

На правах рукописи

НЕСТЕРЧУК МИХАИЛ ВАСИЛЬЕВИЧ

**ВЫКЛЮЧЕНИЕ СИНТЕЗА БЕЛКА В БАКТЕРИАЛЬНОЙ
КЛЕТКЕ С ПОМОЩЬЮ ОЛИГОГЛУТАМИЛИРОВАНИЯ
РИБОСОМНОГО БЕЛКА S6**

02.00.10 – биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Москва - 2014

Работа выполнена на кафедре химии природных соединений Химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».

Научный руководитель:

Сергиев Пётр Владимирович, доктор химических наук, профессор кафедры химии природных соединений Химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Официальные оппоненты:

Говорун Вадим Маркович, доктор биологических наук, член-корреспондент Российской академии наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Научно-исследовательский институт физико-химической медицины» Федерального медико-биологического агентства.

Бони Ирина Венедиктовна, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории структуры и функций генов человека Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова».

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук».

Защита состоится 16 декабря 2014 года в 16.00 на заседании Диссертационного совета Д 501.001.41 по химическим наукам при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40, МГУ, Лабораторный корпус «А», аудитория 501.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова, и на сайте Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (по адресу <http://www.chem.msu.ru/rus/theses/2014/2014-09-30-nesterchuk/>)

Автореферат разослан ____ октября 2014 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук,
доцент

Смирнова И.Г.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Биосинтез белка – один из ключевых процессов в живых организмах. Генетическая информация хранится и передается в виде последовательности нуклеотидов ДНК. Для того чтобы перевести её в последовательность аминокислот, в живой клетке существует специальная структура – рибосома, представляющая собой сложный комплекс белков и рРНК. Главная задача рибосомы – обеспечить узнавание кодона мРНК молекулой тРНК, несущей нужную аминокислоту, и ориентировать в пространстве две молекулы тРНК таким образом, чтобы между присоединёнными к ним аминокислотными остатками образовалась пептидная связь.

Трансляция является одним из самых энергозатратных процессов в клетке. Это значит, что клетка нуждается в очень хорошо налаженной системе регуляции работы рибосомы в соответствии с потребностью в тех или иных белках. В естественной среде обитания бактериальная клетка большую часть времени проводит в условиях недостатка ресурсов. Это значит, что необходима система эффективного «выключения» рибосомы, в противном случае, клетка будет тратить свои энергетические резервы, что неизбежно приведет к их исчерпанию. С другой стороны, в случае появления во внешней среде питательных веществ, клетке нужно обратно «включить» рибосому, чтобы расти и делиться. Бактерии используют целый ряд механизмов для обратимого подавления трансляции в неблагоприятных условиях. Важность изучения этих механизмов подкрепляется их терапевтической значимостью, ведь именно они позволяют патогенам пережить воздействие антибиотиков.

В 2009 году за изучение структуры и функции рибосомы была присуждена Нобелевская премия по химии. Её лауреаты получили кристаллы рибосом и провели рентгеноструктурный анализ. Это позволило узнать структуру рибосомы с точностью до атома. Тем не менее, до сих пор остаются загадками многие аспекты работы трансляционного аппарата. Одна из таких загадок – ферментативные модификации компонентов рибосомы, такие как метилирование, псевдоуридинилирование, дигидроуридинилирование рРНК а также метилирование, ацетилирование рибосомных белков. Хотя эти модификации не являются жизненно необходимыми для клетки, для многих из них предполагается регуляторная роль.

Среди посттрансляционных модификаций белков *Escherichia coli* одна из самых необычных у рибосомного белка S6. К его С-концу добавляются дополнительные остатки глутаминовой кислоты. Модификацию осуществляет специальный фермент RimK. Это первый установленный случай такого последовательного наращивания полипептидной цепи. Зачем эта модификация нужна, и почему дополнительные остатки добавляются посттрансляционно (ведь их можно закодировать в геноме) – до сих пор не установлено.

Белок S6 – самый кислый белок бактериальной рибосомы (рI немодифицированной формы 5,26). Наблюдаемая посттрансляционная модификация дополнительно усиливает его кислотность (рI полностью модифицированной формы 4,93). Белок S6 располагается в регуляторной области малой субчастицы рядом с местом посадки мРНК и тРНК в E-участке. Это косвенно может свидетельствовать о регуляторной роли модификации, осуществляемой ферментом RimK

Цель работы. Целью данной работы было установить функциональную роль посттрансляционной модификации рибосомного белка S6 *Escherichia coli*. В поставленной задаче можно выделить три направления. Во-первых, необходимо установить, когда происходит модификация, зависит ли она от внешних факторов или является конститутивной. Во-вторых, нужно понять, как происходит модификация, что является Эсубстратом фермента RimK. Это может быть свободный белок S6 или S6 в составе различных рибосомных частиц. И, наконец, в-третьих, требуется выяснить, на что влияет модификация белка S6.

Научная новизна и практическая значимость работы. В ходе работы была выяснена регуляция посттрансляционной модификации рибосомного белка S6.

Модификация осуществляется только в стационарной фазе роста и отсутствует в логарифмической. При переходе культуры клеток из стационарной фазы роста в логарифмическую модифицированный белок разбавляется вновь синтезированным немодифицированным S6, то есть модификация белка S6 является необратимой.

В работе было установлено, что фермент RimK модифицирует белок S6 только в составе собранной рибосомы. Оказалось, что данная модификация приводит к подавлению трансляции. Таким образом, впервые показана регуляция процесса трансляции в бактериальной клетке с помощью модификации компонента рибосомы. Подавление трансляции в стационарной фазе необходимо для экономии ресурсов клетки в условиях недостатка питательных веществ, а значит, модификация белка S6 необходима для выживания клетки в неблагоприятных условиях. Это было продемонстрировано экспериментально.

Полученные в работе данные расширяют наши знания о принципах регуляции трансляции и механизмах приспособления бактериальной клетки к неблагоприятным условиям. Важность изучения этих механизмов подкрепляется их терапевтической значимостью, ведь именно они позволяют патогенам пережить воздействие антибиотиков.

Публикации и апробация работы. По материалам работы опубликовано 3 статьи в международных периодических изданиях и 1 глава в книге. Результаты были представлены на Международной конференции молодых учёных по фундаментальным наукам «Ломоносов-2010» (Москва, Россия), Международной школе-конференции молодых учёных по молекулярной генетике «Непостоянство генома» (Звенигород, Россия, декабрь 2012), на 38-ом конгрессе FEBS “Mechanisms in Biology” (Санкт-Петербург, Россия, июль 2013), и на международной конференции «Ribosomes» (Долина Напа, США, июль 2013).

Структура и объём диссертационной работы. Диссертация изложена на 108 страницах машинописного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы (посвящен посттрансляционным модификациям рибосомных белков *E. coli*), обсуждение результатов, материалы и методы, выводы и список литературы. Материал иллюстрирован 52 рисунками и 5 таблицами. Библиографический указатель включает в себя 105 цитированных работ.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Характеристика объектов исследования

В качестве объекта для изучения мы использовали штамм JW0836, в котором удалён ген *rimK*, а значит, отсутствует модификация белка S6. Во всех экспериментах мы сравнивали этот штамм с родительским штаммом BW25113 (дикий тип). Кроме того нами был получен штамм, в котором дополнительные остатки глутаминовой кислоты уже закодированы в геномной ДНК. Для этого в геномную ДНК клеток из штамма *ΔrimK* вместо гена *rpsF*, кодирующего рибосомный белок S6, была вставлена кассета, состоящая из гена *rpsF*, уже кодирующего дополнительные 4 остатка глутаминовой кислоты на C-конце, и гена устойчивости к хлорамфениколу (рис. 1). Для контроля была вставлена такая же кассета, но без дополнительных остатков глутамата. Таким образом, был получен модельный штамм, в котором модификация белка S6 всегда присутствует - *ΔrimK-S6-E4-cat* (либо всегда отсутствует в случае контрольного штамма *ΔrimK-S6-cat*).

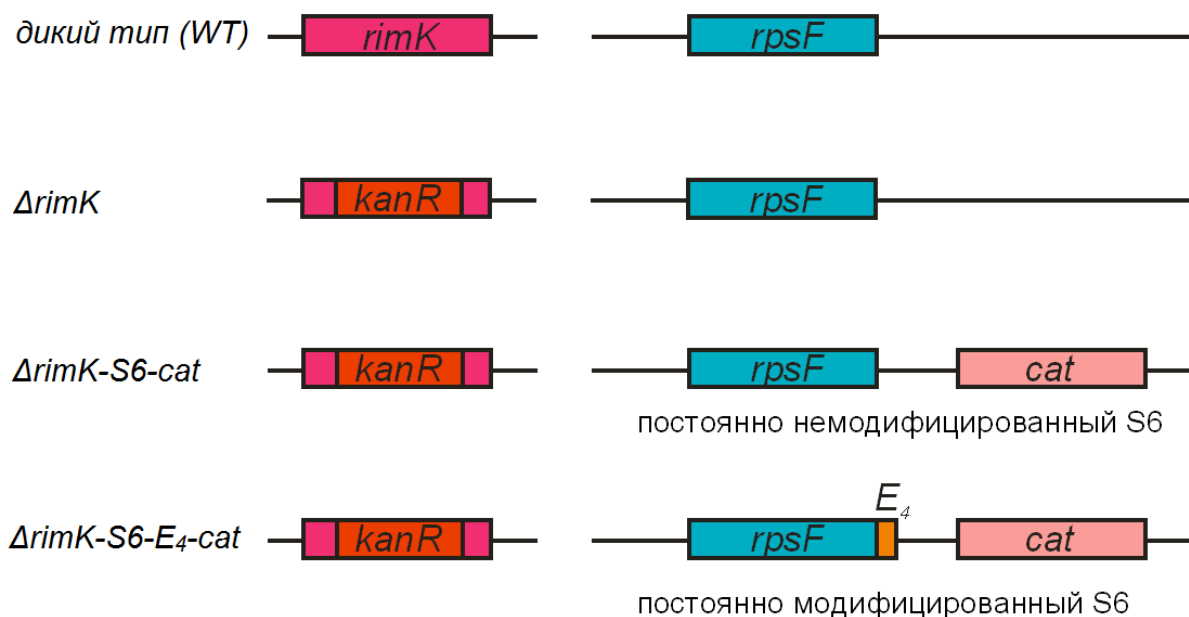


Рисунок 1. Используемые в работе штаммы *E. coli*. В штамме $\Delta rimK$ модификация белка S6 отсутствует. В штамме $\Delta rimK$ -S6-E₄-cat 4 дополнительных остатка глутаминовой кислоты внесены в ген *rpsF*, штамм $\Delta rimK$ -S6-cat – контрольный.

