

## ВЕТЕРИНАРНА МЕДИЦИНА

### Епізоотологія та інфекційні хвороби

УДК 636.09:577.21/.25:579.842.1/2

РУБЛЕНКО Н.М.

rublenko@biocontrol.com.ua

Державний науково-контрольний інститут  
біотехнології і штамів мікроорганізмів

#### МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ ВИЖИВАННЯ І РЕЗИСТЕНТНОСТІ САЛЬМОНЕЛ

У статті наведено дані наукової літератури, що описують молекулярно-генетичні механізми захисту від несприятливих умов у бактерій роду *Salmonella*. Основними бар'єрами на початкових етапах інфекційного процесу є висока осмолярність та низькі значення рН. Захисні механізми сальмонели спрямовані на уникнення дії цих факторів з метою подальшої проліферації в інфікованому організмі.

Відповідь на несприятливі умови реалізується за допомогою двокомпонентних систем сигнальної трансдукції. В основі яких лежить принцип взаємодії сенсора та регулятора. Сенсор, представлений гістидин-кіназою здійснює фосфорилування регулятора, який у свою чергу прямо чи опосередковано ініціює транскрипцію генів патогенності. На сьогодні в науковій літературі описано функціонування системи EnvZ/OmpR, що активується за умов високої осмолярності та регулює утворення капсулярного Vi-антигену у тифоїдного серовара *S. Typhi*. Система PhoP/PhoQ здійснює відповідь на кисле середовище та функціонує за тим самим принципом: фосфорилування регуляторного білка сенсором. Також охарактеризовано залежність системи PhoP/PhoQ від сигма-фактора RpoS (субодиниця бактеріальної РНК-полімерази). Сигналом для накопичення RpoS є низька концентрація катіонів Магнію.

З'ясовано, що дані системи сигнальної трансдукції регулюють транскрипцію оперонів, які кодують гени систем секреції білків 3 типу. До складу останніх входять ефекторні білки, здатні до перебудови цитоскелету епітеліоцитів тонкого кишечника, що дозволяє сальмонелі проникати в них у вигляді специфічних фагосом.

Таким чином, двокомпонентні системи сигнальної трансдукції у сальмонели не лише є механізмами, що забезпечують виживання та проліферацію в несприятливих умовах, але також здійснюють регуляцію генетичних детермінант, що кодують гени патогенності.

**Ключові слова:** сальмонела, рН, осмолярність, гени патогенності, оперон, сигнальна трансдукція.

**doi:** 10.33245/2310-4902-2018-144-2-6-12

**Постановка проблеми.** Сальмонела – грамнегативна бактерія, яка є збудником харчових токсикоінфекцій. Вона належить до родини *Enterobacteriaceae* і включає 2 види, які поділяються на 6 підвидів, в межах яких виділяють 2700 сероварів [1]. Із них 3 – *S. Typhi*, *Paratyphi A*, *B*, *C* – є збудниками черевного тифу та виключно специфічні для людини [2; 3; 4]. Решта серотипів – нетифоїдні – збудники сальмонельозу як у людини, так і тварин.

Сальмонела потрапляє до організму ссавців аліментарним шляхом, внаслідок споживання контамінованих харчових продуктів. Вхідними воротами інфекції за сальмонельозу є слизова оболонка тонкого кишечника. За допомогою фімбрій та пілей сальмонела прикріплюється до стінок тонкого кишечника для подальшого проникнення в клітину. В цьому процесі задіяні дві системи секреції білків: T3SS1 (type 3 secretion system – система секреції білків 3 типу), до складу якої входять ефекторні білки, здатні до перебудови цитоскелету клітини, та T3SS2, що включає в себе ряд білків, необхідних для виживання збудника всередині клітини еукаріота [5; 6]. Однак експресія генів ефекторних білків відбувається лише у відповідь на дію системи сигнальної трансдукції. У випадку початкових етапів інфекційного процесу йдеться про гени ефекторних білків, що локалізуються на острівцях патогенності SPI-1 та SPI-2 (*Salmonella* pathogenicity island) [7].

**Аналіз останніх досліджень і публікацій.** У сальмонели є кілька систем, які активуються у відповідь на несприятливі умови, а саме висока осмолярність, кислотний або тепловий шок та дефіцит поживних речовин. В основі них лежить принцип двокомпонентної системи, в якій є

сенсор, що сприймає цитоплазматичні сигнали, та регулятор. В якості останнього виступає ДНК-зв'язувальний білок, який активує транскрипцію генів патогенності [8]. Сенсор – гістидин-кіназа, яка фосфорилує регуляторний білок, таким чином активуючи його. Бактерії з мутаціями в генах сенсорних кіназ не мають механізму фосфорилування і регуляторний білок в системі толерантності є неактивним. Такі штами чутливі до високих значень рН та швидко гинуть [20].

