

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

Химический факультет
Кафедра Химии природных соединений

На правах рукописи

НЕСТЕРЧУК МИХАИЛ ВАСИЛЬЕВИЧ

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

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Специальность 02.00.10 – биоорганическая химия

Научный руководитель:
доктор химических наук,
профессор Сергиев П.В.

Москва 2014

Содержание

Список принятых сокращений.....	5
Введение	6
1. Обзор литературы. Посттрансляционные модификации рибосомных белков	
<i>Escherichia coli</i>	8
Введение.....	8
1.1. Процессинг N-конца рибосомных белков.....	10
1.2. Процессинг С-конца белка L31	12
1.3. Метилирование рибосомных белков	14
1.3.1. Метилирование белка L11	15
1.3.2. Метилирование белка L3	19
1.3.3. Метилирование белка S11 и образование изомерной пептидной связи	22
1.3.4. Метилирование белка L7/L12.....	24
1.3.5. Метилирование белков L16 и L33	25
1.4. Ацетилирование рибосомных белков.....	26
1.4.1. Ацетилирование белка S5.....	27
1.4.2. Ацетилирование белка S18.....	29
1.4.3. Ацетилирование белка L12.....	32
1.5. Гидроксилирование белка L16.....	34
1.6. Метилтиолирование белка S12	36
1.7. Олигоглутамилирование белка S6.....	42
Заключение.....	47
2. Обсуждение результатов	48
Введение.....	48
2.1. Зависимость модификации белка S6 от стадии роста бактериальной культуры	51
2.2. Определение субстратной специфичности фермента RimK.....	53
2.3. Влияние олигоглутамилирования белка S6 на процесс трансляции.....	55
2.4. Влияние модификации белка S6 на активность рибосом in vitro	60
2.5. Влияние модификации белка S6 на выживаемость бактериальной культуры в условиях дефицита ресурсов	66
2.6. Связь модификации белка S6 с образованием спящих бактериальных клеток	69
Заключение.....	78

3. Материалы и методы	81
3.1. Реактивы и биопрепараты.....	81
3.1.1. Реактивы.....	81
3.1.2. Буферы и растворы.....	81
3.1.3. Штаммы и плазмиды.....	84
3.1.4. Олигонуклеотиды.....	85
3.2. Методики, использованные в работе.....	86
3.2.1. Манипуляции с ДНК.....	86
3.2.1.1. Выделение плазмидной ДНК.....	86
3.2.1.2. Определение концентрации ДНК в растворе.....	86
3.2.1.3. Рестриктный анализ плазмидной ДНК.....	86
3.2.1.4. Разделение фрагментов ДНК в агарозном геле.....	87
3.2.1.5. Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля.....	87
3.2.1.6. Приготовление вектора и вставки.....	87
3.2.1.7. Лигирование.....	87
3.2.1.8. ПЦР.....	88
3.2.1.9. Мутагенез с помощью набора QuickChange (Stratagene).....	88
3.2.1.10. Секвенирование плазмид и ПЦР-продуктов.....	89
3.2.1.11. Приготовление компетентных клеток.....	89
3.2.1.12. Трансформация компетентных клеток.....	89
3.2.2. Получение модельных штаммов <i>ΔrimK-S6-cat</i> и <i>ΔrimK-S6-E₄-cat</i>	90
3.2.2.1. Получение кассеты для трансформации.....	90
3.2.2.2. Внесение кассеты в геномную ДНК.....	90
3.2.2.1. Анализ полученных клонов.....	91
3.2.3. Получение плазмиды для экспрессии гена <i>rimK</i>	91
3.2.4. Работа с клеточными культурами.....	92
3.2.4.1. Определение титра клеток.....	92
3.2.4.2. Измерение выживаемости клеток в стационарной фазе роста.....	92
3.2.4.3. Измерение скорости вытеснения клеток <i>ΔrimK</i> клетками дикого типа при совместном культивировании.....	92
3.2.4.4. Определение количества спящих клеток (ампициллиновый тест).....	92
3.2.4.5. Определение количества спящих клеток с помощью проточной цитометрии.....	93
3.2.5. Выделение рибосом, белков, клеточных экстрактов.....	93
3.2.5.1. Выделение фракции рибосом.....	93

3.2.5.2. Выделение суммарного рибосомного белка	94
3.2.5.3. Белковый электрофорез в ПААГ в денатурирующих условиях.....	94
3.2.5.4. Иммуноблоттинг	94
3.2.5.5. Двумерный дифференциальный гель-электрофорез	95
3.2.5.6. Окрашивание белковых ПААГ серебром	96
3.2.5.7. Идентификация белковых зон в ПААГ	96
3.2.5.8. Мечение флуоресцентной меткой вновь синтезированных белков.	96
3.2.5.9. Выделение рекомбинантного фермента RimK с помощью Ni-NTA агарозы	97
3.2.5.10. Приготовление клеточного экстракта S30	97
3.2.5.11. In vitro трансляция	98
3.2.5.12. Проведение модификации белка S6 in vitro	98
4. Выводы	99
Список литературы.....	100

Список принятых сокращений

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК – рибонуклеиновая кислота
рРНК – рибосомная РНК
мРНК – матричная РНК
тРНК – транспортная РНК
50S – большая субчастица рибосомы
30S – малая субчастица рибосомы
S1-S21 – белки малой субчастицы рибосомы
L1-L36 – белки большой субчастицы рибосомы
IF2 – инициаторный фактор 2
EF-Tu – элонгационный фактор Tu
EF-G – элонгационный фактор G
RF3 – фактор терминации 3
SAM – S-аденозилметионин
Да, кДа – дальтон, килодальтон
ДМСО – диметилсульфоксид
SDS – додецилсульфат натрия
HPG - гомопропаргилглицин
БСА – бычий сывороточный альбумин
DTT – 1,4-дитиотреитол
ИПТГ – изопропил-1-тио-β-D-галактопиранозид
ПААГ – полиакриламидный гель
TEMED – N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамид
ЭДТА – этилендиаминтетраацетат натрия
NEPES – N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота
Tris – трис(гидроксиметил)аминометан
АТФ – аденозин-5'-трифосфат
АДФ- аденозин-5'-дифосфат
ГТФ – гуанозин-5'-трифосфат
ЦТФ – цитидин-5'-трифосфат
УТФ – уридин-5'-трифосфат
УФ – ультрафиолет
E. coli – *Escherichia coli*

Введение

Биосинтез белка – один из ключевых процессов в живых организмах. Генетическая информация хранится и передаётся 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, но для многих из них предполагается регуляторная роль.

Помимо вышеописанных модификаций компонентов рибосомы существуют и более специфические. Рибосомный белок S6 *E. coli* подвергается уникальной посттрансляционной модификации. Специальный фермент RimK присоединяет дополнительные остатки глутаминовой кислоты к его С-концу. Данная работа посвящена

изучению функциональной роли олигоглутамилирования рибосомного белка S6. Была выяснена регуляция этой модификации, субстратная специфичность фермента RimK, а также установлена роль данной посттрансляционной модификации в подавлении трансляции в неблагоприятных условиях.

1. Обзор литературы.

Посттрансляционные модификации рибосомных белков *Escherichia coli*

Введение

Рибосома – сложная молекулярная машина, отвечающая за правильный перевод генетической информации с последовательности нуклеотидов мРНК в последовательность аминокислот синтезируемого белка. Она представляет собой комплекс рибосомных РНК и белков, который состоит из двух неравных частей (большой и малой субчастиц). В *E. coli* малая субчастица состоит из 16S рРНК и 21 белка (обозначаемых S1-S21), а большая – из 5S и 23S рРНК и 33 различных белков (L1-L36). Как рРНК, так и рибосомные белки подвержены ферментативной модификации в клетке (табл. 1). Больше половины рибосомных белков подвергаются отщеплению N-концевого метионина. Шесть рибосомных белков метилированы (S11, L3, L11, L12, L16, L33), три – ацетилированы (S5, S18 и L7), один метилтиолирован (S12), один гидроксигликозилирован (L16), к одному добавляются дополнительные аминокислотные остатки (S6), один подвергается частичному протеолизу (L31). Природа некоторых модификаций рибосомных белков *E. coli* до сих пор не установлена [1].

В большинстве случаев идентифицированы гены, которые кодируют ферменты, осуществляющие ту или иную модификацию. Как правило, мутации в этих генах не летальны для клетки, но зачастую ведут к небольшим фенотипическим отличиям от дикого типа (скорость роста, чувствительность к стрессовым условиям). Это говорит о регуляторной роли, которую выполняют посттрансляционные модификации.

В обзоре литературы мы постарались собрать всю имеющуюся на сегодняшний день информацию о посттрансляционных модификациях рибосомных белков *E. coli* и о ферментах, осуществляющих эти модификации.

Таблица 1. Посттрансляционные модификации рибосомных белков *E. coli*

Белок	Положение модификации	Модификация	Модифицирующий фермент
S5	N-концевая аминокетильная группа	Ацетилирование	RimJ
S6	C-конец	Добавление дополнительных остатков глутаминовой кислоты	RimK
S11	N-концевая аминокетильная группа	Метилирование, образование изопептидной связи.	Не установлен
		Образование остатка изоаспартата	Не установлен
S12	Asp88	Метилтиолирование	RimO
S18	N-концевая аминокетильная группа	Ацетилирование	RimI
L3	Gln150	Метилирование	PrmB
L7/L12	Lys81	Метилирование	Не установлен
L11	Ala1, Lys3, Lys39	Метилирование	PrmA
L12	N-концевая аминокетильная группа	Ацетилирование	RimL
L16	N-концевая аминокетильная группа	Метилирование	Не установлен
L16	Arg81	Гидроксилирование	YcfD
L31	C-конец	Удаление аминокислотных остатков	Не установлен
L33	N-концевая аминокетильная группа	Метилирование	Не установлен

1.1. Процессинг N-конца рибосомных белков

Самый распространённый тип посттрансляционной модификации белков – удаление N-концевого остатка метионина, осуществляемое ферментом метионин аминопептидазой (MAP). В случае рибосомных белков *E. coli* оно наблюдается в 34 случаях из 56 (данные представлены в табл. 2).

Эта модификация наиболее часто встречается в том случае, когда следующий за метионином аминокислотный остаток имеет короткую боковую цепь [2]. Большие по размеру боковые цепи в этом случае препятствуют попаданию белка в активный центр метионин аминопептидазы. Когда вторым аминокислотным остатком является аланин (21 случай), метионин всегда удалён. Аналогично в случае лейцина, пролина и глицина в положении 2. Если же за первым остатком следует лизин, изолейцин, глутамин, аргинин, аспарагиновая кислота, тирозин, глутаминовая кислота, фенилаланин или валин (20 случаев), то метионин всегда сохраняется. Когда серин находится в положении 2, в четырёх случаях из пяти метионин сохраняется. В случае белка L33 удаление остатка метионина осуществляется только для некоторой доли белковых молекул, часть цепей (не более 25%) остаётся с N-концевым метилированным метионином. Вероятно, это связано с конкуренцией N-концевого метилирования и отщепления метионина [3].

Таблица 2. Посттрансляционное удаление N-концевого остатка метионина в рибосомных белках *E. coli* [1].

Белок	Удаление Met	2-й остаток после Met
S1	?	Thr
S2	+	Ala
S3	+	Gly
S4	+	Ala
S5	+	Ala
S6	–	Arg
S7	+	Pro
S8	+	Ser
S9	+	Ala
S10	–	Gln
S11	+	Ala
S12	+	Ala

S13	+	Ala
S14	+	Ala
S15	+	Ser
S16	–	Val
S17	+	Thr
S18	+	Ala
S19	+	Pro
S20	+	Ala
S21	+	Pro
S22	–	Lys
L1	+	Ala
L2	+	Ala
L3	–	Ile
L4	–	Glu
L5	+	Ala

L6	+	Ser
L7	+	Ser
L9	-	Gln
L10	+	Ala
L11	+	Ala
L12	+	Ser
L13	-	Lys
L14	-	Ile
L15	-	Arg
L16	-	Ley
L17	-	Arg
L18	-	Asp
L19	-	Ser
L20	+	Ala
L21	-	Tyr
L22	-	Glu

L23	-	Ile
L24	+	Ala
L25	-	Phe
L26	+	Ala
L27	+	Ala
L28	+	Ser
L29	-	Lys
L30	+	Ala
L31	-	Lys
L32	+	Ala
L33	+	Ala
L34	-	Lys
L35	+	Pro
L36	-	Lys

1.2. Процессинг С-конца белка L31

Определённая химическим путём последовательность С-конца рибосомного белка L31 (...RFNK) [4] отличается от предсказанной из последовательности гена L31 (...RFNKRFNIPGSK). Был сделан вывод, что белок L31 подвергается процессингу С-конца (возможно, существует специфическая протеаза, удаляющая фрагмент RFNIPGSK). В последующей работе эти данные были опровергнуты, полученная последовательность остатков L31 согласуется с геномом [5]. Однако масс-спектрометрический анализ рибосомных белков показывает наличие двух пиков для L31: при 7871,1 Да, который соответствует полной последовательности L31, предсказанной из генома, и при 6971,1 Да, соответствующий фрагменту L31 без С-концевого участка ...RFNIPGSK [1]. По-видимому, процессинг белка L31 происходит частично.

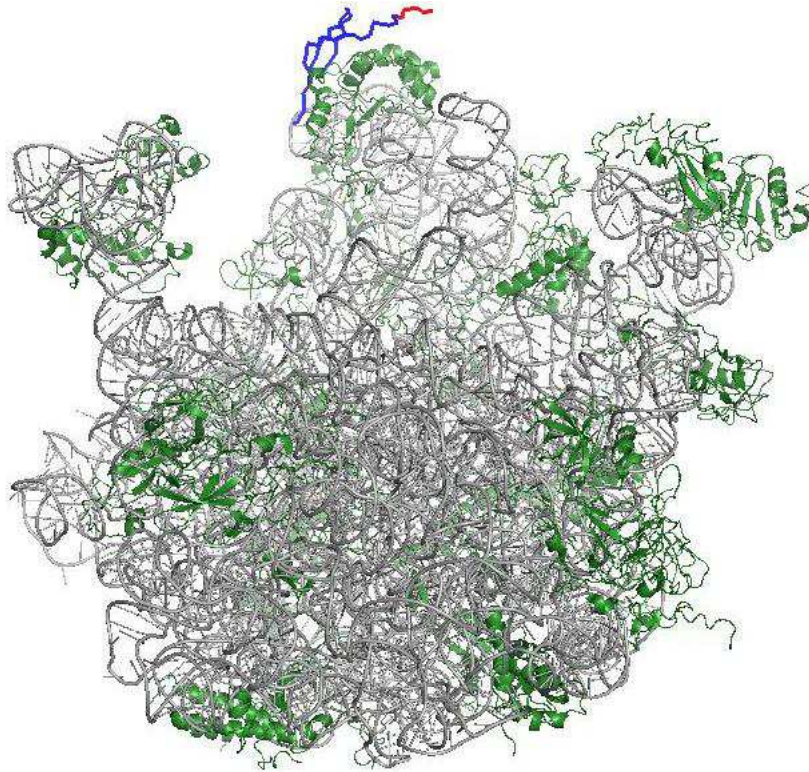


Рисунок 1.1. Расположение L31 на большой субчастице. Серым показана рРНК, зелёным – белки, синим – белок L31, красным – С-концевой остаток.

L31 – малоизученный компонент бактериальной рибосомы. Известно, что он образует рибонуклеопротеидный комплекс с белками L5, L18, L25 и 5S рРНК, а также, что он располагается на вершине центрального протуберанца (рис. 1.1) в непосредственной близости с местом контакта субчастиц. Посттрансляционная модификация, возможно, служит для активации белка, либо играет регуляторную роль. Однако данных о функции сайт-специфического протеолиза L31, как и о его возможном механизме, нет.

Интересной особенностью белка L31 также служит наличие в геноме *E. coli* двух генов этого белка со сходной, но не идентичной последовательностью [6]. В белке L31, присутствующем в клетках в «обычных» лабораторных условиях культивирования, имеется мотив «цинковая лента». В условиях недостатка ионов цинка с помощью транскрипционного регулятора Zur активируется экспрессия другого варианта L31, лишённого «цинковой ленты». Это переключение, по-видимому, способствует более «экономному» использованию ионов цинка в клетке. Аналогичный механизм описан для рибосомного белка L36 [7].

1.3. Метилирование рибосомных белков

Метилирование – один из наиболее распространённых типов посттрансляционной модификации белков. Множество самых различных прокариотических и эукариотических белков метилированы. Метилирование рибосомных белков происходит во всех организмах. Оно осуществляется специальными ферментами (метилтрансферазами), которые используют S-аденозилметионин в качестве донора метильных групп. Выделяют 5 классов метилтрансфераз, отличающихся структурой и субстратной специфичностью.

Метилирование рибосомных белков, как правило, происходит по боковой аминогруппе лизина или аргинина, также часто встречается метилирование N-концевой аминогруппы. В *E. coli* метилированы шесть рибосомных белков (представлены в табл. 2) [8]. Для двух белков (L11 и L3) идентифицированы специфические метилтрансферазы (PrtmA и PrtMB, соответственно), найдены кодирующие их гены. Об остальных модификациях известно очень немного.

Некоторые метилированные рибосомные белки играют важную роль в функционировании рибосомы: L7/L12 и L11 взаимодействуют с факторами трансляции, L3 участвует в сборке рибосомы. Но, несмотря на то, что функции этих рибосомных белков в достаточной степени известны, биологическое значение их метилирования до сих пор не выяснено. Мутации в генах, кодирующих соответствующие метилтрансферазы, не приводят к заметным фенотипическим изменениям. Вероятно, метилирование регулирует внутри- и межмолекулярные взаимодействия в белке или влияет на его сродство к РНК, и, таким образом, действует на различные клеточные процессы, такие как регуляция трансляции, её точность, процессинг РНК и сборка рибосомы.

1.3.1. Метилирование белка L11

Наиболее сильно метилированный белок бактериального аппарата трансляции – рибосомный белок L11 [9]. Он содержит три метилированных по аминокислоте остатка: N-концевой остаток аланина триметилирован по α -аминогруппе, 3-й и 39-й остатки лизина триметилированы по ϵ -аминогруппам. Таким образом, всего к белку посттрансляционно присоединяется 9 метильных групп [10]. Метилирование осуществляется одним ферментом, который называется PrmA (protein modification). Этот фермент был выделен и охарактеризован [11]. Установлено, что это белок массой 31 кДа, использующий в качестве донора метильной группы S-аденозилметионин и преимущественно модифицирующий свободный белок L11. Последнее указывает на то, что метилирование предшествует встраиванию белка в рибосому [11].

Получен мутантный штамм *E. coli*, не содержащий метильных групп в белке L11. С помощью него определили положение гена *prmA*, кодирующего соответствующую метилтрансферазу [12].

Фермент PrmA обладает необычной субстратной специфичностью, которая позволяет ему модифицировать несколько аминокислотных остатков белка, находящихся на расстоянии друг от друга и имеющих различную природу (α - и ϵ -аминогруппы). Для этого фермент должен либо связываться с субстратом в нескольких разных ориентациях, либо для множественной модификации использовать систему гибкого субстратного позиционирования, позволяющую переориентировать субстрат относительно постоянного участка связывания. Строение PrmA и механизм его взаимодействия с субстратом был подробно изучен [13,14].

Метилтрансфераза PrmA состоит из двух доменов, соединённых гибким линкером (рис. 2). Большой каталитический C-концевой домен является типичным примером метилтрансфераз класса I. Семитяжевой β -лист фланкирован с обеих сторон α -спиралями. Небольшой дополнительный трёхтяжевой β -лист служит связующим звеном между C-концевым доменом и линкерной междоменной α -спиралью. Малый N-концевой домен состоит из четырёхтяжевого β -листа, фланкированного с одной стороны междоменной линкерной α -спиралью, с другой – N-концевой α -спиралью. N-концевой домен уникален для PrmA и способен распознавать и связывать белок L11 (рис. 1.2) [13]. С помощью биоинформатических методов установлено, что N-концевой домен PrmA по структуре напоминает V-домен фактора EF-G, который при связывании с рибосомой находится в непосредственной близости к белку L11 [15].

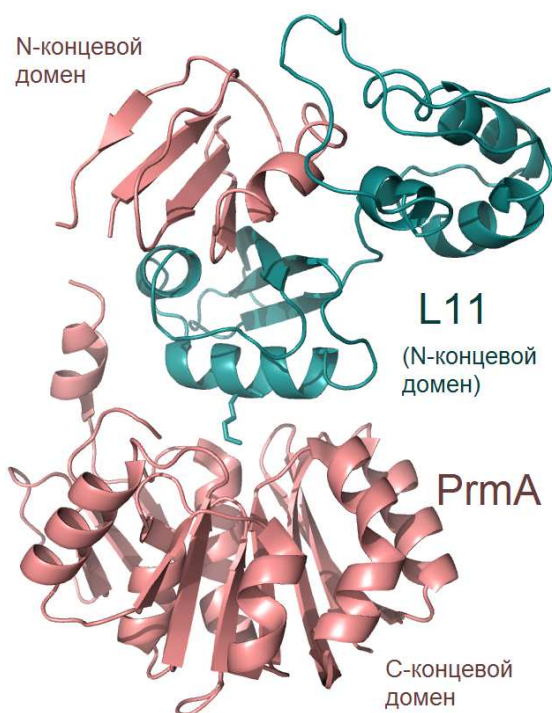


Рисунок 1.2. Структура PrmA в комплексе с N-концевым доменом L11 [13].

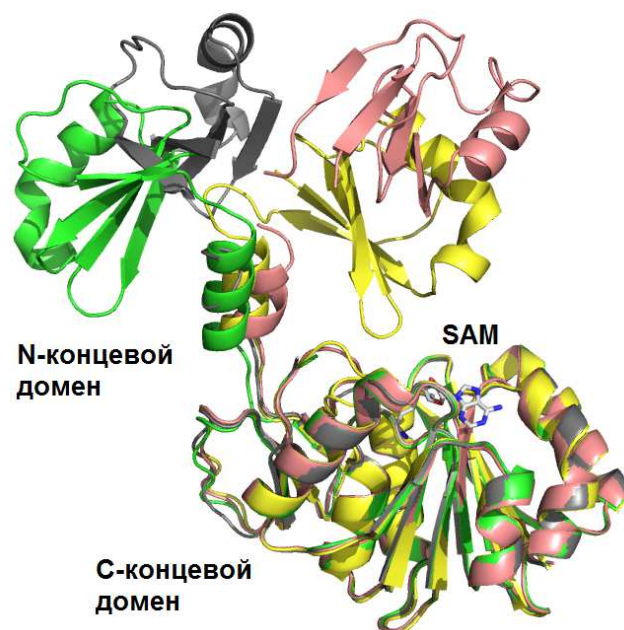


Рисунок 1.3. Наложение структур PrmA в различных конформациях. Зелёным и серым показаны 2 конформации PrmA в свободном состоянии, жёлтым – комплекс фермента и кофермента, розовым – в комплексе с субстратом. Видна высокая подвижность N-концевого домена [13].

Поверхность связывания N-концевого домена PrmA с белком L11 частично перекрывается с поверхностью связывания L11 с 23S рРНК. Поэтому PrmA модифицирует L11 только в свободном состоянии, до его встраивания в рибосому. Это подтверждает ранее полученные данные метилирования L11 *in vitro* [11]. Связывание N-концевого домена PrmA с L11 высокоспецифично, стабилизировано множеством водородных связей, тогда как каталитический С-концевой домен сам по себе не обладает специфичностью, его взаимодействие с субстратом стабилизировано лишь локальным гидрофобным взаимодействием (боковая цепь модифицируемого остатка лизина попадает в активный центр через туннель, образованный гидрофобными аминокислотными остатками, которые взаимодействуют с углеводородной цепью). За счёт гибкости междоменного линкера каталитический домен может изменять своё положение относительно связанного с L11 N-концевого домена и метилировать все доступные для него аминокислотные группы (рис. 1.3).

В структуре каталитического домена имеется специальный гидрофобный карман для связывания S-аденозилметионина, этот карман является открытым, то есть, возможен обмен между S-аденозилгомоцистеином (продуктом реакции) и S-аденозилметионином без нарушения фермент-субстратного комплекса. В активном центре PrmA нет атомов, затрудняющих вращение метилированной аминогруппы, это позволяет однажды связавшемуся с субстратом ферменту сразу триметилировать его. Для осуществления метилирования аминогруппы необходимо наличие в каталитическом центре основного аминокислотного остатка, акцептирующего протон с атома азота. Роль такого остатка, очевидно, выполняет His104, находящийся в активном центре напротив участка связывания кофактора.

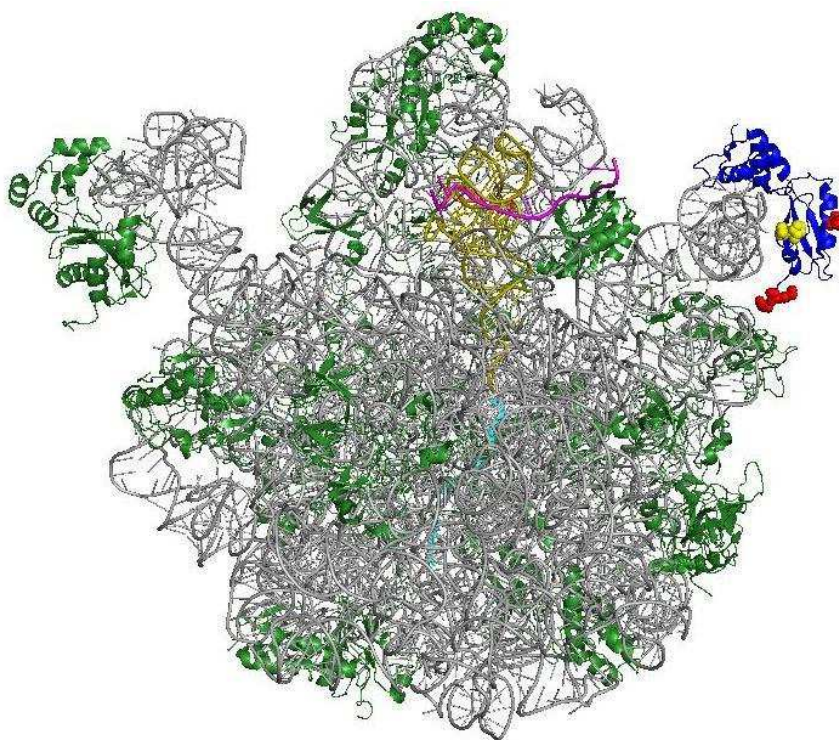


Рисунок 1.4. Расположение L11 на большой субчастице. Серым показана рРНК, зелёным – белки, жёлтым – тРНК в Р-участке, фиолетовым – мРНК, циановым – синтезируемый пептид, синим – белок L11, красными сферами – метилированные остатки, жёлтыми сферами – остатки в L11, мутации в которых приводят к устойчивости к тиострептону.

Таким образом, метилирование, осуществляемое ферментом PrmA, является редким примером одновременного специфического узнавания мишени и множественной модификации субстрата за счёт разделения в пространстве участка связывания и каталитического центра, а так же их взаимной подвижности. Одна молекула

метилтрансферазы способна последовательно ввести 9 метильных групп в белок L11 без диссоциации фермент-субстратного комплекса.

Белок L11 – это консервативный компонент большой субчастицы бактериальной рибосомы и активный участник взаимодействия рибосомы с факторами инициации, элонгации и терминации трансляции. Он состоит из двух доменов, соединённых между собой гибким линкером: С-концевой, связывающий 23S РНК и N-концевой, взаимодействующий с трансляционными факторами [13]. Последний является мишенью антибиотика тиострептона, который ингибирует связывание EF-G с рибосомой (устойчивость к тиострептону обеспечивается рядом мутаций в N-концевом домене белка L11) [16] (рис. 1.4). Методом криоэлектронной микроскопии показан прямой контакт между N-концевым доменом L11 и факторами EF-G [15] и EF-Tu [17].

Все аминокислотные остатки, которые триметилируются PrmA, находятся в N-концевом домене. Такое расположение модифицированных остатков рядом с местом контакта с факторами трансляции может указывать на функциональную роль метилирования. Структура PrmA является консервативной у всех бактерий, что также может свидетельствовать о его вкладе в функционирование L11. Но, тем не менее, функция модификации, осуществляемой ферментом PrmA, до сих пор не установлена. Штамм с мутацией гена *prmA* не только жизнеспособен, но и не обладает никакими заметными отличиями от дикого типа (одинаковая скорость роста, одинаковое поведение в стрессовых условиях) [18,19]. Это означает, что множественное метилирование L11 не является необходимым для нормального функционирования рибосомы. В то же время оно может оказывать влияние на скорость и точность некоторых этапов работы рибосомы, таких как декодирование и транслокация. Такое влияние может быть зафиксировано только с применением очень точного кинетического анализа *in vitro* либо введением специфических мутаций в белок L11 или другие компоненты аппарата трансляции *in vivo* [13].

1.3.2. Метилирование белка L3

К рибосомному белку L3 посттрансляционно добавляется одна метильная группа [20]. Метилирование происходит по амидной группе 150-го остатка глутамина [21]. Модификация осуществляется специфической метилтрансферазой PrmB [12]. PrmB – первая описанная в литературе метилтрансфераза, мишенью которой является амидный атом азота.

В штамме, содержащем мутацию в гене *prmB*, отсутствие метилирования в белке L3 сочетается с чувствительностью к холоду. Скорость роста мутантных клеток при 22°C значительно ниже, чем у клеток дикого типа [22,23]. Это связано с тем, что сборка рибосом в мутантных клетках происходит неэффективно в условиях низкой температуры, при этом образующиеся промежуточные рибонуклеопротеидные комплексы отличаются по структуре и стабильности от соответствующих интермедиатов в диком типе в этих же условиях. Тем не менее, полностью сформированные при пониженной температуре мутантные рибосомы не отличаются по стабильности от рибосом дикого типа. Разницы в скорости трансляции, её точности так же не наблюдается ни *in vivo*, ни *in vitro* [22].

Исследование активности фермента PrmB *in vitro* показало, что метилирование белка L3 в свободном состоянии не происходит. Полностью собранную рибосому метилтрансфераза также не модифицирует. Наибольшая активность наблюдается в случае неполностью собранной рибосомы, а также при наличии в реакционной смеси РНК (любой, не обязательно рибосомной) [22].

Белок L3 связывается с 3'-концевым участком 23S рРНК на самом первом этапе сворачивания структуры и является, наряду с L24, инициатором всего процесса сборки рибосомы [24].

Из вышесказанного можно сделать вывод, что *in vivo* PrmB осуществляет метилирование L3, связываясь с рибосомой на одном из промежуточных этапов её сворачивания, и тем самым, вероятно, оказывает определённое влияние на правильность её упаковки. Таким образом, фермент PrmB можно отнести к факторам сборки рибосомы.

