МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М. В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Плетнёв Филипп Игоревич

Новые особенности регуляции аппарата экспрессии генов в стационарной фазе бактериальной культуры *E. coli*

Специальность:

02.00.10 – биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2020

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

Научный руководитель – **Сергиев Петр Владимирович**
доктор химических наук, профессор РАН.

Официальные оппоненты – **Никулин Алексей Донатович,** доктор химических наук, главный научный сотрудник, зав. лабораторией структурных исследований аппарата трансляции, зам. директора Института белка РАН.

Малыгин Алексей Аркадьевич, доктор химических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории структуры и функции рибосом Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

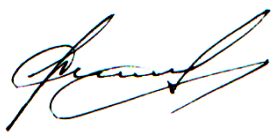
Иванов Александр Владимирович, кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник, зав. лаборатории биохимии вирусных инфекций Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН.

Защита диссертации состоится 26 января 2021 г. в 16^{00} часов на заседании диссертационного совета МГУ.02.03 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 40, НИИ ФХБ, аудитория 501.

E-mail: sig@genebee.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27). Со сведениями о регистрации участия в защите в удаленном интерактивном режиме и с диссертацией в электронном виде также можно ознакомиться на сайте ИАС «ИСТИНА»: https://istina.msu.ru/dissertations/336051010/.

Автореферат разослан «___» декабря 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
к.х.н., доцент  И.Г. Смирнова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

В отличие от лабораторных условий, в естественных условиях обитания бактериальная популяция постоянно подвергается воздействию различных стрессов. Негативное влияние окружающей среды, накопление токсичных отходов метаболизма при голоде, антибиотики – все это является предметом постоянной заботы для *Escherichia coli.* Одним из способов борьбы с голодом или агрессивными условиями окружающей среды является переход клеток в стационарную фазу. Подобный переход сопровождается активацией внутренних систем защиты от стресса, которые являются критически важными для бактериальной клетки. Для выживания в подобных неблагоприятных условиях она способна кардинально изменять свою организацию, как на молекулярном уровне, так и на уровне структурной организации отдельной клетки. Именно стационарная фаза представляет наибольший интерес с практической точки зрения, ведь именно в этом состоянии бактерии «вступают в бой» с человечеством посредством увеличения устойчивости к антибиотикам и другим стрессам. Таким образом, в наше время, когда основы ключевых молекулярных процессов логарифмической фазы роста достаточно подробно описаны, изучение любых процессов, ассоциированных со стационарной фазой, представляет огромный интерес.

Среди множества процессов, происходящих в стационарной фазе, особый интерес вызывает посттрансляционное добавление остатков глутаминовой кислоты на С-конец рибосомного белка S6 ферментом RimK. Роль данной модификации остается неизвестной, а именно, почему эти аминокислоты добавляются посттрансляционно, а не закодированы в геноме. В ходе работы оказалось, что исследуемый штамм *ΔrimK* содержит стороннюю мутацию в гене сигма субъединицы РНК полимеразы и эффекты, наблюдаемые нами, связаны именно с ней. Тот факт, что данная мутация находится в самом неизученном домене σ^{70}-субъединицы и приводит ко множественным аномалиям в бактериальном метаболизме, делает актуальным и значимым не только изучение функциональной роли олигоглутамилирование рибосомного белка S6, но и исследование эффектов, оказываемых изучаемой мутацией σ^{70} на жизнедеятельность клеток *E. coli*.

Степень разработанности темы

Регион 1.1 является одним из наименее изученных доменов сигма-фактора σ^{70}. Ранее для него были описаны некоторые мутации (I53A, G52A и D61A), влияющие на стабильность промоторных комплексов, которые образуются РНКП, содержащей мутантную σ^{70}, однако их влияние на транскрипцию так и не было изучено *in vivo.* В свою очередь, олигоглутамилирование рибосомного белка S6 остается одной из последних модификаций рибосомы *E. coli,* для которой так и не была изучена ее функциональная роль.