Штаммы были проверены с помощью ПЦР с геномной ДНК с праймерами S6-ver-f и S6-ver-r, которые комплементарны участкам ДНК, фланкирующим ген *rpsF*. Если вставка произошла, то в результате должен получиться более длинный продукт, чем в случае исходного штамма. Полученные ПЦР-продукты были секвенированы. В результате было показано, что в полученных штаммах ген *rpsF*, действительно кодирует требуемое количество остатков глутаминовой кислоты на С-конце белка S6, а также, что ген не содержит никаких дополнительных мутаций.

2. Зависимость модификации белка S6 от стадии роста бактериальной культуры

Первый вопрос, на который мы хотели получить ответ, когда происходит модификация белка S6, зависит ли она от внешних факторов или является конститутивной? Мы выяснили это, проанализировав наличие модификации белка S6 на разных стадиях роста бактериальной культуры.

Добавление дополнительных аминокислотных остатков к белку S6 приводит к увеличению его молекулярной массы, что уменьшает подвижность белка в денатурирующем полиакриламидном геле. Это позволяет отличить модифицированную форму белка S6 от немодифицированной с помощью иммуноблоттинга со специфическими антителами на S6. Используя этот подход, мы проанализировали олиоглутамилирование белка S6 на разных стадиях роста бактериальной культуры *E. coli* дикого типа (рис. 2). Оказалось, что модификация S6 наблюдается только в стационарной фазе роста и отсутствует в логарифмической. В аналогичном контрольном эксперименте с культурой клеток штамма $\Delta rimK$, модификация белка S6 отсутствует во всех фазах роста.

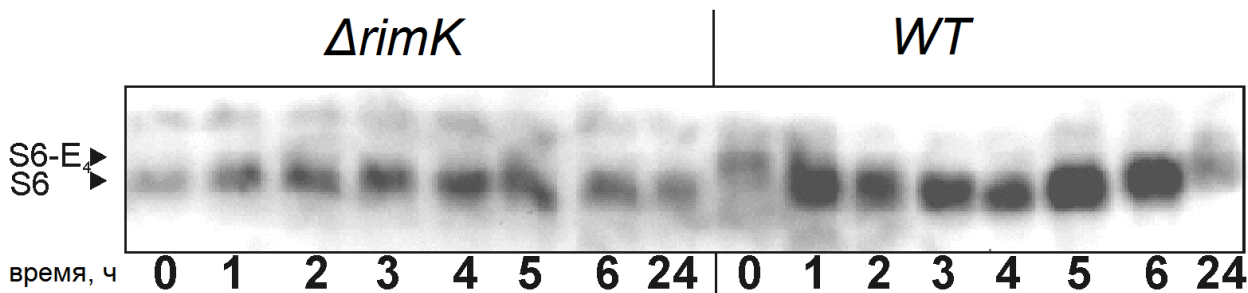


Рисунок 2. Анализ модификации белка S6 на разных стадиях цикла роста культуры с помощью иммуноблоттинга с антителами на S6. Дорожки соответствуют образцам суммарных белков клеток, взятых через указанное время после разбавления в свежей среде культуры в стационарной фазе.

При переходе бактериальной культуры из стационарной фазы в логарифмическую модификация S6 в клетках пропадает. Возможны два альтернативных механизма, которые объяснили бы утрату модификации. Модифицированный белок S6 может замещаться большим количеством вновь синтезированного немодифицированного S6, либо существует специальный механизм активной демодификации S6 во время выхода культуры из стационарной фазы роста. Чтобы установить, какой из этих механизмов реализуется, мы проанализировали статус модификации S6 на разных стадиях роста культуры штамма *ΔrimK-S6-E₄-cat*, в котором дополнительные остатки глутаминовой кислоты закодированы в геномной ДНК, а также в контрольном штамме *ΔrimK-S6-cat*. Результаты представлены на рис. 3.

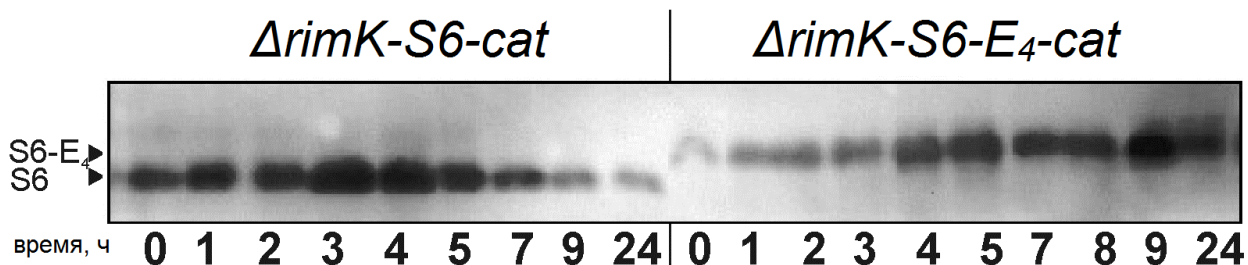


Рисунок 3. Анализ модификации белка S6 на разных стадиях цикла роста культуры с помощью иммуноблоттинга с антителами на S6. Дорожки соответствуют образцам суммарных белков клеток, взятых через указанное время после разбавления культуры, находящейся в стационарной фазе, свежей средой.

Если при выходе культуры из стационарной фазы роста осуществляется активное удаление дополнительных остатков глутаминовой кислоты, то в данном эксперименте мы наблюдали бы наличие демодифицированной формы S6. Такой демодификации не наблюдается, это значит, что интенсивная экспрессия генов рибосомных белков в логарифмической фазе роста приводит к замещению олигоглутамилированного S6 вновь синтезированным немодифицированным S6.

3. Определение субстратной специфичности фермента RimK

Субстратом фермента RimK может быть как свободный белок S6, так и S6 в составе различных рибосомных частиц, 30S, 70S, или 100S.

Биоинформатическими методами показано, что в структуре фермента RimK присутствует РНК-связывающий мотив. Кроме того мы установили, что белок S6 модифицируется в стационарной фазе, когда синтез новых рибосом не осуществляется.

Оба этих факта позволяют предположить, что субстратом для фермента RimK является не свободный белок S6, а S6 в составе уже собранной рибосомы. Для проверки этой гипотезы мы воспользовались разработанной нами системой для модификации S6 *in vitro*.

Штамм *ΔrimK*, в котором отсутствует олигоглутамилирование S6, мы использовали в качестве источника потенциальных субстратов для RimK. В качестве последних мы использовали 70S, 30S и 100S рибосомные частицы из клеток *ΔrimK* в логарифмической и стационарной фазы роста, рибосомные белки, отделённые от рРНК (TP70), а также S30 клеточный экстракт. Для сравнения мы аналогичным образом приготовили субстраты из клеток дикого типа.

Для детекции модификации S6 рекомбинантным RimK мы использовали ¹⁴C-глутаминовую кислоту. После остановки реакции мы разделяли белки в денатурирующем ПААГ, гель проявляли с помощью автордиографии. Результаты показаны на рис. 4.

Нами было показано (рис. 4), что субстратом для RimK может быть только S6 в составе 30S, 70S или 100S рибосомных частиц. Свободный белок S6 не может быть модифицирован. Кроме того *in vitro* олигоглутамилирование рибосом, выделенных из клеток дикого типа, подтверждает наши результаты о том, что S6 модифицирован только в стационарной фазе роста клеток. Рибосомы дикого типа, выделенные из клеток логарифмической фазы роста способны присоединить столько же остатков глутаминовой кислоты, сколько и рибосомы из клеток *ΔrimK*, в которых олигоглутамилирование S6 отсутствует. Это означает, что белок S6 не олигоглутамилирован в клетках логарифмической фазы роста. В то же время рибосомы дикого типа из клеток стационарной фазы роста способны присоединить заметно меньше глутаминовой кислоты, что говорит о том, белок S6 в них уже содержит дополнительные аминокислотные остатки (рис. 4).

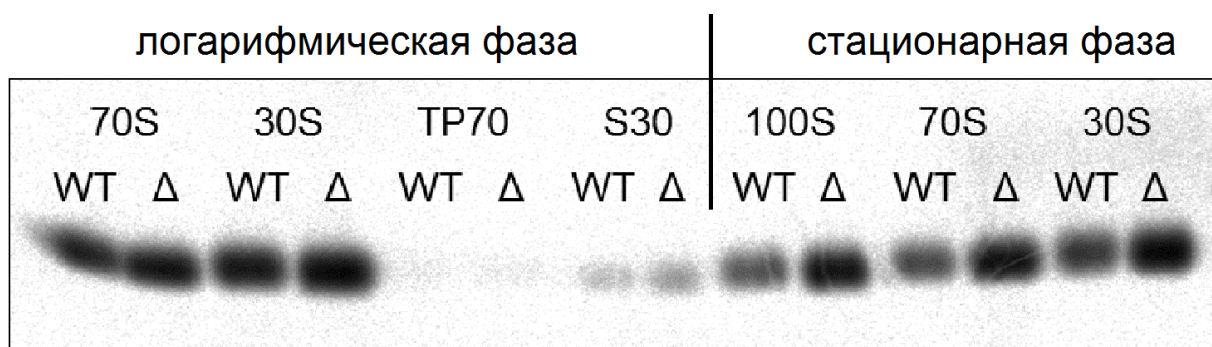


Рисунок 4. *In vitro* модификация белка S6 рекомбинантным ферментом RimK с помощью радиоактивно меченой глутаминовой кислоты. Автордиография гелей, содержащих белки из реакционной смеси после завершения реакции. Видимые зоны соответствуют белку S6 со встроенными остатками радиоактивной глутаминовой кислоты. Каждая дорожка соответствует определённому субстрату (70S, 30S, 100S рибосомы, суммарный рибосомный белок – TP70, или S30 экстракт).