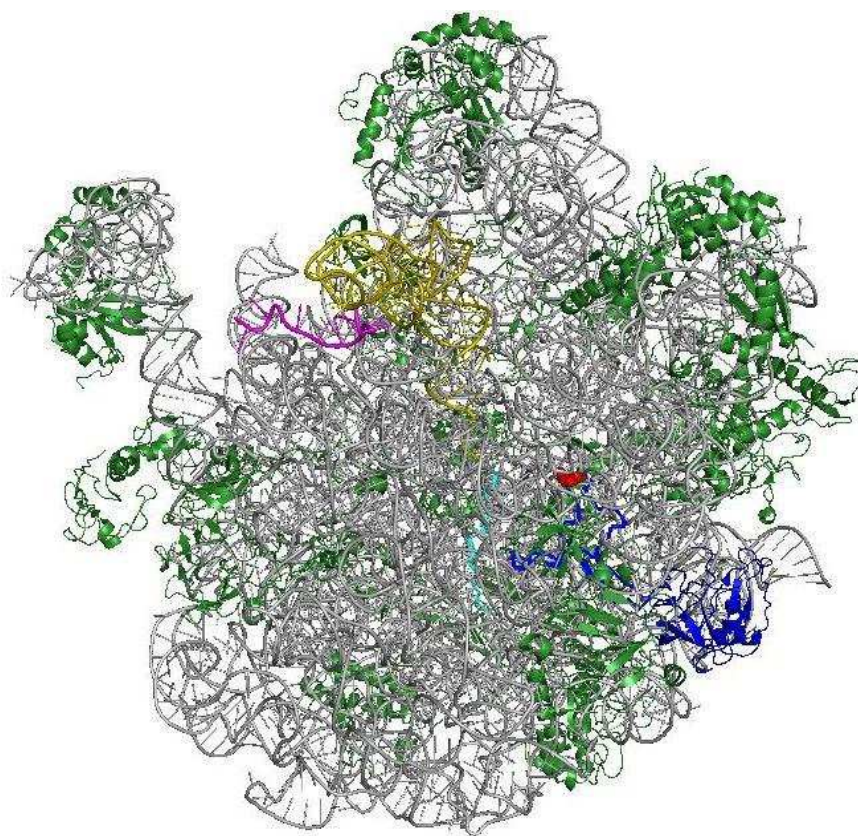


Рисунок 1.5. Расположение L3 на большой субчастице. Серым показана рРНК, зелёным – белки, жёлтым – тРНК в Р-участке, фиолетовым – мРНК, циановым – синтезируемый пептид, синим – белок L3, красными сферами – метилированный остаток.

Белок L3 имеет глобулярный домен, располагающийся на поверхности рибосомы, и длинный глубоко погружённый внутрь отросток. Модифицированный 150-й остаток глутамина располагается внутри рибосомы рядом с туннелем для растущей полипептидной цепи (рис. 1.5) и образует контакты с нуклеотидными остатками G2032, C2055 и A2572, которые находятся в 3'-концевой области 23S рРНК (рис. 1.6). Очевидно, этот остаток вносит вклад в формирование и поддержание правильной конформации рРНК.

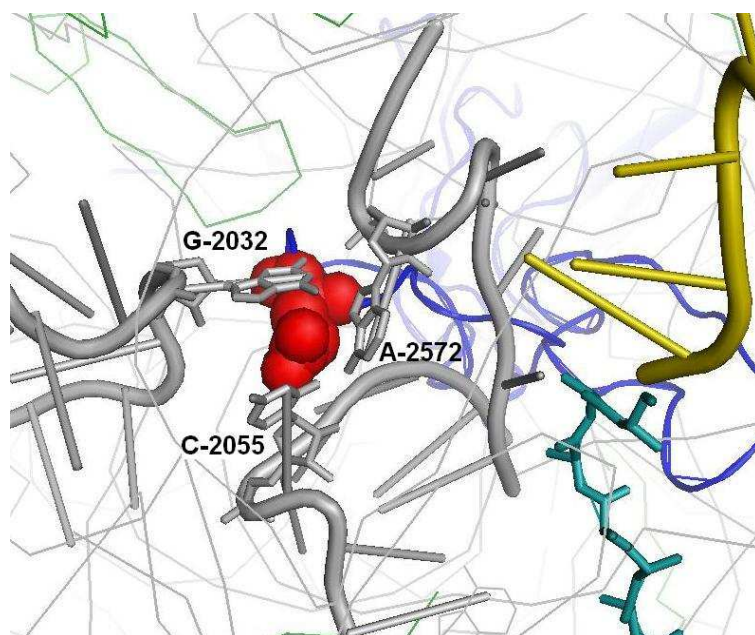


Рисунок 1.6. Расположение метилированного остатка L3 в рибосоме. Серым показана рРНК, жёлтым – тРНК в Р-участке, циановым – синтезируемый пептид, синим – белок L3, красными сферами – метилированный остаток.

1.3.3. Метилирование белка S11 и образование изомерной пептидной связи

Рибосомный белок S11 метилирован по N-концевой аминогруппе остатка аланина. Помимо метилирования наблюдается образование изопептидной связи, что является уникальным случаем в *E. coli*. При этом разрушается пептидная связь между первым остатком аланина и вторым остатком лизина (рис. 1.7) [25].

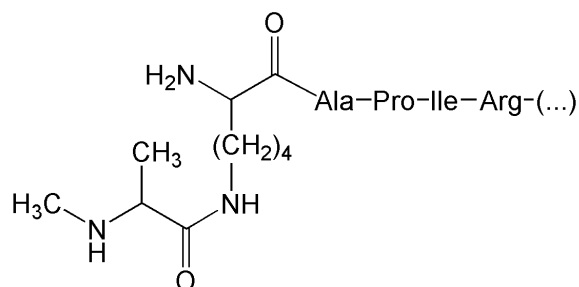


Рисунок 1.7. Структура метилированного N-концевого остатка S11, образующего изопептидную связь [25].

В работе [26] сообщается, что в белке S11 обнаружен остаток изоаспартата. На один моль белка его приходится 0,5 моль. При этом показано, что в логарифмической фазе роста S11 – единственный белок, имеющий такую модификацию.

Ферменты, осуществляющие перечисленные модификации не найдены. Функциональная роль модификаций также не установлена.

Белок S11 находится в непосредственной близости с мРНК и тРНК в E-участке (рис. 1.8). Его N-конец, выступающий на поверхность рибосомы, не виден в кристаллической структуре и, вероятно, не имеет фиксированной ориентации. Маловероятно, что модифицированный остаток вносит вклад в поддержание структуры рибосомы. Возможно, метилированный N-конец S11 взаимодействует с тРНК и облегчает её выход из E-участка.

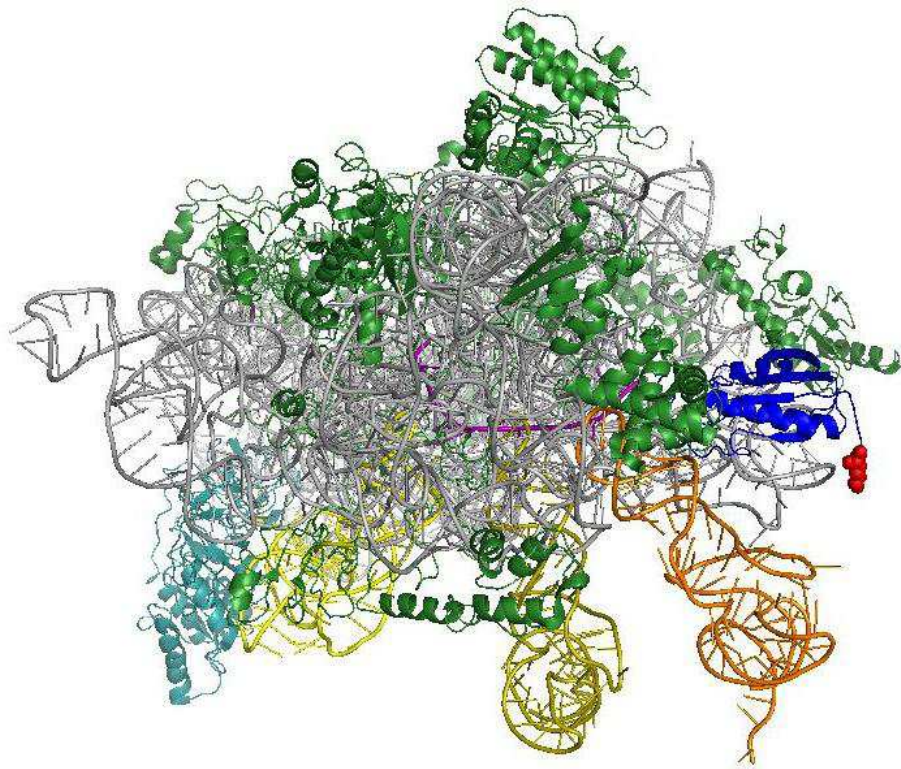


Рисунок 1.8. Расположение S11 на малой субчастице. Серым показана рРНК, зелёным – белки, оттенками жёлтого – тРНК, фиолетовым – мРНК, циановым – EF-Tu, синим – белок S11, красными сферами – N-концевой остаток.

1.3.4. Метилирование белка L7/L12

Рибосомный белок L7/L12 монометилирован по ϵ -аминогруппе 81-го остатка лизина. Степень метилирования сильно зависит от температуры. При 37°C модификации практически не наблюдается (меньше 0,1 метильной группы на белок). С понижением температуры количество вводимых групп резко увеличивается. Так при 27°C оно составляет 0,6 остатков монометиллизина на белок [27]. Фермент, осуществляющий эту модификацию, не установлен.

Примечательно, что белки L7 и L12, одинаковые по структуре и отличающиеся только наличием ацетильной группы на N-концевой аминокислоте (подробнее про это в разделе 1.4.3. Ацетилирование белка L12) подвергаются метилированию в разной степени. Преимущественно метилирован L12 (неацетилированная форма), тогда как только малая часть L7 содержит модификацию [28].

В составе рибосомы белок L7/L12 находится в виде тетрамера, представляющего собой палочковидный отросток, так называемый «L7/L12-стебель» (рис. 1.15). Каждая цепь в составе тетрамера состоит из двух доменов: N-концевого, связывающегося с белком L10, и C-концевого. Домены соединены гибким линкером, позволяющим C-концевым доменам свободно изменять своё положение относительно большой субчастицы. Таким образом, L7/L12 – единственный рибосомный белок, не контактирующий непосредственно с рРНК, он связан с ней через комплекс с белком L10. Этот комплекс выполняет важную роль в процессе трансляции, он участвует в связывании с рибосомой трансляционных факторов (IF2, EF-Tu, EF-G и RF3) [29]. Метилированные остатки располагаются в C-концевом домене (рис. 1.9) и, возможно, вносят свой вклад во взаимодействие с трансляционными факторами.

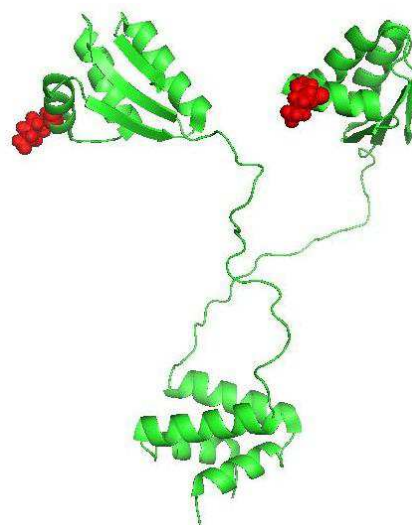


Рисунок 1.9. Димер L7/L12. Красными сферами показаны метилированные остатки.

1.3.5. Метилирование белков L16 и L33

Рибосомные белки L16 и L33 подвергаются метилированию по N-концевым аминокетильным группам. В L16 модифицирован первый остаток метионина [30]. В L33 наблюдается гетерогенность N-конца, часть полипептидных цепей начинается с монометилированного метионина (не более 25%), а часть – с монометилированного аланина [31]. Такая гетерогенность, по-видимому, связана с конкуренцией процессов метилирования и отщепления N-концевого метионина. Предположение о возможном восстановлении N-формилметионина до N-метилметионина было опровергнуто [3].

Метилтрансферазы, осуществляющие модификацию белков L16 и L33, не идентифицированы.

Белки L16 и L33 располагаются рядом с центральным протуберанцем с противоположных сторон (рис. 1.10). Их N-концевые остатки выходят на поверхность рибосомы и не образуют прямых контактов с рРНК и белками.

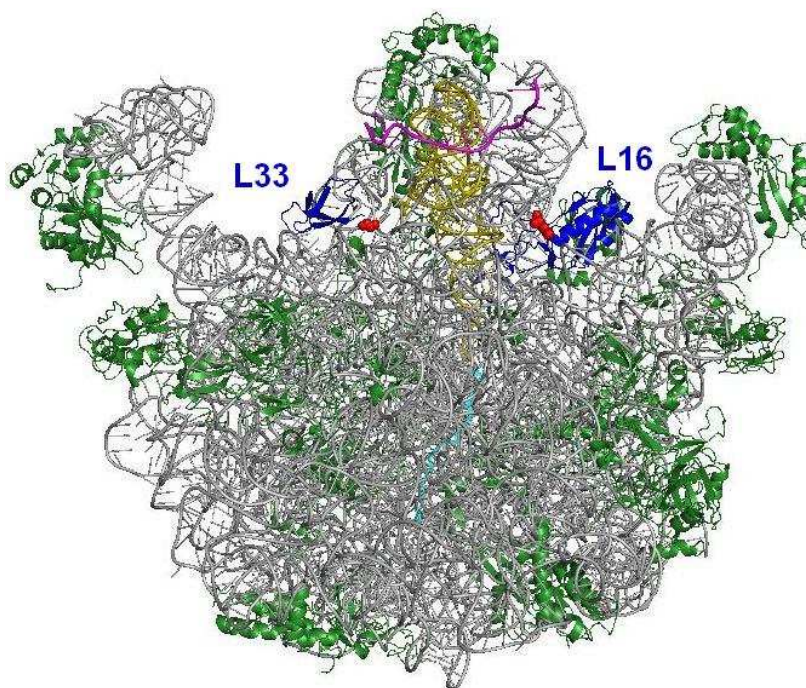


Рисунок 1.10. Расположение L16 и L33 на большой субчастице. Серым показана рРНК, зелёным – белки, жёлтым – тРНК в Р-участке, фиолетовым – мРНК, циановым – синтезируемый пептид, синим – белки L16 и L33, красными сферами – N-концевые остатки.

1.4. Ацетилирование рибосомных белков

N^{α} -ацетилирование белков катализируется N^{α} -ацетилтрансферазами, которые переносят ацетильную группу с ацетилкофермента А на N-концевую аминокгруппу белка. У эукариот такая модификация белков встречается повсеместно, 80-90% цитоплазматических белков у млекопитающих и 50% у дрожжей ацетилированы по N-концу [32]. У прокариот такая модификация осуществляется редко. Известно всего 4 белка в *E. coli*, которые ей подвергаются: фактор EF-Tu а также рибосомные белки S5, S18 и L7. У последних определены гены, кодирующие ферменты, которые осуществляют модификацию: *rimJ*, *rimI* и *rimL*, соответственно. Каждая из перечисленных ацетилтрансфераз специфически модифицирует только один белок (в отличие от эукариот, у которых такие ферменты менее специфичны). Несмотря на близость функции этих ферментов, их структуры сильно отличаются. Сходство между последовательностями RimI (148 остатков) и RimJ (194 остатка) и RimL (178 остатков) составляет 19% и 20%, соответственно, а между RimJ и RimL – 23% (хотя RimI и RimJ – аланин-ацетилтрансферазы, а RimL – серин-ацетилтрансфераза). Вероятно, эти белки не имели общего предка и развивались независимо друг от друга [33].

Эукариотические N^{α} -ацетилтрансферазы, как правило, состоят из двух или трёх различных субъединиц и модифицируют субстрат котрансляционно, тогда как прокариотические чаще мономерны или представляют из себя гомодимеры (например, RimL) и ацетилирование осуществляют посттрансляционно [34].

Показано, что в случае нарушения сборки 30S рибосомной субчастицы белки S5 и S18 ацетилированы лишь частично. В то же время установлено, что ферменты RimJ и RimI принимают участие в организации правильного сворачивания рРНК. Предполагается, что модификация белков S5 и S18 являются сигналом качества сборки рибосомы [35].

1.4.1. Ацетилирование белка S5

Рибосомный белок S5 ацетилирован по α -аминогруппе первого остатка аланина [36]. Ацетилирование осуществляется специфическим ферментом RimJ (ribosomal modification) [37,38].

Установлена субстратная специфичность фермента RimJ. Авторы исследовали штамм *E. coli*, содержащий мутацию в центральном псевдоузле 16S рРНК (C18A) [39]. Эта мутация приводит к нарушению сборки 30S субчастицы, ухудшению связывания с ней белков S1, S2, S18 и S21 и, следовательно, к снижению эффективности трансляции. Помимо этого мутация вызывает уменьшение доли ацетилированных молекул S5, то есть, снижается активность RimJ. Это, очевидно, связано с тем, что S5 находится в непосредственной близости к центральному псевдоузлу, и мутации в последнем могут изменять место посадки S5 на 30S субчастицу, и тогда RimJ не может связываться с субстратом. Стоит отметить что недоацетилирование S5 не наблюдается в собранных 70S мутантных рибосомах. Видимо, связывание мутантной 30S субчастицы с 50S восстанавливает её нативную структуру и вместе с ней активность RimJ. Ранее было показано, что мутация в белке S4 также приводит к недоацетилированию S5 [40]. Эти данные свидетельствуют, что ацетилирование S5 осуществляется на собранной рибосоме.

Функция RimJ связана не только с модификацией белка S5, но и с другими этапами биогенеза малой субчастицы рибосомы [41]. В штамме *E. coli*, в котором содержится мутация в гене белка S5 (28-й остаток глицина заменён на аланин), нарушена сборка рибосомы и снижена точность трансляции, также наблюдается чувствительность к холоду. Суперэкспрессия RimJ в этом штамме полностью восстанавливает все дефекты трансляции. Это означает, что RimJ не зависимо от ацетилтрансферазной активности вносит вклад в формирование правильной структуры рибосомы. Доказательством может служить то, что RimJ связывается с 30S субчастицей на ранних стадиях её сборки [41]. Функции RimJ как фактора сборки рибосомы и ацетилтрансферазы могут быть совмещены, и осуществляться одновременно или последовательно.

Белок S5 располагается на противоположной по отношению к декодирующему центру стороне малой субчастицы (рис. 1.11). N-концевые остатки выступают над поверхностью рибосомы и не видны в кристаллической структуре. Значит, α -аминогруппа первого остатка S5 в составе рибосомы доступна для ацетилирования, что согласуется с результатами из работы [39].

У белка RimJ найдены функции, не связанные напрямую с ацетилированием S5. Показано, что RimJ является репрессором *par* оперона, отвечающего за биосинтез пилей в патогенном пиелонефрическом штамме *E. coli*. RimJ регулирует транскрипцию этого оперона в зависимости от внешних условий (температура, наличие питательных веществ). Механизм, по которому происходит эта регуляция и связь её с ацетилтрансферазной функцией RimJ не установлены [42].

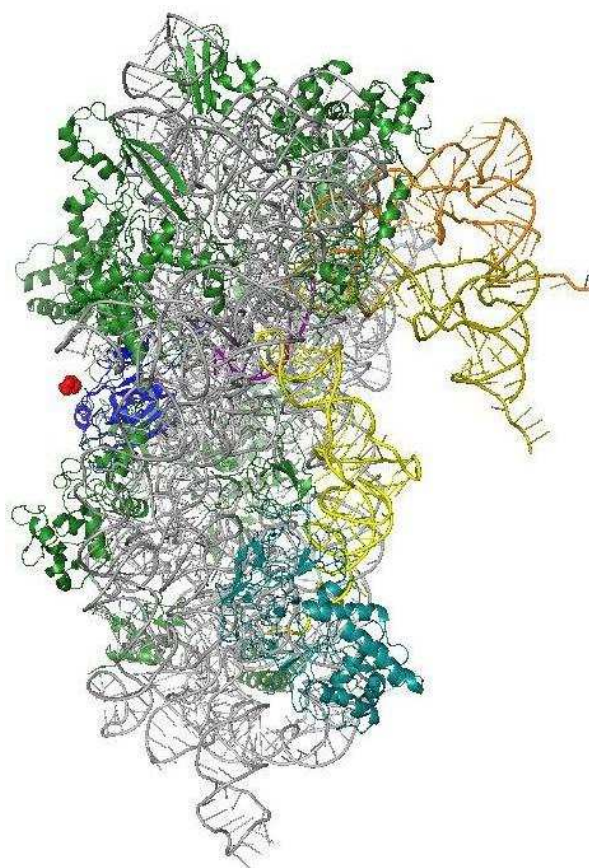


Рисунок 1.11. Расположение S5 на малой субчастице. Серым показана рРНК, зелёным – белки, оттенками жёлтого – тРНК, фиолетовым – мРНК, циановым – EF-Tu, синим – белок S5, красными сферами – N-концевой остаток.

1.4.2. Ацетилирование белка S18

Белок S18, как и S5 и L12, подвергается аминоконцевому ацетилированию (по остатку аланина) [43]. Модификация осуществляется специфической ацетилтрансферазой RimI[38].

Модификация не является необходимой для клетки, мутанты по гену *rimI* не только жизнеспособны, но и не проявляют никаких фенотипических отличий от дикого типа, кроме отсутствия модификации S18 [44].

Определена пространственная структура RimI из *Salmonella typhimurium* (первичная структура полностью идентична RimI из *E. coli*) [33]. Фермент имеет смешанную $\alpha\beta$ структуру с центральным семитяжевым β -листом, фланкированным четырьмя α -спиралями (рис. 1.12). Центральный β -лист имеет преимущественно антипараллельную структуру, за исключением тяжей 4 и 5, которые параллельны. Порядок β -тяжей в листе линейный, кроме тяжа $\beta 7$, расположенного между $\beta 5$ и $\beta 6$. Лист имеет V-образную структуру, в которой тяжи $\beta 1$ - $\beta 4$ формируют одно плечо, а $\beta 5$ - $\beta 7$ – другое. Предполагается, что в V-образном расширении между $\beta 4$ и $\beta 5$ -тяжами располагается ацетилтрансферазный центр.

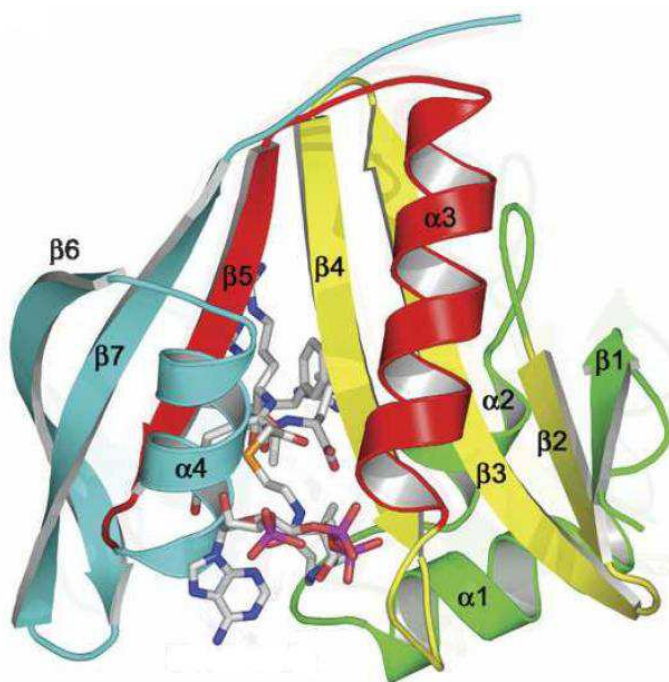


Рисунок 1.12. Структура RimI. Фермент изображён в виде лент, субстрат и кофермент в каркасном виде. Элементы вторичной структуры окрашены зелёным, жёлтым, красным и синим в порядке их следования с N-конца [33].

Исходя из данных по пространственной структуре комплекса фермента с субстратом и коферментом (ацетилкоферментом А) был предложен механизм ацетилтрансферной реакции (рис. 1.13).

N-концевой атом азота S18 нуклеофильно атакует карбонильный атом углерода ацетилкофермента А, остаток Glu103 выступает здесь как акцептор протона (рис. 13, i). Это приводит к образованию тетраэдрического интермедиата (рис. 13, ii), который распадается на продукты, при этом остаток Tyr115 служит донором протона (рис. 13, iii).

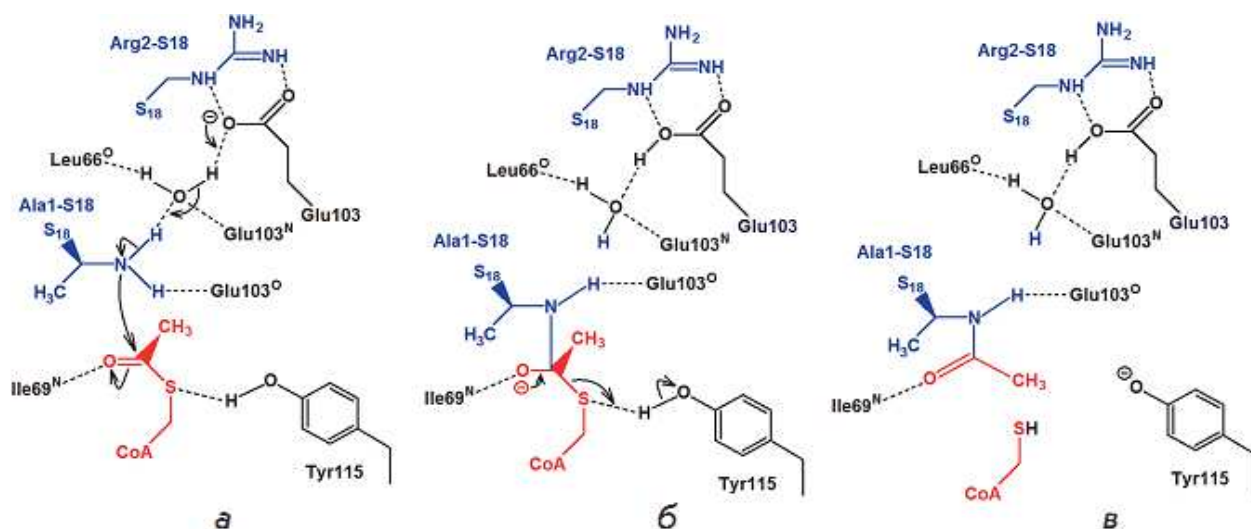


Рисунок 1.13. Предполагаемый механизм реакции, катализируемой ферментом RimI. а – нуклеофильная атака карбонильного атома ацетилкофермента А; б – образование тетраэдрического интермедиата; в – комплекс RimI с продуктами[33].

Несмотря на то, что установлен механизм ацетилирования S18, до сих пор остаётся невыясненным, в чём его функция, и когда оно происходит. Белок S18 располагается в центральном домене малой субчастицы рибосомы рядом с белками S11 и S6, причём взаимодействие S18 с S6 настолько прочно, что образуется стабильный гетеродимер [45]. S18 находится вблизи E-участка (рис.1.14) Первые 15 аминоконцевых остатка аминокислот S18 не видны в кристаллической структуре рибосомы, а значит, скорее всего, не имеют фиксированного положения в пространстве. Возможно, они располагаются рядом с участком посадки мРНК на малую субчастицу (рис. 1.14), в этом случае, N-концевое ацетилирование может оказывать влияние на процесс инициации трансляции.

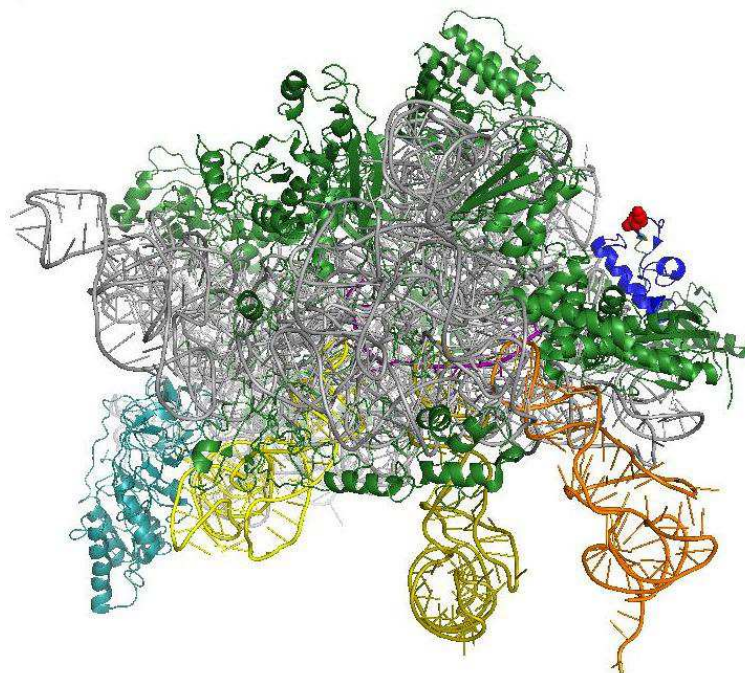


Рисунок 1.14. Расположение S18 на малой субчастице. Серым показана рРНК, зелёным – белки, оттенками жёлтого – тРНК, фиолетовым – мРНК, циановым – EF-Tu, синим – белок S18, красными сферами – N-концевой остаток.

1.4.3. Ацетилирование белка L12

Рибосомный белок L12 существует в двух различных формах: не ацетилированной (L12) и ацетилированной (называемой L7) [46]. Из-за такой близости в структурах в литературе этот белок называют L7/L12.

Ацетилирование α -атома азота первого остатка серина L12 с образованием L7 осуществляется специфическим ферментом RimL [48]. RimL может ацетилировать *in vitro* как свободный белок L12 [49], так и L12 в составе рибосомы [34]. По-видимому, *in vivo* модификация L12 тоже может идти на любом этапе биогенеза рибосомы. В отличие от S5 и S18, которые модифицированы полностью, L12 ацетилирован лишь частично. Соотношение L7/L12 варьирует в зависимости от фазы и скорости роста. В середине логарифмической фазы доля L12 достигает 85%, затем содержание L7 постепенно увеличивается и становится 75-80% в стационарной фазе [50]. При росте клеток в минимальной среде белок целиком переходит в форму L7.

Показано, что модификация L12 повышает прочность комплекса тетрамера L7/L12 с белком L10 [47]. Авторы объясняют это тем, что ацетилирование стабилизирует N-концевые α -спирали L7 (на рис. 1.15 обозначены $\alpha 1$), фиксируя положение аминоконцевого остатка в пространстве, и тем самым компактизуя структуру, делает её более прочной.

Тем не менее, штамм с мутацией в гене *rimL*, в котором весь белок L12 присутствует в

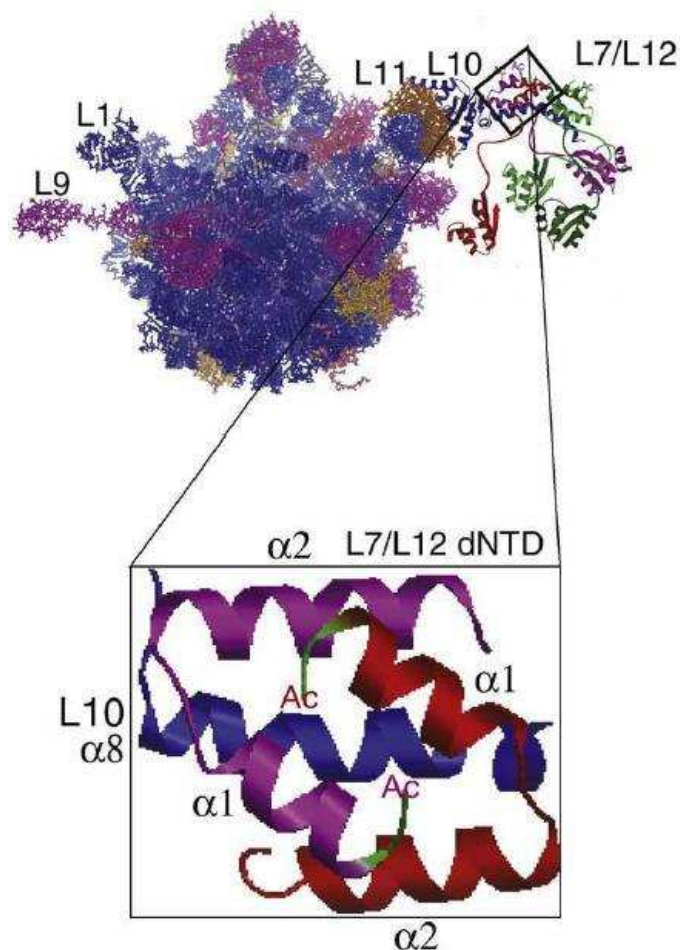


Рисунок 1.15. 50S субчастица рибосомы *E. coli* и входящий в её состав комплекс L7/L12 и L10 [47].