Цели и задачи исследования

Целями данной работы являлось изучение функциональной роли олигоглутамилирования рибосомного белка S6 и исследование эффектов, оказываемых мутацией I48S σ^{70} на жизнедеятельность клеток *E. coli.*

Для достижения целей исследования были поставлены следующие задачи:

1. Создание новых штаммов *E. coli,* содержащих независимо полученные делецию гена *rimK и* мутацию в гене *rpoD;*
2. Изучение функциональной роли олигоглутамилирования рибосомного белка S6 с помощью изучения регуляции появления модификации и анализа фенотипа штамма *ΔrimK;*
3. Исследование влияния замены I48S в σ^{70}-субъединице на жизнедеятельность *E. coli* с помощью изучения метаболической активности клеток *in vivo* и описания свойств мутантной РНК-полимеразы *in vitro*.

Объект исследования

Посттрансляционная модификация рибосомного белка S6 и σ^{70}-субъединица *Escherichia coli*.

Предмет исследования

Функциональная роль посттрансляционной модификации рибосомного белка S6 и влияние мутации I48S на регуляцию транскрипции.

Научная новизна исследования

Впервые проведено исследование влияния мутации в регионе σ1.1 на бактериальный метаболизм. Результаты экспериментов, полученные несколькими методами, свидетельствуют о значимом нарушении в процессе регуляции транскрипции в мутантных клетках, что позволяет предположить ранее неизвестный механизм влияния региона 1.1 на регуляцию ответа на стресс. Впервые изучена регуляция экспрессии гена *rimK*.

Теоретическая значимость исследования

В представленной работе показано, что мутация I48S приводит к ремоделированию клеточной транскрипции за счет изменения в силе взаимодействия РНКП и промоторной ДНК, а также за счет снижения чувствительности РНКП I48S к действию факторов строгого ответа. Также было продемонстрированно, что олигоглутамилирование рибосомного белка S6 происходит в стационарной фазе роста бактериальной культуры *E. coli*. На основе полученных данных, сделано предположение, что появление модификации вызывается не каким-то конкретным регуляторным механизмом, а кинетикой биосинтеза рибосом при переходе к стационарной фазе.

Практическая значимость исследования

Результаты данного исследования способствуют пониманию молекулярных механизмов регуляции ответа на стресс в стационарной фазе роста. В частности, мы показали, что мутация в регионе σ1.1 приводит к повышенной чувствительности бактериальных клеток к действию антибиотиков разного класса. Таким образом, регион 1.1 может стать мишенью для разработки антибактериальных препаратов, способствующих более эффективному действию антибиотиков.

Методология диссертационного исследования

В данной работе использовались современные биохимические и молекулярно-биологические методы. Для изучения регуляции экспрессии гена *rimK*, а также для оценки метаболической активности клеток *E. coli* использовали флуоресцентно-активированную проточную цитометрию с помощью высокоскоростного клеточного сортера BD FACSAria III

(Beckton Dickinson). Для определения статуса модификации белка S6 выделяли рибосомы и проводили идентификацию «отпечатков пептидных масс» с помощью масс-спектрометрии на приборе Ultraflex II (Bruker). Анализ влияния мутации I48S на регуляцию транскрипции проводили с помощью высокопроизводительного секвенирования РНК на платформе Illumina HiSeq2500. Выделение РНК, ДНК обратную транскрипцию и ПЦР проводили с помощью специализированных коммерчески доступных наборов реактивов. Иммуноблоттинг, количественный и качественный анализ белков и РНК осуществляли с помощью электрофореза.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Мутация I48S σ^{70}-фактора приводит к ремоделированию регуляции транскрипции *E. coli* за счет изменения силы взаимодействия РНК-полимеразы с промоторами и изменения чувствительности РНКП к действию факторов строго ответа.
2. Мутация I48S σ^{70}-фактора приводит к нарушению регуляции правильного распределения ресурсов при выходе *E. coli* из стационарной фазы и продлению лаг фазы.
3. Мутация I48S σ^{70}-фактора приводит к повышенной чувствительности бактериальных клеток к антибиотикам.
4. Олигоглутамилирование рибосомного белка S6 *E. coli* вызывается наступлением стационарной фазы, при этом, модификация S6 может происходить независимо от наличия специфичных факторов стационарной фазы.