Ще одним фактором, який здатний запобігати проліферації збудника в організмі людини або тварини є дія неспецифічного імунітету. Клітини, здатні до фагоцитозу – нейтрофіли, макрофаги та епітеліоцити слизової оболонки – здійснюють механічне захоплення клітин бактерії у фагосоми, де створюють кисле середовище з метою нейтралізації або ліквідації збудника [8, 9]. Хоча кисле середовище не є токсичним, але створює оптимальні умови для активності гідролітичних ферментів та утворення пероксиду [10, 11, 12, 13]. Наявність у сальмонели системи сигнальної трансдукції EnvZ/OmpR, яка призводить до відповідного закислення її власної цитоплазми, дозволяє уникнути фагоцитозу.

Інфікування організму ссавців сальмонелами супроводжується утворенням специфічних вакуоль SCV (*Salmonella-containing vacuole* – вакуолі, що містять сальмонелу) в цитоплазмі еукаріотичної клітини [14]. SCV – це модифікована фагосома, яка утворюється в результаті перебування цитоскелету клітини. При цьому, зазвичай, мішенню є клітини, здатні до фагоцитозу: нейтрофіли, макрофаги та епітеліоцити слизової оболонки тонкого кишечника – М-клітини [15].

З огляду на специфічний механізм інфікування, сальмонелу вважають факультативним внутрішньоклітинним патогеном. Перебудовуючи цитоскелет еукаріотичної клітини за допомогою ряду ефекторних білків, вона проникає в клітину у вигляді вакуолі SCV, де продовжує свою персистенцію.

**Метою роботи** було проаналізувати публікації, що описують молекулярно-генетичні механізми функціонування двокомпонентних систем сигнальної трансдукції у сальмонел, які забезпечують виживання сальмонели в умовах високої кислотності та осмолярності.

**Матеріал і методи дослідження.** Використано матеріали експериментальних та оглядових статей, опублікованих в електронних та друкованих наукових журналах протягом 2002–2019 років. Також використано дані статей попередніх років та наукових посібників.

**Основні результати дослідження.** Останнім часом дослідженням молекулярних механізмів патогенності сальмонели приділяється багато уваги, особливо механізмам толерантності до несприятливих умов.

На сьогодні відомо, що толерантність до високого осмотичного тиску досягається завдяки функціонуванню системи EnvZ/OmpR, яка також регулює експресію оперона *ssrAB*, що локалізується на острівці патогенності SPI-2 (*Salmonella pathogeni city island*) та запускає експресію ефекторних білків, які виступають факторами патогенності. Оперон *ssrAB* також регулюється двокомпонентною системою протидії кислотному шоку PhoP/PhoQ [16]. Функціонування системи PhoP/PhoQ безпосередньо залежить від сигма-фактора RpoS, накопичення якого відбувається за умов низьких концентрацій катіонів магнію [17].

Система стійкості до осмотичного тиску EnvZ/OmpR побудована за принципом взаємодії сенсора та регулятора. Білок EnvZ є сенсорною кіназою, яка активується у відповідь на підвищення осмотичного тиску у внутрішньоклітинному просторі та здійснює фосфорилування ДНК-зв'язуючого білка OmpR. Останній регулює експресію ряду генів, що кодують АТФ-синтазу у сальмонели. Ці гени локалізуються на острівці патогенності SPI-2 (*Salmonella pathogeni city island 2*). Внаслідок цього утворюється протонний градієнт, який дозволяє окислювати цитоплазму бактерії, а потім і вакуолі SCV. Це є важливим захисним механізмом, що попереджає знищення бактерії макрофагами. Оскільки після ізолювання бактерії, макрофаги створюють кисле середовище всередині внутрішньоклітинних компартментів [8, 9].

Також є дані про те, що система EnvZ/OmpR регулює утворення капсулярного Vi-антигену у тифоїдного серовара *S. Typhi*. Регулятор OmpR разом із РНК-зв'язувальним фактором Hfq координує процес транскрипції генів Vi-антигену [18]. Цей процес відбувається шляхом взаємодії OmpR із промотором гена *tvIA* (активатор Vi-антигену на локусі *viaB* у серовара *S. Typhi*), що призводить до активації транскрипції останнього і таким чином активує капсулярний антиген. За результатами досліджень [18], в яких штам *S. Typhi* культивували в умовах високої та низь-

кої осмолярності, у клітинах, які піддавалися осмотичному стресу, спостерігали високий рівень мРНК OmpR.

Результати досліджень нетифоїдних сероварів – *S. Typhimurium* – показали, що OmpR є білком кислотного шоку та регулюється на рівні транскрипції [19, 20]. Важливим фактом також є те, що за відсутності етапу фосфорилування сенсорною кіназою EnvZ, OmpR не може впливати на експресію генів, що кодують пурини зовнішньої мембрани OmpC та OmpF.