деацетилированной форме, не имеет никаких заметных фенотипических отличий от дикого типа, в частности, нет разницы в скорости роста при 25, 37 и 42°C [49]. Значит,

модификация не является важной для функционирования рибосомы, а вопрос о её возможной функции до сих пор остаётся открытым.

Установлена субстратная специфичность RimL [34]. Первый изучаемый аспект касался природы N-концевого аминокислотного остатка субстрата. Согласно литературным данным, в N^α-ацетилированных белках это, как правило, серин, аланин или метионин. Например, в L12 из *E. coli* это серин, а в L12 из *Pseudomonas aeruginosa* и *Bacillus subtilis* – аланин. В S18 и S5 – также аланин. Было сделано предположение, что RimL не проявляет специфичности к аминоконцевому остатку. Это было подтверждено экспериментально, RimL эффективно ацетилюет *in vitro* мутантный L12, в котором Ser1 заменён на Ala1 [34].

Второй аминокислотный остаток N^α-ацетилируемого белка влияет на модификацию первого в случае эукариотических N^α-ацетилтрансфераз. Если второй остаток – аспартат или глутамат – то модификация идёт эффективно. Чтобы исследовать эффект второго аминокислотного остатка на активность RimL был получен мутантный L12, в котором Pe2 заменён на Asp2. Оказалось, что RimL ацетилюет такой мутантный белок гораздо менее эффективно, чем нативный L12. Это ещё раз подчёркивает отличие между прокариотическими и эукариотическими N^α-ацетилтрансферазами [34].

Получена кристаллическая структура RimL из *Salmonella typhimurium*. RimL представляет собой гомодимер, способный связать 2 молекулы ацетилкофермента А и модифицировать димерный L12 [51].

Помимо ацетилирования L12 RimL обеспечивает защиту клетки от воздействия ряда антибиотиков. Установлено, что RimK ацетилюет микроцин С (MсС), делая его нетоксичным для клетки, таким образом, клетки, содержащие активный RimL, оказываются устойчивыми к этому антибиотику. Кроме того, суперэкспрессия RimL делает клетки устойчивыми к альбомицину и ряду синтетических негидролизующих аналогов аминокислотаденилатов – аминокислотсульфоамиладенилатам (аспартил-, лейцил-, лизил-, глицил-, аланил- и фенилаланилсульфоамиладенилату), которые также становятся нетоксичными вследствие ацетилирования. У ферментов RimI и RimJ данной активности не наблюдается [52].

1.5. Гидроксилирование белка L16

В рибосомном белке L16 гидроксилирован β -атом углерода 81-го остатка аргинина. Модификация осуществляется специфическим ферментом YcfD (RoxA), членом семейства 2-оксогutarат/ Fe^{2+} -зависимых оксигеназ. В результате гидроксилирования образуется дополнительный хиральный центр, модифицированный остаток аргинина имеет конфигурацию 2S, 3R [53].

Модификация не является жизненно необходимой для клетки, штамм *YcfD* жизнеспособен, но при этом в бедной среде рост нокаутных клеток заметно ниже, чем клеток дикого типа. Кроме того суммарная активность трансляционного аппарата в клетках *YcfD* в 3-4 раза ниже, чем в клетках дикого типа [53].

Установлена пространственная структура YcfD (рис. 1.16). Каталитический N-концевой домен представляет собой DBSH-домен (double stranded beta helix), что является характерной чертой 2-оксогutarат/ Fe^{2+} -зависимых оксигеназ. Основу домена составляют два β -листа, первый построен из пяти цепей, второй – из трёх, вместе они образуют структуру β -бочки. Внутри этой бочки располагается каталитический центр, в котором находится ион Fe^{2+} , координированный остатками His125, Glu127 и His187 и двумя молекулами воды. Биоинформатически и с помощью мутагенеза установлено, что в связывании 2-оксогutarата участвуют остатки Ser116 и Arg140 [54].

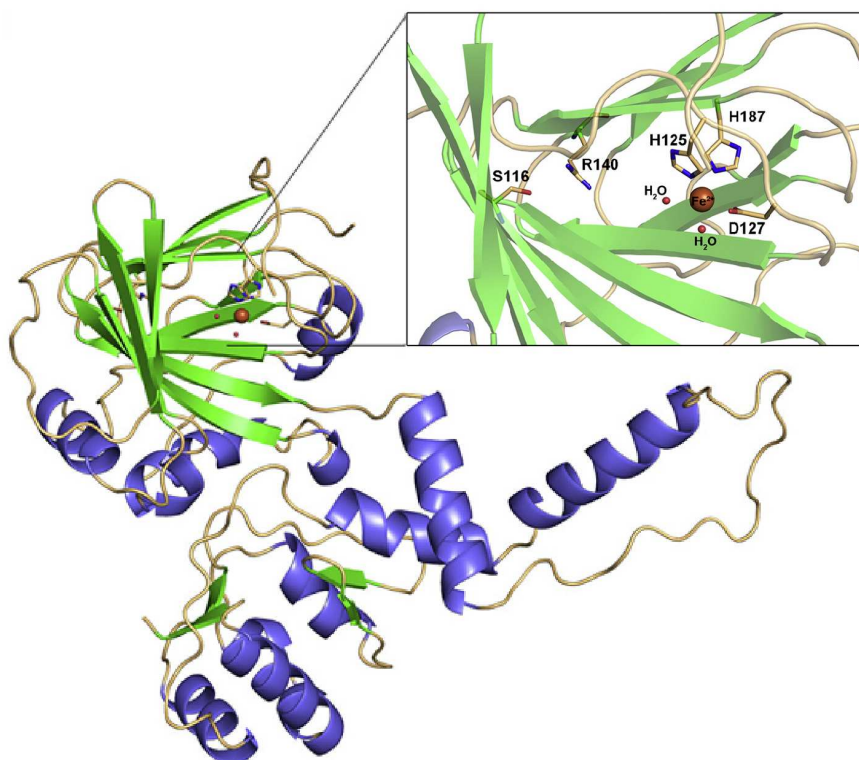


Рисунок 1.16. Структура мономера YcfD. α -спирали показаны синим цветом, β -тяжи – зелёным. Активный центр показан в увеличенном виде [54].

Белок L16 важен в организации структуры аминоксил-тРНК связывающего сайта. Удаление L16 негативно сказывается на ряде аспектов работы рибосомы, в том числе на связывание субчастиц друг с другом [55], связывание аминоксил тРНК [56], пептидилтрансферазной активности [57], гидролизе пегтидил тРНК [58].

Фермент YcfD структурно гомологичен человеческим белкам Mina53 и NO66, которые катализируют гидроксирование L27a и L8, соответственно. Оба эти белка связываются с предшественниками рибосом и предположительно участвуют в сборке рибосомных частиц [54].

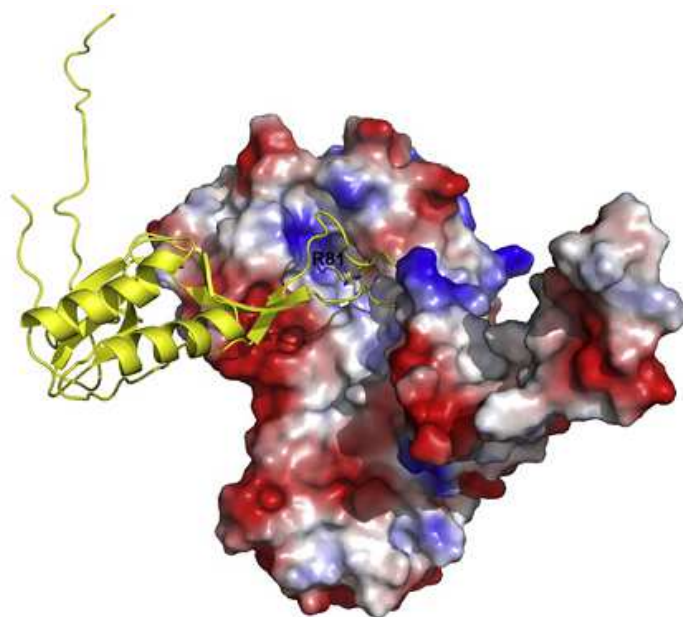


Рисунок 1.17. Смоделированная структура комплекса YcfD (показан в виде поверхности) с L16 (показан в виде лент) [54].

Фермент YcfD модифицирует белок L16 в свободном состоянии, до его включения в рибосому. Остаток Arg81 в структуре несвязанного с рибосомой L16 располагается на длинной, гибкой неструктурированной петле, соединяющей соседние β -тяжи (смоделированная структура комплекса YcfD с L16 показана на рис. 1.17). В структуре рибосомы эта петля имеет фиксированное положение за счёт взаимодействия с 23S рРНК. Гидроксилирование остатка Arg81 может обеспечивать образование дополнительной водородной связи, стабилизирующей комплекс L16 с 23S рРНК [54]. В процессе сборки рибосомы белок L16 встраивается одним из последних [59]. Значит гидроксирование белка L16, вероятно, играет важную роль в последних этапах сборки рибосомы.

1.6. Метилтиолирование белка S12

Когда химическим путём была определена первичная структура рибосомного белка S12 *E. coli*, природа его 88-го аминокислотного остатка так и не была установлена [60]. Последующее определение последовательности гена, кодирующего S12, показало, что 88-ю позицию занимает аспарагиновая кислота [61]. И только через 20 лет, используя масс-спектрометрию, показали, что молекулярная масса S12 равна 13652 Да (на 46,1 Да больше, чем было предсказано из последовательности гена) [1]. Дальнейшее изучение этого феномена показало, что он обусловлен наличием метилтиоэфирной группы (-SCH₃) у β-атома углерода 88-го остатка аспарагиновой кислоты [62]. Ещё позднее был определён ген, который кодирует соответствующую метилтиотрансферазу (*rimO*), осуществляющую данную посттрансляционную модификацию (рис. 1.18) [63].

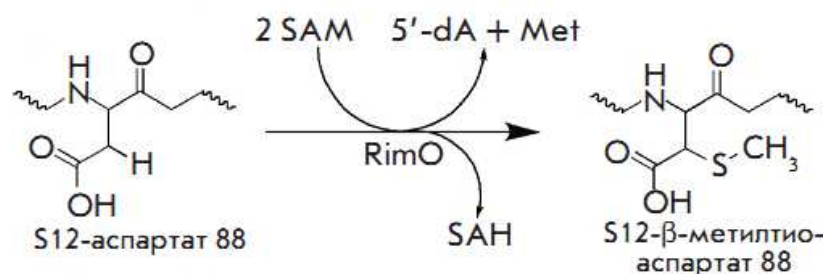


Рисунок 1.18. Реакция, катализируемая ферментом *RimO*. Метилтиолирование остатка Asp88 белка S12.

Эта реакция – пример достаточно редкого в природе ферментативного образования связи C-S из C-H. Такие реакции осуществляются по радикальному механизму с использованием S-аденозилметионина в качестве кофермента [64].

S12 – консервативный элемент рибосомы, а остаток Asp88 строго идентичен во всех известных гомологах S12 в бактериях, археях и эукариотах (хотя модификация наблюдается не всегда). Asp88 располагается рядом с функциональным центром рибосомы. Попытки получить мутант по этой аминокислоте не дали положительного результата. Всё это указывает на важность этого остатка в функционировании рибосомы.

Все известные до *RimO* метилтиотрансферазы посттранскрипционно модифицируют РНК, *RimO* – первый изученный фермент этого семейства, мишенью которого является белок. В *E. coli* помимо *RimO* обнаружена только одна метилтиотрансфераза, *MiaB*, модифицирующая тРНК. Показано сильное сходство в аминокислотных последовательностях этих двух белков [63]. В частности, обе содержат SxxxSxxC мотив, являющийся каноническим для всего семейства метилтиотрансфераз.

Метилтиолирование белка S12 осуществляется по радикальному механизму (рис. 1.19). На первом этапе разрывается связь C-S в S-аденозилметионине с образованием свободного метионина и 5'-дезоксаденозил-радикала. Затем этот радикал отнимает атом водорода у β -атома углерода остатка Asp88. После этого образуется тиоэфир, который на последней стадии метилируется. Таким образом, для модификации одной молекулы белка S12 требуется две молекулы S-аденозилметионина [65]:

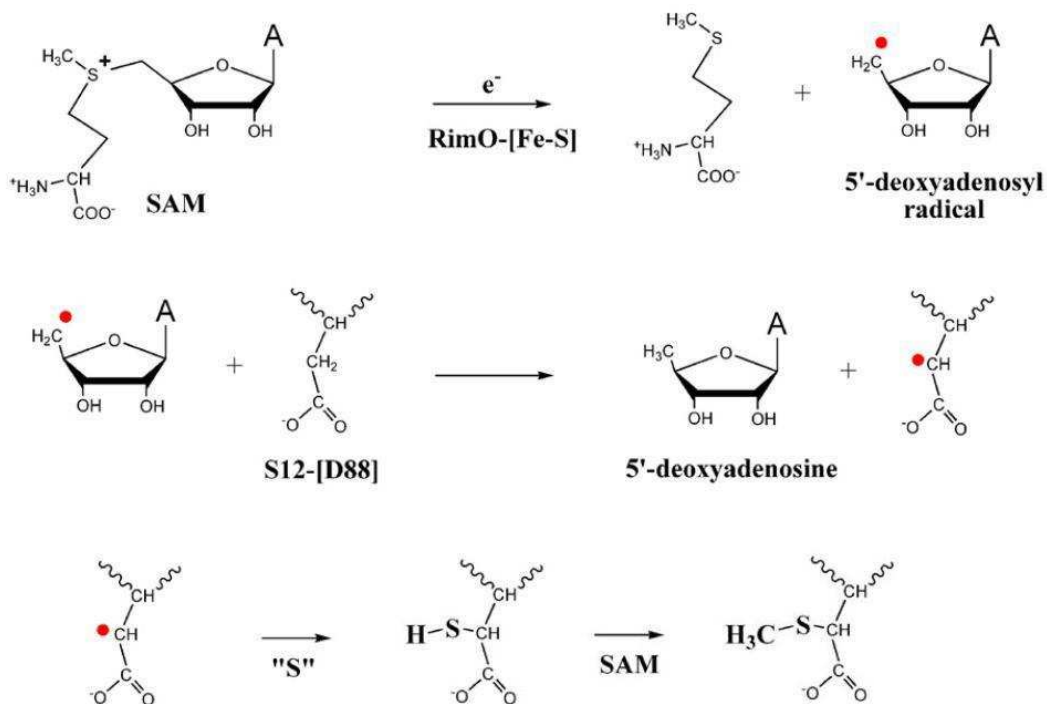


Рисунок 1.19. Механизм реакции, катализируемой ферментом RimO [65].

Метилирование на последней стадии происходит также с помощью фермента RimO. Это значит, что он является метилтрансферазой, хотя консервативных S-аденозилметионин связывающих мотивов, характерных для этого семейства ферментов, в нём найдено не было [66].

Установлена пространственная структура фермента RimO (рис. 1.20). Он состоит из трёх доменов, N-концевого UPF0004 домена, центрального домена (radical SAM домен) и N-концевого TRAM домена [67]. Последний в схожем ферменте MiaB служит для связывания РНК, что может указывать на то, что RimO модифицирует белок S12 в составе рибосомы.

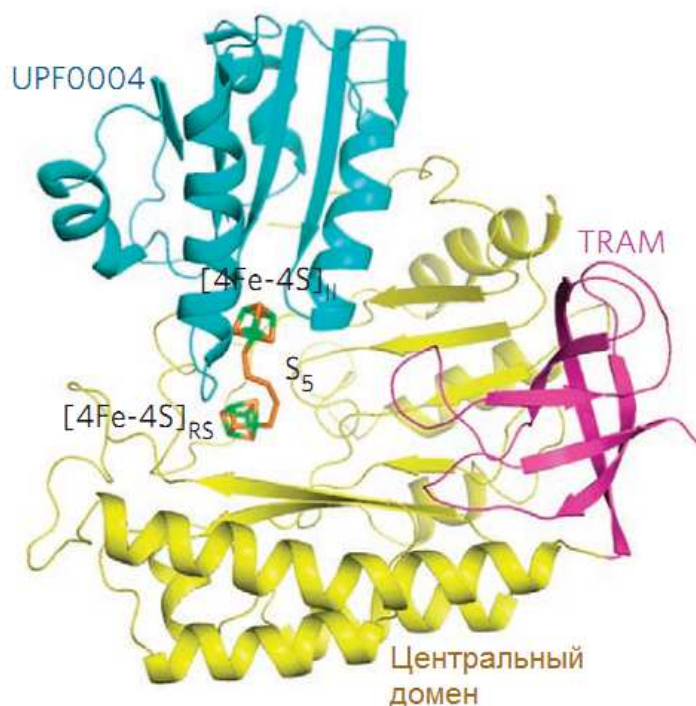


Рисунок 1.20. Структура RimO. Домены UPF0004, центральный и TRAM изображены в виде лент синего, жёлтого и пурпурного цветов, соответственно, кластеры $[4Fe-4S]$ и пентасульфидный мостик в каркасном виде [67].

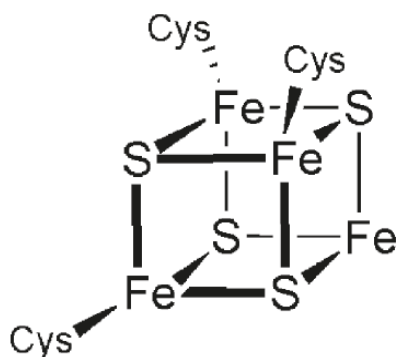


Рисунок 1.21. Кластер $[4Fe-4S]$ в структуре RimO [66].

Действительно, экспериментально подтверждено, что *in vivo* RimO метилтиолирует остаток Asp88 белка S12, когда последний является частью малой субчастицы [68]. Ранее было установлено, что *in vitro* рекомбинантный RimO из *E. coli* and *T. maritima* может модифицировать синтетический пептидный субстрат, который имитирует петлю, содержащую остаток Asp88, но с очень низкой эффективностью [69].

Кроме того в структуре RimO содержится два кластера $[4Fe-4S]$, ковалентно связанных пентасульфидным мостиком (рис. 1.21 и 1.22). Первый (RS-кластер), координированный остатками Cys150, Cys154 и Cys157 центрального домена (консервативный CxxxCxxC мотив), катализирует восстановительное расщепление S-аденозилметионина на метионин и радикал 5'-дезоксаденозил. Второй кластер, координированный остатками Cys17, Cys53 и Cys82 UPF0004 домена, участвует в образовании C-S связи в субстрате, донором атома серы при этом может выступать сульфид или метилсульфид-ион [67,70].

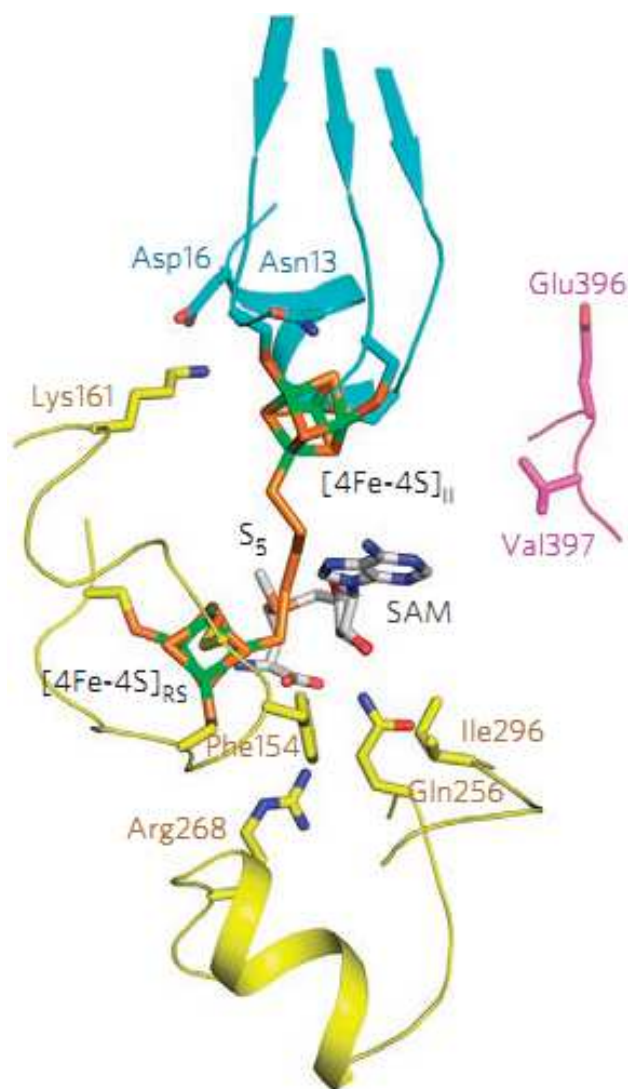


Рисунок 1.22. Структура активного центра *RimO*. Домены *UPF0004*, центральный и *TRAM* изображены в виде лент синего, жёлтого и пурпурного цветов, соответственно, кластеры $[4Fe-4S]$ и пентасульфидный мостик в каркасном виде с атомами железа и серы зелёного и оранжевого цветов, соответственно [67].

Помимо фермента *RimO* в модификации белка *S12* принимает участие консервативный белок *YsaO*, функция которого ранее была неизвестна. Нокаут гена *usaO* приводит к практически полному подавлению метилтиолирующей активности *RimO*. Кроме того, транскриптомный анализ штаммов с делецией генов *rimO* и *usaO* показывает перекрывание транскрипционных фенотипов, что говорит функциональном родстве *RimO* и *YsaO*. Белок *YsaO* связывается с малой субчастицей и, возможно, выполняет функцию шаперона, облегчая образование фермент-субстратного комплекса [68].

Следует упомянуть, что после метилтиолирования остатка аспарагиновой кислоты появляется новый хиральный центр (β -атом углерода), но его конфигурация до сих пор не установлена.

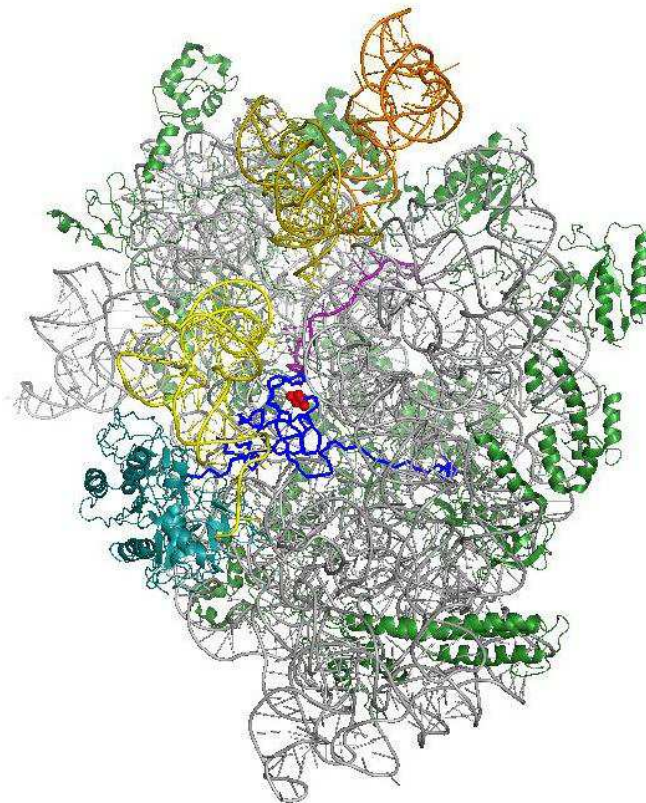


Рисунок 1.23. Расположение S12 на малой субчастице. Серым показана рРНК, зелёным – белки, оттенками жёлтого – тРНК, фиолетовым – мРНК, циановым – EF-Tu, синим – белок S12, красными сферами – модифицированный остаток.

Белок S12 состоит из глобулярного домена, расположенного рядом с А-участком в декодирующем центре, и длинного стержнеобразного отростка, который заякоривает белок на малой субчастице (рис. 1.23). S12 – единственный белок, находящийся на поверхности соприкосновения большой и малой субчастиц. Модифицированный остаток располагается вблизи декодирующего центра, но не образует прямых контактов ни с мРНК, ни с тРНК. Он погружён в карман, образованный двумя петлями: первая формируется из 522-528 нуклеотидов 16S рРНК, вторая – из 44-51 аминокислотных остатков самого S12 (рис. 1.24).

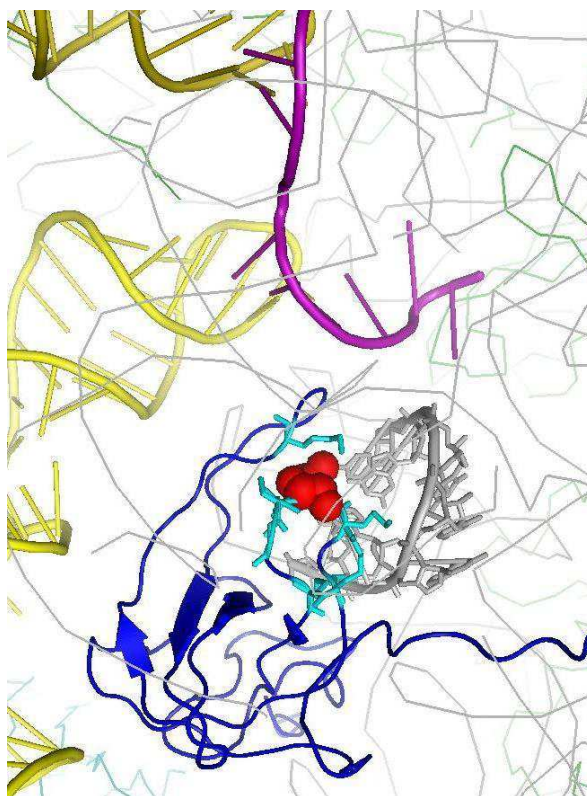


Рисунок 1.24. Положение модифицированного остатка S12 в рибосоме. Серым показана рРНК, зелёным – белки, оттенками жёлтого – тРНК, фиолетовым – мРНК, синим – белок S12, красными сферами – модифицированный остаток. Циановым показаны остатки, мутации в которых приводят к устойчивости к стрептомицину.

Функция модификации S12 до сих пор не выяснена. Известно, что мутации в соседних остатках (Lys87, Leu89, Pro90, Gly91, и Arg93) приводят к появлению устойчивости к стрептомицину или зависимости от него [63]. Так же известно, что белок S12 принимает участие в самопроизвольной транслокации рибосомы (не зависящей от EF-G и GTP), а мутация в соседнем 87-м аминокислотном остатке нарушает эту его функцию [71]. Тем не менее, в случае мутации в гене *rimO* вышеупомянутых фенотипических изменений не наблюдается. Единственное отличие такого мутанта от дикого типа – немного сниженная скорость роста [63].

1.7. Олигоглутамилирование белка S6

Рибосомный белок S6 имеет уникальную разновидность посттрансляционной модификации. На его С-конце располагаются от двух до шести остатков глутаминовой кислоты [72,73]. Из них в гене (*rpsF*) закодированы только первые два [74], остальные добавляются посттрансляционно. Модификация происходит ступенчато, остатки глутаминовой кислоты добавляются по одной [75].

Закодировано в гене S6: ...PMVKAKDERRRERDDFANETADDAEAGDSEE

Анализ первичной структуры S6: ...PMVKAKDERRRERDDFANETADDAEAGDSEE(E)₀₋₄

Был получен мутантный штамм, в котором не наблюдается гетерогенности С-конца белка S6 и содержится только 2 остатка глутаминовой кислоты. С помощью этого штамма был определён ген, отвечающий за модификацию, названный *rimK* [76]. Этот ген кодирует фермент массой 31,5 кДа, который узнаёт белок S6 и добавляет дополнительные остатки к его С-концу. В случае мутации в гене *rpsF*, приводящей к замене предпоследнего аминокислотного остатка в S6 с глутаминовой кислоты на лизин, посттрансляционной модификации не наблюдается [77]. Это означает, что RimK узнаёт С-концевой участок белка S6 дикого типа. В некоторых мутантных штаммах RimK добавляет к S6 больше четырёх остатков глутаминовой кислоты, причины этого не выяснены [77].

Установлено, что в условиях, когда не происходит сборка рибосомы (в облучённых ультрафиолетом клетках), модификации S6 не наблюдается [78]. Биоинформатическими методами в ферменте RimK найден РНК-связывающий мотив [79]. Эти данные могут указывать на то, что модификация белка S6 происходит во время или после встраивания его в рибосому. В первичной структуре RimK был обнаружен АТФ-связывающий мотив [80], что может означать, что фермент является АТФ-зависимой лигазой. Это было подтверждено *in vitro* [81], кроме того с помощью ЯМР было показано, что *in vitro* RimK присоединяет новые остатки глутамата к белку S6 через классическую пептидную связь (а не через γ -карбоксильную группу глутаминовой кислоты) [81].

Пространственная структура фермента RimK была изучена с помощью рентгеноструктурного анализа [82] (рис. 1.25). Мономер RimK имеет массу 35 кДа и состоит из 300 аминокислотных остатков. Он обладает продолговатой формой, состоит из трёх структурных доменов и имеет классическую АТФ-связывающую укладку. Сердцевина N-концевого домена А (остатки 1-99) состоит из четырёх параллельных скрученных β -тяжей, зажатых между двумя α -спиралями с каждой стороны; на поверхности домена А находится трёхтяжевой β -лист, направленный перпендикулярно по

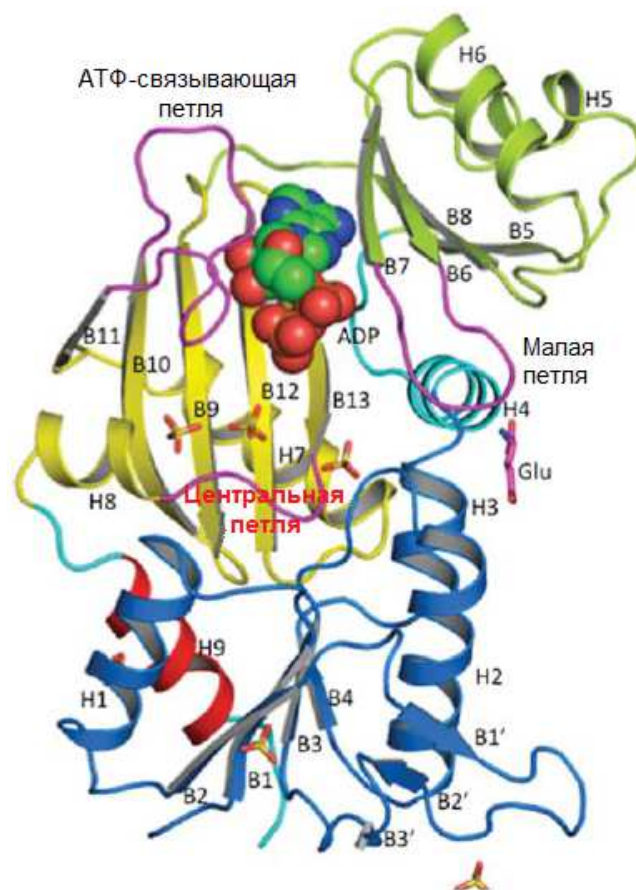


Рис. 1.25. Структура мономера RimK. Структурные элементы показаны разными цветами: синим показан домен А, зелёным – домен В, жёлтым – домен С, красным – последняя С-концевая спираль, голубым – соединения между доменами, розовым – три петли активного центра: АТФ-связывающая, малая и центральная. АДФ показана в пространственной модели, а остальные лиганды, сульфат- и глутамат-ионы, показаны палочками [82].