Степень достоверности результатов

Достоверность результатов данного исследования подтверждается воспроизводимостью экспериментов и статистической обработкой данных. Все экспериментальные процедуры соответствуют поставленным целям и задачам. Результаты получены на современном научном оборудовании и с использованием реактивов, произведенных ведущими мировыми компаниями. Результаты работы опубликованы в международных рецензируемых журналах, индексируемых в системах Web of Science и Scopus.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы были представлены на заседании кафедры химии природных соединений Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, а также на следующих научных мероприятиях и конференциях:

1. Ribosomes and Translation, «Modification of translation apparatus: in a search for a functional role» – доклад (представлялся Сергиевым П.В.), «Функциональная роль олигоглутамилирования рибосомного белка S6» – постерная сессия; Россия, Петергоф, 13.05.2018–16.05.2018;
2. 42nd FEBS Congress «Functional role of ribosomal protein S6 oligoglutamylation in *Escherichia coli*» – постерная сессия; Израиль, Иерусалим, 10.09.2017-14.09.2017;
3. EMBO Conference: Ribosome Structure and Function, “Towards Understanding the Functional Role of Ribosomal Components Modification in *Escherichia coli”* – доклад (представлялся Сергиевым П.В.); Франция, Страсбург, 06.07.2016-10.07.2016.

Личный вклад автора

Личный вклад автора в проведенное исследование заключается в сборе и анализе литературных данных, постановке задач, планировании и проведении экспериментальных процедур, анализе и оформлении полученных результатов, в представлении результатов на научных мероприятиях.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 151 странице машинописного текста и содержит следующие разделы: оглавление, список сокращений, введение, обзор литературы, результаты, обсуждение, материалы и методы, выводы, список литературы, приложение. Материал иллюстрирован 38 рисунками и 3 таблицами. Список литературы включает 159 процитированных работ.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Полногеномное секвенирование штамма *ΔrimK* из Keio коллекции и получение новых штаммов

Образцы геномной ДНК из штаммов BW25113 (WT) и JW0836 (*ΔrimK* Keio) были переданы для секвенирования нашим коллегам из лаборатории Николая Равина ФИЦ «Фундаментальное основы биотехнологии» РАН. С помощью полногеномного секвенирования исследуемых штаммов мы обнаружили точечную мутацию T143G в кодирующей части гена *rpoD*, которая приводит к замене 48 аминокислотного остатка изолейцина на серин (I48S) в регионе 1.1 сигма-фактора РНК-полимеразы σ^{70}. Для изучения влияния мутации I48S на бактериальную физиологию мы создали два новых штамма *E. coli* с использованием фаговой системы рекомбинации (lambda RED system). Схема полученных и исходных штаммов представлена на рис. 1.

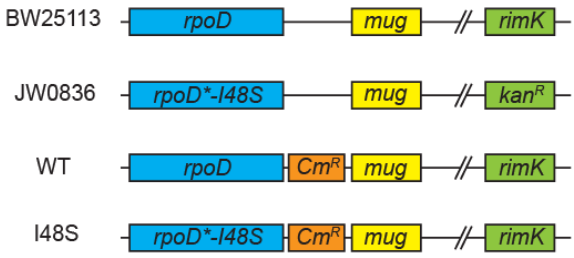


Рисунок 1. Схема полученных и исходных штаммов. BW25113 – штамм дикого типа, использованный в качестве контроля при секвенировании и для получения новых штаммов; JW0836 - штамм *ΔrimK* из Keio коллекции; WT - BW25113 *rpoD-WT-Cm;* I48S - BW25113 *rpoD-I48S-Cm.*