В случае рибосом из клеток *ΔrimK* количество глутаминовой кислоты, присоединяемой *in vitro* к белку S6 рекомбинантным RimK постоянно и не зависит от фазы роста клеток, из которых выделили рибосомы. То есть рибосомы из стационарной фазы не являются преимущественными субстратами для фермента RimK, рибосомы из логарифмической фазы модифицируются *in vitro* столь же эффективно.

4. Влияние олигоглутамилирования белка S6 на процесс трансляции

Мы выяснили, что модификация белка S6 происходит в стационарной фазе роста, а субстратом для RimK является S6 в составе рибосомы. Следующий вопрос – на что влияет сама модификация белка S6. Поскольку мы имеем дело с модификацией компонента

аппарата трансляции, логично предположить, что олигоглутамилирование белка S6 может влиять на работу рибосомы, а значит, может меняться белковый состав клетки.

Мы провели сравнительный протеомный анализ суммарного белка из клеток *ArimK* и клеток дикого типа. Поскольку модификация белка S6 наблюдается только в стационарной фазе роста, а в активно делящихся клетках она отсутствует, то и наблюдаемые эффекты на суммарный протеом могут быть различными на разных фазах роста. Поэтому мы сравнивали белковый состав клеток в стационарной и логарифмической фазе роста. Кроме того, интересен переход из стационарной фазы в логарифмическую, ведь в этот период олигоглутамилированный S6, как мы уже выяснили, замещается вновь синтезированным немодифицированным белком S6. Клетки, «выходящие» из стационарной фазы также были проанализированы. Белки из клеток дикого типа окрашивали зелёной флуоресцентной краской Cy3, белки из штамма с нокаутом – красной краской Cy5. Обе краски ковалентно связываются с боковыми аминогруппами в белках. Образцы наносили на гель и последовательно проводили электрофорез в двух направлениях. Первое направление – изоэлектрофокусировка, второе – ПААГ в денатурирующих условиях. Результат двумерного электрофореза представлен на рис. 5.

Оказалось, что в клетках штамма *ArimK* уровень биосинтеза ряда белков, действительно, отличается. Эти белки были идентифицированы с помощью масс-спектрометрии, результаты также представлены на рис. 5. Функционально эти белки не связаны, среди них есть и факторы транскрипции и трансляции, и белки теплового шока, и ферменты метаболизма. Нам не удалось установить какой-либо общности у этих белков. Возможно, наблюдаемые здесь эффекты являются вторичными, ведь изменение количества одних белков может сказываться на количестве других. Для устранения этих вторичных эффектов мы решили сравнить текущий синтез белка в клетках дикого типа и *ArimK* на разных фазах роста.

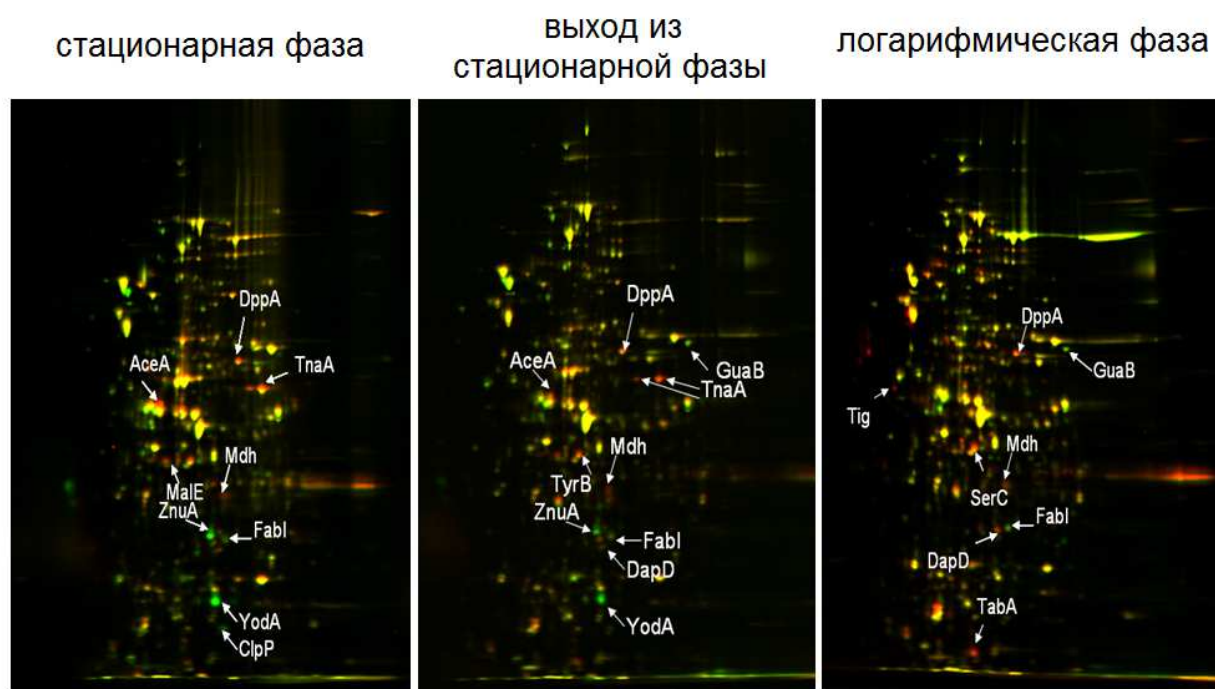


Рисунок 5. Двумерный электрофорез суммарного белка из клеток дикого типа и *ArimK* в различных фазах роста. Горизонтальное направление – изоэлектрофокусировка, вертикальное – распределение белков по массе. Белки из клеток дикого типа окрашены зелёной краской Cy3, а из клеток *ArimK* – красной Cy5.

Мы использовали пульс-мечение вновь синтезированных белков с помощью гомопропаргилглицина. Последний, выступая в качестве аналога метионина, способен

связываться с метиониновой аминоксил-тРНК синтетазой, присоединяться к метиониновой тРНК и таким образом встраиваться во вновь синтезированные белки. Белки, содержащие остаток гомопропаргилглицина могут быть помечены флуоресцентной краской Су5 или Су3, содержащей азидную группу (так называемая реакция клик-химии). С помощью такого подхода можно пометить белки, которые синтезируются после добавления гомопропаргилглицина к среде, то есть зафиксировать текущий синтез белка.

Таким образом, мы сравнили текущий синтез белка в клетках дикого типа и *ΔrimK* в разных фазах роста (рис. 6). В клетках из стационарной фазы роста, когда белок S6 модифицирован (в клетках дикого типа), разница между диким типом и *ΔrimK* оказалась драматической. Уровень биосинтеза белка в клетках, в которых белок S6 модифицирован, значительно ниже, чем в клетках, где модификации не происходит.

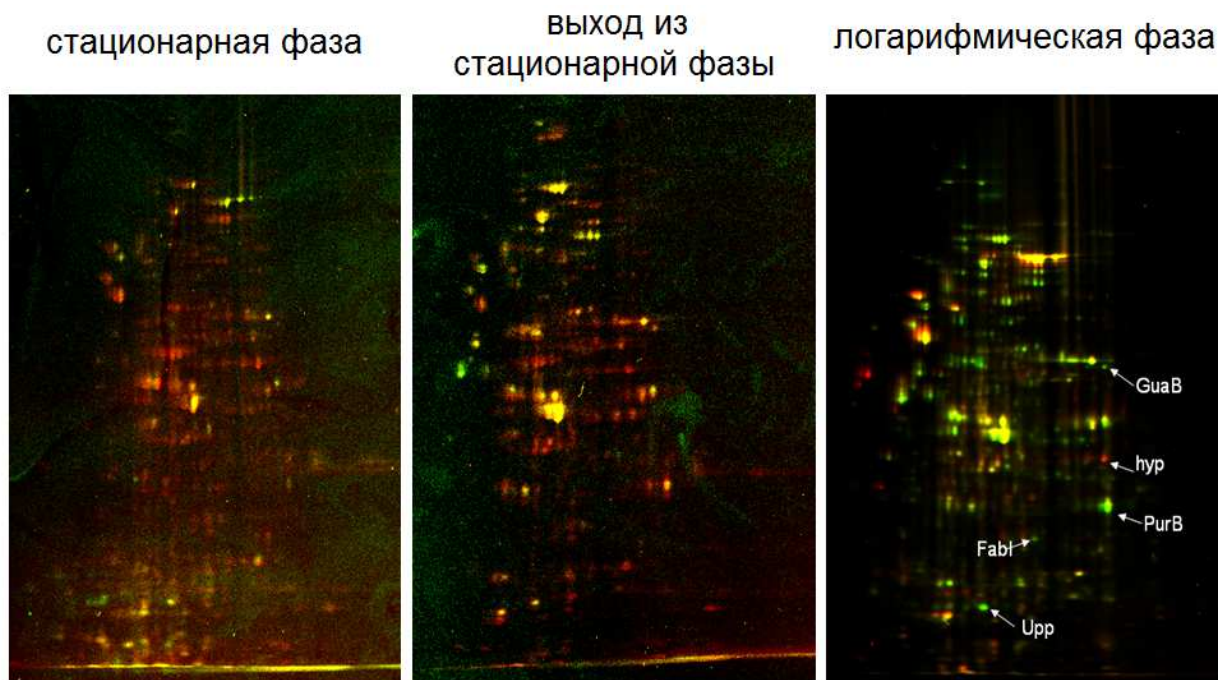


Рисунок 6. Двумерный электрофорез вновь синтезированного белка из клеток дикого типа и *ΔrimK* в различных фазах роста. Горизонтальное направление – изоэлектрофокусировка, вертикальное – распределение белков по массе. Белки из клеток дикого типа окрашены зелёной краской Су3, а из клеток *ΔrimK* – красной Су5.