отношению к находящемуся в сердцевине домена β -листу. Центральный домен В (остатки 116-183) состоит из четырёх антипараллельных β -тяжей, с одного бока от которых находятся две противоположно направленные α -спирали. Домены А и В соединены длинным линкером (остатки 100-115), представляющим собой α -спираль. С-концевой домен С (остатки 184-275) состоит из пяти антипараллельных β -тяжей, с двух сторон от которых находятся две α -спирали, направленные перпендикулярно по отношению к β -тяжам. Оставшиеся аминокислотные остатки приходятся на С-концевую α -спираль, приближенную к N-концу. В щели между доменами В и С находится место посадки АТФ, расположенное между двумя антипараллельными β -листами и скрытое АТФ-связывающей петлёй

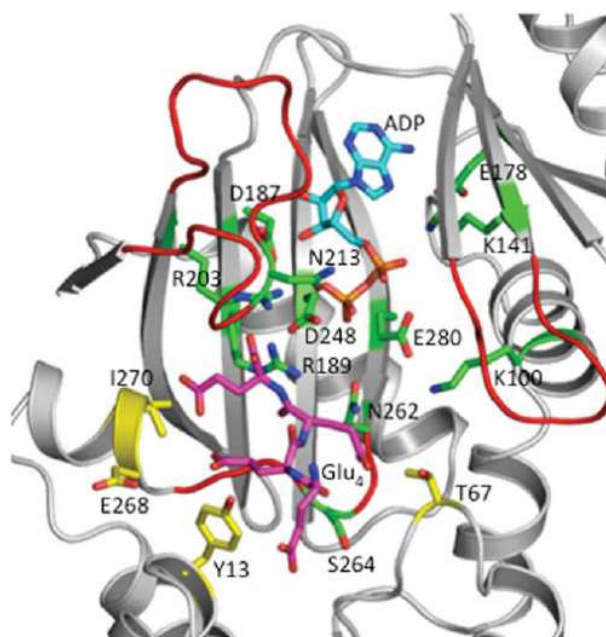


Рис. 1.26. Структура активного центра *RimK*. Белок показан как серая ленточная диаграмма с тремя красными петлями активного центра: АТФ-связывающей, малой и центральной. Связанная молекула АДФ показана голубыми палочками, а моделированный поли- α -глутамат, Glu_4 , – розовыми. Остатки, консервативные для белков *RimK*, *LysX* и глутатион-синтетазы, показаны зелёными палочками. Варибельные остатки, которые могут играть важную роль в связывании Glu_4 , показаны жёлтыми палочками [82].

Активный центр фермента (рис. 1.26) находится в пределах впадины, образуемой тремя доменами, и включает в себя следующие аминокислотные остатки: Lys100, Asp187, Arg189, Arg203, Asn213, Asp248, Glu260 и Asn262. По всей видимости, именно эти остатки, являющиеся консервативными для всех известных представителей суперсемейства АТФ-связывающих ферментов (в частности, *LysX*, участвующий в биосинтезе лизина, и глутатион-синтетазы), играют ключевую роль в связывании субстрата и процессе катализа.

Белок *RimK* также может формировать тетрамер (рис. 27), являющийся димером димеров с двумя интерфейсами. В первом, протяжённом димерном интерфейсе тяж В1' на поверхности домена А одной молекулы образует водородные связи тяжем В5 домена В другой молекулы и наоборот, а также спирали Н2 и Н4 в первой молекуле параллельно взаимодействуют со смежными спиралями Н4 и Н2 второй молекулы. Вторым, малым димерным интерфейсом включает в себя взаимодействие спирали Н6 и тяжа В7 одной молекулы с тяжем В7 и спиралью Н6 другой молекулы соответственно. Отмечается, что тетрамер стабилен в растворе вне зависимости от присутствия АТФ, что подтверждается результатом гель-фильтрационного анализа [82].



Рис. 1.27. Структура тетрамера RimK. Разные мономерные субчастицы показаны красным, жёлтым, синим и зелёным соответственно. Связанные молекулы АДФ показаны в пространственных моделях [82].

Белок S6 располагается в центральном домене малой субчастицы рибосомы (рис. 1.28) Взаимодействуя с белками S18, S8 и S15, он предохраняет 16S рРНК от атаки эндонуклеаз. С-концевые аминокислотные остатки S6 выступают наружу и не видны в кристаллической структуре.

S6 – самый кислый белок 30S-субчастицы ($pI = 4,8$), а наблюдаемая посттрансляционная модификация дополнительно усиливает его кислотность. Функция этой модификации не выяснена, кроме того, это первый установленный случай посттрансляционного добавления аминокислотных остатков.

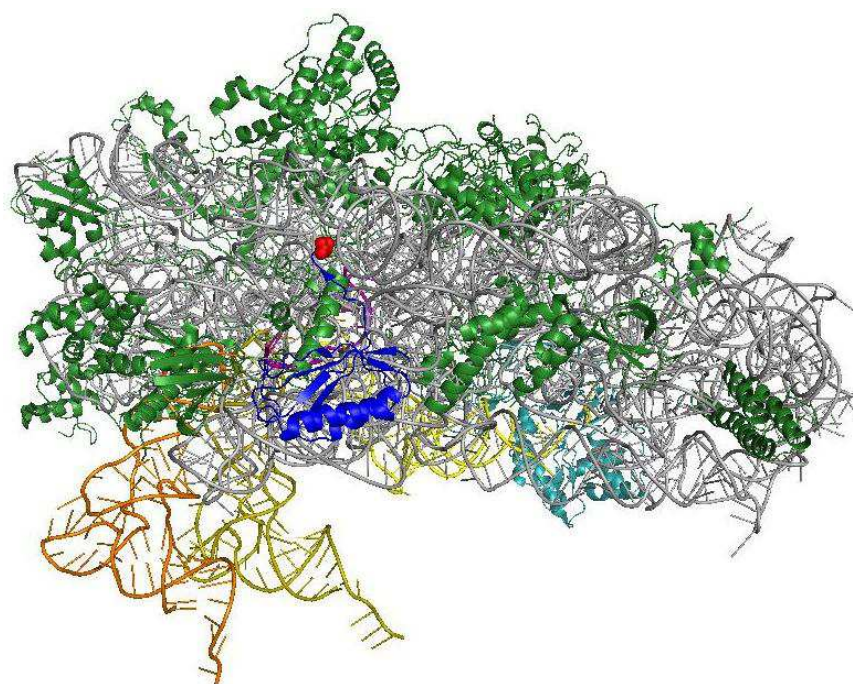


Рисунок 1.28. Расположение S6 на малой субчастице. Серым показана рРНК, зелёным – белки, оттенками жёлтого – тРНК, фиолетовым – мРНК, циановым – EF-Tu, синим – белок S6, красными сферами – С-концевой остаток.

Заключение

Ферментативные модификации рибосомных белков прокариот хорошо описаны. Тем не менее, функциональная роль таких модификаций остаётся непонятной. Установлено, что некоторые модификации рибосомной РНК требуются для правильной сборки рибосом, взаимодействия с рибосомными лигандами, формирования устойчивости к антибиотикам.

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. Известно, что эта модификация, как и все остальные модификации рибосомных белков, не является жизненно необходимой для клетки. Штамм с нокаутом гена *rimK* жизнеспособен.

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.

Целью данной работы было понять функциональную роль посттрансляционной модификации рибосомного белка S6 *Escherichia coli*.

2. Обсуждение результатов

Введение

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 субстратом 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.

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 $\Delta rimK$ вместо гена *rpsF*, кодирующего рибосомный белок S6, была вставлена кассета, состоящая из гена *rpsF*, уже кодирующего дополнительные 4 остатка глутаминовой кислоты на С-конце, и гена устойчивости к хлорамфениколу (рис. 2.1). 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 - $\Delta rimK$ -S6- E_4 -*cat* (либо всегда отсутствует в случае контрольного штамма $\Delta rimK$ -S6-*cat*).

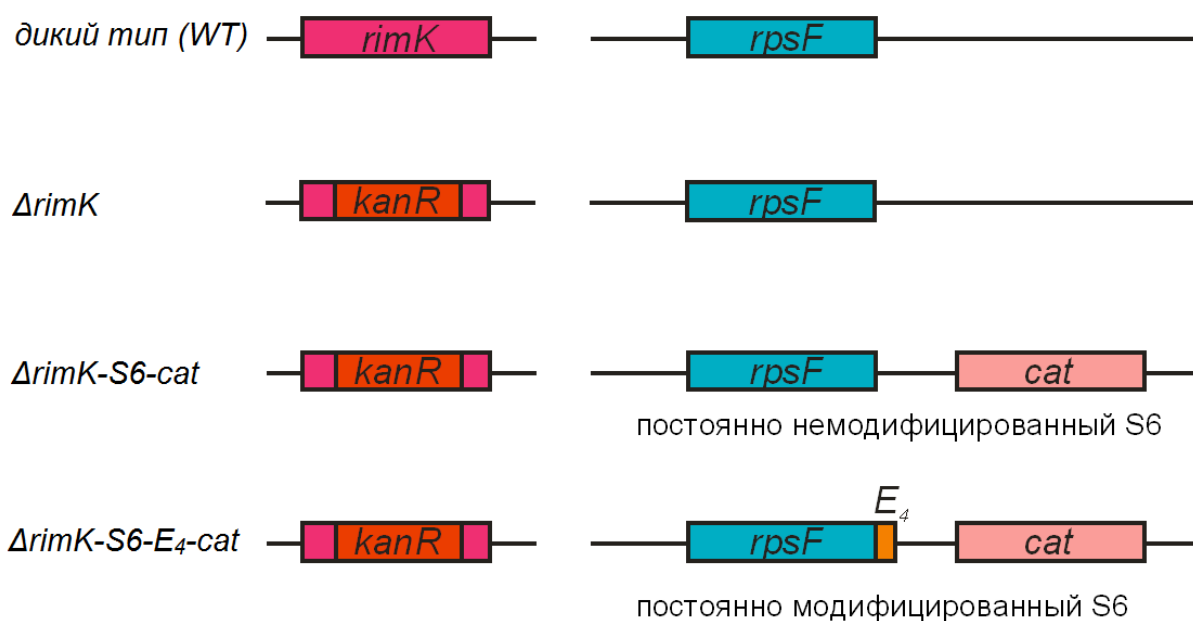


Рисунок 2.1. Используемые в работе штаммы *E. coli*. В штамме $\Delta rimK$ модификация белка S6 отсутствует. В штамме $\Delta rimK$ -S6- E_4 -*cat* 4 дополнительных остатка глутаминовой кислоты внесены в ген *rpsF*, штамм $\Delta rimK$ -S6-*cat* – контрольный.

Способ получения модельных штаммов подробно описан в разделе «Материалы и методы». 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.

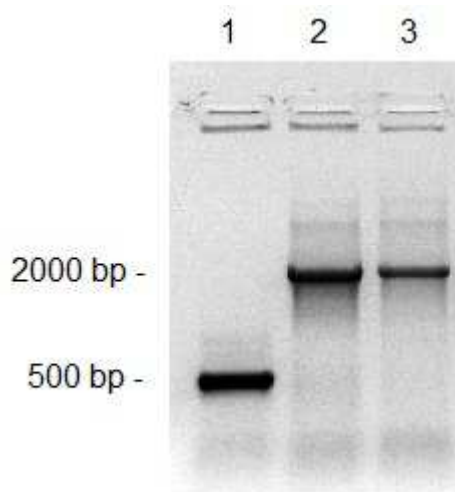
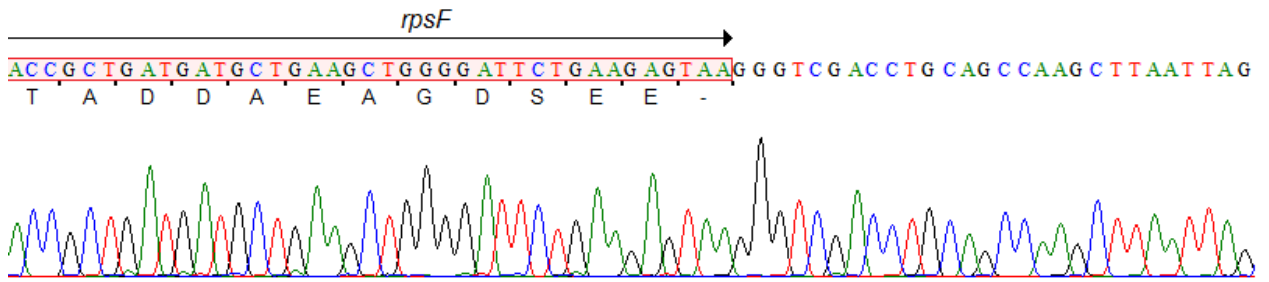


Рисунок 2.2. Анализ модельных штаммов на предмет наличия вставок S6-E₄-cat и S6-cat с помощью ПЦР с геномной ДНК. 1 – ДНК из исходного штамма (без вставки); 2 - ДНК из штамма $\Delta rimK$ -S6-cat; 3 – ДНК из штамма $\Delta rimK$ -S6-E₄-cat.

На рис. 2.2 показаны результаты проверки. Видно, что в обоих случаях вставка кассеты в геномную ДНК произошла. 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 (рис. 2.3).

ΔrimK-S6-cat



ΔrimK-S6-E4-cat

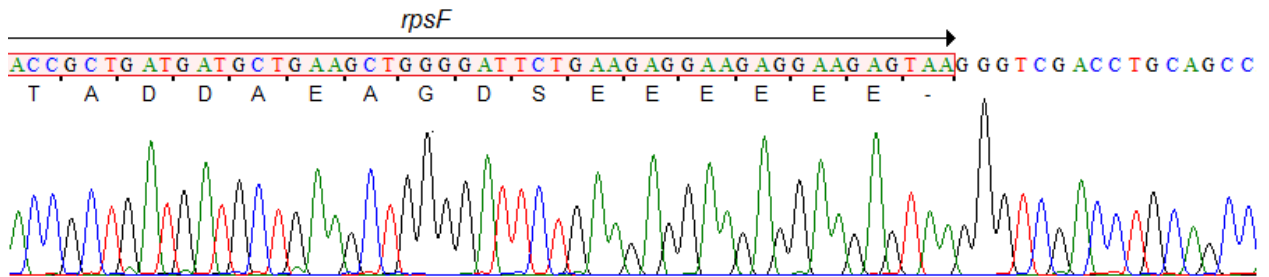


Рисунок 2.3. Результат секвенирования гена *rpsF* в штаммах *ΔrimK-S6-cat* и *ΔrimK-S6-E4-cat*.

2.1. 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 олигоглутамилирование белка S6 на разных стадиях роста бактериальной культуры *E. coli* дикого типа (рис. 2.4). 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.

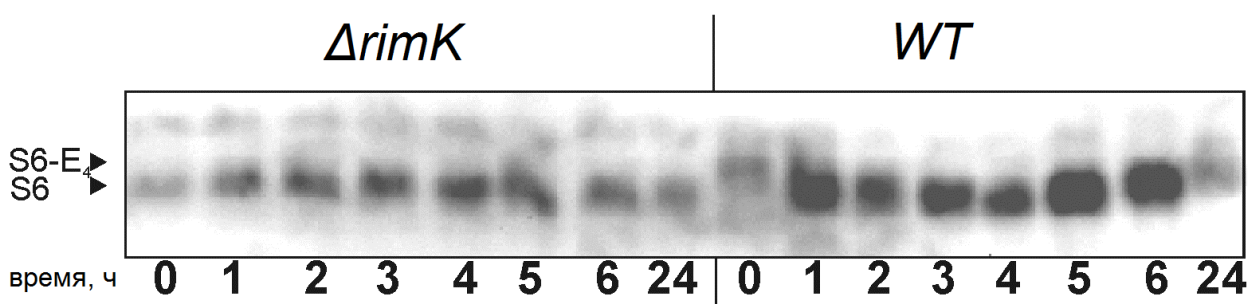


Рисунок 2.4. Анализ модификации белка S6 на разных стадиях цикла роста культуры с помощью иммуноблоттинга с антителами на S6. Дорожки соответствуют образцам суммарных белков клеток, взятых через указанное время после разбавления в свежей среде культуры в стационарной фазе.

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. 2.5.

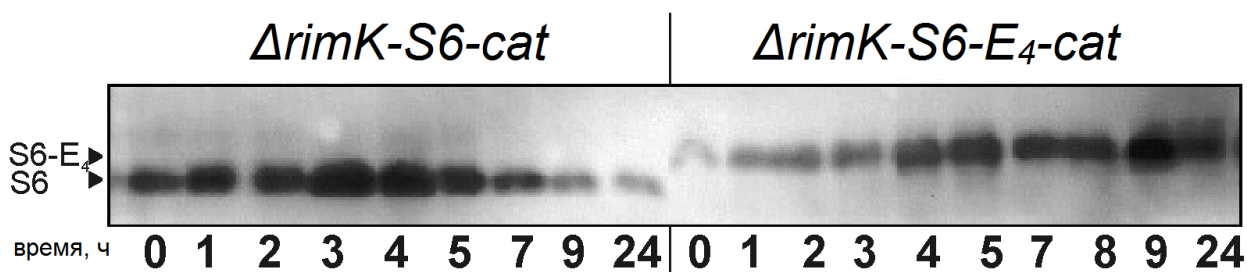


Рисунок 2.5. Анализ модификации белка S6 на разных стадиях цикла роста культуры с помощью иммуноблоттинга с антителами на S6. Дорожки соответствуют образцам суммарных белков клеток, взятых через указанное время после разбавления в свежей среде культуры в стационарной фазе.

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.

2.2. 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 [79]. 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. 2.5.

Нами было показано (рис. 2.6), 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. 2.5).

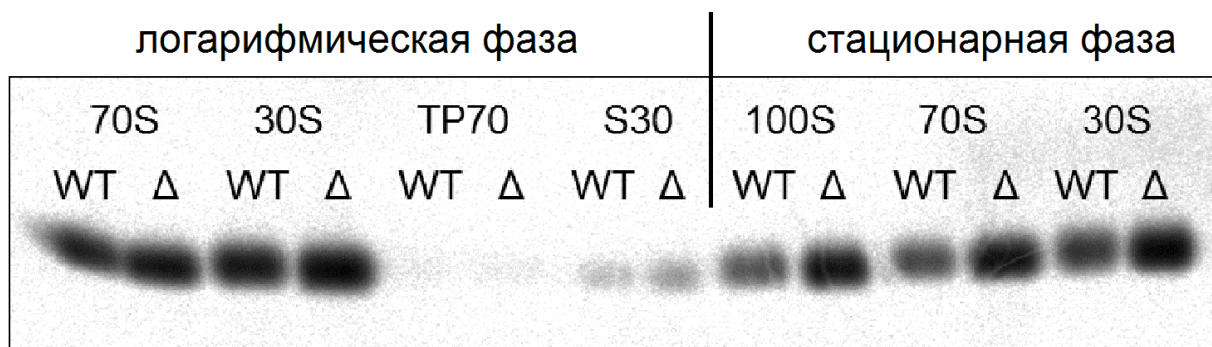


Рисунок 2.6. *In vitro* модификация белка S6 рекомбинантным ферментом RimK с помощью радиоактивно меченой глутаминовой кислоты. Авторадиография гелей, содержащих белки из реакционной смеси после завершения реакции. Видимые зоны соответствуют белку S6 со встроенными остатками радиоактивной глутаминовой кислоты. Каждая дорожка соответствует отпределённому 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.

2.3. 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 *ΔrimK* 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. 2.7.

Оказалось, что в клетках штамма *ΔrimK* уровень биосинтеза ряда белков, действительно, отличается. Эти белки были идентифицированы с помощью масс-спектрометрии, результаты также представлены на рис. 2.7. 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 *ΔrimK* на разных фазах роста.

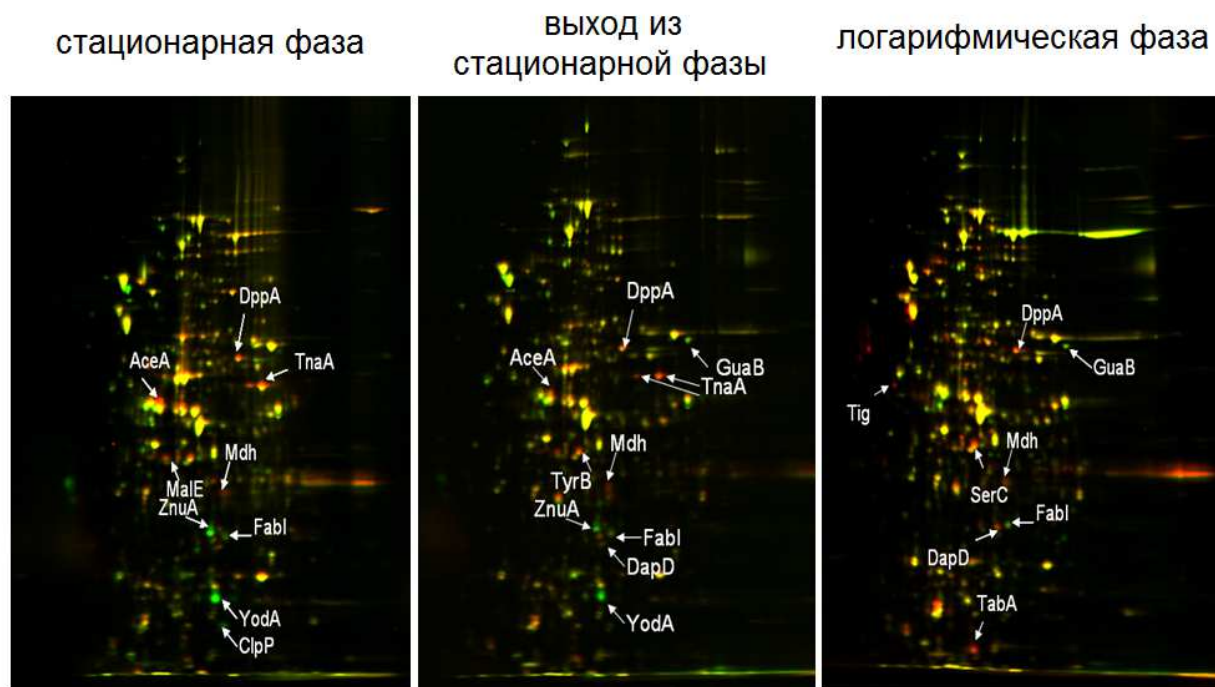


Рисунок 2.7. Двумерный электрофорез суммарного белка из клеток дикого типа и $\Delta rimK$ в различных фазах роста. Горизонтальное направление – изоэлектрофокусировка, вертикальное – распределение белков по массе. Белки из клеток дикого типа окрашены зелёной краской Cy3, а из клеток $\Delta rimK$ – красной 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 Cy5 или Cy3, содержащей азидную группу (так называемая реакция клик-химии, рис. 2.8). С помощью такого подхода можно пометить белки, которые синтезируются после добавления гомопропаргилглицина к среде, то есть зафиксировать текущий синтез белка [83].

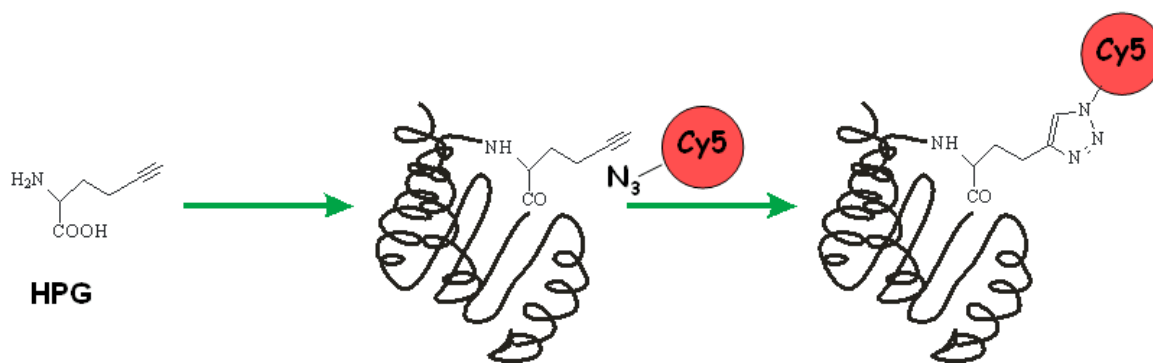


Рисунок 2.8. Схема эксперимента пульс-мечения вновь синтезированных белков с помощью гомопропаргилглицина.

Таким образом, мы сравнили текущий синтез белка в клетках дикого типа и $\Delta rimK$ в разных фазах роста (рис. 2.9). В клетках из стационарной фазы роста, когда белок S6 модифицирован (в клетках дикого типа), разница между диким типом и $\Delta rimK$ оказалась драматической. Уровень биосинтеза белка в клетках, в которых белок S6 модифицирован, значительно ниже, чем в клетках, где модификации не происходит.

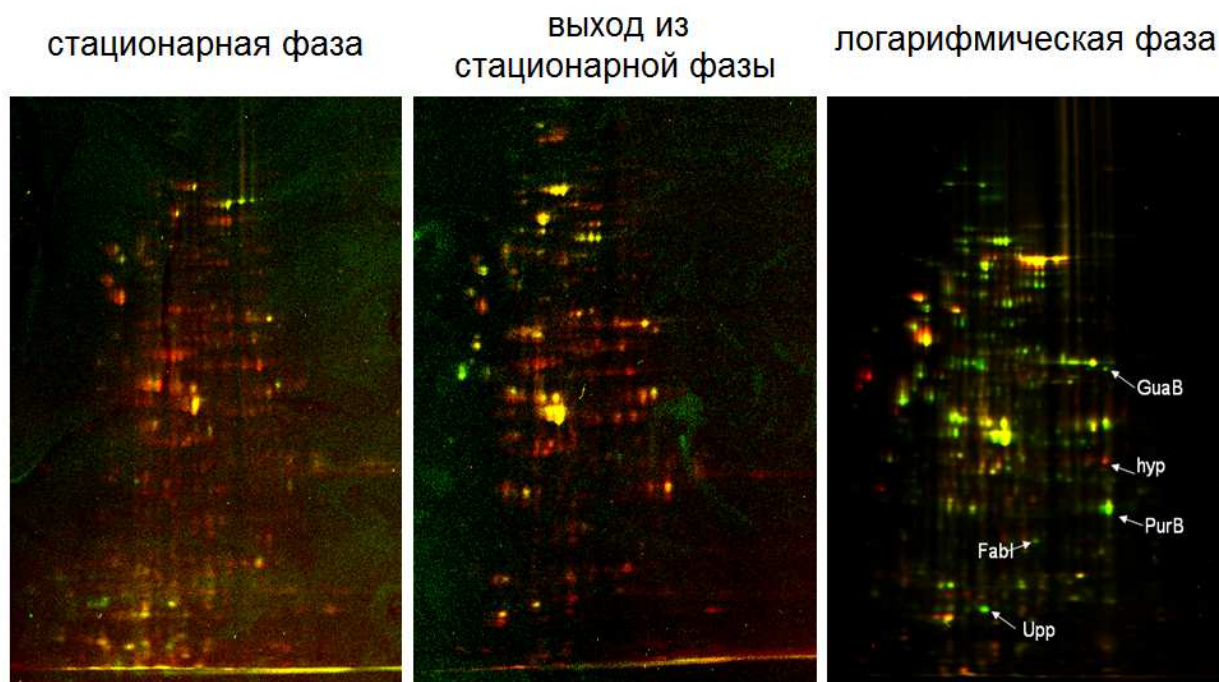


Рисунок 2.9. Двумерный электрофорез вновь синтезированного белка из клеток дикого типа и $\Delta rimK$ в различных фазах роста. Горизонтальное направление – изоэлектрофокусировка, вертикальное – распределение белков по массе. Белки из клеток дикого типа окрашены зелёной краской Cy3, а из клеток $\Delta rimK$ – красной Cy5.

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 гомопротаргилглицин через фиксированные промежутки времени, метили вновь синтезированные белки флуоресцентной краской Су5 и сравнивали встраивание метки (рис. 2.10).

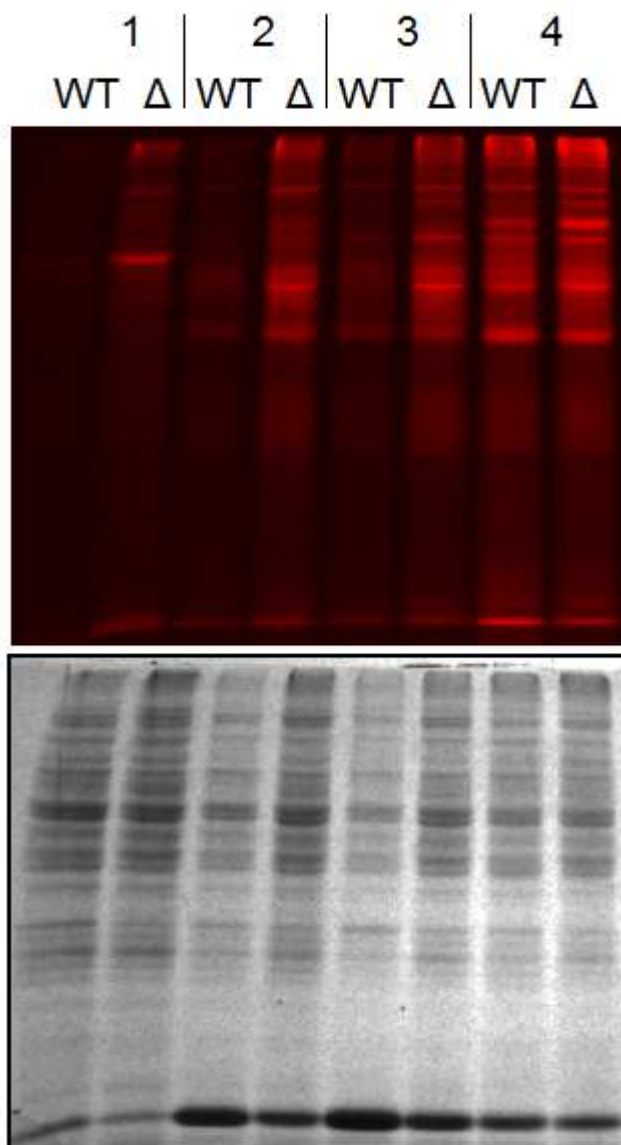


Рисунок 2.10. Синтез белка *in vivo* в клетках дикого типа и *ΔrimK*. (1) Клетки в стационарной фазе. (2, 3, 4) Клетки через 0,5; 1 и 2 часа после разбавления свежей средой, соответственно. Верхний гель – встраивание HPG во вновь синтезируемый белок. Нижний – тот же гель, покрашенный Кумасси.