В ході дослідження трансдукції між компонентами EnvZ/OmpR стало зрозумілим, що сальмонела отримує сигнали із цитоплазматичного простору, а сенсорні молекули знаходяться на внутрішній мембрані [7, 21].

Здатність виживати в умовах кислотного шоку забезпечується системою PhoP/PhoQ, яка також функціонує за принципом сигнальної трансдукції. PhoQ є сигнальним сенсором гістидинкінази. Сигналами, зазвичай, є кисле рН, двовалентні катіони та позитивно заряджені антимікробні пептиди [17]. Відбувається фосфорилування залишку гістидину і перенесення фосфатної групи до регулятора PhoP. Сенсорні домени білка PhoQ розташовані у периплазмі, тоді як сам білок знаходиться на внутрішній мембрані. За підвищення рН задіюється також і цитоплазматичний домен [21].

Також в активації PhoQ задіяні додаткові білки, які відрізняються у різних видів в межах родини *Enterobacteriaceae*. Так, у сальмонел є мембранний білок UgtL, експресію якого забезпечує система PhoP/PhoQ [22, 23]. Подібний до білка SafA, який наявний у *E. Colima Shigella*, на пряму взаємодіє з периплазматичною ділянкою PhoQ та активується за умов кислого рН.

Важливою функцією двокомпонентної системи PhoP/PhoQ є контроль експресії генів *spi/ssa* в середовищі макрофагів [24]. Останні є основною складовою частиною системи секреції білків 3 типу T3SS (type III secretion systems) та синтезуються лише за умов перебування сальмонели всередині еукаріотичної клітини [24]. Також варто сказати, що їхня експресія залежить від SsrB/SpiR і обидві ці системи локалізуються на острівці патогенності SPI-2. Таким чином, PhoP/PhoQ контролює експресію *spi/ssa* у макрофагах через регуляцію SsrB/SpiR [25, 26].

Основним регулятором систем сигнальної трансдукції PhoP/PhoQ та EnvZ/OmpR є альтернативний сигма-фактор, субодиниця бактеріальної РНК-полімерази – RpoS, який функціонує під час стаціонарної фази та, зокрема, в умовах зниженої кислотності, високого осмотичного тиску, теплового шоку та за дефіциту поживних речовин [17, 27]. В РНК полімерази ентеробактерій виділяють основний білок E та сім асоційованих із ним субодиниць, з якими він формує голоензим. Одна із цих субодиниць ( $\sigma$  або RpoS – кодується однойменним геном RpoS) здійснює регуляцію транскрипції генів за експоненціальної фази. Однак за стаціонарної фази відбувається накопичення білка RpoS в клітині за несприятливих умов (дефіцит  $Mg^{2+}$ , низькі значення рН, високий осмотичний тиск) [28].

Необхідність катіонів магнію зумовлена їхньою здатністю виступати кофакторами у більшості ферментних перетворень. Накопичення магнію відбувається здебільшого під час експоненціальної, або логарифмічної, фази розмноження збудника в організмі хазяїна. Під час цієї фази відбувається активний поділ клітин.

Регуляцію транспорту  $Mg^{2+}$  також здійснюють фактори MgtA та MgtB [29, 30]. Ще один фактор, який виконує функцію перенесення магнію – *CogA* – двовалентний катіонний канал, однак його транскрипція не залежить від концентрації в клітині [31, 32, 33, 34].

У випадку дефіциту Магнію у стаціонарній фазі росту, відбувається накопичення сигма-фактора, який запускає реплікацію системи PhoP/PhoQ, яка також є захисним механізмом в умовах низьких значень рН, високого осмотичного тиску, дефіциту поживних речовин.

PhoP/PhoQ знаходяться під регуляцією RpoS забезпечує стійкість до неорганічних кислот [35]. Окрім цього, система PhoP/PhoQ керує адаптацією до дефіциту катіонів магнію  $Mg^{2+}$  та дії макрофагів. Вивчення генів, що кодують систему, та виявлення в них мутацій дозволило зробити висновки про те, що за їх наявності, або інактивації одного з факторів, бактерії володіють значно зниженою вірулентністю та чутливістю до кислого середовища [36].

За умов стресу відбувається швидке накопичення RpoS, що є каталізатором експресії ряду RpoS-залежних білків, які виконують захисну функцію в умовах кислотного стресу. Стабільність сигма-фактора знаходиться у прямій залежності від протеази ClpXP, а деградація – від білка RssB. У сальмонел цей білок кодується геном MviA [37, 38, 39].

Очевидно, що RssB має тенденцію до зв'язування з RpoS. Однак збільшення рівня останнього відбувається шляхом зв'язування іraP з RssB [40]. Водночас транскрипція іraP активується системою PhoP/PhoQ в умовах нестачі катіонів магнію  $Mg^{2+}$  [41].