Для детекции столь сильного эффекта, использование дифференциального двумерного электрофореза стало излишним. Чтобы увидеть, что происходит с уровнем биосинтеза белка в клетках в стационарной фазе и во время перехода в логарифмическую фазу, достаточно одномерного денатурирующего ПААГ. Мы переносили культуры дикого типа и *ΔrimK* в стационарной фазе в свежую среду и добавляли к среде гомопропаргилглицин через фиксированные промежутки времени, метили вновь синтезированные белки флуоресцентной краской Су5 и сравнивали встраивание метки (рис. 7).

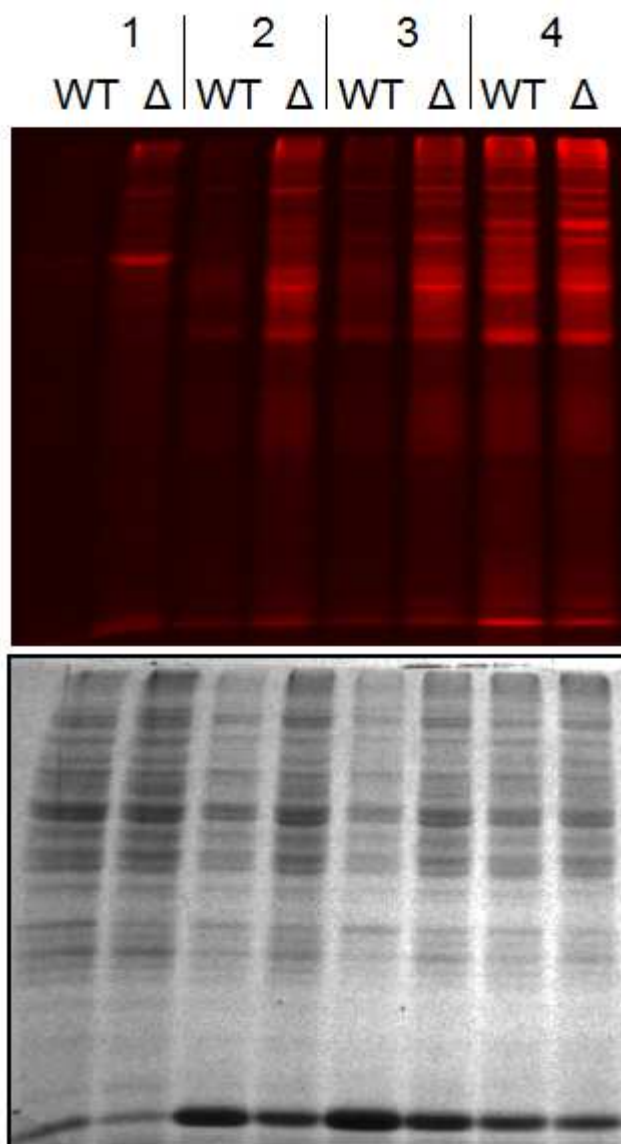


Рисунок 7. Синтез белка *in vivo* в клетках дикого типа и $\Delta rimK$. (1) Клетки в стационарной фазе. (2, 3, 4) Клетки через 0,5; 1 и 2 часа после разбавления свежей средой, соответственно. Верхний гель – встраивание HPG во вновь синтезируемые белки. Нижний – тот же гель, покрашенный Кумасси.

Оказалось, что в логарифмической фазе роста, когда белок S6 не модифицирован, и рибосомы в обоих типах клеток не различаются, заметной разницы в текущем синтезе белка нет. В стационарной же фазе синтез белка в клетках дикого типа, в которых белок S6 модифицирован, значительно ниже, чем в клетках $\Delta rimK$. Во время выхода клеток дикого типа из стационарной фазы происходит замещение модифицированного белка S6 вновь синтезированным немодифицированным S6. При этом разница в текущем синтезе белка в клетках дикого типа и $\Delta rimK$ постепенно нивелируется. Это позволяет предположить, что олигоглутамилирование белка S6 приводит к снижению трансляционной активности рибосом. В логарифмической фазе роста, когда нет недостатка в питательных веществах, в клетках идёт активный синтез белка. В стационарной фазе роста, в условиях голода, клетке необходимо экономить свои ресурсы. Для этого, прежде всего, необходимо свести к минимуму синтез белка, одного из самых энергозатратных процессов в клетке. Олигоглутамилирование белка S6 выключает синтез белка в клетке в стационарной фазе роста.

5. Влияние модификации белка S6 на активность рибосом *in vitro*

Действительно ли рибосомы, содержащие олигоглутамилированный белок S6, менее эффективно синтезируют белок? Достаточно ли модификации белка S6 для выключения трансляционной активности рибосомы, или требуются какие-то дополнительные факторы, связывающиеся с олигоглутамилированным S6? Для ответа на эти вопросы мы осуществили *in vitro* трансляцию рибосомами, выделенными из клеток дикого типа и *ΔrimK* из логарифмической и стационарной фазы роста. Мерой эффективности *in vitro* трансляции служила активность *in vitro* синтезированной люциферазы светлячка. Из результатов, представленных на рис. 8 видно, что рибосомы, содержащие модифицированный S6 (из клеток дикого типа из стационарной фазы роста), синтезируют белок почти на порядок менее эффективно, чем аналогичные рибосомы без модификации (из клеток *ΔrimK* из стационарной фазы роста). Рибосомы, выделенные из клеток логарифмической фазы роста, синтезируют белок с одинаковой эффективностью в случае обоих штаммов. Необходимо отметить, что общее снижение активности рибосом в стационарной фазе наблюдается в клетках обоих штаммов. Очевидно, что олигоглутамилирование S6 – не единственный механизм выключения трансляции в условиях дефицита ресурсов. К решению важной проблемы экономии ресурсов клетка подходит с нескольких сторон. Описано несколько рибосомных гибернаторных факторов: YfiA, RMF, HPF, YbeV, EttA, и YqjD. Каждый из них независимо от остальных ингибирует трансляцию в неблагоприятных условиях.

Таким образом, бактериальная клетка использует целый ряд механизмов для подавления процесса трансляции в условиях дефицита ресурсов. Эти механизмы важны для адаптации клеток к неблагоприятным условиям. Нокаут генов, кодирующих рибосомные гибернаторные факторы, как правило, приводит к снижению выживаемости клеток в стационарной фазе. Нами показано, что одним из способов подавления трансляции также является олигоглутамилирование белка S6.

6. Влияние модификации белка S6 на выживаемость бактериальной культуры в условиях дефицита ресурсов

Мы показали, что фермент RimK, в случае дефицита ресурсов во внешней среде, осуществляет посттрансляционную модификацию рибосомного белка S6, что приводит к ингибированию энергозатратного для клетки процесса трансляции. Насколько это важно для выживания клетки? Мы провели ряд экспериментов, ставящих целью сравнить выживаемость клеток дикого типа и *ΔrimK* в условиях недостатка ресурсов. В первом эксперименте мы инкубировали клетки дикого типа и *ΔrimK* в отдельных пробирках при 37°C в богатой среде LB в течение 12 дней в аэробных условиях. Раз в сутки мы измеряли клеточный титр. Результаты показаны на рис. 9.