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 *ΔrimK*. 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 *ΔrimK* 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.

2.4. 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 фаз роста. Мерой эффективности *in vitro* трансляции служила активность *in vitro* синтезированной люциферазы светлячка. Из результатов, представленных на рис. 2.11 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.

Когда количество питательных веществ становится ограниченным, бактериальная клетка переходит в так называемую стационарную фазу, состояние, которое характеризуется рядом морфологических и физиологических особенностей. Форма клетки становится более компактной, близкой к сферической, нуклеоид конденсируется, клетки становятся устойчивыми к различным формам стресса. Такая трансформация связана с изменением в экспрессии более 200 различных генов, ряд из которых кодируют белки,

активность люциферазы

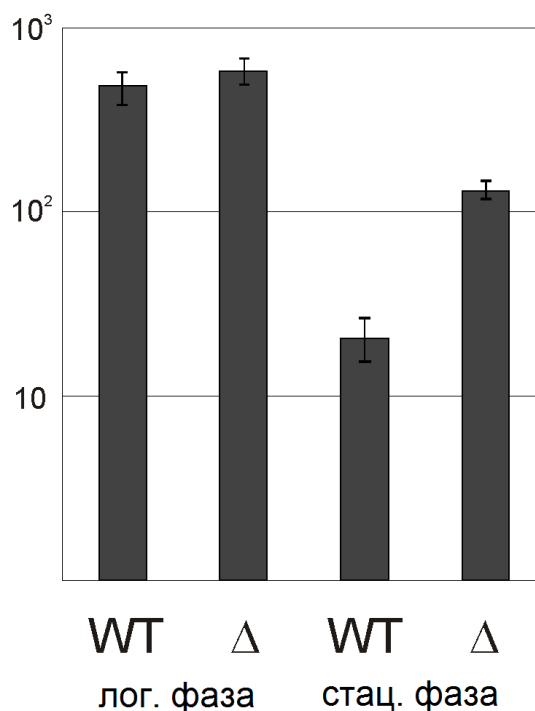


Рисунок 2.11. Активность рибосом из клеток дикого типа и *ΔrimK* *in vitro*

связывающиеся с рибосомой и оказывающие влияние на процесс трансляции: белок Y (YfiA), RMF, HPF, RsfS (YbeB), EttA, SRA и YqjD [84].

В случае аминокислотного голодания в клетке накапливается деацилированная тРНК. Попадание такой незаряженной тРНК в А-сайт рибосомы приводит к активации фермента RelA. Последний синтезирует гуанозин-3'-дифосфат-5'-трифосфат (pppGpp), который затем переводится в гуанозин-3'-дифосфат-5'-трифосфат (ppGpp) под действием pppGpp 5'-фосфогидролазы GppA. Молекула ppGpp также синтезируется ферментом SpoT в ответ на ряд клеточных стрессов: дефицит жирных кислот, фосфора, железа, источников углерода, гиперосмотический шок и окислительный стресс.

Молекула (p)ppGpp связывается с β -субъединицей РНК-полимеразы, как считается, при помощи дополнительного фактора DksA. Это приводит к подавлению транскрипции генов, кодирующих компоненты трансляционного аппарата: рРНК, рибосомные белки, факторы трансляции, а также к активации транскрипции генов, кодирующих метаболические ферменты, в частности, ферменты, участвующие в биосинтезе аминокислот. Кроме того, (p)ppGpp запускает экспрессию гена *rmf*, кодирующего рибосомный гибернационный фактор RMF.

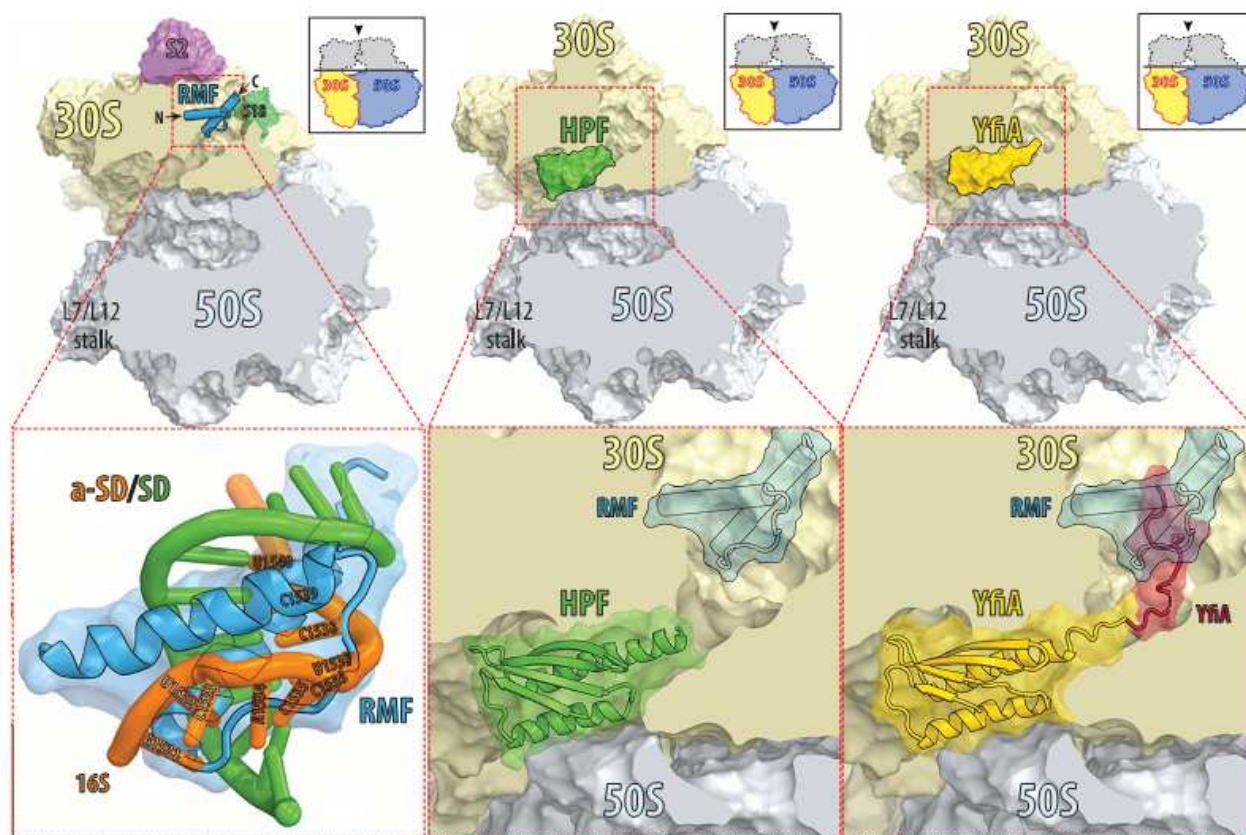


Рисунок 2.12. Сайты связывания гибернационных факторов RMF (показан синим цветом), HPF (показан зелёным цветом) и YfiA (показан жёлтым цветом) [85].

Белок RMF связывается с 3'-концевой областью 16S рРНК между головой и платформой малой субчастицы в районе последовательности анти-Шайн-Дальгарно (рис. 2.12). Таким образом, становится невозможным взаимодействие области Шайн-Дальгарно мРНК с малой субчастицей, и, как следствие, подавляется инициация трансляции. Кроме того, связывание RMF с рибосомой вызывает поворот головы малой субчастицы, благодаря которому стабилизируется конформация, при которой возможна димеризация 70S рибосомных частиц с образованием 90S частиц, которые стабилизируются за счёт связывания другого гibernационного фактора HPF. В результате образуются трансляционно неактивные 100S димеры рибосом. Они представляют собой две 70S частицы, соединённые в результате контактов между малыми субчастицами (рис. 2.13) [85,86]. Контакт между малыми субчастицами образуется за счёт погружения белка S2 в карман, образованный белками S3, S4 и S5 другой субчастицы.

Сайт связывания гibernационного фактора HPF с рибосомой находится в канале между головой и телом малой субчастицы (рис. 2.12). Он перекрывается с сайтами связывания мРНК и тРНК, а также факторов трансляции IF1, IF3 и EF-G, которые принимают участие в диссоциации 70S рибосомной частицы. Таким образом, белок RMF обеспечивает образование димера рибосом, а HPF защищает его от диссоциации на субчастицы.

Димеризация рибосом является обратимой. Когда клетка попадает в богатую питательными веществами среду, RMF и HPF уходят с рибосомы, и 100S димеры диссоциируют на активные 70S частицы. Таким образом, образование 100S частиц используется для временной «консервации» рибосом в период недостатка ресурсов.

Другим известным рибосомным гibernационным фактором, который так же индуцируется в стационарной фазе посредством (p)ppGpp, является белок YfiA, последовательность которого на 40% идентична HPF. Сайты связывания HPF и YfiA с рибосомой совпадают, но при этом они оказывают противоположное действие на образование 100S рибосомных димеров. Дело в том, что YfiA, в отличие от HPF, содержит в структуре удлинённый С-концевой хвост, который блокирует сайт связывания RMF (рис. 2.12). Кроме того, YfiA стабилизирует голову малой субчастицы в её апо-конфигурации. В результате образования 100S рибосомного димера не происходит. Связавшись с рибосомой, YfiA «консервирует» её в виде 70S мономера, защищая её от диссоциации и блокируя трансляцию [85]. Когда клетка попадает в благоприятные условия, белок YfiA покидает рибосому, в результате чего трансляция возобновляется [84].

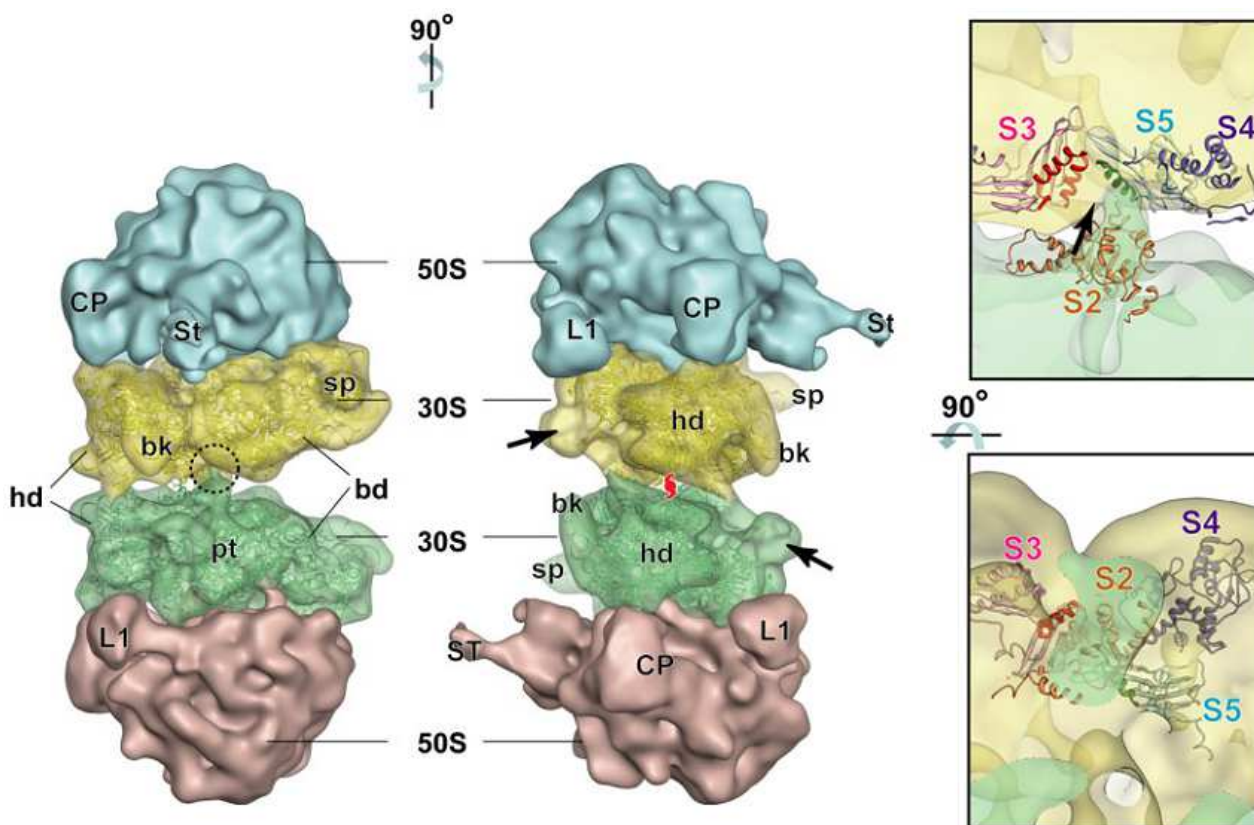


Рисунок 2.13. Структура 100S рибосомных частиц в двух перпендикулярных проекциях. 50S субчастицы окрашены циановым и розовым, 30S субчастицы окрашены жёлтым и зелёным. Область контакта малых субчастиц, выделенная пунктирными линиями, показана справа в увеличенном виде в двух перпендикулярных проекциях. Элементы структуры рибосомы обозначены следующим образом: *bk* – клюв малой субчастицы, *CP* – центральный протуберанец большой субчастицы, *bd* – тело малой субчастицы, *hd* – голова малой субчастицы, *pt* – платформа малой субчастицы рибосомы, *sp* – отросток малой субчастицы, *st* – L7/L12-стебель. Ось симметрии второго порядка показана красным цветом [87].

Другой подход к ингибированию трансляции заключается в блокировке связывания субчастиц. Этот подход реализуется с помощью белка YbeV, который связывается с 50S субчастицей (белком L14) и препятствует образованию 70S рибосом, что также приводит к подавлению синтеза белка в условиях дефицита ресурсов (рис. 2.14) [88].

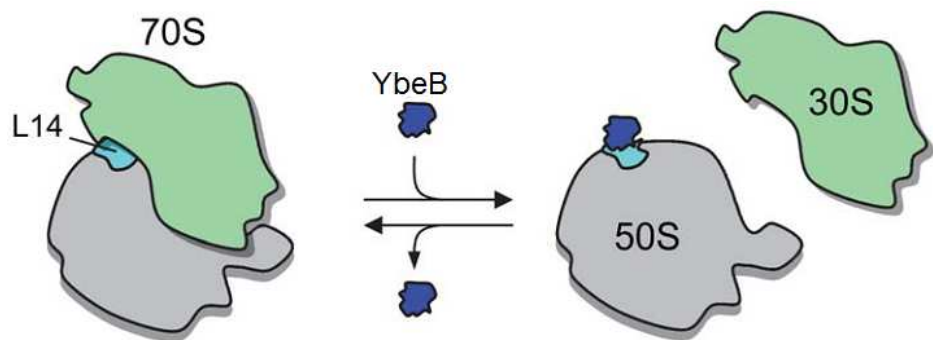


Рисунок 2.14. Механизм действия YbeB. В стационарной фазе YbeB связывается с белком L14 и блокирует образование 70S рибосомных частиц [88].

Показателем доступности питательных веществ и запаса энергии в клетке может служить соотношение АДФ/АТФ. Чем оно выше, тем меньше энергетических ресурсов. В бактериальной клетке существует механизм регуляции синтеза белка в ответ на текущее соотношение АДФ/АТФ. Белок EttA ингибирует трансляцию в случае накопления в клетке АДФ и недостатке АТФ [89]. EttA связывается с рибосомой на стадии инициации трансляции в Е-сайте, располагаясь между белком L1 и инициаторной тРНК в Р-сайте (рис. 2.15). В структуре EttA есть два АТФ-связывающих домена, связывание с рибосомой EttA в комплексе с АДФ ингибирует трансляцию, если же EttA связан с АТФ, то после гидролиза последнего до АДФ EttA покидает рибосому, не влияя на её работу [90]. Экспрессия гена *ettA* увеличивается в стационарной фазе.

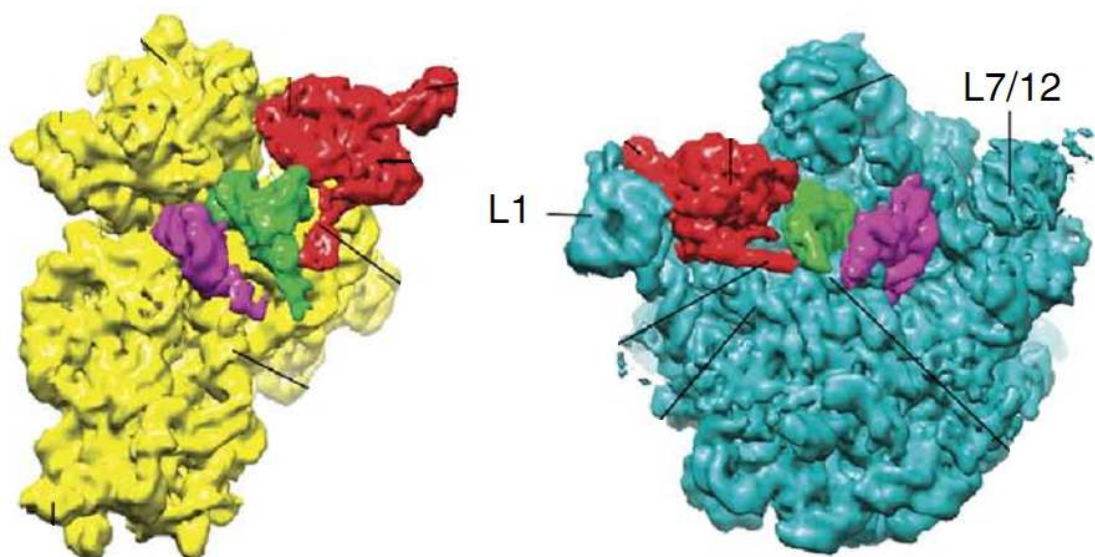


Рисунок 2.15. Сайт связывания EttA (показан красным цветом) на малой (показана жёлтым цветом) и большой (показана голубым цветом) субчастицах рибосомы. тРНК в А- и Р-сайтах показаны фиолетовым и зелёным, соответственно [90].

Ещё одним предполагаемым рибосомным гибернационным фактором является белок YqjD. Он состоит из С-концевого трансмембранного домена и N-концевого домена, который связывается с 70S или 100S рибосомой. YqjD синтезируется в стационарной фазе, экспрессия регулируется сигма фактором RpoS. Предполагается, что YqjD связывается с рибосомой в стационарной фазе, ингибируя её активность и локализуя её возле клеточной мембраны. У белка YqjD в *E. coli* есть два паралога: ElaB и YgaM, которые синтезируются и взаимодействуют с рибосомой аналогично YqjD [91].

Известно, что белок SRA также связывается с рибосомой только в стационарной фазе (в логарифмической фазе роста он представлен в количестве 0,1 копия SRA на одну рибосому, в стационарной фазе эта цифра возрастает до 0,4). Функция SRA до сих пор не установлена [92].

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 гибернационные факторы, как правило, приводит к снижению выживаемости клеток в стационарной фазе. Нами показано, что одним из способов подавления трансляции также является олигоглютамилирование белка S6.

2.5. 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. 2.16.

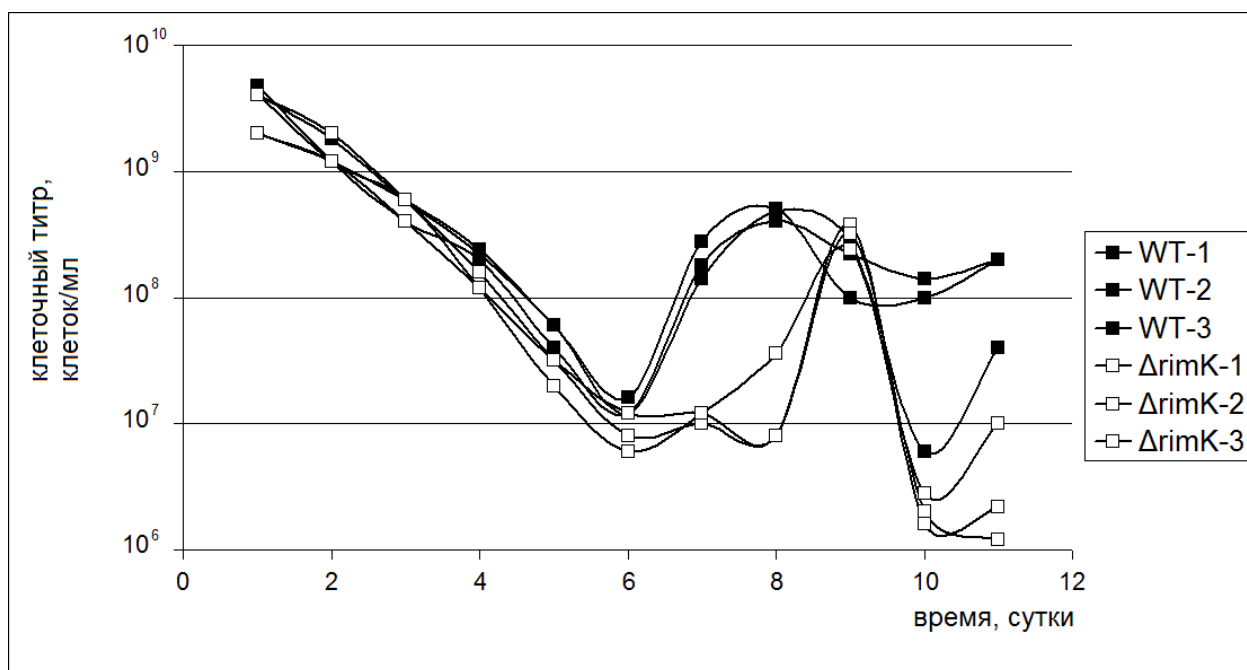


Рисунок. 2.16. Выживаемость клеток дикого типа и *ΔrimK* в стационарной фазе.

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) [93]. 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. 2.17.



Рисунок 2.17. Выживаемость клеток дикого типа и *ΔrimK* в стационарной фазе при совместном культивировании.

В этом случае только клетки дикого типа успевают проявить GASP фенотип, что приводит к полному вытеснению ими клеток *ΔrimK* из культуры. В случае ежедневного пересева в свежую среду смешенной культуры клеток дикого типа и *ΔrimK*, доля последних монотонно падает (рис. 2.18).

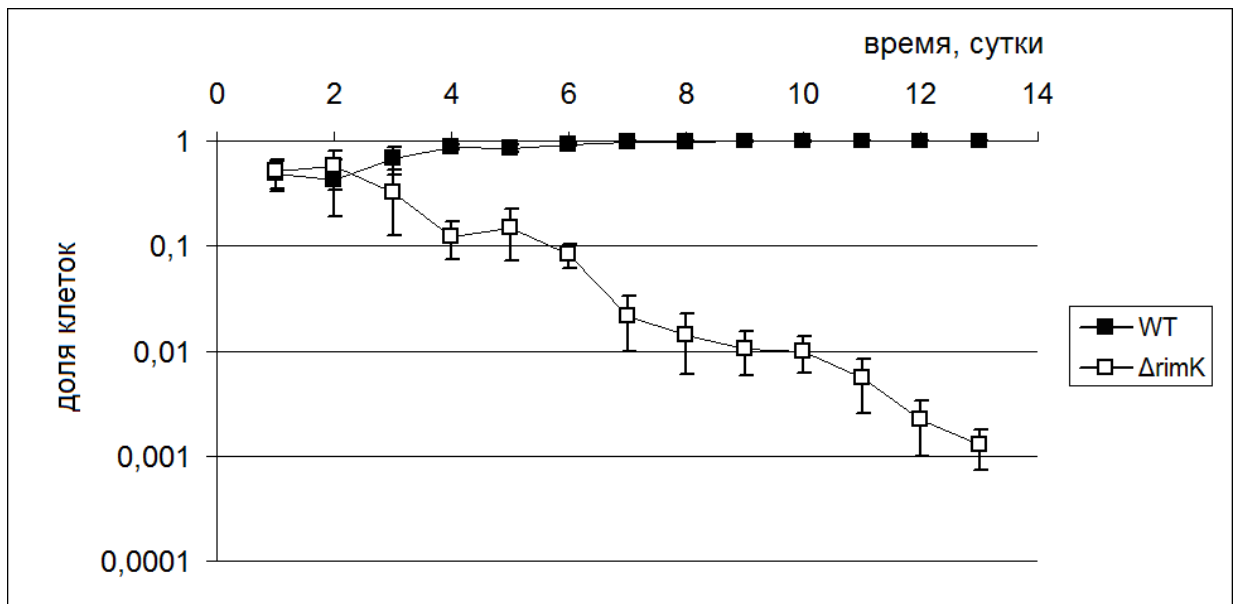


Рисунок 2.18. Вытеснение клеток $\Delta rimK$ клетками дикого типа при совместном культивировании и ежедневных пересевах.

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.

2.6. 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 [94]. 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 HipA, который фосфорилирует глутамил-tРНК синтетазу и тем самым ингибирует трансляцию, обеспечивает образование спящих клеток [95]. 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.[94]

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. 2.19). 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.

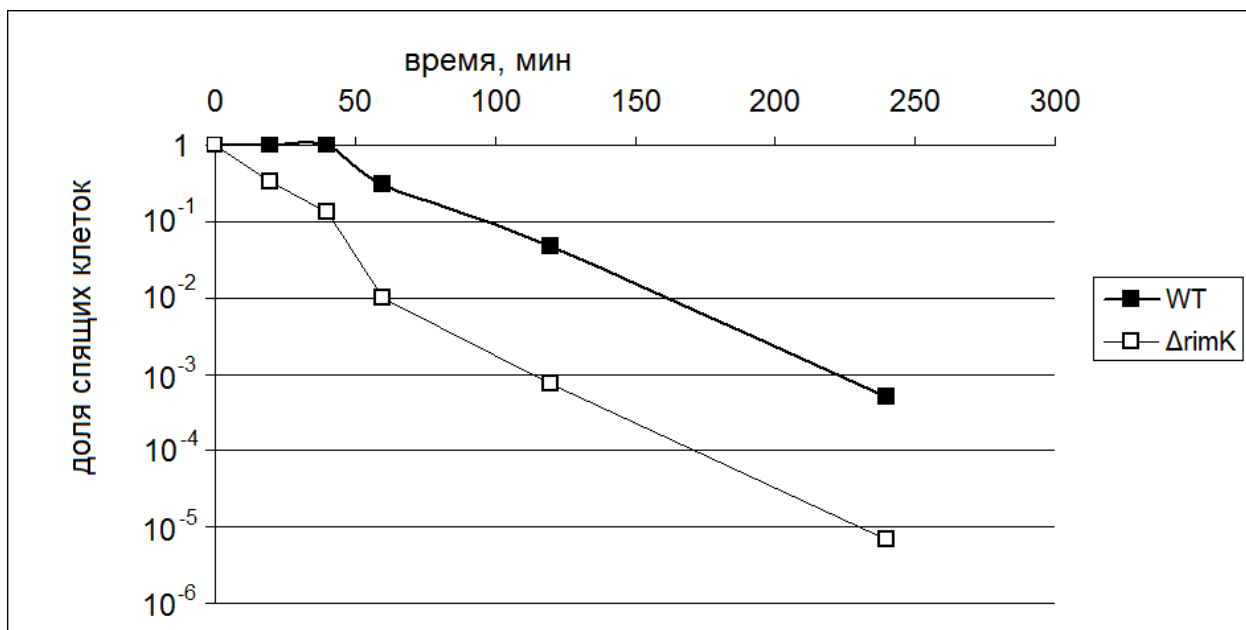


Рисунок 2.19. Доля выживших (спящих) клеток дикого типа и $\Delta rimK$ после добавления к среде ампициллина.

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. 2.20, а схематичное изображение результатов цитометрии на рис. 2.21

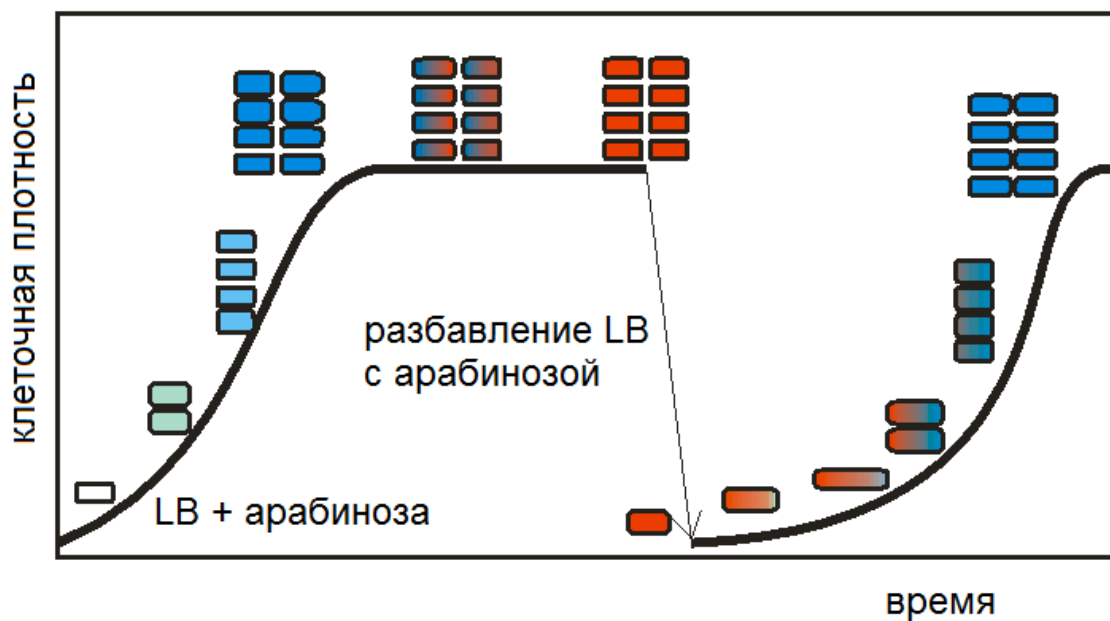


Рисунок 2.20. Схема эксперимента с флуоресцентным белком-таймером FastFT. На первом этапе клетки растут в среде с арабинозой до тех пор, пока весь FastFT не перейдёт в красную форму. После разбавления клеток свежей средой с индуктором клетки начинают синтезировать новый белок FastFT синего цвета.

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. 2.22). 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 в том числе и недавно синтезированный FastFT в голубой форме). Этот результат является независимым подтверждением сделанного нами ранее вывода о влиянии олигоглютамилирования белка S6 на трансляцию в стационарной фазе.