Влияние мутации I48S на кинетику роста и выживаемость клеток

Для изучения влияния мутации I48S на бактериальную физиологию мы сравнили скорость роста штаммов дикого типа и I48S, результаты измерений приведены на рис. 2. Время удвоения в логарифмической фазе роста было сравнимо для обоих штаммов (40.8 ± 1.7 мин и 46.4 ± 2.1 мин в среде LB, 142.6 ± 12.8 мин и 176.4 ± 4.8 мин в минимальной среде MOPS, 125.9 ± 6.1 мин и 146.1 ± 5.3 мин в минимальной среде MOPS с добавлением 20 аминокислот для дикого типа и I48S, соответственно). Однако, в случае штамма с мутацией мы наблюдали значительную задержку при переходе от лаг фазы к логарифмической. Средняя продолжительность лаг фазы исследуемых штаммов составила 56.3 ± 2.7 мин и 95.3 ± 1.7 мин в среде LB, 258.4 ± 9.4 мин и 321.6 ± 12.1 мин в минимальной среде MOPS, 119.8 ± 6.1 мин и 211.6 ± 5.7 в минимальной среде

MOPS с добавлением 20 аминокислот для дикого типа и I48S, соответственно. Наблюдаемый нами фенотип свидетельствует о возможном нарушении механизма адаптации бактериальной культуры к новым условиям окружающей среды.

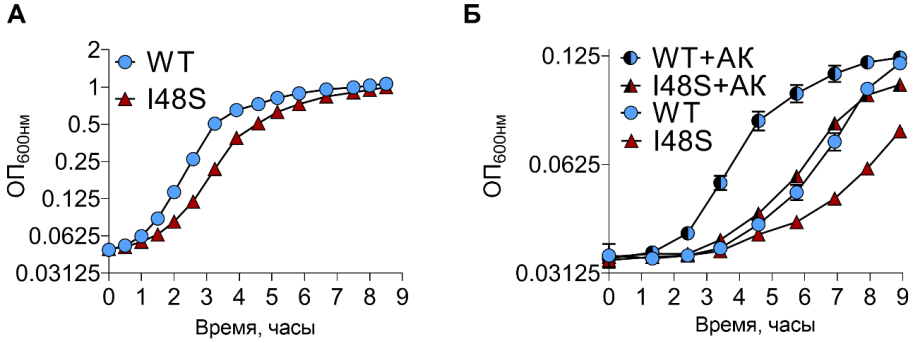


Рисунок 2. Кривые роста штаммов WT и I48S. **(А)** В богатой среде LB. **(Б)** В минимальной среде MOPS без аминокислот и с добавлением 20 протеиногенных аминокислот.

Влияние мутации I48S на метаболическую активность клеток *E. coli*

Одной из ключевых стратегий выживания бактериальной популяции является образование различных покоящихся форм. Подобные клетки характеризуются сниженным метаболизмом и практически нечувствительны к антибиотикам.

Одним из наиболее простых способов проверки возможного влияния мутации I48S на образование покоящихся клеток является ампициллиновый тест. Суть эксперимента заключается в том, что клетки в стационарной фазе роста пересевают в свежую среду с добавлением бактерицидного антибиотика ампициллина. Поскольку покоящиеся клетки резистентны к действию антибиотиков, то падение титра клеток при добавлении ампициллина в лаг фазе объясняется гибелью именно метаболически активных клеток. Мы обнаружили, что в первые три часа инкубации с антибиотиком, титр покоящихся клеток мутантного штамма был значительно ниже, чем титр покоящихся клеток штамма дикого типа (рис. 3А). Похожие результаты были получены при инкубации исследуемых культур клеток с ципрофлоксацином – антибиотиком с механизмом действия, отличным от ампициллина, что дополнительно подтверждает предположение о сниженном титре покоящихся клеток в штамме I48S (Рис. 3Б).