активность люциферазы

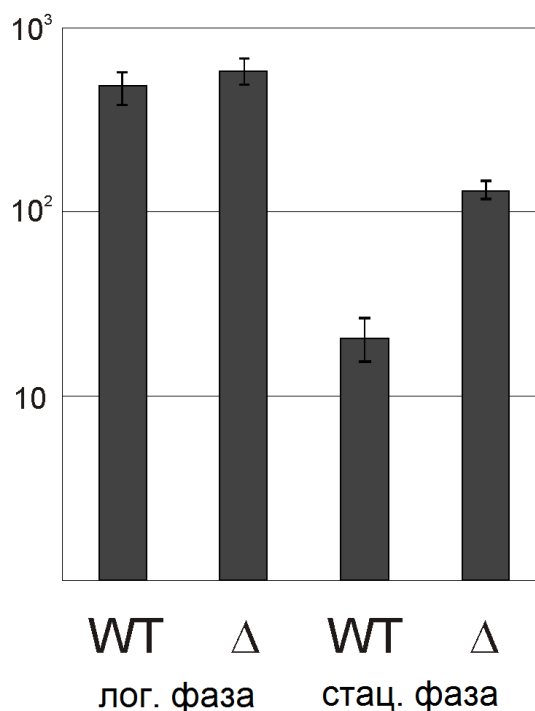


Рисунок 8. Активность рибосом из клеток дикого типа и *ΔrimK* *in vitro*

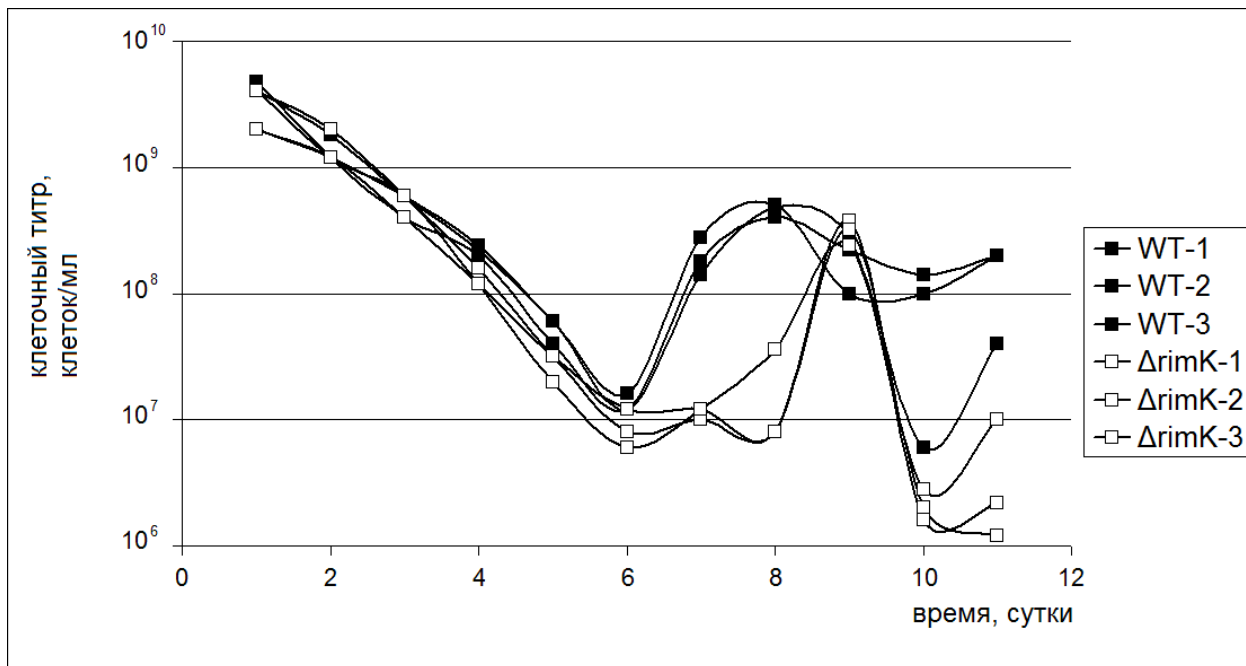


Рисунок 9. Выживаемость клеток дикого типа и *ΔrimK* в стационарной фазе.

Первые 6 дней клеточный титр в случае обоих штаммов монотонно уменьшался, причем на 6-й день титр клеток *ΔrimK* стал примерно в два раза меньше, чем клеток дикого типа. На 7-й день количество живых клеток дикого типа в культуре начинает увеличиваться. Это явление описано в литературе и известно как фенотип ростового преимущества в стационарной фазе (growth advantage in stationary phase – GASP фенотип). Этот фенотип объясняется накоплением в культуре клеток мутаций и, как следствие, появление мутантов, способных использовать в качестве питательных ресурсов мёртвые бактериальные клетки. Такие мутанты получают преимущество и начинают расти и делиться. В клетках *ΔrimK*, в которых нет модификации белка S6, GASP фенотип появляется на 2 дня позже. Такое замедление должно негативно сказаться на выживании клеток в условиях конкуренции за ресурсы с другими штаммами. В следующем эксперименте мы также инкубировали клетки дикого типа и *ΔrimK* при 37°C в богатой среде LB в течение 12 дней в аэробных условиях, но уже в одной пробирке, то есть штаммы конкурировали между собой за питательные ресурсы. Титр клеток дикого типа и *ΔrimK* определяли с помощью высевания стерильных разведений культуры на среду с агаром без антибиотика и с канамицином, соответственно. Результаты показаны на рис. 10.

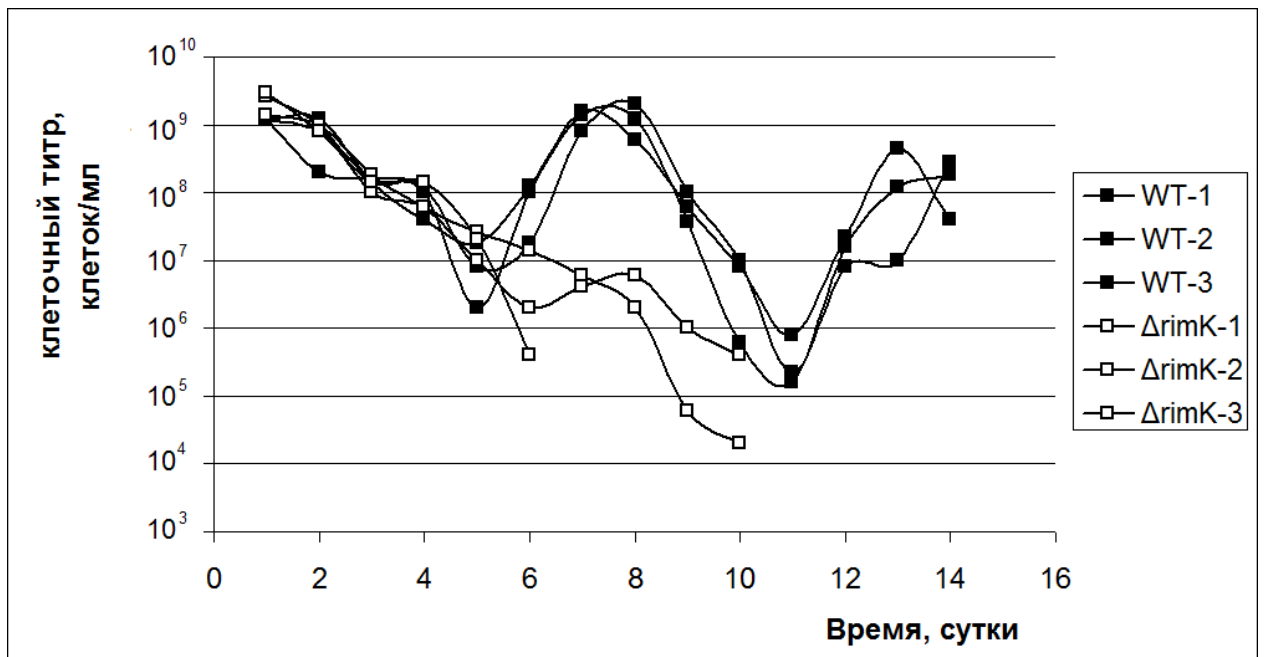


Рисунок 10. Выживаемость клеток дикого типа и $\Delta rimK$ в стационарной фазе при совместном культивировании.

В этом случае только клетки дикого типа успевают проявить GASP фенотип, что приводит к полному вытеснению ими клеток $\Delta rimK$ из культуры. В случае ежедневного пересева в свежую среду смешанной культуры клеток дикого типа и $\Delta rimK$, доля последних монотонно падает (рис. 11).

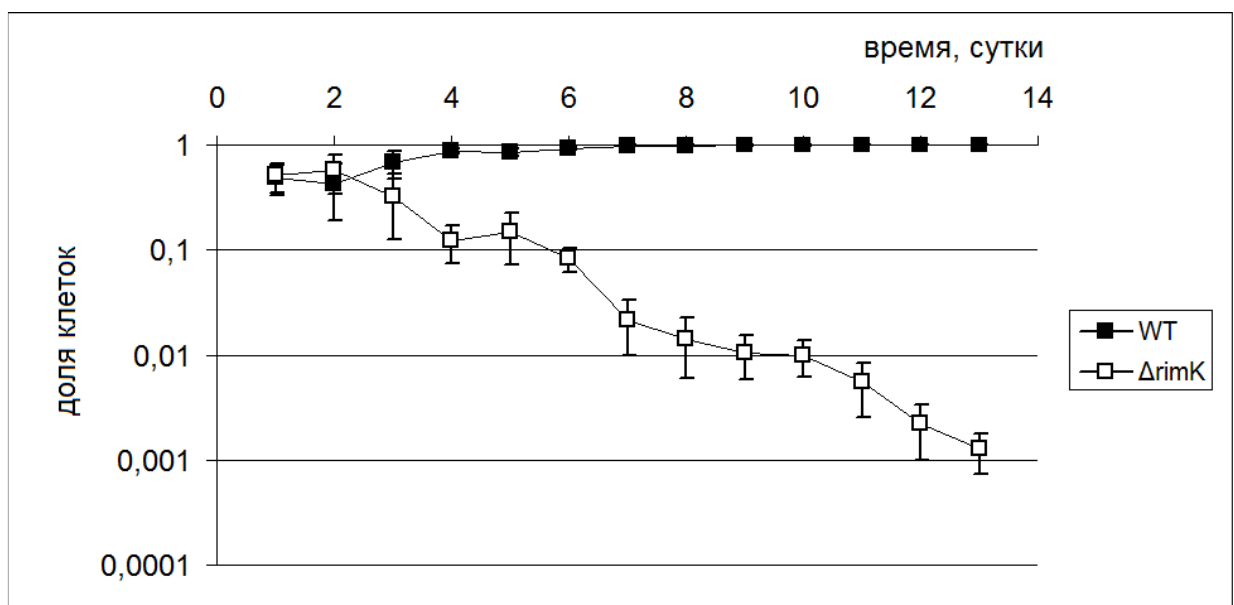


Рисунок 11. Вытеснение клеток $\Delta rimK$ клетками дикого типа при совместном культивировании и ежедневных пересевах.

Бактериальной клетке нужно уметь приспосабливаться к дефициту питательных веществ. В первую очередь ей необходимы механизмы экономии ресурсов. Клетки, в которых такие механизмы работают лучше, оказываются более приспособленными, а значит, обладают конкурентным преимуществом. Описанные результаты наглядно иллюстрируют это положение.