**Висновки.** На сьогодні детально досліджені та описані в літературі етапи інфекційного процесу за сальмонельозу. Особливу увагу зосереджено на системах сигнальної трансдукції, що є поширеними серед ентеробактерій та допомагають їм уникати несприятливих умов. Досліджено їхнє функціонування та регуляцію.

Відомо, що сальмонели отримують сигнали для активації сенсорів з цитоплазми, однак природа цих сигналів ще до кінця не з'ясована. Пристосування бактерії до несприятливих умов та відповідь на фагоцитоз полягає у ініціації транскрипції генів патогенності та пригнічення транскрипції оперону, що нейтралізують умови в цитоплазмі клітин сальмонели. Таким чином, адаптуючись до умов клітин-мішеней, сальмонела продовжує розмноження в організмі.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Grimont Patrick A.D. François-Xavier Weill. Antigenic formulae of the Salmonella serovars. WHO collaborating centre for reference and research on Salmonella. 2007. 9. P. 1–166.
2. Comparison of genome degradation in Paratyphi A and Typhi, human-restricted serovars of Salmonella enterica that cause typhoid / McClelland Michael et al. Nature genetics. 2004. 36. 12. P. 1268.
3. Salmonella typhi, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old / Kidgell Claire et al. Infection, Genetics and Evolution. 2002. 2.1. P. 39–45p.
4. Ширококов В. П. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія. (2010).
5. A second wave of Salmonella T3SS1 activity prolongs the lifespan of infected epithelial cells / Finn Ciaran E. et al. PLoS pathogens. 2017. 13.4. e1006354.
6. Salmonella effector proteins and host-cell responses / Srikanth C.V. et al. Cellular and Molecular Life Sciences. 2011. 68.22. 3687 p.
7. Kenney Linda J. The role of acid stress in Salmonella pathogenesis. Current opinion in microbiology. 2019. 47. P. 45–51.
8. Chakraborty Smarajit, Hideaki Mizusaki, Linda J. Kenney. A FRET-based DNA biosensor tracks OmpR-dependent acidification of Salmonella during macrophage infection. PLoS biology. 2015. 13.4. e1002116.
9. Richardson Lauren A. How salmonella survives the macrophage's acid. attack. PLoS biology. 2015. 13.4. e1002117.
10. Rathman Michellero, Michael D. Sjaastad, Stanley Falkow. Acidification of phagosomes containing Salmonella typhimurium in murine macrophages. Infection and immunity. 1996. 64.7. P. 2765–2773.
11. Densen P., Clark R.A., Nauseef W. M. Granulocytic phagocytes, In: G. L. Mandell, R. G. Douglas, and J. E. Bennett (ed.), Principles and practice of infectious diseases, 3rd ed., vol. 1. Churchill Livingstone, New York. 1990. P. 78–101.
12. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. Science. 1978. 201. P. 875–880.
13. Coffey J. W., Duve C. D. Digestive activity of lysosomes. I. The digestion of proteins by extracts of rat liver lysosomes. J. Biol. Chem. 1968. 243. P. 3255–3263.
14. Steele-Mortimer Olivia. The Salmonella-containing vacuole—moving with the times. Current opinion in microbiology. 11.1. 2008. P. 38–45.
15. Сальмонеллы: молекулярные механизмы приспособленности и факторы вирулентности / Ахметова Д.Г. и др. Eurasian Journal of Applied Biotechnology. 1. 2012. P. 3–24.
16. Worley Micah J., Katherine H.L. Ching, Fred Heffron. Salmonella SsrB activates a global regulon of horizontally acquired genes. Molecular microbiology. 2000. 36.3. P. 749–761.
17. The PhoP/PhoQ two-component system stabilizes the alternative sigma factor RpoS in Salmonella enterica / Tu Xuanlin et al. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2006. 103.36. P. 13503–13508.
18. Reciprocal Regulation of OmpR and Hfq and Their Regulatory Actions on the Vi Polysaccharide Capsular Antigen in Salmonella enterica Serovar Typhi / Zhang Ying et al. Current microbiology. 2018. 75.6. P. 773–778.
19. OmpR regulates the stationary-phase acid tolerance response of Salmonella enterica serovar Typhimurium / Bang Iel Soo et al. Journal of bacteriology. 2000. 182.8. P. 2245–2252.
20. Autoinduction of the ompR response regulator by acid shock and control of the Salmonella enterica acid tolerance response / Bang Iel Soo et al. Molecular microbiology. 2002. 44.5. P. 1235–1250.
21. The inner membrane histidine kinase EnvZ senses osmolality via helix-coil transitions in the cytoplasm / Wang, Loo Chien et al. The EMBO journal. 2012. 31.11. P. 2648–2659.
22. Transcriptional control of the antimicrobial peptide resistance ugtL gene by the Salmonella PhoP and SlyA regulatory proteins / Shi Yixin. et al. Journal of Biological Chemistry. 2004. 279.37. P. 38618–38625.
23. Kato Akinori, Eduardo A. Groisman. The PhoQ/PhoP regulatory network of Salmonella enterica. Bacterial Signal Transduction. Networks and Drug Targets. Springer. New York. NY. 2008. P. 7–21.
24. Bijlsma Jetta J.E., Eduardo A. Groisman. The PhoP/PhoQ system controls the intramacrophage type three secretion system of Salmonella enterica. Molecular microbiology. 2005. 57.1. P. 85–96.
25. Macrophage-dependent induction of the Salmonella pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival / Cirillo Daniela Maria et al. Molecular microbiology. 1998. 30.1. P. 175–188.
26. Ratner Dmitry M., Pontus A. Orning., Egil Lien. Bacterial secretion systems and regulation of inflammasome activation Journal of leukocyte biology. 2017. 101.1. P. 165–181.