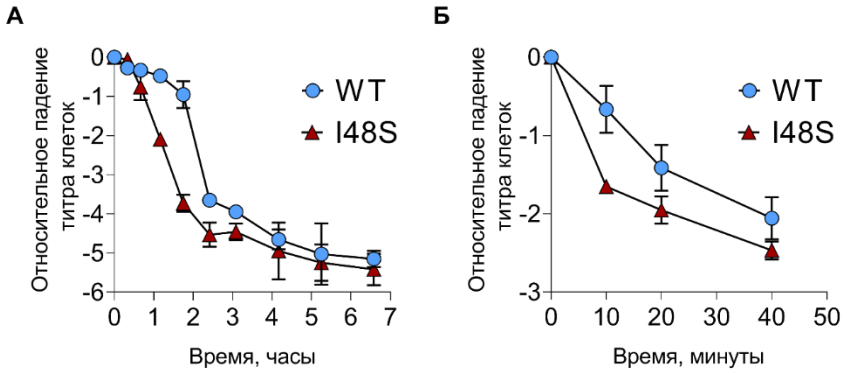


Рисунок 3. Кривая падения относительного титра клеток дикого типа и мутанта после пересева в среду с антибиотиком. Каждая точка соответствует среднему титру трех биологических реплик. (А) Падение титра после обработки клеток ампициллином. (Б) Падение титра после обработки клеток ципрофлоксацином.

Для подтверждения предыдущих результатов и более подробного описания метаболизма штамма с мутацией мы провели анализ *de novo* синтеза белка в разных фазах роста бактериальной

культуры. Клетки выращивали до стационарной фазы (48 часов) в бедной среде со всеми протеиногенными аминокислотами, кроме валина. Культуру клеток в стационарной фазе делили на три равные части. К одной из них добавляли радиоактивный валин-^{14}C и растили клетки еще 1 час (стационарная фаза), к другой части клеток добавляли глюкозу в смеси с радиоактивным валином (лаг фаза). Для измерения *de novo* трансляции в логарифмической фазе сначала добавляли глюкозу и лишь через несколько часов добавляли радиоактивный валин. После инкубации выделяли суммарный белок из клеток, разделяли денатурирующим гель-электрофорезом и анализировали уровень синтеза белка по включению радиоактивной аминокислоты. Результаты эксперимента приведены на рис. 4.

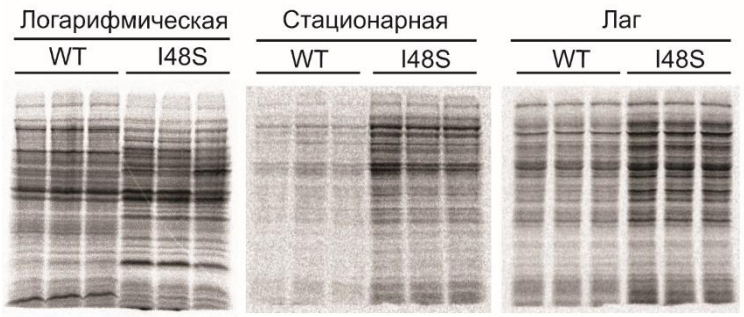


Рисунок 4. Авторадиограмма *de novo* синтезированного белка в штаммах дикого типа и мутанта. Для каждой фазы и штамма измерение уровня *de novo* трансляции было проведено на 3 биологических репликах. Контроль нанесения суммарного белка проводили с помощью окрашивания белковых гелей краской Кумасси перед экспозицией.

Как видно из приведенного выше рисунка, отличия в трансляции наблюдаются как на количественном, так и на качественном уровне. Ожидаемо, в логарифмической фазе, уровень синтеза суммарного белка в обоих штаммах был одинаков, однако, профиль синтезируемых белков значительно различался (рис. 4 слева). В стационарной фазе клетки дикого типа практически полностью подавляли биосинтез белка, в то время как мутант демонстрировал более высокий уровень остаточной трансляции (рис. 4 в центре). Похожая ситуация наблюдалась и в случае измерения эффективности трансляции при выходе из стационарной фазы (рис. 4 справа). Полученные результаты свидетельствуют о том, что клетки штамма I48S имеют повышенный уровень синтетической активности (метаболизма) в стационарной фазе, а также во время перехода от стационарной фазы к логарифмической (лаг фаза).

Как было упомянуто выше, спящие клетки характеризуются минимальной метаболической активностью, включая гибернацию процесса трансляции. Для измерения динамики синтетической активности в индивидуальных клетках бактериальной культуры, мы использовали репортерную конструкцию на основе флуоресцентного белка FastFT. Особенностью FastFT является то, что у новосинтезированного белка длина волны испускания флуоресценции находится в синей области спектра, а через некоторое время после синтеза происходит его окисление и смещение длины волны испускания флуоресценции в красную область спектра. Время полупревращения синей формы в красную составляет 7,5 часов, в то время как созревание синей формы происходит практически мгновенно (время полупревращения около 9 минут).