7. Связь модификации белка S6 с образованием спящих бактериальных клеток

В отличие от лабораторных условий культивирования, в естественных условиях бактерии гораздо больше времени проводят в стационарной фазе. Одна из стратегий выживания бактериальных популяций заключается в образовании спящих форм. В таких спящих состояниях в клетках сильно снижен метаболизм, такие клетки нечувствительны к антибиотикам. Когда внешние условия становятся более благоприятными для роста и деления клеток, популяция разделяется на две субпопуляции: часть клеток активно делится, остальные клетки так и остаются спящими. При воздействии на такую популяцию клеток неблагоприятных факторов, в частности, антибиотиков, активно делящиеся клетки погибают, а спящие продолжают оставаться в своём «законсервированном состоянии», тем самым сохраняя жизнеспособность до лучших времён. Одним из механизмов образования спящих клеток является повышенный уровень синтеза белков, которые токсичны и ингибируют рост, но при этом не вызывают гибель клеток. Токсин HrpA, который фосфорилирует глутамил-тРНК синтетазу и тем самым ингибирует трансляцию, обеспечивает образование спящих клеток. Токсины RelE и MazF расщепляют мРНК, что приводит к её деградации в клетке, а значит и к подавлению синтеза белка. Эти токсины, и ранее описанный рибосомный гибернационный фактор RMF так же способствуют переходу клетки в спящее состояние.

Действуя на бактериальную культуру антибиотиком (ампициллином) в течение ограниченного времени и измеряя титр выживших клеток, можно определить долю спящих клеток в данной культуре.

Используя описанный ампициллиновый тест, мы сравнили долю спящих клеток в культурах штаммов дикого типа и *ΔrimK* (рис. 12). Оказалось, что доля спящих клеток в нокаутном штамме в 100 раз ниже, чем в штамме дикого типа. Отсутствие олигоглутамилирования белка S6 негативным образом сказывается на образовании спящих форм клеток.

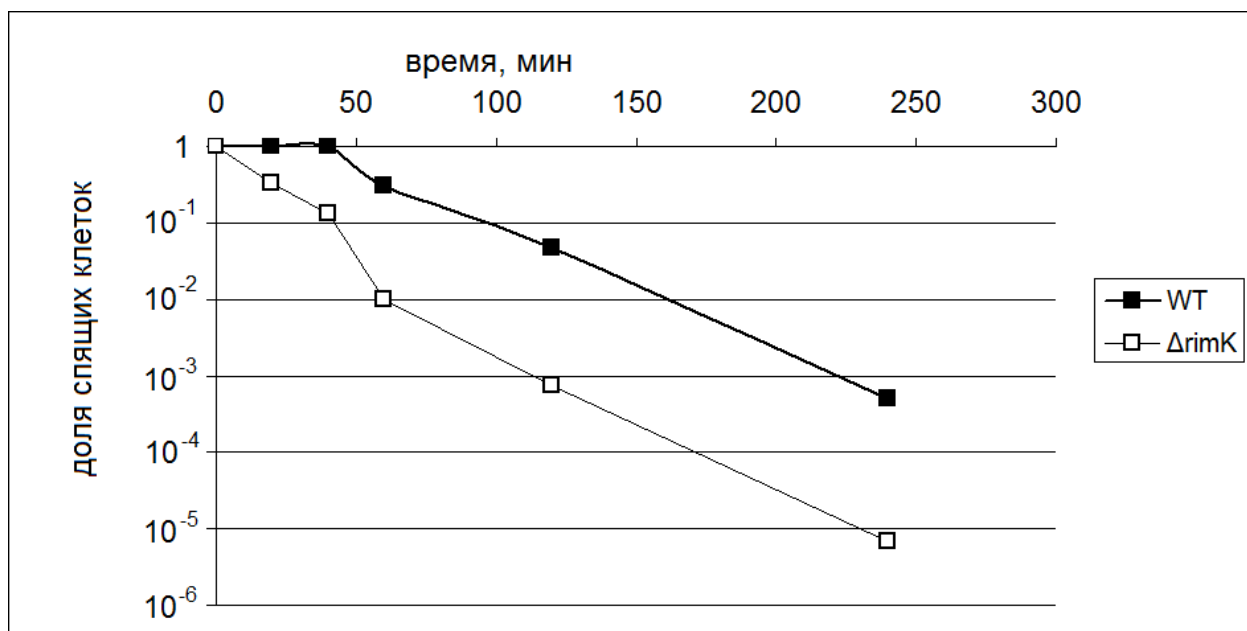


Рисунок 12. Доля выживших (спящих) клеток дикого типа и *ΔrimK* после добавления к среде ампициллина.

Для проверки данной гипотезы мы решили проанализировать популяцию двух штаммов, флуоресцентно промаркировав спящие клетки. В качестве маркера мы использовали плазмиду, содержащую ген флуоресцентного белка таймера FastFT, для которого характерны две ступени созревания. Первая ступень, характеризующаяся

временем полуреакции 0,25 часа, приводит к флуоресценции белка в синей области. Вторая ступень, с периодом полуреакции 7 часов, ведёт к сдвигу спектра флуоресценции в красную область. Используя проточную цитометрию, можно отличить спящие клетки (в них весь FastFT будет в красной форме) от активно синтезирующих белок (такие клетки будут содержать голубую форму белка-таймера). Схема эксперимента показана на рис. 13, а схематичное изображение результатов цитометрии на рис. 14.

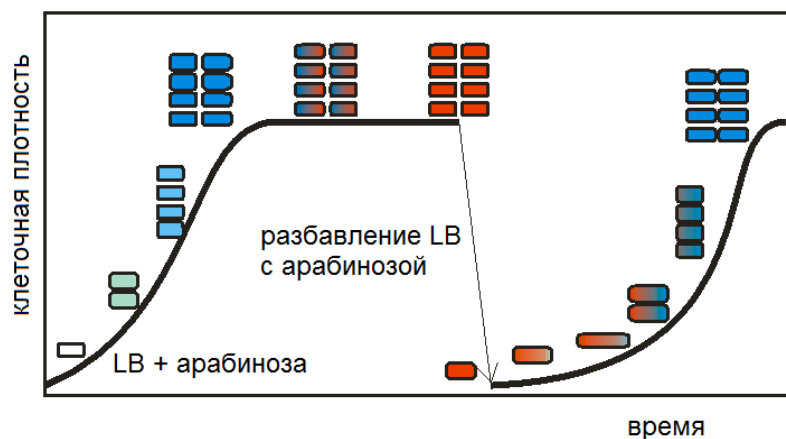


Рисунок 13. Схема эксперимента с флуоресцентным белком-таймером FastFT. На первом этапе клетки растут в среде с арабинозой до тех пор, пока весь FastFT не перейдёт в красную форму. После разбавления клеток свежей средой с индуктором клетки начинают синтезировать новый белок FastFT синего цвета.

Плазмиду, содержащую ген FastFT, мы внесли в клетки дикого типа и *ΔrimK*. Трансформированные клетки инкубировали в среде с индуктором в течение 48 часов. Этого времени достаточно, чтобы весь синтезированный в логарифмической фазе роста белок FastFT перешёл в красную форму. Полученные культуры мы проанализировали с помощью проточной цитометрии (рис. 15). Клетки дикого типа в стационарной фазе прекращают синтезировать новый белок (в них присутствует только красная форма FastFT), в то время как клетки *ΔrimK* сохраняют небольшую трансляционную активность (помимо красной формы белка-таймера в них содержится и недавно синтезированный FastFT в голубой форме). Этот результат является независимым подтверждением сделанного нами ранее вывода о влиянии олигоглутамилирования белка S6 на трансляцию в стационарной фазе.

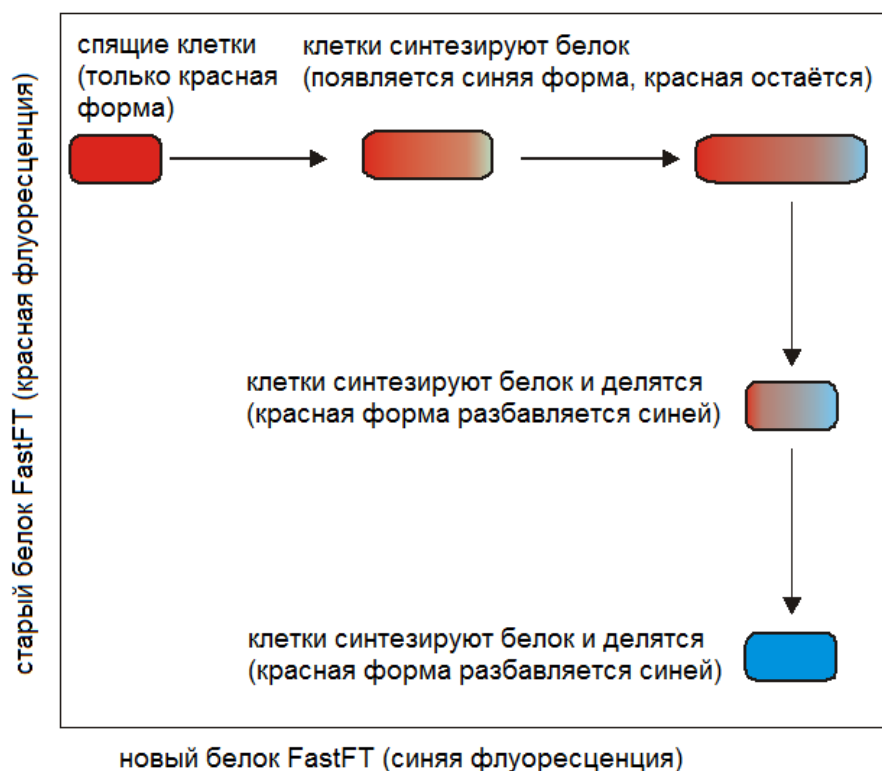


Рисунок 14. Схематичное изображение результатов проточной цитометрии. Спящие клетки располагаются в левом верхнем углу.