27. Physiological effects of Crl in *Salmonella* are modulated by  $\sigma$ S level and promoter specificity / Robbe-Saule Véronique et al. *Journal of bacteriology*. 2007. 189.8. P. 2976–2987.
28. ATP reduction by MgtC and Mg<sup>2+</sup> homeostasis by MgtA and MgtB enables *Salmonella* to accumulate RpoS upon low cytoplasmic Mg<sup>2+</sup> stress / Park Myungseo et al. *Molecular microbiology*. 2018. 110.2. P. 283–295.
29. Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*. Regulation of mgtA and mgtB expression / Snively M.D et al. *Journal of Biological Chemistry*. 1991. 266.2. P. 824–829.
30. Elongation factor P controls translation of the mgtA gene encoding a Mg<sup>2+</sup> transporter during *Salmonella* infection / Choi Eunna et al. *Microbiology Open*. 2018. e00680.
31. Kowatz Thomas., Michael E. Maguire. Loss of cytosolic Mg<sup>2+</sup> binding sites in the *Thermotoga maritima* CorA Mg<sup>2+</sup> channel is not sufficient for channel opening. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2019. 1863.1. P. 25–30.
32. Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: characterization of magnesium influx and cloning of a transport gene / Hmiel S.P et al. *Journal of bacteriology*. 1986. 168.3. P. 1444–1450.
33. High-level, constitutive expression of the mgtC gene confers increased thermotolerance on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium / Gall Aaron R et al. *Molecular microbiology*. 2018.
34. Papp-Wallace Krisztina M., Michael E. Maguire. Regulation of CorA Mg<sup>2+</sup> channel function affects the virulence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Journal of bacteriology*. 190.19. 2008. P. 6509–6516.
35. Bearson Bradley L., Lee Wilson., John W. Foster. A low pH-inducible, PhoPQ-dependent acid tolerance response protects *Salmonella typhimurium* against inorganic acid stress. *Journal of bacteriology*. 180.9. 1998. P. 2409–2417.
36. Hengge-Aronis Regine. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the  $\sigma$ S (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 66.3. 2002. P. 373–395.
37. Regulation of sigma S degradation in *Salmonella enterica* var typhimurium: in vivo interactions between sigma S, the response regulator MviA (RssB) and ClpX / Moreno Matthew et al. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*. 2000. 2.2. P. 245–254.
38. Induction of RpoS degradation by the two-component system regulator RstA in *Salmonella enterica* / Cabeza María L. et al. *Journal of bacteriology*. 2007. 189.20. P. 7335–7342.
39. ClpXP affects the cell metabolism of *Salmonella typhimurium* partially in an RpoS-dependent manner / Tang Tian et al. *Metabolomics*. 2017. 13.12. 157 p.
40. Phosphate and carbohydrate facilitate the formation of filamentous *Salmonella enterica* during osmotic stress / Lensmire Joshua M. et al. *Microbiology*. 2018. 164.12. P. 1503–1513.
41. DksA and ppGpp regulate the  $\sigma$ S stress response by activating promoters for the small RNA DsrA and the anti-adaptor protein IraP / Girard Mary E et al. *Journal of bacteriology*. 2018. 200.2. e00463–17.