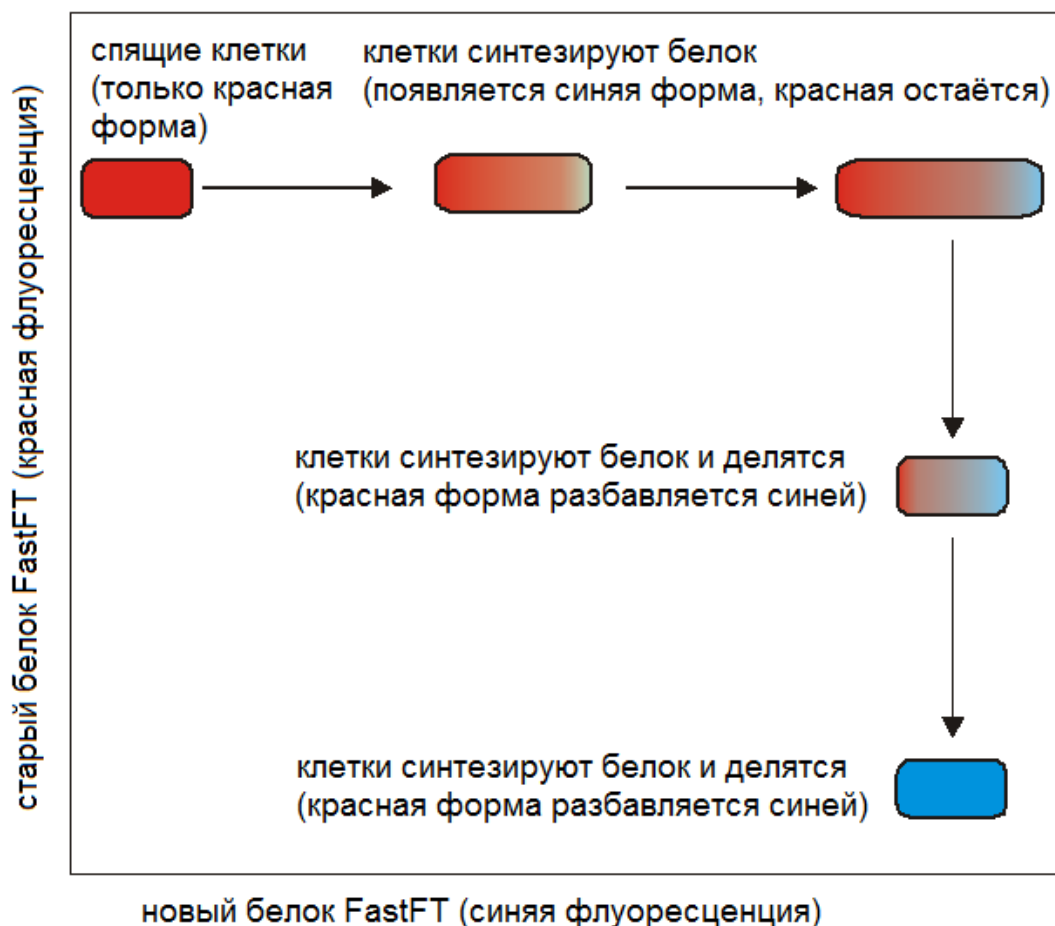


Рисунок 2.21. Схематичное изображение результатов проточной цитометрии. Спящие клетки располагаются в левом верхнем углу.

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.

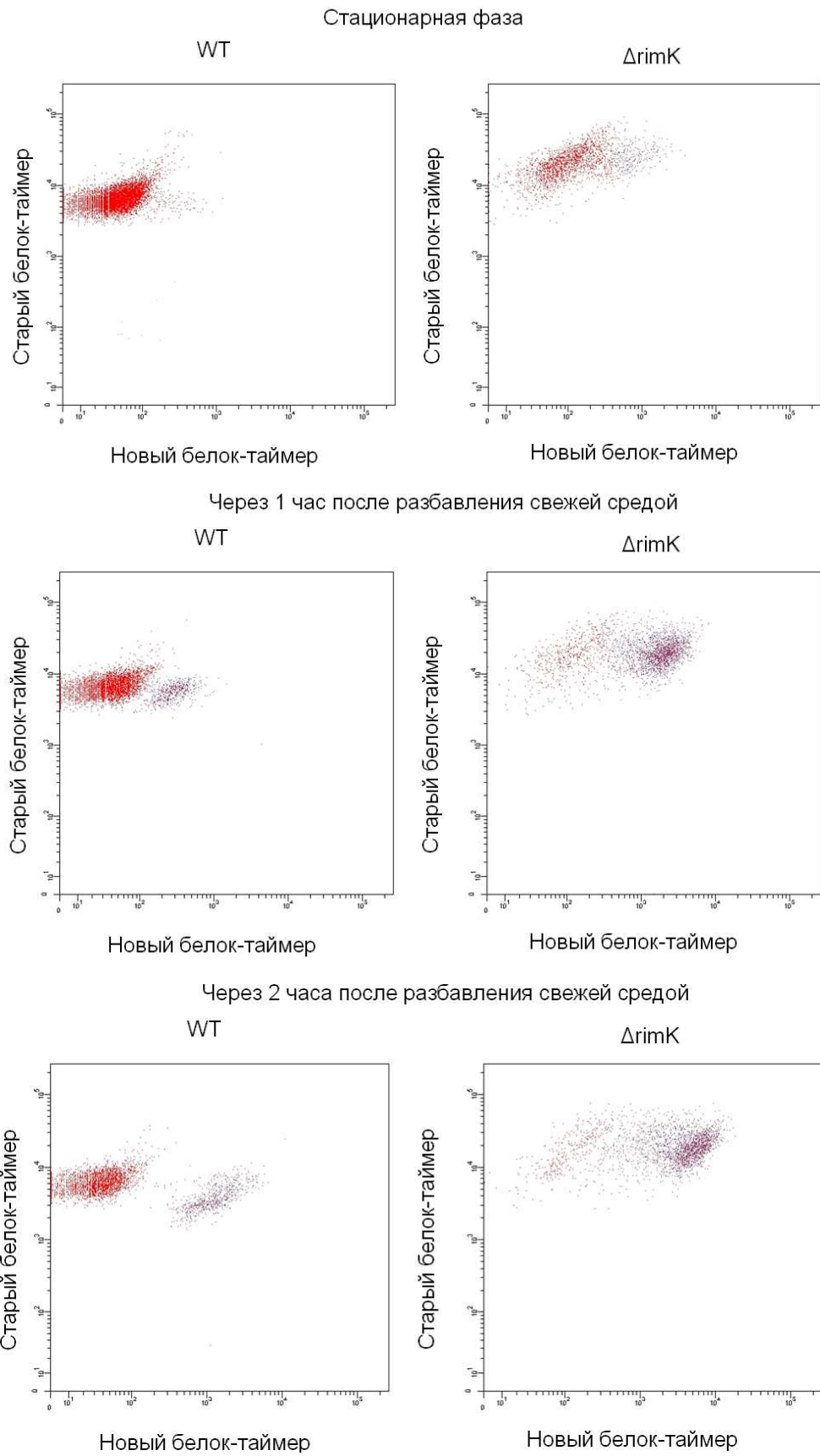
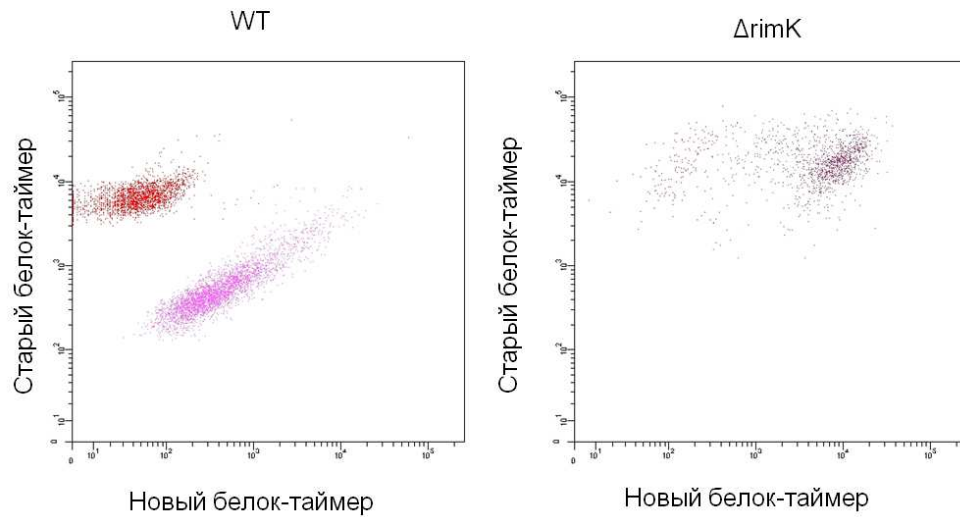
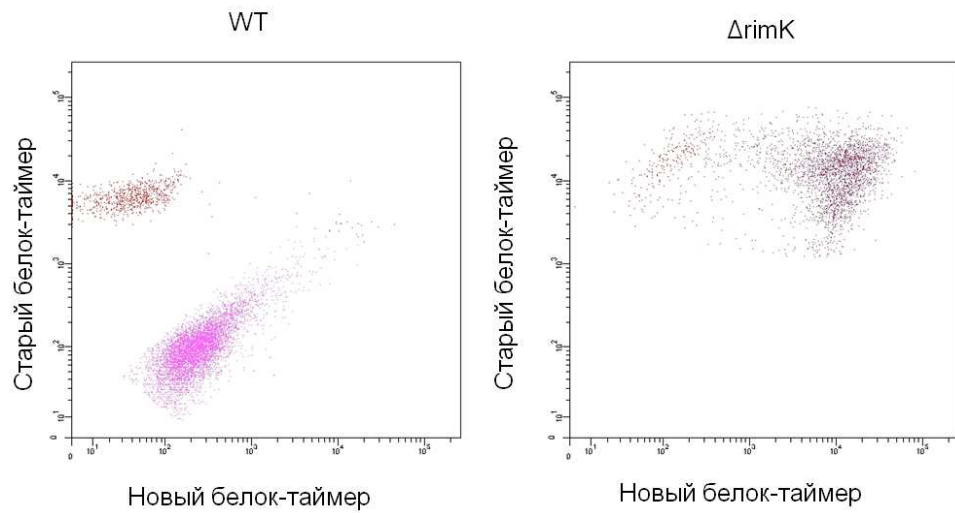


Рисунок 2.22. Результаты проточной цитометрии клеток дикого типа и $\Delta rimK$, синтезирующих флуоресцентный белок-таймер FastFT.

Через 3 часа после разбавления свежей средой



Через 4 часа после разбавления свежей средой



Через 5 часов после разбавления свежей средой

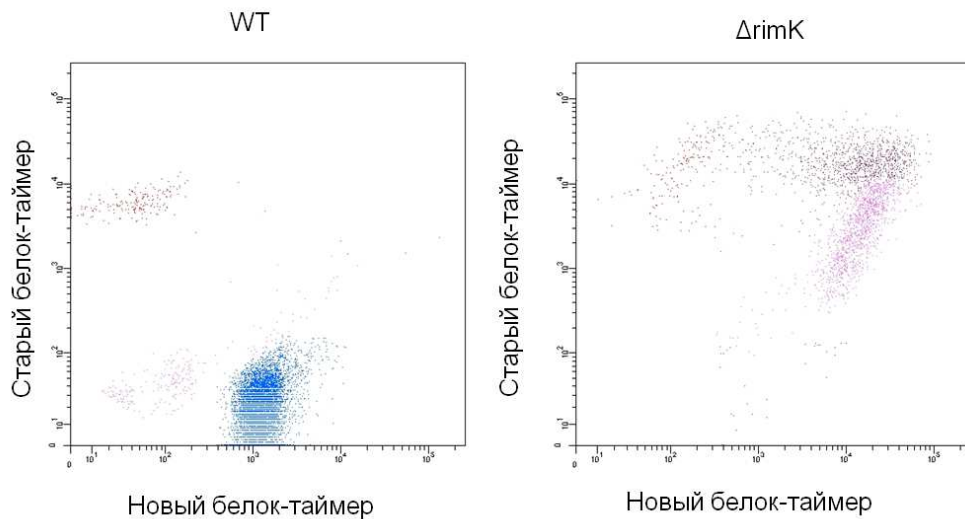


Рисунок 2.22 (продолжение). Результаты проточной цитометрии клеток дикого типа и $\Delta rimK$, синтезирующих флуоресцентный белок-таймер FastFT.

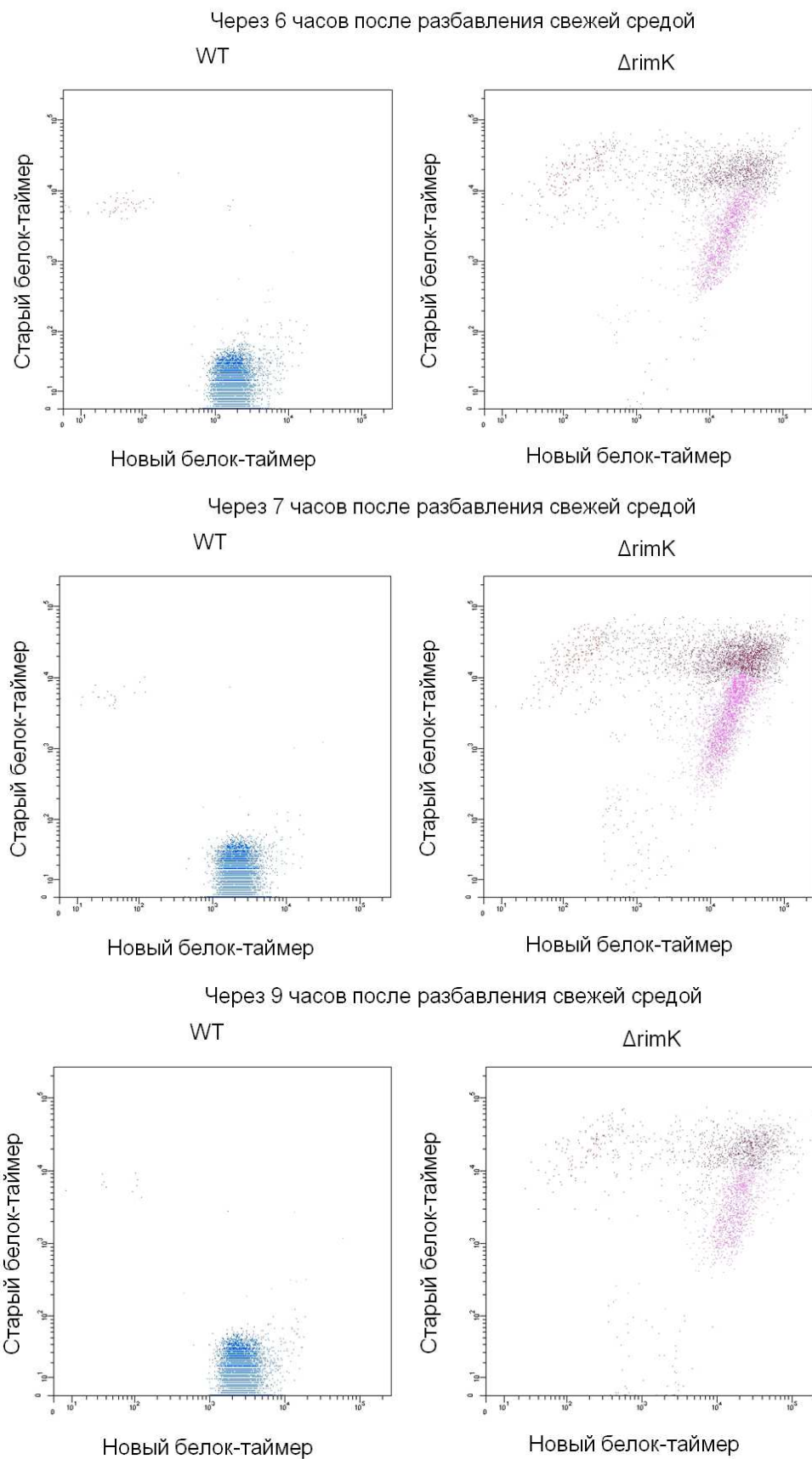


Рисунок 2.22 (продолжение). Результаты проточной цитометрии клеток дикого типа и $\Delta rimK$, синтезирующих флуоресцентный белок-таймер FastFT.

Интересно отметить, что морфология клеток дикого типа и $\Delta rimK$, экспрессирующих FastFT, сильно отличается (рис. 2.23). На изображениях, полученных методом флуоресцентной микроскопии, видно, что клетки дикого типа в стационарной фазе имеют характерную для *E. coli* вытянутую форму, красный FastFT равномерно

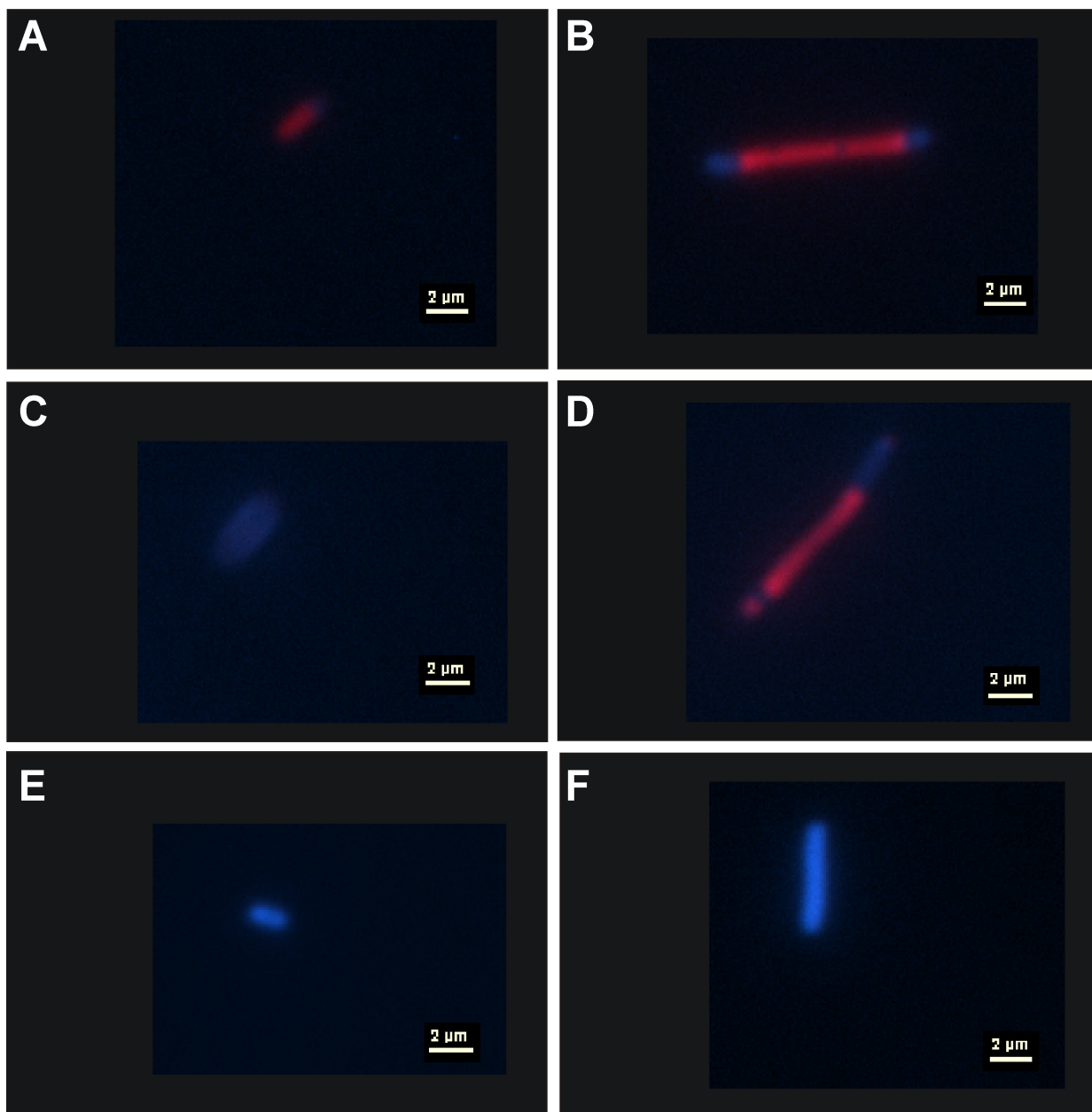


Рисунок 2.23. Морфология клеток дикого типа и $\Delta rimK$, экспрессирующих флуоресцентный белок-таймер FastFT. Синие области соответствуют недавно синтезированному FastFT, красные – старому FastFT. (A) Клетки дикого типа в стационарной фазе. (B) Клетки $\Delta rimK$ в стационарной фазе. (C, E) Клетки дикого типа через 1 и 7 часов после разбавления свежей средой с арабинозой, соответственно. (D, F) Клетки $\Delta rimK$ через 1 и 7 часов после разбавления свежей средой с арабинозой, соответственно.

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.

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.

Заключение

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 олигоглютамилирование 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 *ArimK* в стационарной фазе ниже, чем клеток дикого типа, и они проигрывают последним в конкурентной борьбе.

Мы показали, что для ингибирования трансляции рибосом с олигоглютамилированным 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 понятно. 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. 2.24).

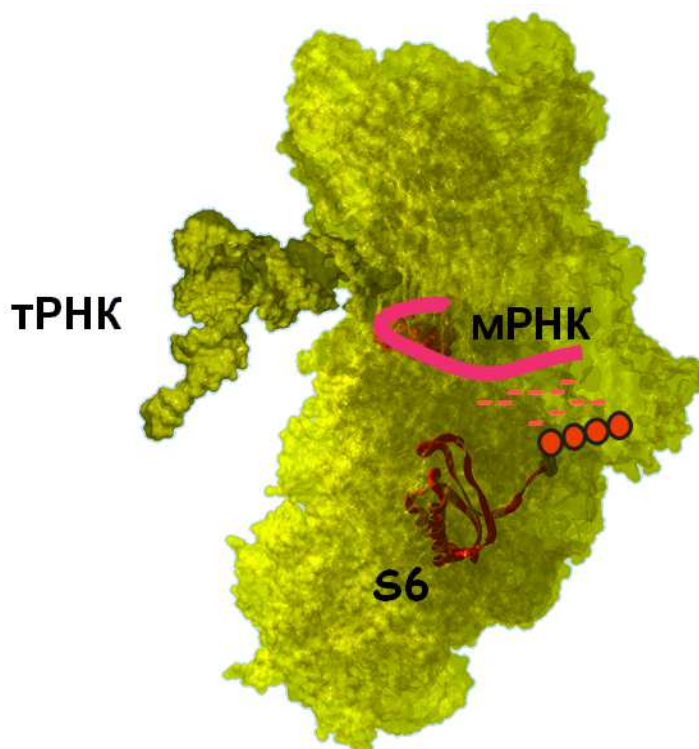


Рисунок 2.24. Пространственная близость С-конца белка S6 с местом посадки мРНК

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, 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 [96]. 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 [50]. Таким образом, олигоглутамилирование рибосомного белка S6 – первая описанная регулируемая посттрансляционная модификация бактериального рибосомного белка, являющаяся частью системы регуляции трансляции.

3. Материалы и методы

3.1. Реактивы и биопрепараты

3.1.1. Реактивы

В работе были использованы следующие реактивы: дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (ICN Biomedicals Inc., США); 1,4-дителиотреитол (DTT), хлорамфеникол, арабиноза, хлорид марганца, гидроксид калия, бромфеноловый синий, ксиленцианол, тиомочевина нитрат серебра, формальдегид, аминокислоты, нуклеозидтрифосфаты, фолиновая кислота, Chaps (Sigma-Aldrich, США); 2-меркаптоэтанол, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД), акриламид, изопропил-1-тио-β-D-галактопиранозид (ИПТГ), сахароза, персульфат аммония, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид аммония, ацетат аммония, борная кислота, трис(оксиметил)аминометан (Tris), агар, агароза глюкоза, гидрофосфат натрия, дигидрофосфат калия, Tween 20, nonidet P40, (Хеликон, Россия); додецилсульфат натрия, хлорид магния, хлорид кальция, ацетат магния, сульфат магния, этилендиаминтетраацетат (ЭДТА), глицерин, ацетон (Merck, Германия); этанол (Ферейн, Россия); N,N'-метиленбисакриламид, мочевиная, N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота (HEPES), глицин, дрожжевой экстракт, бакто-триптон, диметилсульфоксид (ДМСО), канамицин, ампициллин, бычий сывороточный альбумин (БСА) (Amresco, США); Кумасси R250, глутамат калия, ацетонинтил, гидрокарбонат аммония (Fluca); соляная кислота, (Химмед, Россия); уксусная кислота (Экрос, Россия); Triton X-100 (Serva, Германия); имидазол (MP Biomedicals, Франция) карбонат натрия, тиосульфат натрия (Panreac, Испания) амфолиты (Bio-Rad, США); Ni-NTA агароза (Qiagen); U-¹⁴C глутаминовая кислота (Amersham, США), гомопротаргилглицин (Invitrogen, США), гидроксид натрия (Chemapol, Чехословакия).

В работе использовали ферменты фирм: MBI Fermentas (Литва), Promega (США), New England Biolabs (США), Roche (Франция), Helicon (Россия), СибЭнзим (Россия). Олигонуклеотиды фирм ДНК-Синтез (Россия), Евроген (Россия) и Синтол (Россия).

3.1.2. Буферы и растворы

В работе были использованы следующие буферы и растворы:

Микробиологические среды:

LB: 1% (w/v) бактотриптона, 0,5% (w/v) дрожжевого экстракта, 1% (w/v) NaCl.

Агаризованные среды: LB с добавлением 1,5% бактоагара.

SOB: 2% (w/v) бактотриптона, 0,55% (w/v) дрожжевого экстракта, 10 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ MgSO₄.

SOC: 2% (w/v) бактотриптона, 0,55% (w/v) дрожжевого экстракта, 10 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ MgSO₄, 20 мМ глюкоза.

M9: 11,4 г/л Na₂HPO₄·7H₂O, 3 г/л KH₂PO₄, 0,5 г/л NaCl, 1 г/л NH₄Cl, 2 мМ MgSO₄, 0,1 мМ CaCl₂, 0,2% глюкоза.

Буфер для приготовления компетентных клеток ТВ: 10 мМ PIPES, 15 мМ CaCl₂, 250 мМ KCl, 55 мМ MnCl₂, pH 6,7.

Растворы для белкового электрофореза и иммуноблоттинга:

Буфер трис-глицин: 25 мМ Tris-HCl (pH 8,3), 250 мМ глицин, 0,1% SDS.

Разделяющий гель: 15% полиакриламид в смеси с 1/30 бисакриламида, 0,375 М Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 0,1% персульфат аммония, 0,03% TEMED.

Концентрирующий гель: 5% полиакриламид в смеси с 1/30 бисакриламида, 0,125 М Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% персульфат аммония, 0,03% TEMED.

Буфер для нанесения образцов на полиакриламидный гель: 50 мМ Tris-HCl (pH 6,8), 100 мМ DTT, 2% SDS, 0,1% бромфеноловый голубой, 10% глицерин.

Раствор для прокрашивания белковых гелей: 0,25% красителя Кумасси R-250, 45% этанола и 10% уксусной кислоты.

TBST: 50 мМ Tris HCl, pH 7,6; 150 мМ NaCl; 0,05% Tween 20.

Растворы для двумерного белкового электрофореза:

TBS: 50 мМ Tris HCl pH 7,6; 150 мМ NaCl.

Chaps/NP40: 30% Chaps; 10% Nonidet P-40.

Смесь нуклеаз: 0,08 мг/мл рибонуклеазы А, 1 у/мкл дезоксирибонуклеаза I.

Буфер для образца: 30 мМ Tris HCl, pH 8,5; 7М мочевины; 2М тиомочевина; 3% Chaps; 1% Nonidet P-40.

Раствор Бредфорд: 0,01% кумасси G-250; 5% этиловый спирт; 8,5% фосфорной кислоты.

Гель для изоэлектрофокусировки: 4% полиакриламид в смеси с 0,8/29 бисакриламида; 8М мочевины; 2% амфолиты; 1,8% Chaps, 0,6% Nonidet P-40.

8% ПААГ: 8% полиакриламид в смеси с 1/30 бисакриламида; 0,375 М Tris-HCl, pH 8,8; 0,1% SDS; 0,1% персульфат аммония; 0,02% TEMED.

16% ПААГ: 16% полиакриламид в смеси с 1/30 бисакриламида; 0,375 М Tris-HCl, pH 8,8; 0,1% SDS; 0,025% персульфат аммония; 0,02% TEMED.

Буфер для уравнивания: 150 мМ Tris-HCl, pH 6,8; 8М мочевины; 2,5% SDS; 50% глицерин.

Фиксаж: 20% этанол, 10% уксусная кислота.

Растворы для окрашивания белковых гелей серебром:

Раствор тиосульфата натрия: 0,03% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

Раствор нитрата серебра: 0,1% AgNO_3 ; 0,04% формальдегид.

Проявитель: 4% Na_2CO_3 ; 0,0006% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; 0,04% формальдегид.

Раствор для остановки окрашивания: 10% уксусная кислота.

Растворы для подготовки образцов белков к MALDI:

Буфер для промывки: 50 мМ NH_4HCO_3 ; 40% ацетонитрил.

Раствор для трипсинолиза: 10 нг/мкл трипсин; 100 мМ NH_4HCO_3 .

Раствор для окончания трипсинолиза и элюции пептидов из геля: 0,5% трифторуксусная кислота.

Растворы для электрофореза в агарозном геле:

ТВЕ: 100 мМ Tris-HCl; 100 мМ H_3BO_3 ; 2 мМ EDTA pH 8,3.

Агарозные гели: 1-2% агарозы в буфере ТВЕ, 1 мкг/мл этидий-бромид.

Буфер для нанесения образцов в агарозный гель: 10 мМ Tris-HCl (pH 7,6), 0,03% бромфенолового синего, 0,03% ксиленцианола, 60 мМ ЭДТА, 60% глицерин, ТВЕ.

Буферы для выделения рибосом, рибосомных белков:

Связывающий буфер (для выделения рибосом): 20 мМ Hepes-KOH (pH 7,5); 10 мМ $\text{Mg}(\text{OAc})_2$; 100 мМ NH_4OAc ; 2 мМ дитиотреитол.

Диссоциирующий буфер (для выделения рибосом): 20 мМ Hepes-KOH (pH 7,5); 1 мМ $\text{Mg}(\text{OAc})_2$; 100 мМ NH_4OAc ; 2 мМ дитиотреитол.

Буфер для суммарного рибосомного белка: 20 мМ Tris-HCl (pH 7,4), 4 мМ $\text{Mg}(\text{OAc})_2$, 400 мМ NH_4Cl , 0,2 мМ ЭДТА, 5 мМ 2-меркаптоэтанол.

Буферы для выделения белка с помощью Ni-NTA агарозы:

Буфер для промывки клеток: 10 мМ Tris-HCl (pH 7,8), 1 мМ MgCl_2 , 100 мМ NH_4Cl .

Буфер для лизиса: 10 мМ Tris-HCl (pH 7,8), 1 мМ MgCl_2 , 100 мМ NH_4Cl , 5 мМ имидазол, 0,1% лизоцим.

Буфер для промывки смолы: 10 мМ Tris-HCl (pH 7,8), 1 мМ MgCl_2 , 100 мМ NH_4Cl , 40 мМ имидазол.

Буфер для элюции: 10 мМ Tris-HCl (pH 7,8), 1 мМ MgCl_2 , 100 мМ NH_4Cl , 400 мМ имидазол, 0,1% Тритон X100, 2 мМ дитиотреитол.

Буфер для диализа: 10 мМ Tris-HCl (pH 7,8), 1 мМ MgCl_2 , 100 мМ NH_4Cl , 0,1% Тритон X100, 2 мМ дитиотреитол.