При разбавлении полученных культур свежей средой клетки дикого типа и *ΔrimK* ведут себя по-разному. Проточная цитометрия показала, что через час после помещения в свежую среду, клетки дикого типа разделяются на две субпопуляции: большая часть клеток остаётся в спящей форме, а примерно 10% популяции начинают синтезировать новый белок-таймер. В дальнейшем, эти клетки активно делятся и образуют новую популяцию клеток в логарифмической фазе роста, доля спящих клеток постепенно сокращается, но их количество, по-видимому, остаётся постоянным. При этом культура *ΔrimK* не разделяется на субпопуляции. Практически все клетки *ΔrimK* штамма начинают синтезировать новый белок FastFT. Спящих клеток детектировать не удаётся.

Через 2 часа инкубации в свежей среде клетки дикого типа начинают делиться (при делении уменьшается сигнал красной формы FastFT в активно метаболизирующих клетках). Клетки *ΔrimK* продолжают синтезировать новый белок-таймер без деления, они начинают делиться только через 4 часа после помещения в новую среду.

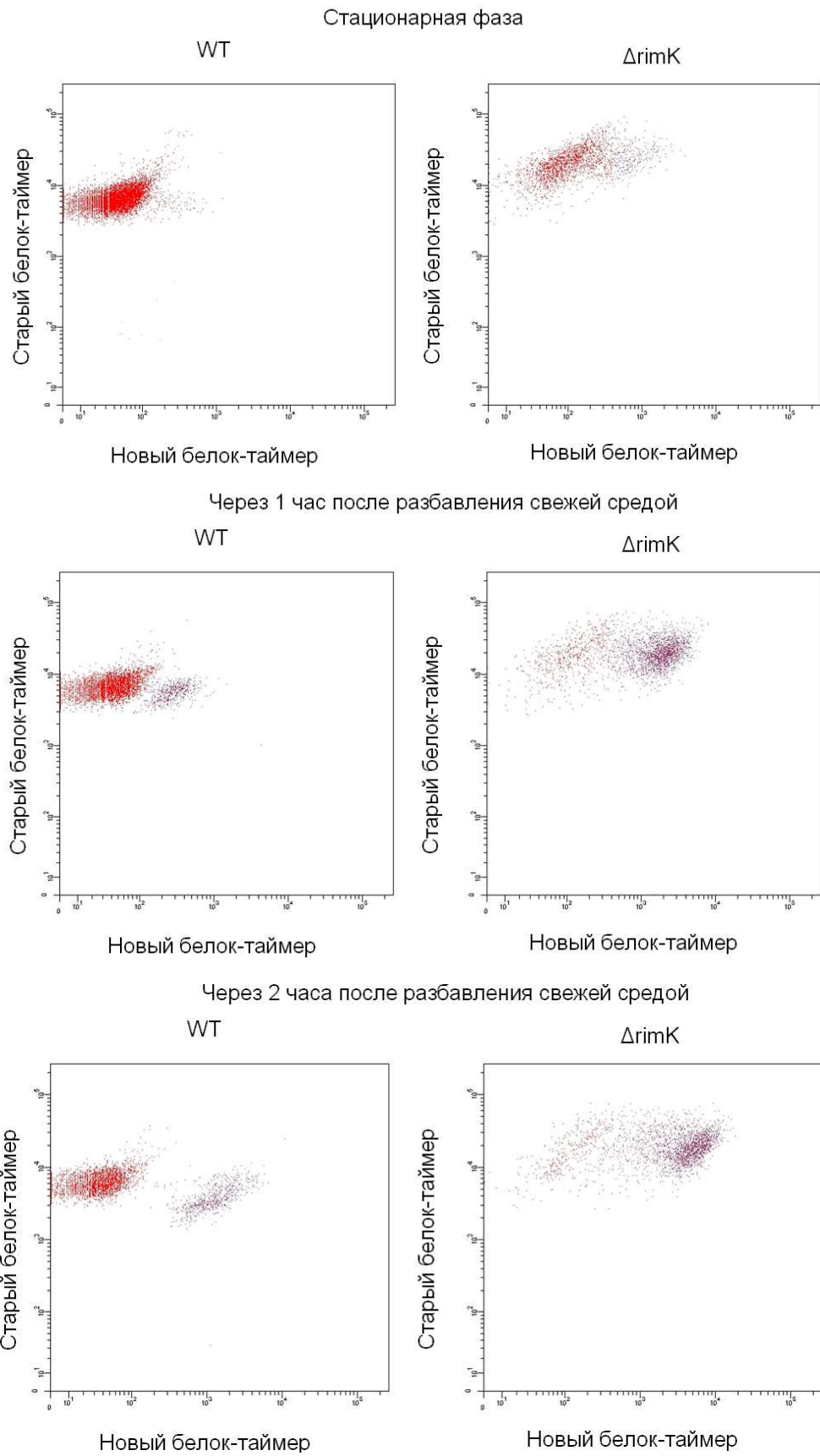


Рисунок 15. Результаты проточной цитометрии клеток дикого типа и $\Delta rimK$, синтезирующих флуоресцентный белок-таймер FastFT.

Интересно отметить, что морфология клеток дикого типа и *ΔrimK*, экспрессирующих FastFT, сильно отличается (рис. 16). На изображениях, полученных методом флуоресцентной микроскопии, видно, что клетки дикого типа в стационарной фазе имеют характерную для *E. coli* вытянутую форму, красный FastFT равномерно распределён по объёму клетки. Клетки *ΔrimK* в аналогичных условиях имеют очень необычную морфологию, они сильно удлинены, центральная часть заполнена синтезированным в логарифмической фазе роста красным FastFT. На периферии клетки наблюдаются локусы, заполненные недавно синтезированным голубым FastFT. При помещении клеток *ΔrimK* в свежую среду, эти локусы начинают увеличиваться в размерах. В клетках дикого типа такого разделения клетки не наблюдается, а новый белок-таймер начинает равномерно синтезироваться по всему объёму цитоплазмы.

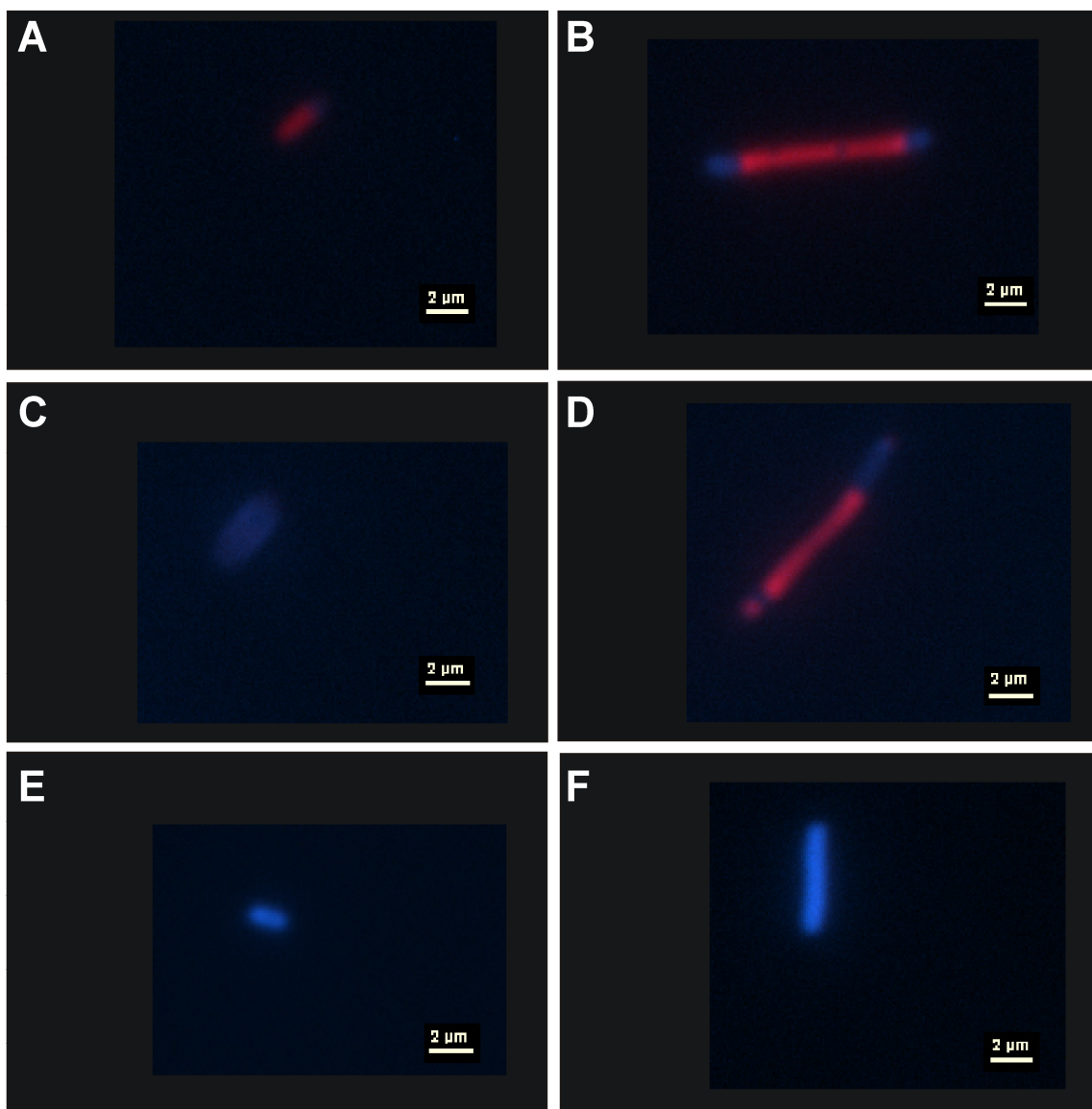


Рисунок 16. Морфология клеток дикого типа и *ΔrimK*, экспрессирующих флуоресцентный белок-таймер FastFT. Синие области соответствуют недавно синтезированному FastFT, красные – старому FastFT. (A) Клетки дикого типа в стационарной фазе. (B) Клетки *ΔrimK* в стационарной фазе. (C, E) Клетки дикого типа через 1 и 7 часов после разбавления свежей средой с арабинозой, соответственно. (D, F) Клетки *ΔrimK* через 1 и 7 часов после разбавления свежей средой с арабинозой, соответственно.