Плазмидой, несущей ген, кодирующий белок FastFT под контролем фагового промотора T5, были трансформированы клетки дикого типа и I48S. Культуру клеток выращивали в течение

48 часов в среде LB до наступления стационарной фазы и анализировали с помощью проточной цитометрии, что позволило одновременно измерять уровень новосинтезированного и «старого» FastFT, транслированного в предшествующей логарифмической фазе. Результат анализа, приведенный на рис. 5, показал, что, как и ожидалось, клетки дикого типа полностью ингибируют биосинтез белка в стационарной фазе (рис. 5а, 4% метаболически активных клеток), в то время как популяция мутантных клеток содержала значительную субпопуляцию клеток, продолжавших трансляцию репортерного белка (рис. 5б, 22% метаболически активных клеток).

Разбавление стационарной культуры клеток свежей средой выявило существенное различие в динамике активации метаболизма между штаммами дикого типа и I48S. Через 60 минут после разбавления свежей средой клетки дикого типа образовывали три популяции (рис. 5в). Большая часть клеток дикого типа оставалась «спящей» (49%), 27% культуры были представлены поделившимися клетками (популяция клеток со сниженным уровнем «красной» флуоресценции), в то время как 23% популяции начинали синтез синей формы FastFT без деления (популяция с увеличенным уровнем «синей» флуоресценции, но без снижения уровня «красной» флуоресценции). В отличие от дикого типа, только 34% культуры мутанта были представлены спящими клетками и, что интересно, мы обнаружили четыре субпопуляции клеток с различной белок синтезирующей активностью. Дополнительная популяция была представлена поделившимися клетками с высоким уровнем синтетической активности (рис. 5г, обратите внимание на популяцию с увеличенной «синей» и сниженной «красной» флуоресценцией, отмеченную стрелкой).

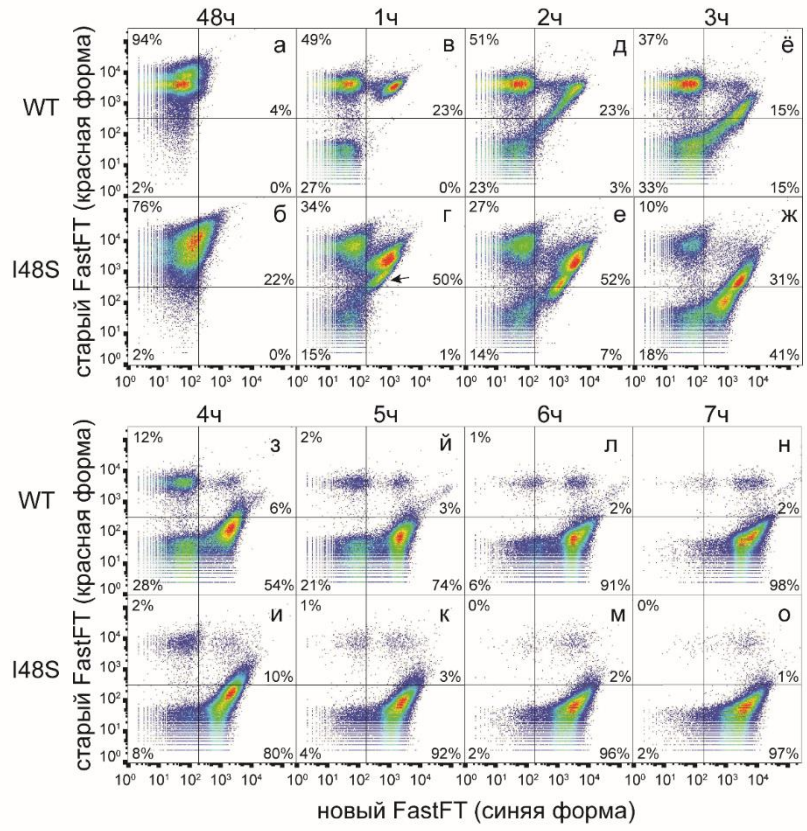


Рисунок 5. Результаты флуоресцентно-активированной проточной цитометрии клеток WT и I48S, трансформированных репортерной конструкцией FastFT. Каждая точка соответствует единичной клетке, по вертикали отложена интенсивность «красной» флуоресценции, а по горизонтали отложена интенсивность «синей» флуоресценции. Псевдоцвета соответствуют количеству клеток в каждой точке графика, где синий цвет