Растворы для *in vitro* трансляции:

Раствор А: 87,5 мМ Tris-CH₃COOH (pH 8); 0,5 мМ глутамат калия; 75 мМ CH₃COONH₄; 5 мМ DTT; 20 мМ (CH₃COO)₂Mg; 1,25 мМ аминокислоты; 5 мМ АТФ; 1,25 мМ ГТФ; 1,25 мМ ЦТФ; 1,25 мМ УТФ; фосфоенолпируват; 0,25 мг/мл тРНК; 50 мкг/мл фолиновая кислота.

Раствор рибонуклеазы А: 1 мкг/мл рибонуклеаза А.

Буфер для проточной цитометрии:

PBS: 1,57 мМ KH₂PO₄; 5,2 мМ Na₂HPO₄; 150 мМ NaCl.

Буферы для работы с ДНК:

Буферы для эндонуклеаз рестрикции фирм: MBI Fermentas (Литва), Promega (США), New England Biolabs (Англия), Roche (Франция), СибЭнзим (Россия); буфер для ДНК лигазы бактериофага Т4 фирмы MBI Fermentas (Литва).

3.1.3. Штаммы и плазмиды

Таблица. 3.1. Используемые в работе штаммы.

Штамм	Описание	Ссылка
BW25113	<i>lacI^f rrnB^{T14} ΔlacZWJ16 hsdR514 ΔaraBADAH33</i> <i>ΔrhaBADLD78</i>	[97]
JW0836	<i>lacI^f rrnB^{T14} ΔlacZWJ16 hsdR514 ΔaraBADAH33</i> <i>ΔrhaBADLD78, ΔrimK::kan</i>	[98]
JM109	<i>e14- (McrA-) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r_K- m_K+)</i> <i>supE44 relA1 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI^fZΔM15]</i>	
BL21 (DE3)	<i>F⁻ dcm ompT hsdS(r_B- m_B-) gal λDE3</i>	Invitrogen
<i>ΔrimK-S6-E4-cat</i>	<i>lacI^f rrnB^{T14} ΔlacZWJ16 hsdR514 ΔaraBADAH33</i> <i>ΔrhaBADLD78, ΔrimK::kan, ΔrpsF::(rpsFE4-cat)</i>	
<i>ΔrimK-S6-cat</i>	<i>lacI^f rrnB^{T14} ΔlacZWJ16 hsdR514 ΔaraBADAH33</i> <i>ΔrhaBADLD78, ΔrimK::kan, ΔrpsF::(rpsF-cat)</i>	

Таблица 3.2. Плазмиды, использованные в работе

Плаزمида	Описание	Ссылка
pCA24rpsF	pCA24N, Cam ^R , ген <i>rpsF</i> под контролем T5lac промотора	[99]
pET-33b		Novagen
pBAD-FastFT	pBAD, Amp ^r , ген FastFT под контролем арабинозного промотора	[100]

3.1.4. Олигонуклеотиды

Таблица 3.3. ДНК-олигонуклеотиды, использованные в работе.

Название олигонуклеотида	Нуклеотидная последовательность (5' - 3')
S6-N-pr1	CATAGTTAATTTCTCCTCTTTAATG
S6-N-pr2	CGTCATTACGAAATCGTTTTTATG
S6-QCF	AAGCTGGGGATTCTGAAGAGTAAGGGTTCGACCTGCAGCCA
S6-QCR	TGGCTGCAGGTCGACCCTTACTCTTCAGAATCCCCAGCTT
S6-QCEF	AAGCTGGGGATTCTGAAGAGGAAGAGGAAGAGTAAGGGTTCG ACCTGCAGCCA
S6-QCER	TGGCTGCAGGTCGACCCTTACTCTTCCTCTTCCTCTTCAGAAT CCCCAGCTT
Seq-pCA24N_982rev	СТААТТААГСТТГГСТГ
S6-ins-f	GTCATTACGAAATCGTTTTTATG
S6-ins-r	GCACACGGTGCCGGACAACACCAGACGGTTGGTCATCAGAA ATTACGCCCCGCCCTGCC
S6-ver-f	ACAGGAGGCTGAATAATCCG
S6-ver-r	GAATTCCTGATGGACTGACC
rimK-pr1	CCATGGTCAAААТТGCCАТТGTCCCGG
rimK-pr2	GTCGACACCACCCGTTTTTCAGGCAAT
T7-prom-seq	TAATACGACTCACTATAGGG

3.2. Методики, использованные в работе

3.2.1. Манипуляции с ДНК

3.2.1.1. Выделение плазмидной ДНК

Выделение плазмидной ДНК осуществляли с помощью набора реагентов для выделения плазмидной ДНК фирмы Fermentas согласно протоколу с использованием фирменных растворов.

Колонию клеток *E. coli*, несущую определенную плазмиду, помещали в 5 мл среды LB, содержащей соответствующий антибиотик, и инкубировали при перемешивании в течение 16 ч при 37°C. Клетки осаждали центрифугированием при 7000 об/мин 5 мин, ресуспендировали в 250 мкл Resuspension Solution (Fermentas), добавляли 250 мкл Lysis Solution (Fermentas), перемешивали, переворачивая пробирку, до образования вязкого прозрачного раствора. К полученному раствору добавляли 350 мкл Neutralization Solution (Fermentas), перемешивали, переворачивая пробирку, до появления белого хлопьевидного осадка. Осадок удаляли центрифугированием при 14000 об/мин в течение 5 мин, отбирали супернатант и пропускали его через специальную колонку для выделения ДНК (Fermentas), два раза промывали эту колонку 500 мкл Wash Solution (Fermentas), затем центрифугировали при 14000 об/мин для удаления следов этанола. Плазмидную ДНК элюировали с колонки 50 мкл Elution Buffer (Fermentas).

3.2.1.2. Определение концентрации ДНК в растворе.

Отбирали 5–10 мкл раствора ДНК (плазмидная ДНК, ПЦР-фрагменты, праймеры) в воде или в буферном растворе EB (Qiagen), добавляли до 100 мкл раствор 0,1 М Tris-HCl pH 8,0, измеряли поглощение полученного раствора при 260 нм. Полученное значение A_{260} с учетом разбавления пересчитывали в значение концентрации ДНК мкг/мкл. При необходимости рассчитывали значение концентрации ДНК в единицах пмоль/мкл.

3.2.1.3. Рестриктивный анализ плазмидной ДНК

Составляли следующую реакционную смесь:

Раствор плазмидной ДНК	1 мкл
10x буфер для эндонуклеазы рестрикции	1 мкл
Эндонуклеаза рестрикции	1 ед
H ₂ O	до 10 мкл

Полученную смесь инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Добавляли 2 мкл 6x буфера для нанесения, наносили на агарозный гель и приводили разделение фрагментов ДНК. Распределение фрагментов по длине определяли с помощью камеры с УФ-лампой.

3.2.1.4 Разделение фрагментов ДНК в агарозном геле [101]

Для приготовления агарозного геля добавляли 0,8–1,0 г агарозы к 100 мл раствора 1xTBE. Раствор прогревали в микроволновой печи до полного растворения агарозы, но не допуская кипения. После этого полученный раствор охлаждали до ~ 40–50°C, добавляли 10 мкл водного раствора бромистого этидия 10 мг/мл, перемешивали, выливали в плашку. После застывания геля вносили образцы, смешанные с буфером для нанесения, в ячейки и проводили электрофорез при силе тока ~ 100–150 мА. Разделение фрагментов ДНК контролировали с помощью камеры с УФ-лампой.

3.2.1.5. Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля

Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля проводили с помощью набора реагентов для выделения фрагментов ДНК из агарозного геля фирмы Fermentas согласно протоколу с использованием фирменных реагентов.

Из агарозного геля вырезали полоску, содержащую нужный фрагмент ДНК, взвешивали и помещали в пластиковую пробирку на 1,5 мл. Добавляли Binding Buffer (Fermentas) в отношении 1:1 (объем раствора к массе полоски геля). Инкубировали пробирку при 50-60°C в течение 10 мин, перемешивая каждые 2-3 мин, до полного растворения геля. Переносили полученный раствор в специальную колонку для выделения ДНК и центрифугировали при 14000 об/мин 1 мин. Промывали колонку 700 мкл Wash Solution (Fermentas). Элюировали ДНК 50 мкл Elution Buffer (Fermentas). Качество выделения и приблизительную концентрацию ДНК определяли с помощью электрофореза в агарозном геле.

3.2.1.6. Приготовление вектора и вставки [101]

Составляли следующую реакционную смесь:

Плазмидная ДНК	1–4 мкг
10x буфер для эндонуклеазы рестрикции	4 мкл
Эндонуклеаза рестрикции	1 мкл
H ₂ O	до 40 мкл

Полученную смесь инкубировали при 37°C в течение 2–4 ч. Добавляли 8 мкл буфера для нанесения, наносили на агарозный гель и проводили электрофорез при 100–150 мА. ДНК-фрагмент нужной длины вырезали из геля и выделяли с помощью набора реагентов для выделения ДНК из агарозного геля (Fermentas).

3.2.1.7. Лигирование [101]

Составляли следующую реакционную смесь:

Вектор	20 нг
--------	-------

Вставка 10–50 нг (3х–10х мольный избыток по отношению к вектору)

10х буфер для T4 ДНК-лигазы 1 мкл
H₂O до 10 мкл

Смесь перемешивали, добавляли 1 ед. T4 ДНК-лигазы. Инкубировали при комнатной температуре в течение 2-3 ч. Полученными лигазными смесями трансформировали компетентные клетки штамма JM109 *E. coli*.

3.2.1.8. ПЦР.

Обычно в пробирке 0,5 мл составляли следующую смесь:

10х буферный раствор для Taq-полимеразы 5 мкл
матричная ДНК (плазмидная или геномная) 5–50 нг
праймер 1 5–20 пмоль
праймер 2 5–20 пмоль
смесь dNTP по 0,2 мМ каждого
Mg(OAc)₂ 2,5 мМ
H₂O до 49 мкл

Добавляли 1 мкл Taq-полимеразы (1 ед/мкл), тщательно перемешивали. Помещали пробирку в прибор для проведения ПЦР Mastercycler gradient фирмы Eppendorf.

Параметры ПЦР: предварительный прогрев 95°C, 3 мин,
25–35 циклов: 95°C, 1 мин,
55–65°C, 1 мин,
72°C, 1–5 мин.

После проведения ПЦР в смесь добавляли 10 мкл буфера для нанесения, проводили разделение фрагментов ДНК в 1% агарозном геле.

3.2.1.9. Мутагенез с помощью набора QuickChange (Stratagene)

В пробирке 0,2 мл составляли следующую смесь:

10х буферный раствор (из набора) 5 мкл
плазмидная ДНК 5 нг
праймер 1 125 нг
праймер 2 (комплементарный) 125 нг
смесь dNTP (из набора) 1 мкл
H₂O до 49 мкл

Добавляли 1 мкл PfuTurbo-полимеразы (2,5 ед/мкл), тщательно перемешивали. Помещали пробирку в прибор для проведения ПЦР Mastercycler gradient фирмы Eppendorf.

Параметры ПЦР: предварительный прогрев 95°C, 30 с,
12-18 циклов: 95°C, 30 с,
55°C, 1 мин,
68°C, 2мин/1000 пар
нуклеотидов плазмиды.

После проведения ПЦР проводили трансформацию компетентных клеток *E.coli* штамма JM-109.

3.2.1.10. Секвенирование плазмид и ПЦР-продуктов

Нуклеотидную последовательность полученной плазмиды определяли с помощью автоматического секвенатора ABI prism 3100-Avant genetic Analyzer (4-х капиллярный). Для проведения секвенирования образцы, содержащие анализируемую ДНК и соответствующий праймер, отдавали в Центр Коллективного Пользования «Геном» (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН).

3.2.1.11. Приготовление компетентных клеток [102]

Несколько колоний клеток переносили в колбу с 50 мл LB, растили при интенсивном перемешивании при 18°C до $A_{600} \sim 0,6$. После этого клетки охлаждали во льду в течение 10 мин и осаждали центрифугированием при 4000 об/мин 10 мин при 4°C. Сливали супернатант, центрифугировали повторно при 4000 об/мин 10 мин при 4°C. Отбирали остатки супернатанта и ресуспендировали осадок клеток в 15 мл ТВ, полученную суспензию инкубировали 10 мин при 0°C. Центрифугировали суспензию при 3000 об/мин 10 мин при 4°C, сливали супернатант, после чего повторно центрифугировали при 3000 об/мин 10 мин при 4°C и отбирали остатки супернатанта.

Полученный промытый осадок клеток ресуспендировали в 2 мл ТВ, добавляли 70 мкл ДМСО и инкубировали полученную суспензию 10 мин при 0°C. После этого добавляли к суспензии ещё 70 мкл ДМСО и снова инкубировали 10 мин при 0°C. Полученные таким образом компетентные клетки аликвотили по 200 мкл и замораживали в жидком азоте.

3.2.1.12. Трансформация компетентных клеток

Суспензию компетентных клеток размораживали во льду, добавляли 1 мкл раствора плазмидной ДНК или 10 мкл лигазной смеси, инкубировали 30 мин при 0°C.

Затем прогревали смесь на водяной бане в течение 40–50 сек при 42°C, охлаждали до 0°C, добавляли 500 мкл LB и инкубировали 1 час при 37°C, интенсивно перемешивая. Аликвоту 100–200 мкл (в случае плазмидной ДНК) или полный объем (в случае лигазной смеси) трансформационной смеси высевали на чашку Петри с твердой средой LB, содержащей соответствующие антибиотики. Инкубировали чашку при 37°C в течение 16 ч.

3.2.2. Получение модельных штаммов *ΔrimK-S6-cat* и *ΔrimK-S6-E₄-cat*

3.2.2.1. Получение кассеты для трансформации

За основу для кассеты была взята плазида pCA24N-rpsF [99]. Эта плазида содержит в себе ген *rpsF*, кодирующий рибосомный белок S6, и ген устойчивости к хлорамфениколу. Ген *rpsF* в этой плазмиде содержит N- и C-концевые довески. На первом этапе требовалось удалить эти довески с обоих концов гена *rpsF*, а также внести дополнительные кодоны глутаминовой кислоты в конец гена. N-концевой довесок в гене *rpsF* был удалён с помощью ПЦР с плазмиды pCA24N-rpsF с праймерами S6-N-pr1 и S6-N-pr2 и последующего самолигирования ПЦР-продукта. Праймеры были подобраны так, чтобы в ПЦР амплифицировалась вся плазида кроме дополнительных кодонов в начале гена *rpsF* (N-концевого довеска).

Удаление дополнительных кодонов в конце гена *rpsF* а также внесение 4-х кодонов глутаминовой кислоты в конец гена осуществлялось посредством сайт-направленного мутагенеза с помощью набора QuickChange (Stratagene) с праймерами S6-QCF и S6-QCR или S6-QCEF и S6-QCER. В случае первой пары праймеров происходило удаление кодонов, кодирующих C-концевой довесок, а в случае второй, помимо удаления довеска осуществлялась также и вставка 4-х дополнительных кодонов глутаминовой кислоты. Полученные плазмиды были секвенированы с праймером Seq-pCA24N_982rev.

Таким образом были получены две плазмиды, первая с нативным вариантом гена *rpsF*, а вторая – с геном *rpsF*, кодирующем белок S6 с четырьмя дополнительными остатками глутаминовой кислоты на C-конце. Эти плазмиды служили матрицами для ПЦР с праймерами S6-ins-f и S6-ins-r. В результате были получены две кассеты, содержащие модифицированный/немодифицированный вариант S6 и ген устойчивости к хлорамфениколу. Кассеты на концах содержали фланки, идентичные участкам геномной ДНК, в которые они были вставлены.

3.2.2.2. Внесение кассеты в геномную ДНК

За основу была взята методика получения нокаутных штаммов *E. coli* [97]. Клетки *ΔrimK* трансформировали плазмидой pKD46. Из полученных трансформантов

выращивали ночную культуру в SOB с ампициллином при 30°C. 1 мл ночной культуры разбавляли 100 мл SOB с ампициллином и 10мМ арабинозой, растили при интенсивном перемешивании при 30°C до $A_{600} \sim 0,6$. После этого клетки осаждали центрифугированием при 4000 об/мин 10 мин при 4°C. Сливали супернатант, центрифугировали повторно при 4000 об/мин 10 мин при 4°C. Отбирали остатки супернатанта и ресуспендировали осадок клеток в 50 мл 10% раствора глицерина в деионизованной воде. Центрифугировали суспензию при 4000 об/мин 10 мин при 4°C, сливали супернатант, после чего повторно центрифугировали при 4000 об/мин 10 мин при 4°C и отбирали остатки супернатанта. Повторяли описанную выше процедуру промывки клеток 10% глицерином.

Полученный промытый осадок клеток ресуспендировали в 0,4 мл 10% раствора глицерина в деионизованной воде, суспензию аликвотили по 100 мкл и замораживали в жидком азоте.

К аликвоте электрокомпетентных клеток *ΔrimK* добавляли 10 мкл раствора ДНК-кассеты и осуществляли электропорацию (1800 В). После электропорации к суспензии добавляли 4-х кратный объём SOC, инкубировали при 37°C и высевали полученную суспензию на чашку Петри с твердой средой LB, содержащей канамицин и хлорамфеникол. Инкубировали чашку при 37°C в течение 24 ч.

3.2.2.1. Анализ полученных клонов

Полученные колонии высевали в жидкую среду LB, выращивали ночные культуры. 5 мкл ночной культуры помещали в 0,2 мл пробирку, клетки осаждали центрифугированием 3000 об/мин, 5 минут, отбирали супернатант. Полученный осадок ресуспендировали в 10 мкл реакционной смеси и проводили ПЦР с праймерами S6-ver-f и S6-ver-r. Длину полученного ПЦР-продукта определяли с помощью электрофореза в агарозном геле. В случае успешной вставки кассеты в геномную ДНК полученный ПЦР-продукт секвенировали.

3.2.3. Получение плазмиды для экспрессии гена *rimK*

Плазмиду pET-33b (Novagen), обработанную эндонуклеазами рестрикции NcoI и XhoI, использовали в качестве вектора. Вставкой служил обработанный эндонуклеазами рестрикции NcoI и SalI ПЦР-продукт, полученный в результате ПЦР с геномной ДНК из клеток дикого типа с праймерами *rimK-pr1* и *rimK-pr2*. Проводили лигирование вектора и вставки и трансформацию продуктом лигирования компетентных клеток JM109. Полученную плазмиду секвенировали, используя праймер T7-prom-seq. Для выделения рекомбинантного RimK использовали штамм BL21 (DE3).

3.2.4. Работа с клеточными культурами

3.2.4.1. Определение титра клеток

1 мкл культуры разводили стерильной средой LB до 100 мкл. Далее проводили последовательные разбавления культуры с шагом в 10 раз стерильной средой LB, получая таким образом ряд разбавлений 10^2 - 10^7 . По 5 мкл из каждого образца разбавленной культуры высевали чашки Петри с LB. Чашки инкубировали при 37°C в течении ночи, считали количество колоний клеток и рассчитывали клеточный титр.

3.2.4.2. Измерение выживаемости клеток в стационарной фазе роста

Инокулировали 10 мл среды LB колонией клеток дикого типа или *ΔrimK*. Культуру выращивали при 37°C и умеренном перемешивании в течение 14 суток. Раз в сутки отбирали 1 мкл культуры для измерения клеточного титра.

В случае измерения выживаемости клеток дикого типа и *ΔrimK* при совместном культивировании, образцы разбавленной культуры высевали на чашки Петри с LB без антибиотика и с канамицином, селективно ингибирующим рост клеток дикого типа, но не клеток *ΔrimK*. После инкубации чашек при 37°C в течении ночи, считали количество колоний клеток и рассчитывали титр клеток дикого типа и *ΔrimK*.

3.2.4.3. Измерение скорости вытеснения клеток *ΔrimK* клетками дикого типа при совместном культивировании

Инокулировали 5 мл среды LB колонией клеток дикого типа. В другой пробирке, инокулировали 5 мл среды LB колонией клеток *ΔrimK*. После выращивания в течении ночи при 37°C и умеренном перемешивании, культуры клеток смешивали и использовали 10 мкл смеси для инокуляции 10 мл среды LB. Смесь клеток двух штаммов выращивали в течении ночи при 37°C и умеренном перемешивании. Использовали 10 мкл полученной культуры для инокуляции 10 мл среды и цикл роста повторяли. Проводили 12 циклов роста.

После каждого цикла, 1 мкл культуры использовали для определения титра клеток LB. Образцы разбавленной культуры высевали на чашки Петри с LB без антибиотика и с канамицином, селективно ингибирующим рост клеток дикого типа, но не клеток *ΔrimK*. После инкубации чашек при 37°C в течении ночи, считали количество колоний клеток и рассчитывали титр клеток дикого типа и *ΔrimK*.

3.2.4.4. Определение количества спящих клеток (ампициллиновый тест)

Клетки растили в LB до $A_{600} \sim 0,6$, после чего к культуре добавляли ампициллин (50 мкг/мл), инкубировали при 37°C и умеренном перемешивании и определяли титр

клеток через разные промежутки времени. Для сравнения использовали клеточный титр исходной культуры без антибиотика.

3.2.4.5. Определение количества спящих клеток с помощью проточной цитометрии

Клетки дикого типа и *ΔrimK* трансформировали плазмидой pBAD-FastFT. Полученными колониями инокулировали 5 мл среды LB с ампициллином и 10 мМ арабинозой и инкубировали при 37°C и умеренном перемешивании в течение 2 суток. 1 мл полученной культуры разбавляли в 100 мл среды LB с ампициллином и 10 мМ арабинозой и инкубировали при 37°C и умеренном перемешивании. Через каждый час отбирали аликвоту культуры, осаждали клетки центрифугированием при 5000 об/мин, промывали осадок ресуспендированием в стерильном фильтрованном PBS и последующем центрифугированием при 5000 об/мин. Осадок клеток ресуспендировали в стерильном фильтрованном PBS и анализировали на цитометре FacsAria III (Becton Dickinson and Company). Для детекции голубой формы белка FastFT использовали лазер с длиной волны 405 нм и фильтр 450/20 нм, а для детекции красной формы использовали лазер с длиной волны 561 нм и фильтр 610/10 нм.

3.2.5. Выделение рибосом, белков, клеточных экстрактов

3.2.5.1. Выделение фракции рибосом

К 400 мл среды LB добавляли 4 мл свежей ночной культуры клеток и инкубировали при 37°C и перемешивании 180 об/мин до A_{600} 0,5-0,8. Клетки охлаждали во льду в течение 20 мин (все дальнейшие манипуляции проводили при +4°C) и осаждали центрифугированием при 5000 об/мин 10 мин в роторе JA-10 в препаративной центрифуге Beckman. Осадок ресуспендировали в 10 мл охлажденного связывающего буфера, суспензию центрифугировали, сливали супернатант. Промытый осадок ресуспендировали в 3 мл связывающего буфера. Суспензию обрабатывали ультразвуком во льду 4 раза по 15 сек с перерывом в 45 сек.

Клеточный дебрис осаждали центрифугированием в роторе JA-20 при 15000 об/мин в течение 30 мин в препаративной центрифуге Beckman. Супернатант наносили на градиент сахарозы 10-40%. Центрифугирование в сахарозном градиенте проводили на ультрацентрифуге Beckman L7-55 в роторе SW-32-Ti при 18000 об/мин в течение 16 ч. 70S фракцию рибосом собирали в отдельную пробирку, доводили до нужного объема раствором сахарозы в связывающем буфере и осаждали центрифугированием при 70000 об/мин в роторе MLA-80 в течение 1 часа. Сливали супернатант, осадки растворяли в связывающем буфере, определяли оптическую

плотность полученного раствора при 260 нм. Раствор разделяли на аликвоты по 100 мкл, замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80°C.

3.2.5.2. Выделение суммарного рибосомного белка

Брали 150-200 оптических единиц рибосом в 200 мкл буфера. Добавляли 20 мкл (0,1 объёма) 1М ацетата магния и 440 мкл (2 объёма) ледяной уксусной кислоты, перемешивали при 0°C в течение 45 мин. Центрифугировали при 10000 об/мин 30 мин при 4°C. Переносили супернатант в новую пробирку, добавляли к нему 3,3 мл (5 объёмов) ацетона, инкубировали 3 ч при -20°C. Полученный осадок осаждали центрифугированием при 10000 об/мин 30 мин при 4°C, сливали супернатант и высушивали осадок. Затем ресуспендировали осадок в 500 мкл буфера для суммарного рибосомного белка содержащего 6 М мочевины и диализовали против этого же буфера. После этого ещё 3 раза диализовали против буфера для суммарного рибосомного белка (без мочевины), центрифугировали при 5000 об/мин 5 мин, супернатант аликвотили. Концентрацию белка определяли по поглощению при 230 нм [103].

3.2.5.3. Белковый электрофорез в ПААГ в денатурирующих условиях

Собирали камеру для заливки ПААГ Mini-Protean II фирмы Bio-Rad, заливали разделяющий гель. После полимеризации разделяющего геля заливали концентрирующий гель, в который вставляли “гребенку” для образцов. После полимеризации концентрирующего геля наносили предварительно прогретые при 95°C в течение 5 мин образцы (к образцам предварительно добавляли 2х буфер для нанесения на гель). Электрофорез проводили в буфере трис-глицин, сначала при 80 В, пока краситель не достигал границы концентрирующего и разделяющего гелей, затем при 130 В до прохождения бромфенолового синего до конца геля.

После проведения электрофореза гель помещали в ванночку с раствором для прокрашивания белков и инкубировали 2–16 ч. Затем гель отмывали водой с уксусной кислотой до проявления белковых зон.

3.2.5.4. Иммуноблоттинг

Проводили белковый электрофорез в 18% ПААГ в денатурирующих условиях. Замачивали мембрану PVDF в этиловом спирте 2 минуты, промывали 5 минут в дистиллированной воде, затем мембрану и гель замачивали 5-10 минут в буфере для переноса. Гель помещали на 3 листа фильтровальной бумаги Watman 3MM, смоченных в буфере для переноса, накрывали мембраной, 3 листами фильтровальной бумаги Watman 3MM, смоченных в буфере для переноса. Перенос проводили при 100 мА 2 часа в буфере

для переноса. Далее мембрану блокировали в 5% растворе BSA в TBST (1мл/см²) в течение 12 часов, промывали TBST 4 раза по 5 минут.

Далее для визуализации белков мембрану в течение 1 часа инкубировали с первичными антителами - анти-S6 (разведение 1:10000 в TBST). Мембрану промывали TBST 3 раза по 10 минут и инкубировали в течение 1 часа со вторичными антителами против антител козы, конъюгированными с пероксидазой хрена (разведение 1:3000). Мембрану промывали TBST 3 раза по 10 минут.

Окрашивание мембраны проводили с помощью “ECL+ kit” (GE Healthcare). Для проявления смешивали растворы А и В в соотношении 40:1, 0,5 мл полученной смеси смачивали мембрану, после чего раствор удаляли. Проявку осуществляли с помощью камеры BioRad.

3.2.5.5. Двумерный дифференциальный гель-электрофорез

5 мл клеточных культур центрифугировали при 4000 об/мин, дважды промывали ресуспендированием в 1 мл TBS и центрифугированием при 4000 об/мин. Избавлялись от остатков супернатанта и ресуспендировали осадки в 20 мкл 40% Chaps-NP40. К полученным суспензиям добавляли 10 мкл раствора смеси нуклеаз и лизировали клетки заморозкой в жидком азоте – разморозкой при 37°C (5 циклов). После этого пробирки инкубировали во льду 30 минут, добавляли 70 мкл буфера для образца и центрифугировали при 12000 об/мин, избавляясь затем от осадка. В полученных растворах определяли концентрацию белка по методу Бредфорд [104].

Отбирали аликвоты растворов, содержащие 100 мкг белка, доводили объёмы буфером для образца до 40 мкл. К растворам добавляли 1 мкл (400 пмоль) флуоресцентных красителей (Cy3 – к образцам из клеток дикого типа, Cy5 – к образцам из клеток *ArimK*). Инкубировали пробирки 30 минут во льду, после чего добавляли 1 мкл 10 mM лизина и инкубировали ещё 15 минут во льду.

Заливали гели для изоэлектрофокусировки в трубочки с диаметром 1 мм. После полимеризации гелей образцы из клеток дикого типа смешивали с соответствующими образцами из клеток *ArimK*, добавляли к смеси амфолиты BioRad до 1% и дитиотреитол до 1%, наносили на гели и проводили изоэлектрофокусировку по следующей программе: линейный градиент напряжения от 50 В до 600 В, 6 часов, 700 В, 10 часов, 900 В, 2 часа.

Заливали градиентные (8%-16%) денатурирующие ПААГ для второго направления. Останавливали изоэлектрофокусировку, извлекали гели из стеклянных трубочек и инкубировали гели 30 минут в буфере для уравнивания. Наносили изоэлектрофокусировочные гели на гели для второго направления и проводили электрофорез при 250 В в течение 5 часов. Сканировали гели на флуоресцентном сканере

Turphoon (Fuji). После этого гели замачивали в фиксаже минимум на 2 часа. Фиксированные гели 3 раза отмывали деионизованной водой и окрашивали серебром

3.2.5.6. Окрашивание белковых ПААГ серебром

Все манипуляции проводили в растворах с деионизованной водой. Фиксированный и промытый водой гель промывали 0,03% раствором тиосульфата натрия в течение 2 минут. Затем отмывали гель водой 3 раза по 1 минуте и окрашивали раствором нитрата серебра 15-20 минут. После двукратной 30-секундной отмывки водой от нитрата серебра к гелю добавляли проявитель и инкубировали в нём гель до полной проявки. Окрашивание останавливали добавлением 10% уксусной кислоты. Затем сливали жидкость и промывали гель 3-4 раза водой.

3.2.5.7. Идентификация белковых зон в ПААГ

Все манипуляции проводили в растворах с хроматографически чистой водой CHROMASOLV, Raneas. Белковые зоны из окрашенных серебром гелей вырезали скальпелем, куски геля дважды промывали буфером для промывки в течение 20 минут. Затем куски геля обезвоживали в ацетонитриле в течение 5 минут и сушили на воздухе. К высушенным кускам геля добавляли равный объём раствора трипсина и инкубировали при 37°C 4 часа, после чего добавляли равный объём 0,5% трифторуксусной кислоты. Образец наносили на подложку для MALDI, высушивали на воздухе и анализировали с помощью масс-спектрометра Ultraflex II (Bruker). Полученный масс-спектр анализировали в программе flexAnalysis 3.2, белки идентифицировали, используя программу Mascot 2.4.2 и базу данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI). MALDI-TOF анализ выполнялся д.х.н. Серебряковой М.В.

3.2.5.8. Мечение флуоресцентной меткой вновь синтезированных белков.

Индивидуальную колонию помещали в среду M9, в которые были добавлены все аминокислоты (40 мг/л каждая) и растили ночь при 37°C. Полученную ночную культуру разбавляли в 50 раз в 10 мл среды M9 с аминокислотами. В определённый момент (указано в обсуждении результатов) к среде с клетками добавляли гомопропаргилглицин (до концентрации 25 мкМ, Invitrogen). Встраивание гомопропаргил глицина останавливали скручиванием клеток через 10 минут (через час, в случае добавления гомопропаргилглицина к клеточной культуре в стационарной фазе). Клетки дважды промывали 0,9% NaCl и суспендировали в буфере для лизиса. После инкубирования в течение 20 минут на льду раствор замораживали в жидком азоте и медленно размораживали. Затем клетки разрушали обработкой ультразвуком и центрифугировали. Супернатант собирали и хранили при -20°C. Для мечения использовали набор Click-iT

(Invitrogen) и метку Cy5. Помеченные образцы разделяли в одномерном денатурирующем ПААГ. Детекцию флуоресценции осуществляли при помощи сканера флуоресценции (Fuji).