#### REFERENCES

1. Grimont Patrick, A.D., François-Xavier, Weill. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO collaborating centre for reference and research on *Salmonella*. 2007, 9, pp. 1–166.
2. McClelland, Michael. Comparison of genome degradation in Paratyphi A and Typhi, human-restricted serovars of *Salmonella enterica* that cause typhoid. *Nature genetics*. 2004, 36, 12, 1268 p.
3. Kidgell, Claire. *Salmonella typhi*, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old. *Infection, Genetics and Evolution*. 2002, 2.1, pp. 39–45.
4. Shyrobokov, V.P. (2010). *Medychna mikrobiologija, virusologija ta imunologija* [Medical Microbiology, Virology and Immunology].
5. Finn, Ciaran E. A second wave of *Salmonella* T3SS1 activity prolongs the lifespan of infected epithelial cells. *PLoS pathogens*. 2017, 13.4, e1006354.
6. Srikanth, C.V. *Salmonella* effector proteins and host-cell responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2011, 68.22, 3687 p.
7. Kenney Linda, J. The role of acid stress in *Salmonella* pathogenesis. *Current opinion in microbiology*. 2019, 47, pp. 45–51.
8. Chakraborty, Smarajit., Hideaki, Mizusaki, Linda J. Kenney. A FRET-based DNA biosensor tracks OmpR-dependent acidification of *Salmonella* during macrophage infection. *PLoS biology*. 2015, 13.4, e1002116.
9. Richardson, Lauren A. How salmonella survives the macrophage's acid. attack. *PLoS biology*. 2015, 13.4, e1002117.
10. Rathman, Michelle., Michael D. Sjaastad., Stanley, Falkow. Acidification of phagosomes containing *Salmonella typhimurium* in murine macrophages. *Infection and immunity*. 1996, 64.7, pp. 2765–2773.
11. Densen, P., Clark, R. A., Nauseef, W. M. Granulocytic phagocytes, In: G. L. Mandell, R. G. Douglas, and J. E. Bennett (ed.), *Principles and practice of infectious diseases*, 3rd ed., vol. 1. Churchill Livingstone, New York. 1990, pp. 78–101.
12. Fridovich, I. The biology of oxygen radicals. *Science*. 1978, 201, pp. 875–800.
13. Coffey, J. W., Duve, C. D. Digestive activity of lysosomes. I. The digestion of proteins by extracts of rat liver lysosomes. *J. Biol. Chem*. 1968, 243, pp. 3255–3263.
14. Steele-Mortimer, Olivia. The *Salmonella*-containing vacuole—moving with the times. *Current opinion in microbiology*. 11.1, 2008, pp. 38–45.
15. Ahmetova, D.G. Sal'monelly: molekularnyye mehanizmy prispoblenosti i factory virulentnosti. *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*. [Salmonella: molecular fitness mechanisms and virulence factors]. 2012, 1, pp. 3–24.
16. Worley Micah, J., Katherine, H.L. Ching., Fred, Heffron. *Salmonella* SsrB activates a global regulon of horizontally acquired genes. *Molecular microbiology*. 2000, 36.3, pp. 749–761.
17. Tu, Xuanlin. The PhoP/PhoQ two-component system stabilizes the alternative sigma factor RpoS in *Salmonella enterica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006, 103.36, pp. 13503–13508.
18. Zhang, Ying. Reciprocal Regulation of OmpR and Hfq and Their Regulatory Actions on the Vi Polysaccharide Capsular Antigen in *Salmonella enterica* Serovar Typhi. *Current microbiology*. 2018, 75.6, pp. 773–778.