соответствует единичным клеткам, а ярко-красный цвет обозначает высокую концентрацию клеток с одинаковым соотношением флуоресценции. Отмеченное время отражает время инкубации клеток в свежей среде после пересева культуры.

После трех часов инкубации в свежей среде 37% клеток дикого типа оставались «спящими» (рис. 5ё), в сравнении с 10% популяции клеток I48S (рис. 5ж). Анализ динамики синтеза FastFT в клетках дикого типа и мутанта при выходе из стационарной фазы показал, что штамм дикого типа поддерживает субпопуляцию «спящих» клеток даже через 7 часов после пересева (рис. 5з, й, л, н), в то время как популяция «спящих» клеток целиком исчезала из культуры штамма I48S уже через 6 часов после разбавления свежей средой (рис. 5и, к, м, о).

Анализ результатов эксперимента по экспрессии гена флуоресцентного таймера FastFT показал, что после разбавления свежей средой культура клеток дикого типа разделяется на три популяции, представленные метаболически активными и «спящими» клетками. В свою очередь, в штамме с мутацией в гене *rpoD* мы наблюдали более высокую долю метаболически активных клеток, а также дополнительную популяцию, представленную активно делящимися клетками с высоким уровнем синтетической активности. Таким образом, сниженный титр «спящих клеток» и повышенный уровень трансляции хорошо коррелирует с результатами, полученными с помощью проточной цитометрии. Вероятнее всего, наблюдаемая задержка при переходе от стационарной фазы к логарифмической может объясняться значительным нарушением регуляции транскрипции в штамме с мутацией в сигма-факторе РНК-полимеразы, в связи с чем клеткам требуется заметно больше времени для адаптации к новым условиям.

Изучение транскриптома штамма I48S

σ^{70} является основным транскрипционным фактором *E. coli*, так что весьма вероятно, что мутация в гене *rpoD* может оказывать значительное влияние на транскриптом. Для изучения транскрипционных эффектов, оказываемых РНКП I48S, штаммы дикого типа и I48S выращивали до логарифмической и стационарной фазы, после чего клетки собирали и выделяли суммарную РНК. Подготовленные образцы (три биологические реплики для каждого штамма были переданы нашим коллегам из отдела молекулярной биологии микроорганизмов ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологий» Российской академии наук под руководством Николая Равина для секвенирования суммарной РНК. Биоинформатический анализ результатов секвенирования, содержащих таблицу с указанием дифференциально экспрессируемых генов, проводился автором диссертации.

По результатам секвенирования оказалось, что доля рРНК среди суммарной РНК составила 85-87% и 73-78% для штаммов I48S и WT, соответственно. Также был проведён анализ дифференциальной экспрессии (ДЭ) для белок-кодирующих генов. Первичный анализ ДЭ генов проводили с помощью сервиса “Functional annotation” на веб-сервере David и сервиса “Analysis” на веб-сервере базы данных STRING. Метаболические пути, которые были достоверно обогащены среди ДЭ генов, были выявлены с помощью применения аннотации KEGG и GO. Нами было обнаружено, что уровень экспрессии 886 и 148 генов достоверно различался между диким типом и мутантном штаммом в логарифмической и стационарной фазах, соответственно (модуль отношения количества РНК в мутанте по сравнению с диким типом ≥ 1.5; P-значение < 0.05) (рис. 6А).