Для перехода клетки в спящее состояние ей нужно свести к минимуму все клеточные процессы, требующие затрат энергии, в том числе и процесс биосинтеза белка.

Как мы показали ранее, олигоглутамилирование белка S6 приводит к снижению трансляционной активности рибосомы. Видимо, поэтому в клетках из штамма *ΔrimK* механизм образования спящих клеток нарушен.

В естественных условиях бактерии редко сталкиваются с избытком питательных веществ, гораздо чаще приходится иметь дело с дефицитом ресурсов. Адаптация к изменению окружающей среды необходима для выживания бактериальной культуры. Одной из важнейших составляющих этой адаптации является прекращение процесса трансляции, поскольку синтез белка требует огромных затрат ресурсов. Именно поэтому олигоглутамилирование рибосомного белка S6 происходит в стационарной фазе роста, что вызывает подавление трансляции. Модификация белка S6 важна для выживания клеток в условиях дефицита ресурсов. Отсутствие модификации S6 приводит к нарушению нормального ингибирования трансляции в стационарной фазе, что приводит к истощению клеточных ресурсов. Возможно, именно поэтому выживаемость клеток *ΔrimK* в стационарной фазе ниже, чем клеток дикого типа, и они проигрывают последним в конкурентной борьбе.

Мы показали, что для ингибирования трансляции рибосом с олигоглутамилированным белком S6 никаких дополнительных факторов не требуется. Таким образом, модификация белка S6 сама по себе ингибирует активность рибосомы в стационарной фазе. С-конец рибосомного белка S6 не разрешён на имеющихся трёхмерных моделях бактериальной рибосомы, но его примерное положение в пространстве件нятно. Белок S6 располагается на платформе малой субчастицы рибосомы близко к месту связывания 5'-нетранслируемой области мРНК в процессе инициации трансляции. Закодированный в геномной ДНК С-концевой участок белка S6, DDAEAGDSEE, сам по себе достаточно кислый, причём два концевых остатка глутаминовой кислоты уже содержатся в нём. Суммарный заряд С-концевого участка в физиологических условиях равен -6. Посттрансляционное добавление остатков глутаминовой кислоты приводит к дополнительному увеличению отрицательного заряда. Одним из наиболее вероятных объяснений ингибирования трансляции может быть электростатическое отталкивание отрицательно заряженной мРНК от её сайта связывания на рибосоме (рис. 17).

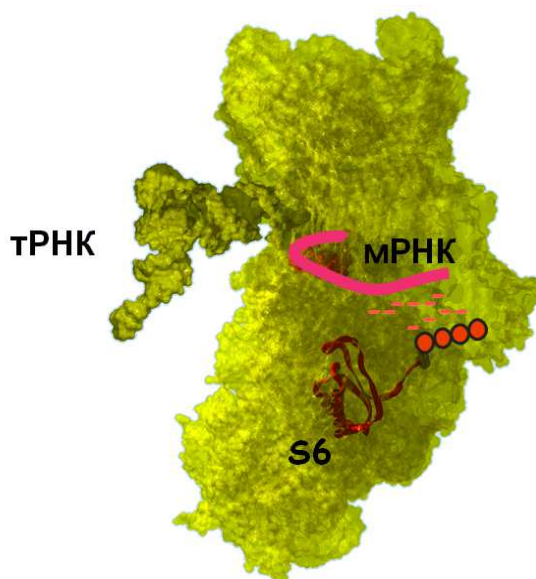


Рисунок 17. Пространственная близость С-конца белка S6 с местом посадки мРНК

Переход из стационарной фазы в состояние активного роста бактериальной культуры имеет свои подводные камни. Активно метаболизирующие и делящиеся клетки

становятся мишенью для многочисленных антибиотиков. Эволюцией придумана стратегия защиты бактериальной культуры, основанная на минимизации рисков. Для этого в растущей популяции всегда присутствуют «спящие» клетки, в которых сведён к минимуму метаболизм, и которым проще пережить неблагоприятные условия, в частности, действие антибиотиков. Такое разделение популяции на спящие и делящиеся клетки позволяет увеличить для бактериальной культуры шанс выжить в постоянно меняющихся внешних условиях. Мы показали, что этот механизм защиты нарушен в клетках *ΔrimK*. Популяция клеток, в которых не происходит олигоглутамилирования белка S6, при попадании в благоприятные условия не разделяется на субпопуляции спящих и делящихся клеток, все клетки начинают активно синтезировать белок. Возможно, это происходит потому, что у них нарушен механизм ингибирования трансляции. Олигоглутамилирование белка S6 важно для образования спящих клеток, а значит, для реализации стратегии минимизации рисков в бактериальной культуре.

Спящие бактериальные клетки, не чувствительные к антибиотикам, являются серьёзной проблемой в терапии инфекционных болезней. Фермент RimK, который участвует в подавлении биосинтеза белка в клетке, может быть перспективной мишенью для направленного создания ингибиторов. Этот подход может быть полезен в дальнейшем развитии антибактериальной терапии.

Для эукариот описано множество посттрансляционных модификаций белков (в основном, фосфорилирования), которые осуществляются в регуляторных целях. Например, фосфорилирование эукариотического рибосомного белка S6, являющееся следствием запуска mTOR-пути, приводит к активации трансляции и оказывает влияние на многие клеточные процессы, такие как пролиферация и гомеостаз глюкозы в клетке. Для прокариотических рибосомных белков подобной регуляции трансляции посредством посттрансляционной модификации до сих пор не было описано. Известен пример регулируемой модификации рибосомного белка – ацетилирование белка L12, которое происходит в стационарной фазе роста, но функция этой модификации остаётся неизвестной. Таким образом, олигоглутамилирование рибосомного белка S6 – первая описанная регулируемая посттрансляционная модификация бактериального рибосомного белка, являющаяся частью системы регуляции трансляции.

ВЫВОДЫ

1. Показана регуляция модификации рибосомного белка S6. S6 олигоглутамилирован в стационарной фазе роста и не модифицирован в логарифмической.
2. Установлено, что олигоглутамилирование рибосомного белка S6 необратимо. При переходе культуры клеток из стационарной фазы роста в логарифмическую модифицированный белок разбавляется вновь синтезированным немодифицированным S6.
3. Создана система *in vitro* модификации рибосомного белка S6. Для модификации белка S6 используется свободная глутаминовая кислота и АТФ.
4. Установлено, что белок S6 олигоглутамилируется только в составе уже собранной рибосомы, свободный белок S6 не подвергается модификации.
5. Продемонстрировано, что олигоглутамилирование белка S6 в стационарной фазе роста приводит к снижению активности рибосомы.
6. Обнаружено, что модификация белка S6 способствует переходу бактериальной клетки в «спящее» состояние.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Нестерчук М.В., Сергиев П.В., Донцова О.А. Посттрансляционные модификации рибосомных белков *Escherichia coli*. // *Acta Naturae*. 2011. Т. 3. № 2 (9). С. 24-35
2. Сергиев П.В., Остерман И.А., Прохорова И.В., Нестерчук М.В., Сергеева О.В., Головина А.Я., Дёмина И.А., Галямина М.А., Серебрякова М.В., Донцова О.А. Опыт изучения методами системной биологии функциональной роли ферментативной модификации бактериальной рибосомы. // *Биоорганическая химия*. 2011. Т. 37. №1. С. 81-90.
3. Sergiev P.V., Golovina A.Y., Sergeeva O.V., Osterman I.A., Nesterchuk M.V., Bogdanov A.A., Dontsova O.A. How much can we learn about the function of bacterial rRNA modification by mining large-scale experimental datasets? *Nucleic Acids Res.* 2012. V. 40. P. 5694-5705.
4. Sergiev P.V., Golovina A.Y., Prokhorova I.V., Sergeeva O.V., Osterman I.A., Nesterchuk M.V., Burakovsky D.E., Bogdanov A.A. and Dontsova O.A. // *Modifications of Ribosomal RNA: From Enzymes to Function*; In: Rodnina M., Wintermeyer W., Green R. (Editors). *Ribosomes. Structure, Function, and Dynamics*. Springer Verlag, Wien. 2011. P. 97-110.
5. Нестерчук М.В. Изучение посттрансляционной модификации рибосомного белка S6 *E. coli*. Международная конференция молодых учёных по фундаментальным наукам «Ломоносов-2010». Секция «Химия». 12-15 апреля 2010. Москва, Россия.
6. Нестерчук М.В., Сергиев П.В., Донцова О.А. Изучение роли незакодированных в геноме аминокислотных остатков рибосомного белка S6 *E. coli*. Международная школа-конференция молодых учёных по молекулярной генетике «Непостоянство генома». 3-7 декабря 2012. Звенигород, Россия.
7. Nesterchuk M.V., Sergiev P.V., Dontsova O.A. Posttranslational modification of protein S6 in *E. coli* leads to suppression of translation in stationary phase. FEBS Congress 2013 “Mechanisms in Biology”. 6-11 July 2013. Saint Petersburg, Russia.
8. Sergiev P.V., Nesterchuk M.V., Osterman I.A., Haliullin B.G., Evfratov S.A., Bogdanov A.A., Dontsova O.A. Modification of bacterial ribosome in control of the stationary phase translation. *Ribosomes 2013*. 9–12 July 2013. Napa Valley, USA.