19. Bang, Iel Soo. OmpR regulates the stationary-phase acid tolerance response of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of bacteriology*. 2000, 182.8, pp. 2245–2252.
20. Bang, Iel Soo. Autoinduction of the ompR response regulator by acid shock and control of the *Salmonella enterica* acid tolerance response. *Molecular microbiology*. 2002, 44.5, pp. 1235–1250.
21. Wang., Loo Chien. The inner membrane histidine kinase EnvZ senses osmolality via helix-coil transitions in the cytoplasm. *The EMBO journal*. 2012, 31.11, pp. 2648–2659.
22. Shi, Yixin. Transcriptional control of the antimicrobial peptide resistance *ugtL* gene by the *Salmonella* PhoP and SlyA regulatory proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 2004, 279.37, pp. 38618–38625.
23. Kato, Akinori., Eduardo A. Groisman. The PhoQ/PhoP regulatory network of *Salmonella enterica*. *Bacterial Signal Transduction. Networks and Drug Targets*. Springer. New York. NY. 2008, pp. 7–21.
24. Bijlsma Jetta, J.E., Eduardo, A. Groisman. The PhoP/PhoQ system controls the intramacrophage type three secretion system of *Salmonella enterica*. *Molecular microbiology*. 2005, 57.1, pp. 85–96.
25. Cirillo, Daniela Maria. Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. *Molecular microbiology*. 1998, 30.1, pp. 175–188.
26. Ratner Dmitry, M., Pontus A. Orning., Egil, Lien. Bacterial secretion systems and regulation of inflammasome activation. *Journal of leukocyte biology*. 2017, 101.1, pp. 165–181.
27. Robbe-Saule., Véronique. Physiological effects of Crl in *Salmonella* are modulated by  $\sigma$ S level and promoter specificity. *Journal of bacteriology*. 2007, 189.8, pp. 2976–2987.
28. Park, Myungseo. ATP reduction by MgtC and Mg<sup>2+</sup> homeostasis by MgtA and MgtB enables *Salmonella* to accumulate RpoS upon low cytoplasmic Mg<sup>2+</sup> stress. *Molecular microbiology*. 2018, 110.2, pp. 283–295.
29. Snively, M.D. Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*. Regulation of *mgtA* and *mgtB* expression. *Journal of Biological Chemistry*. 1991, 266.2, pp. 824–829.
30. Choi, Eunna. Elongation factor P controls translation of the *mgtA* gene encoding a Mg<sup>2+</sup> transporter during *Salmonella* infection. *Microbiology Open*. 2018, e00680.
31. Kowatz, Thomas., Michael E. Maguire. Loss of cytosolic Mg<sup>2+</sup> binding sites in the *Thermotoga maritima* CorA Mg<sup>2+</sup> channel is not sufficient for channel opening. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2019, 1863.1, pp. 25–30.
32. Hmiel, S.P. Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: characterization of magnesium influx and cloning of a transport gene. *Journal of bacteriology*. 1986, 168.3, pp. 1444–1450.
33. Gall Aaron, R. High-level, constitutive expression of the *mgtC* gene confers increased thermotolerance on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular microbiology*. 2018.
34. Papp-Wallace Krisztina, M., Michael E. Maguire. Regulation of CorA Mg<sup>2+</sup> channel function affects the virulence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Journal of bacteriology*. 2008, 190.19, pp. 6509–6516.
35. Bearson Bradley, L., Lee, Wilson., John W. Foster. A low pH-inducible, PhoPQ-dependent acid tolerance response protects *Salmonella typhimurium* against inorganic acid stress. *Journal of bacteriology*. 1998, 180.9, pp. 2409–2417.
36. Hengge-Aronis, Regine. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the  $\sigma$ S (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2002, 66.3, pp. 373–395.
37. Moreno, Matthew. Regulation of sigma S degradation in *Salmonella enterica* var typhimurium: in vivo interactions between sigma S, the response regulator MviA (RssB) and ClpX. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*. 2000, 2.2, pp. 245–254.
38. Cabeza María, L. Induction of RpoS degradation by the two-component system regulator RstA in *Salmonella enterica*. *Journal of bacteriology*. 2007, 189.20, pp. 7335–7342.
39. Tang, Tia. ClpXP affects the cell metabolism of *Salmonella typhimurium* partially in an RpoS-dependent manner. *Metabolomics*. 2017, 13.12, 157 p.
40. Lensmire Joshua M. Phosphate and carbohydrate facilitate the formation of filamentous *Salmonella enterica* during osmotic stress. *Microbiology*. 2018, 164.12, pp. 1503–1513.
41. Girard Mary, E. DksA and ppGpp regulate the  $\sigma$ S stress response by activating promoters for the small RNA DsrA and the anti-adaptor protein IraP. *Journal of bacteriology*. 2018, 200.2, e00463–17.

#### **Молекулярно-генетические механизмы выживания и резистентности сальмонелл**

**Рубленко Н.М.**

В статье изложены данные научной литературы, описывающие молекулярно-генетические механизмы защиты от неблагоприятных условий у бактерий рода *Salmonella*. Основными барьерами на начальных этапах инфекционного процесса являются высокая осмолярность и низкие значения pH. Защитные механизмы сальмонеллы направлены на избежание действия этих факторов с целью дальнейшей пролиферации в инфицированном организме.

Ответ на неблагоприятные условия реализуется с помощью двухкомпонентных систем сигнальной трансдукции. В основе которых лежит принцип взаимодействия сенсора и регулятора. Сенсор, представленный гистидин-киназой осуществляет фосфорилирование регулятора, который в свою очередь прямо или опосредованно инициирует транскрипцию генов патогенности. На сегодня в научной литературе описаны функции системы EnvZ/OmpR, которая активируется в условиях высокой осмолярности и регулирует образование капсулярного Vi-антигена у тифоидного серовара *S. Typhi*. Система PhoP/PhoQ осуществляет ответ на условия кислой среды и функционирует по тому же принципу: фосфорилирование регулятора сенсором. Также охарактеризована зависимость системы PhoP/PhoQ от сигма-фактора RpoS (субединица бактериальной РНК-полимеразы). Сигналом для накопления RpoS является низкая концентрация катионов Магния.

Установлено, что данные системы сигнальной трансдукции регулируют транскрипцию оперонов, которые кодируют гены систем секреции белков 3 типа. В состав последних входят эффекторный белки, способные к перестраи-

ванию цитоскелета эпителиоцитов тонкого кишечника, что позволяет сальмонелле проникать в них в виде специфических фагосом.

Таким образом, двухкомпонентные системы сигнальной трансдукции у сальмонеллы не только являются механизмами, обеспечивающими выживание и пролиферацию в неблагоприятных условиях, но и осуществляют регуляцию генетических детерминант, кодирующих гены патогенности.

