587–4596. – URL: <https://doi.org/10.1128/JB.00178-07> (дата обращения: 20.07.2023).
210. Thomas V., McDonnell G., Denyer S. P., Maillard J.-Y. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. – Text : electronic // FEMS Microbiol. Rev. – 2010. – Vol. 34, № 3. – P. 231–259. – URL: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00190.x> (дата обращения: 20.07.2023).
211. Turnbull A. L., Surette M. G. Cysteine biosynthesis, oxidative stress and antibiotic resistance in *Salmonella typhimurium*. – Text : electronic // Res. Microbiol. – 2010. – Vol. 161, № 8. – P. 643–650. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.06.004> (дата обращения: 20.07.2023).
212. Uzzau S., Brown D. J., Wallis T. [et al.] Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. – Text : electronic // Epidemiol. Infect. – 2000. – Vol. 125, № 2. – P. 229–255. – URL: <https://doi.org/10.1017/s0950268899004379> (дата обращения: 20.07.2023).
213. Vaerewijck M. J. M., Baré J., Lambrecht E., Sabbe K., Houf K. Interactions of Foodborne Pathogens with Free-living Protozoa: Potential

Consequences for Food Safety. – Text : electronic // Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. – 2014. – Vol. 13, № 5. – P. 924–944. – URL: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12100> (дата обращения: 20.07.2023).

214. VanCleave T. T., Pulsifer A. R., Connor M. G., Warawa J. M., Lawrenz M. B. Impact of Gentamicin Concentration and Exposure Time on Intracellular *Yersinia pestis*. – Text : electronic // Front. Cell. Infect. Microbiol. – 2017. – Vol. 7. – Art. № 505. – URL: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00505> (дата обращения: 20.07.2023).

215. Velayudhan J., Karlinsey J. E., Frawley E. R. [et al.] Distinct roles of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium CyaY and YggX proteins in the biosynthesis and repair of iron-sulfur clusters. – Text : electronic // Infect. Immun. – 2014. – Vol. 82, № 4. – P. 1390–1401. – URL: <https://doi.org/10.1128/IAI.01246-13> (дата обращения: 20.07.2023).

216. Vingataramin Y., Delumeau A., Quétel I. [et al.] Characterization of the natural bacterial microbiota of pathogenic free-living amoebae (*Acanthamoeba* spp. and *Naegleria fowleri*) isolated from rivers and tap water in Guadeloupe. – Text : electronic // Sci. Total Environ. – 2025. – Vol. 975. – Art. № 179204. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2025.179204> (дата обращения: 20.07.2023).

217. Walochnik J., Picher O., Aspöck C., Ullmann M., Sommer R., Aspöck H. Interactions of «limax amoebae» and gram-negative bacteria: experimental studies and review of current problems. – Text : electronic // Tokai J. Exp. Clin. Med. – 1999. – Vol. 24, № 3. – P. 273–278. – URL: (дата обращения: 20.07.2023).

218. Wang M., Luo Z., Du H. [et al.] Molecular characterization of a functional type VI secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhi. – Text : electronic // Curr. Microbiol. – 2011. – Vol. 63, № 1. – P. 22–31. – URL: <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9935-z> (дата обращения: 20.07.2023).

219. Wang Y., Yi L., Zhang J. [et al.] Functional analysis of superoxide dismutase of *Salmonella typhimurium* in serum resistance and biofilm formation. –

Text : electronic // J. Appl. Microbiol. – 2018. – Vol. 125, № 5. – P. 1526–1533. – URL: <https://doi.org/10.1111/jam.14059> (дата обращения: 20.07.2023).

220. Waterman S. R., Holden D. W. Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. – Text : electronic // Cell. Microbiol. – 2003. – Vol. 5, № 8. – P. 501–511. – URL: <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00294.x> (дата обращения: 20.07.2023).

221. Westermann A. J., Gorski S. A., Vogel J. Dual RNA-seq of pathogen and host. – Text : electronic // Nat. Rev. Microbiol. – 2012. – Vol. 10, № 9. – P. 618–630. – URL: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2852> (дата обращения: 20.07.2023).

222. Westermann A., Förstner K., Amman F. [et al.] Dual RNA-seq unveils noncoding RNA functions in host–pathogen interactions. – Text : electronic // Nature. – 2016. – Vol. 529. – P. 496–501. – URL: <https://doi.org/10.1038/nature16547> (дата обращения: 20.07.2023).

223. White A. E., Tillman A. R., Hedberg C. [et al.] Foodborne Illness Outbreaks Reported to National Surveillance, United States, 2009-2018. – Text : electronic // Emerg. Infect. Dis. – 2022. – Vol. 28, № 6. – P. 1117–1127. – URL: <https://doi.org/10.3201/eid2806.211555> (дата обращения: 20.07.2023).

224. Wiedemann A., Virlogeux-Payant I., Chaussé A. M., Schikora A., Velge P. Interactions of *Salmonella* with animals and plants. – Text : electronic // Front. Microbiol. – 2015. – Vol. 5. – Art. № 791. – URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00791> (дата обращения: 20.07.2023).

225. Xu J., Preciado-Llanes L., Aulicino A. [et al.] Single-Cell and Time-Resolved Profiling of Intracellular *Salmonella* Metabolism in Primary Human Cells. – Text : electronic // Anal. Chem. – 2019. – Vol. 91, № 12. – P. 7729–7737. – URL: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b01010> (дата обращения: 20.07.2023).

226. Yang X., Huang J., Zhang Y. [et al.] Prevalence, abundance, serovars and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from retail raw poultry meat in China. – Text : electronic // Sci. Total Environ. – 2020. – Vol. 713. – Art. № 136385. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136385> (дата обращения: 20.07.2023).
227. Zhang J., Ormälä-Odegrip A. M., Mappes J., Laakso J. Top-down effects of a lytic bacteriophage and protozoa on bacteria in aqueous and biofilm phases. – Text : electronic // Ecol. Evol. – 2014. – Vol. 4, № 23. – P. 4444–4453. – URL: <https://doi.org/10.1002/ece3.1302> (дата обращения: 20.07.2023).
228. Zhang Y. M., Rock C. O. Transcriptional regulation in bacterial membrane lipid synthesis. – Text : electronic // J. Lipid Res. – 2009. – Vol. 50, Suppl. – P. S115–S119. – URL: <https://doi.org/10.1194/jlr.R800046-JLR200> (дата обращения: 20.07.2023).
229. Zhao S., Li C., Hsu C.-H. [et al.] Comparative genomic analysis of 450 strains of *Salmonella enterica* isolated from diseased animals. – Text : electronic // Genes. – 2020. – Vol. 11, № 9. – Art. № 1025. – URL: <https://doi.org/10.3390/genes11091025> (дата обращения: 20.07.2023).
230. Zheng J., Cui S., Meng J. Effect of transcriptional activators RamA and SoxS on expression of multidrug efflux pumps AcrAB and AcrEF in fluoroquinolone-resistant *Salmonella* Typhimurium. – Text : electronic // J. Antimicrob. Chemother. – 2009. – Vol. 63, № 1. – P. 95–102. – URL: <https://doi.org/10.1093/jac/dkn448> (дата обращения: 20.07.2023).

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 (русскоязычная 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: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки 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
русской науки и высшей школы" : Сборник тезисов, Саратов, 14–19 июня
2024. // Санкт-Петербург: ООО Издательский дом "Петрополис", 2024. – С. 68.
[РИНЦ]