3.2.5.9. Выделение рекомбинантного фермента RimK с помощью Ni-NTA агарозы

Клетки штамма BL21 (DE3) были трансформированы плазмидой pET-33-rimK и высеяны на чашку Петри с канамицином. Одной колонией клеток инокулировали 4 мл среды LB с канамицином. Культуру клеток растили при 37°C в течение 16 ч при интенсивном перемешивании. Полученную ночную культуру переносили в колбу с 400 мл LB, содержащей канамицин, выращивали при 37°C и перемешивании 180 об/мин до A_{600} 0,3. Затем добавляли 400 мкл 1М водного раствора ИПТГ, растили еще 2 ч. Культуру клеток охлаждали до 4°C затем клетки осаждали центрифугированием в роторе JA-10 при 5000 об/мин 4°C в течение 10 мин. Сливали супернатант, осадок клеток ресуспендировали в 20 мл буфера для промывки клеток. Суспензию центрифугировали в роторе JA-10 при 5000 об/мин 4°C в течение 10 мин. Затем ещё раз промывали 20 мл буфера и центрифугировали. Осадок клеток ресуспендировали в 10 мл буфера для лизиса и проводили разрушение клеток ультразвуком 5 раз по 15 сек с перерывами по 45 сек. Клеточный дебрис осаждали центрифугированием при 15000 об/мин 30 мин при 4°C. Отбирали супернатант и добавляли к нему 1 мл 50% суспензии Ni-NTA агарозы (Qiagen). Медленно перемешивали в течение 30 мин на качалке при 4°C. Осаждали смолу центрифугированием при 5000 об/мин в течение 5 мин. Промывали 5 раз по 10 мл буфера для промывки смолы в течение 15 мин. После каждой промывки, осадок Ni-NTA агарозы отделяли центрифугированием при 5000 об/мин в течение 5 мин. Для элюции белка к смоле добавляли 5 мл буфера для элюции, медленно перемешивали в течение 15 мин. Осаждали смолу центрифугированием при 5000 об/мин в течение 5 мин, отбирали супернатант.

Проводили диализ отобранного супернатанта. Диализный мешок выдерживали в воде 30 минут, переносили в неё раствор белка и диализовали против 1 л буфера для диализа в течении 12 часов при +4°C. После этого разделяли полученный белок на аликвоты по 100 мкл и хранили при -80°C. Чистоту выделяемого белка определяли с помощью белкового электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях.

3.2.5.10. Приготовление клеточного экстракта S30

Колонию клеток переносили в 4 мл LB. Растили при 37°C в течение 16 ч. Полученную культуру переносили в колбу с 400 мл LB и растили при 37°C до A_{600} ~ 0,5. Клетки осаждали центрифугированием при 5000 об/мин 10 мин, сливали супернатант,

осадок ресуспендировали в 10 мл буфера для промывки. Полученную суспензию центрифугировали 5000 об/мин 10 мин, сливали супернатант, осадок ресуспендировали в 3 мл буфера для лизиса. Ресуспендированные клетки лизировали ультразвуком, после чего осаждали дебрис центрифугированием при 30000 g в течение 30 мин. Супернатант аликвотили в пластиковые пробирки на 1,5 мл и замораживали в жидком азоте.

3.2.5.11. *In vitro* трансляция.

In vitro трансляцию осуществляли по описанной методике [105]. В качестве матрицы использовали мРНК люциферазы сверчка, S100 экстракт *E. coli* и рибосомы, выделенные из клеток дикого типа и *ΔrimK*. Состав реакционной смеси:

- 1) S100 экстракт *E. coli* – 3 мкл;
- 2) раствор А – 4 мкл;
- 3) рибосомы – 5 пмоль;
- 4) мРНК – 100 пмоль;
- 5) связывающий буфер для выделения рибосом – до 10 мкл общего объёма.

Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 10 минут. Реакцию останавливали добавлением к реакционной смеси раствора рибонуклеазы А. Измерение активности люциферазы осуществляли с помощью набора реагентов для анализа активности люцифераз фирмы Promega согласно протоколу с использованием фирменных растворов. К 10 мкл реакционной смеси добавляли 50 мкл Luciferase Assay Reagent II (Promega) и измеряли люминесценцию на плащечном ридере Victor, Perkin-Elmer.

3.2.5.12. Проведение модификации белка S6 *in vitro*

Составляли реакционную смесь:

- 1) предполагаемый субстрат (70S, 30S или 100S рибосомы, суммарный рибосомный белок или S30 экстракт) – объём, содержащий 10 пмоль белка S6;
- 2) фермент RimK – 1 пмоль;
- 3) АТФ – 1 мкл (100 ммоль);
- 4) ¹⁴C-меченная глутаминовая кислота – 5 мкл (1 ммоль);
- 5) реакционный буфер – до 20 мкл общего объёма.

Смесь перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. После этого к смеси добавляли 5 мкл 5X буфера для нанесения образца на ПААГ и инкубировали 5 минут при 95°C.

4. 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 литературы

1. R.J. Arnold, J.P. Reilly. Observation of *Escherichia coli* ribosomal proteins and their posttranslational modifications by mass spectrometry. // *Anal Biochem.* 1999. V. 269. P. 105-112.
2. A. Ben-Bassat, K. Bauer, S.Y. Chang, K. Myambo, A. Boosman, S. Chang. Processing of the initiation methionine from proteins: properties of the *Escherichia coli* methionine aminopeptidase and its gene structure. // *Journal of Bacteriology.* 1987. V. 169. P. 751-757.
3. F.N. Chang, C. Budzilowicz. Characterization of methylated neutral amino acids from *Escherichia coli* ribosomes. // *Journal of Bacteriology.* 1977. V. 131. P. 105-110.
4. J. Brosius. Primary structure of *Escherichia coli* ribosomal protein L31. // *Biochemistry.* 1978. V. 17. P. 501-508.
5. A.J. Eistetter, P.D. Butler, R.R. Traut, T.G. Fanning. Characterization of *Escherichia coli* 50S ribosomal protein L31. // *FEMS Microbiology Letters.* 1999. V. 180. P. 345-349.
6. K. Makarova, V. Ponomarev, E. Koonin. Two C or not two C: recurrent disruption of Zn-ribbons, gene duplication, lineage-specific gene loss, and horizontal gene transfer in evolution of bacterial ribosomal proteins. // *Genome Biology.* 2001. V. 2. P. 1-14.
7. S.E. Gabriel, J.D. Helmann. Contributions of Zur-controlled ribosomal proteins to growth under zinc starvation conditions. // *J Bacteriol.* 2009. V. 191. P. 6116-6122.
8. B. Polevoda, F. Sherman. Methylation of proteins involved in translation. // *Mol Microbiol.* 2007. V. 65. P. 590-606.
9. C.N. Chang, N. Chang. Methylation of the ribosomal proteins in *Escherichia coli*. Nature and stoichiometry of the methylated amino acids in 50S ribosomal proteins. // *Biochemistry.* 1975. V. 14. P. 468-477.
10. M.J. Dognin, B. Wittmann-Liebold. Purification and primary structure determination of the N-terminal blocked protein, L11, from *Escherichia coli* ribosomes. // *Eur J Biochem.* 1980. V. 112. P. 131-151.
11. F.N. Chang, L.B. Cohen, I.J. Navickas, C.N. Chang. Purification and properties of a ribosomal protein methylase from *Escherichia coli* Q13. // *Biochemistry.* 1975. V. 14. P. 4994-4998.
12. C. Colson, J. Lhoest, C. Urlings. Genetics of ribosomal protein methylation in *Escherichia coli*. III. Map position of two genes, *prmA* and *prmB*, governing methylation of proteins L11 and L3. // *Mol Gen Genet.* 1979. V. 169. P. 245-250.

13. H. Demirci, S.T. Gregory, A.E. Dahlberg, G. Jögl. Recognition of ribosomal protein L11 by the protein trimethyltransferase PrmA. // *EMBO J.* 2007. V. 26. P. 567-577.
14. H. Demirci, S.T. Gregory, A.E. Dahlberg, G. Jögl. Multiple-site trimethylation of ribosomal protein L11 by the PrmA methyltransferase. // *Structure.* 2008. V. 16. P. 1059-1066.
15. R.K. Agrawal, J. Linde, J. Sengupta, K.H. Nierhaus, J. Frank. Localization of L11 protein on the ribosome and elucidation of its involvement in EF-G-dependent translocation. // *J Mol Biol.* 2001. V. 311. P. 777-787.
16. D.M. Cameron, J. Thompson, P.E. March, A.E. Dahlberg. Initiation factor IF2, thiostrepton and micrococcin prevent the binding of elongation factor G to the *Escherichia coli* ribosome. // *J Mol Biol.* 2002. V. 319. P. 27-35.
17. M. Valle, A. Zavialov, W. Li, S.M. Stagg, J. Sengupta, R.C. Nielsen, P. Nissen, S.C. Harvey, M. Ehrenberg, J. Frank. Incorporation of aminoacyl-tRNA into the ribosome as seen by cryo-electron microscopy. // *Nat Struct Mol Biol.* 2003. V. 10. P. 1074-1074.
18. A. Vanet, J.A. Plumbridge, M.-F. Guérin, J.-H. Alix. Ribosomal protein methylation in *Escherichia coli*: the gene *prmA*, encoding the ribosomal protein L11 methyltransferase, is dispensable. // *Molecular Microbiology.* 1994. V. 14. P. 947-958.
19. C. Colson. Genetics of ribosomal protein methylation in *Escherichia coli*. I. A mutant deficient in methylation of protein L11. // *Mol Gen Genet.* 1977. V. 154. P. 167-173.
20. J. Lhoest, C. Colson. Genetics of ribosomal protein methylation in *Escherichia coli*. II. A mutant lacking a new type of methylated amino acid, N5-methylglutamine, in protein L3. // *Mol Gen Genet.* 1977. V. 154. P. 175-180.
21. T.A. Muranova, A.V. Muranov, L.F. Markova, Y.A. Ovchinnikov. The primary structure of ribosomal protein L3 from *Escherichia coli* 70 S ribosomes. // *FEBS Letters.* 1978. V. 96. P. 301-305.
22. J. Lhoest, C. Colson. Cold-sensitive ribosome assembly in an *Escherichia coli* mutant lacking a single methyl group in ribosomal protein L3. // *Eur J Biochem.* 1981. V. 121. P. 33-37.
23. V. Heurgue-Hamard, S. Champ, A. Engstrom, M. Ehrenberg, R.H. Buckingham. The *hemK* gene in *Escherichia coli* encodes the N(5)-glutamine methyltransferase that modifies peptide release factors. // *EMBO J.* 2002. V. 21. P. 769-778.
24. M. Kaczanowska, M. Ryden-Aulin. Ribosome biogenesis and the translation process in *Escherichia coli*. // *Microbiol Mol Biol Rev.* 2007. V. 71. P. 477-494.
25. R. Chen, U. Chen-Schmeisser. Isopeptide linkage between N-alpha-monomethylalanine and lysine in ribosomal protein S11 from *Escherichia coli*. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977. V. 74. P. 4905-4908.

26. C.L. David, J. Keener, D.W. Aswad. Isoaspartate in ribosomal protein S11 of *Escherichia coli*. // *J Bacteriol.* 1999. V. 181. P. 2872-2877.
27. F.N. Chang. Temperature-dependent variation in the extent of methylation of ribosomal proteins L7 and L12 in *Escherichia coli*. // *J Bacteriol.* 1978. V. 135. P. 1165-1166.
28. X. Liu, J.P. Reilly. Correlating the chemical modification of *Escherichia coli* ribosomal proteins with crystal structure data. // *J Proteome Res.* 2009. V. 8. P. 4466-4478.
29. A.T. Gudkov. The L7/L12 ribosomal domain of the ribosome: structural and functional studies. // *FEBS Lett.* 1997. V. 407. P. 253-256.
30. J. Brosius, R. Chen. The primary structure of protein L16 located at the peptidyltransferase center of *Escherichia coli* ribosomes. // *FEBS Letters.* 1976. V. 68. P. 105-109.
31. C.N. Chang, M. Schwartz, F.N. Chang. Identification and characterization of a new methylated amino acid in ribosomal protein L33 of *Escherichia coli*. // *Biochem Biophys Res Commun.* 1976. V. 73. P. 233-239.
32. B. Polevoda, F. Sherman. The diversity of acetylated proteins. // *Genome Biology.* 2002. V. 3. P. reviews0006.
33. M.W. Vetting, D.C. Bareich, M. Yu, J.S. Blanchard. Crystal structure of RimI from *Salmonella typhimurium* LT2, the GNAT responsible for N(alpha)-acetylation of ribosomal protein S18. // *Protein Sci.* 2008. V. 17. P. 1781-1790.
34. L. Miao, H. Fang, Y. Li, H. Chen. Studies of the in vitro Nalpa-acetyltransferase activities of *E. coli* RimL protein. // *Biochem Biophys Res Commun.* 2007. V. 357. P. 641-647.
35. S.F. Clatterbuck Soper, R.P. Dator, P.A. Limbach, S.A. Woodson. In vivo X-ray footprinting of pre-30S ribosomes reveals chaperone-dependent remodeling of late assembly intermediates. // *Mol Cell.* 2013. V. 52. P. 506-516.
36. B. Wittmann-Liebold, B. Greuer. The primary structure of protein S5 from the small subunit of the *Escherichia coli* ribosome. // *FEBS Lett.* 1978. V. 95. P. 91-98.
37. I. Janda, M. Kitakawa, K. Isono. Gene *rpmF* for ribosomal protein L32 and gene *rimJ* for a ribosomal protein acetylating enzyme are located near *pyrC* (23.4 min) in *Escherichia coli*. // *Mol Gen Genet.* 1985. V. 201. P. 433-436.
38. A. Yoshikawa, S. Isono, A. Sheback, K. Isono. Cloning and nucleotide sequencing of the genes *rimI* and *rimJ* which encode enzymes acetylating ribosomal proteins S18 and S5 of *Escherichia coli* K12. // *Mol Gen Genet.* 1987. V. 209. P. 481-488.
39. R.A. Poot, R.E. Jeeninga, C.W. Pleij, J. van Duin. Acetylation of ribosomal protein S5 affected by defects in the central pseudoknot in 16S ribosomal RNA? // *FEBS Lett.* 1997. V. 401. P. 175-179.

40. A.G. Cumberlidge, K. Isono. Ribosomal protein modification in *Escherichia coli*. I. A mutant lacking the N-terminal acetylation of protein S5 exhibits thermosensitivity. // *J Mol Biol*. 1979. V. 131. P. 169-189.
41. B. Roy-Chaudhuri, N. Kirthi, T. Kelley, G.M. Culver. Suppression of a cold-sensitive mutation in ribosomal protein S5 reveals a role for RimJ in ribosome biogenesis. // *Mol Microbiol*. 2008. V. 68. P. 1547-1559.
42. C.A. White-Ziegler, A.M. Black, S.H. Eliades, S. Young, K. Porter. The N-acetyltransferase RimJ responds to environmental stimuli to repress pap fimbrial transcription in *Escherichia coli*. // *J Bacteriol*. 2002. V. 184. P. 4334-4342.
43. M. Yaguchi. Primary structure of protein S18 from the small *Escherichia coli* ribosomal subunit. // *FEBS Lett*. 1975. V. 59. P. 217-220.
44. K. Isono, S. Isono. Ribosomal protein modification in *Escherichia coli*. II. Studies of a mutant lacking the N-terminal acetylation of protein S18. // *Mol Gen Genet*. 1980. V. 177. P. 645-651.
45. M.I. Recht, J.R. Williamson. Central domain assembly: thermodynamics and kinetics of S6 and S18 binding to an S15-RNA complex. // *J Mol Biol*. 2001. V. 313. P. 35-48.
46. C. Terhorst, W. Moller, R. Laursen, B. Wittmann-Liebold. The primary structure of an acidic protein from 50-S ribosomes of *Escherichia coli* which is involved in GTP hydrolysis dependent on elongation factors G and T. // *Eur J Biochem*. 1973. V. 34. P. 138-152.
47. Y. Gordiyenko, S. Deroo, M. Zhou, H. Videler, C.V. Robinson. Acetylation of L12 increases interactions in the *Escherichia coli* ribosomal stalk complex. // *J Mol Biol*. 2008. V. 380. P. 404-414.
48. S. Tanaka, Y. Matsushita, A. Yoshikawa, K. Isono. Cloning and molecular characterization of the gene *rimL* which encodes an enzyme acetylating ribosomal protein L12 of *Escherichia coli* K12. // *Mol Gen Genet*. 1989. V. 217. P. 289-293.
49. S. Isono, K. Isono. Ribosomal protein modification in *Escherichia coli*. III. Studies of mutants lacking an acetylase activity specific for protein L12. // *Mol Gen Genet*. 1981. V. 183. P. 473-477.
50. S. Ramagopal, A.R. Subramanian. Alteration in the acetylation level of ribosomal protein L12 during growth cycle of *Escherichia coli*. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1974. V. 71. P. 2136-2140.
51. M.W. Vetting, L.P. de Carvalho, S.L. Roderick, J.S. Blanchard. A novel dimeric structure of the RimL Nalpha-acetyltransferase from *Salmonella typhimurium*. // *J Biol Chem*. 2005. V. 280. P. 22108-22114.

52. T. Kazakov, K. Kuznedelov, E. Semenova, D. Mukahmedjarov, K.A. Datsenko, A. Metlytskaya, G.H. Vondenhoff, A. Tikhonov, V. Agarwal, S. Nair, A. Van Aerschot, K. Severinov. The RimL Transacetylase Provides Resistance to Translation Inhibitor Microcin C. // *J Bacteriol.* 2014.
53. W. Ge, A. Wolf, T. Feng, C.H. Ho, R. Sekirnik, A. Zayer, N. Granatino, M.E. Cockman, C. Loenarz, N.D. Loik, A.P. Hardy, T.D. Claridge, R.B. Hamed, R. Chowdhury, L. Gong, C.V. Robinson, D.C. Trudgian, M. Jiang, M.M. Mackeen, J.S. McCullagh, Y. Gordiyenko, A. Thalhammer, A. Yamamoto, M. Yang, P. Liu-Yi, Z. Zhang, M. Schmidt-Zachmann, B.M. Kessler, P.J. Ratcliffe, G.M. Preston, M.L. Coleman, C.J. Schofield. Oxygenase-catalyzed ribosome hydroxylation occurs in prokaryotes and humans. // *Nat Chem Biol.* 2012. V. 8. P. 960-962.
54. L.M. van Staaldouin, S.K. Novakowski, Z. Jia. Structure and functional analysis of YcfD, a novel 2-oxoglutarate/Fe(2)(+)-dependent oxygenase involved in translational regulation in *Escherichia coli*. // *J Mol Biol.* 2014. V. 426. P. 1898-1910.
55. M. Kazemie. The importance of *Escherichia coli* ribosomal proteins L1, L11 and L16 for the association of ribosomal subunits and the formation of the 70-S initiation complex. // *Eur J Biochem.* 1975. V. 58. P. 501-510.
56. M. Kazemie. Binding of aminoacyl-tRNA to reconstituted subparticles of *Escherichia coli* large ribosomal subunits. // *Eur J Biochem.* 1976. V. 67. P. 373-378.
57. V.G. Moore, R.E. Atchison, G. Thomas, M. Moran, H.F. Noller. Identification of a ribosomal protein essential for peptidyl transferase activity. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975. V. 72. P. 844-848.
58. W.P. Tate, H. Schulze, K.H. Nierhaus. The importance of the *Escherichia coli* ribosomal protein L16 for the reconstitution of the peptidyl-tRNA hydrolysis activity of peptide chain termination. // *J Biol Chem.* 1983. V. 258. P. 12810-12815.
59. K.H. Nierhaus. The assembly of prokaryotic ribosomes. // *Biochimie.* 1991. V. 73. P. 739-755.
60. G. Funatsu, M. Yaguchi, B. Wittmann-Liebold. Primary structure of protein S12 from the small *Escherichia coli* ribosomal subunit. // *FEBS Lett.* 1977. V. 73. P. 12-17.
61. L.E. Post, M. Nomura. DNA sequences from the *str* operon of *Escherichia coli*. // *J Biol Chem.* 1980. V. 255. P. 4660-4666.
62. J.A. Kowalak, K.A. Walsh. Beta-methylthio-aspartic acid: identification of a novel posttranslational modification in ribosomal protein S12 from *Escherichia coli*. // *Protein Sci.* 1996. V. 5. P. 1625-1632.

63. B.P. Anton, L. Saleh, J.S. Benner, E.A. Raleigh, S. Kasif, R.J. Roberts. RimO, a MiaB-like enzyme, methylthiolates the universally conserved Asp88 residue of ribosomal protein S12 in *Escherichia coli*. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008. V. 105. P. 1826-1831.
64. S.J. Booker, R.M. Cicchillo, T.L. Grove. Self-sacrifice in radical S-adenosylmethionine proteins. // *Curr Opin Chem Biol*. 2007. V. 11. P. 543-552.
65. M. Fontecave, E. Mulliez, M. Atta. New light on methylthiolation reactions. // *Chem Biol*. 2008. V. 15. P. 209-210.
66. K.H. Lee, L. Saleh, B.P. Anton, C.L. Madinger, J.S. Benner, D.F. Iwig, R.J. Roberts, C. Krebs, S.J. Booker. Characterization of RimO, a new member of the methylthiotransferase subclass of the radical SAM superfamily. // *Biochemistry*. 2009. V. 48. P. 10162-10174.
67. F. Forouhar, S. Arragain, M. Atta, S. Gambarelli, J.M. Mouesca, M. Hussain, R. Xiao, S. Kieffer-Jaquinod, J. Seetharaman, T.B. Acton, G.T. Montelione, E. Mulliez, J.F. Hunt, M. Fontecave. Two Fe-S clusters catalyze sulfur insertion by radical-SAM methylthiotransferases. // *Nat Chem Biol*. 2013. V. 9. P. 333-338.
68. M.B. Strader, N. Costantino, C.A. Elkins, C.Y. Chen, I. Patel, A.J. Makusky, J.S. Choy, D.L. Court, S.P. Markey, J.A. Kowalak. A proteomic and transcriptomic approach reveals new insight into beta-methylthiolation of *Escherichia coli* ribosomal protein S12. // *Mol Cell Proteomics*. 2011. V. 10. P. M110 005199.
69. S. Arragain, R. Garcia-Serres, G. Blondin, T. Douki, M. Clemancey, J.M. Latour, F. Forouhar, H. Neely, G.T. Montelione, J.F. Hunt, E. Mulliez, M. Fontecave, M. Atta. Post-translational modification of ribosomal proteins: structural and functional characterization of RimO from *Thermotoga maritima*, a radical S-adenosylmethionine methylthiotransferase. // *J Biol Chem*. 2010. V. 285. P. 5792-5801.
70. B.J. Landgraf, A.J. Arcinas, K.H. Lee, S.J. Booker. Identification of an intermediate methyl carrier in the radical S-adenosylmethionine methylthiotransferases RimO and MiaB. // *J Am Chem Soc*. 2013. V. 135. P. 15404-15416.
71. L.S. Asatryan, A.S. Spirin. Non-enzymatic translocation in ribosomes from streptomycin-resistant mutants of *Escherichia coli*. // *Mol Gen Genet*. 1975. V. 138. P. 315-321.
72. H. Hitz, D. Schafer, B. Wittmann-Liebold. Primary structure of ribosomal protein S6 from the wild type and a mutant of *Escherichia coli*. // *FEBS Lett*. 1975. V. 56. P. 259-262.
73. H. Hitz, D. Schafer, B. Wittmann-Liebold. Determination of the complete amino-acid sequence of protein S6 from the wild-type and a mutant of *Escherichia coli*. // *Eur J Biochem*. 1977. V. 75. P. 497-512.

74. J. Schnier, M. Kitakawa, K. Isono. The nucleotide sequence of an *Escherichia coli* chromosomal region containing the genes for ribosomal proteins S6, S18, L9 and an open reading frame. // *Mol Gen Genet*. 1986. V. 204. P. 126-132.
75. S. Reeh, S. Pedersen. Post-translational modification of *Escherichia coli* ribosomal protein S6. // *Mol Gen Genet*. 1979. V. 173. P. 183-187.
76. W.K. Kang, T. Icho, S. Isono, M. Kitakawa, K. Isono. Characterization of the gene *rimK* responsible for the addition of glutamic acid residues to the C-terminus of ribosomal protein S6 in *Escherichia coli* K12. // *Mol Gen Genet*. 1989. V. 217. P. 281-288.
77. B. Kade, E.R. Dabbs, B. Wittmann-Liebold. Protein-chemical studies on *Escherichia coli* mutants with altered ribosomal proteins S6 and S7. // *FEBS Letters*. 1980. V. 121. P. 313-316.
78. M. Kitakawa, L. Blumenthal, K. Isono. Isolation and characterization of specialized transducing lambda phages carrying ribosomal protein genes of *Escherichia coli*. // *Mol Gen Genet*. 1980. V. 180. P. 343-349.
79. E.V. Koonin, P. Bork, C. Sander. A novel RNA-binding motif in omnipotent suppressors of translation termination, ribosomal proteins and a ribosome modification enzyme? // *Nucleic Acids Res*. 1994. V. 22. P. 2166-2167.
80. M.Y. Galperin, E.V. Koonin. A diverse superfamily of enzymes with ATP-dependent carboxylate-amine/thiol ligase activity. // *Protein Sci*. 1997. V. 6. P. 2639-2643.
81. K. Kino, T. Arai, Y. Arimura. Poly-alpha-glutamic acid synthesis using a novel catalytic activity of RimK from *Escherichia coli* K-12. // *Appl Environ Microbiol*. 2011. V. 77. P. 2019-2025.
82. G. Zhao, Z. Jin, Y. Wang, N.M. Allewell, M. Tuchman, D. Shi. Structure and function of *Escherichia coli* RimK, an ATP-grasp fold, L-glutamyl ligase enzyme. // *Proteins*. 2013. V. 81. P. 1847-1854.
83. I.A. Osterman, A.V. Ustinov, D.V. Evdokimov, V.A. Korshun, P.V. Sergiev, M.V. Serebryakova, I.A. Demina, M.A. Galyamina, V.M. Govorun, O.A. Dontsova. A nascent proteome study combining click chemistry with 2DE. // *Proteomics*. 2013. V. 13. P. 17-21.
84. A.L. Starosta, J. Lassak, K. Jung, D.N. Wilson. The bacterial translation stress response. // *FEMS Microbiol Rev*. 2014.
85. Y.S. Polikanov, G.M. Blaha, T.A. Steitz. How hibernation factors RMF, HPF, and YfiA turn off protein synthesis. // *Science*. 2012. V. 336. P. 915-918.
86. H. Yoshida, A. Wada. The 100S ribosome: ribosomal hibernation induced by stress. // *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2014. V. 5. P. 723-732.

87. T. Kato, H. Yoshida, T. Miyata, Y. Maki, A. Wada, K. Namba. Structure of the 100S ribosome in the hibernation stage revealed by electron cryomicroscopy. // *Structure*. 2010. V. 18. P. 719-724.
88. R. Hauser, M. Pech, J. Kijek, H. Yamamoto, B. Titz, F. Naeve, A. Tovchigrechko, K. Yamamoto, W. Szaflarski, N. Takeuchi, T. Stellberger, M.E. Diefenbacher, K.H. Nierhaus, P. Uetz. RsfA (YbeB) proteins are conserved ribosomal silencing factors. // *PLoS Genet*. 2012. V. 8. P. e1002815.
89. G. Boel, P.C. Smith, W. Ning, M.T. Englander, B. Chen, Y. Hashem, A.J. Testa, J.J. Fischer, H.J. Wieden, J. Frank, R.L. Gonzalez, Jr., J.F. Hunt. The ABC-F protein EttA gates ribosome entry into the translation elongation cycle. // *Nat Struct Mol Biol*. 2014. V. 21. P. 143-151.
90. B. Chen, G. Boel, Y. Hashem, W. Ning, J. Fei, C. Wang, R.L. Gonzalez, Jr., J.F. Hunt, J. Frank. EttA regulates translation by binding the ribosomal E site and restricting ribosome-tRNA dynamics. // *Nat Struct Mol Biol*. 2014. V. 21. P. 152-159.
91. H. Yoshida, Y. Maki, S. Furuike, A. Sakai, M. Ueta, A. Wada. YqjD is an inner membrane protein associated with stationary-phase ribosomes in *Escherichia coli*. // *J Bacteriol*. 2012. V. 194. P. 4178-4183.
92. K. Izutsu, C. Wada, Y. Komine, T. Sako, C. Ueguchi, S. Nakura, A. Wada. *Escherichia coli* ribosome-associated protein SRA, whose copy number increases during stationary phase. // *J Bacteriol*. 2001. V. 183. P. 2765-2773.
93. S.E. Finkel. Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype. // *Nat Rev Microbiol*. 2006. V. 4. P. 113-120.
94. K. Lewis. Persister cells, dormancy and infectious disease. // *Nat Rev Microbiol*. 2007. V. 5. P. 48-56.
95. E. Germain, D. Castro-Roa, N. Zenkin, K. Gerdes. Molecular mechanism of bacterial persistence by HipA. // *Mol Cell*. 2013. V. 52. P. 248-254.
96. I. Ruvinsky, O. Meyuhas. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. // *Trends Biochem Sci*. 2006. V. 31. P. 342-348.
97. K.A. Datsenko, B.L. Wanner. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000. V. 97. P. 6640-6645.
98. T. Baba, T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K.A. Datsenko, M. Tomita, B.L. Wanner, H. Mori. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. // *Mol Syst Biol*. 2006. V. 2. P. 2006 0008.
99. M. Kitagawa, T. Ara, M. Arifuzzaman, T. Ioka-Nakamichi, E. Inamoto, H. Toyonaga, H. Mori. Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (a complete set of

- E. coli K-12 ORF archive): unique resources for biological research. // *DNA Res.* 2005. V. 12. P. 291-299.
100. F.V. Subach, O.M. Subach, I.S. Gundorov, K.S. Morozova, K.D. Piatkevich, A.M. Cuervo, V.V. Verkhusha. Monomeric fluorescent timers that change color from blue to red report on cellular trafficking. // *Nat Chem Biol.* 2009. V. 5. P. 118-126.
101. J. Sambrook, D.W. Russel, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
102. H. Inoue, H. Nojima, H. Okayama. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. // *Gene.* 1990. V. 96. P. 23-28.
103. K.H. Nierhaus, Reconstitution of ribosomes, in: G. Spedding (Ed.), *Ribosomes and protein synthesis: a practical approach.*, IRL Press, Oxford, 1990, pp. 161-189.
104. M.M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. // *Anal Biochem.* 1976. V. 72. P. 248-254.
105. M.S. Svetlov, A. Kommer, V.A. Kolb, A.S. Spirin. Effective cotranslational folding of firefly luciferase without chaperones of the Hsp70 family. // *Protein Sci.* 2006. V. 15. P. 242-247.