**Ключевые слова:** сальмонелла, pH, осмолярность, гены патогенности, оперон, сигнальная трансдукция.

### **Molecular genetics of salmonella survival and resistance**

**Rublenko N.**

Salmonella is one of the most common cause of the food borne illness. Salmonella belongs to Enterobacteriaceae family and consists of 2 species, which diverge on 6 subspecies. These subspecies consists of 2700 serovars. There are typhoid serovars among them – S. Typhi, Paratyphi A, B, C – which cause typhoid fever in human. The rest of the serovars are non-typhoidal and leads to gastroenteritis both in animal and human. Salmonella enters to a mammal organism as a result of consumption of contaminated food products: meat, eggs, milk and products containing them. The entry of the infection for salmonellosis is the small intestine mucosa. Salmonella attaches to cell walls by fimbria and pili.

Salmonella has several systems that are activated in response to adverse conditions such as: high osmolarity, acid or heat shock and nutrient deficiencies. They are based on the principle of a two-component system in which there is a sensor that receives cytoplasmic signals, and a regulator. Regulator (usually DNA-binding protein) initiates the transcription of the virulence genes (Chakraborty, 2015). The sensor is histidine kinase, which phosphorylates the regulatory protein, thereby activating it. During the infectious cycle of salmonella in mammalian organism the formation of specific vacuole SCV takes place (Salmonella-containing vacuole-containing vacuole containing salmonella) in the cytoplasm of the eukaryotic cell (Steele-Mortimer, 2008). SCV is a modified phagosome, which is formed as a result of cytoskeleton rearrangements. The target are usually phagocytic cells: neutrophils, macrophages and epithelial cells of the small intestine mucosa – M-cells (Akhmetova, 2012).

Given the specific mechanism of infection, salmonella is considered a facultative intracellular pathogen. Bacterium invades the eukaryotic cell by rearrangement of its cytoskeleton with effector proteins and continue to persistence in a form of SCV.

It is well-known nowadays that tolerance to high osmotic pressure is achieved through the EnvZ / OmpR system, which also regulates the expression of the *ssrAB* operon that is localized on the Salmonella pathogenicity island SPI-2 and triggers the expression of the effector proteins. The *ssrAB* operon is also regulated by the two-component acid shock response system PhoP / PhoQ (Worley, 2000). The functioning of the PhoP / PhoQ system directly depends on the sigma factor RpoS, which accumulates under low concentrations of magnesium cations (Tu, 2006).

According to the researches of transduction between the EnvZ / OmpR components, it is clear that salmonella receives signals from the cytoplasmic environment, and sensory molecules are located on the inner membrane (Kenney, 2019; Wang et al., 2012).

The ability to survive under acid shock is provided by the PhoP / PhoQ system, which also operates on the principle of signal transduction. PhoQ is a Histidine Kinase Signal Sensor. Signals are acidic pH, divalent cations and positively charged antimicrobial peptides.

An important function of the two-component PhoP / PhoQ system is the control of *spi* *ssa* gene expression in a macrophage environment (Bijlsma, 2005). These genes are the main component of the type III secretion systems and are transcribed only when salmonella enters eukaryotic cell. (Bijlsma, 2005). The main regulator of signal transduction systems PhoP/PhoQ and EnvZ/OmpR is sigma-factor RpoS – subunit of bacterial RNA-polymerase – which operates in stationary phase at low pH, high osmolarity, heat shock or nutrient deficiency. RpoS protein accumulates in adverse conditions during stationary phase (Mg<sup>2+</sup> deficiency, low pH, high osmolarity). Need in magnesium cations is dependent on their ability to act as cofactors in many enzymatic activities. The accumulation begins at exponential (logarithmic) phase of bacterial reproduction. This is the phase of active cell division. Two factors MgtA and MgtB are responsible for Mg<sup>2+</sup> transport. Another molecule with the same function is CorA – bivalent cation channel, though its transcriptions doesn't depend on magnesium concentration in cell. In a case of magnesium deficiency at the stationary phase, RpoS accumulates vigorously and initiates replication of PhoP/PhoQ.

PhoP/PhoQ regulates tolerance to inorganic acids. Also, PhoP/PhoQ controls adaptation to magnesium cations deficiency and macrophage activity. Results of many studies on genes coding this system and their mutations led to conclusion the mutation or inactivation of one factor causes decrease in virulence and makes bacterial susceptible to acid environment.

To date, the stages of the infectious process for salmonellosis have been studied and described in detail in the literature. Particular attention is paid to signal transduction systems that are common among enterobacteria and help to avoid adverse conditions. Their functioning and regulation are investigated.

It is known that salmonella receives signals for the activation of sensors from the cytoplasm, but the nature of these signals is not yet fully understood. Adaptation of the bacteria to adverse conditions and the response to phagocytosis is initiated by the transcription of pathogenic genes and the suppression of the transcription of the operon, which neutralize the conditions in the cytoplasm of salmonella cells. Thus, adapting to the conditions of target cells, salmonella continues to multiply in the body.

**Key words:** salmonella, pH, osmolarity, virulence genes, operon, signal transduction.

*Надійшла 08.11.2018 р.*