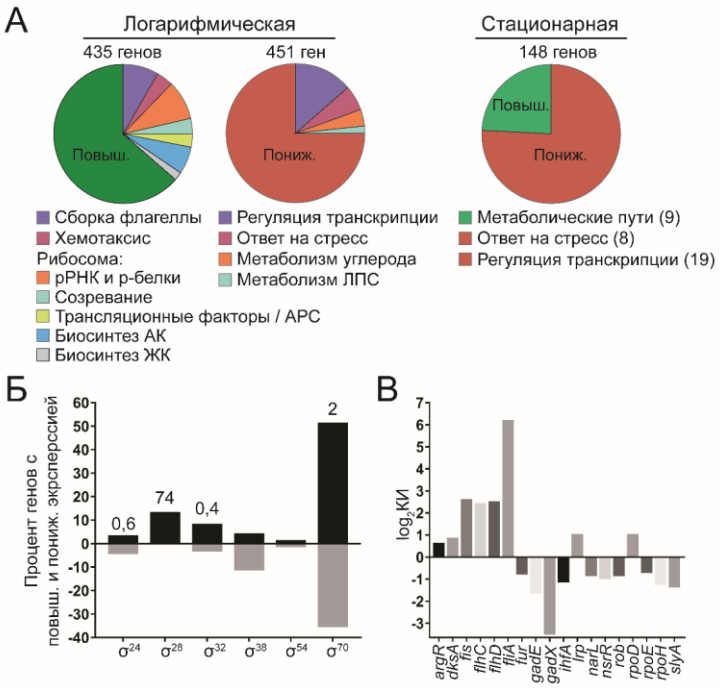


Рисунок 6. (А) Круговая диаграмма, отражающая количество генов с повышенной и пониженной экспрессией (Модуль кратности изменения экспрессии |КИ| ≥ 1.5; Р-значение < 0.05) в логарифмической и стационарной фазах культуры мутантных клеток. Достоверно обогащённые метаболические пути среди генов с дифференциальной экспрессией приведены под диаграммой. (Б) График, отражающий процент генов с повышенной и пониженной экспрессией в логарифмической фазе, принадлежащих к разным сигмулонам (регулонам σ-факторов). КИ экспрессии соответствующих σ-факторов приведена над столбцами. (В) График КИ экспрессии ключевых факторов регуляции транскрипции в логарифмической фазе.

Среди дифференциально экспрессирующихся генов в логарифмической фазе наблюдалось достоверное обогащение множества регуляторных путей. В штамме I48S была повышена экспрессия генов следующих метаболических путей: сборка флагеллы (37 генов), бактериальный хемотаксис (17 генов), рибосома (40 генов рРНК и рибосомных белков), биогенез рибосомы (15 генов факторов сборки и созревания рибосомы), трансляция (14 генов трансляционных факторы и аминоацил-тРНК-синтетаз), биосинтез аминокислот (27 генов) и биосинтез жирных кислот (9 генов). В то же время, среди генов с пониженной экспрессией в логарифмической фазе мутантного штамма были обогащены пути регуляции транскрипции (62 гена), ответа на стресс (26 генов), а также пути метаболизма источников углерода (18 генов) и липополисахаридов (7 генов).

Для более полного понимания характера изменения регуляции транскрипции в логарифмической фазе роста штамма I48S, мы визуализировали результаты секвенирования РНК с помощью сервиса “Omics Dashboard” на веб-сервере EcoCyc. На рис. 6Б приведен результат анализа ДЭ генов с помощью сервиса “Omics Dashboard”. Видно, что в логарифмической фазе роста происходит комплексное нарушение баланса в конкуренции сигма-факторов. Анализ активности сигмулонов продемонстрировал значительный сдвиг от экспрессии генов, связанных с ответом на стресс, к генам необходимым для активного роста бактериальной культуры. Отдельно стоит отметить, что ДЭ генов, кодирующих ключевые факторы транскрипции (рис. 6В), заметно осложняет анализ полученных данных и делает практически невозможным разделение первичных и вторичных эффектов, оказываемых мутацией I48S на регуляцию транскрипции.

Одной из наиболее интересных особенностей транскриптома штамма I48S в логарифмической фазе роста являлось то, что все обогащенные регуляторные пути с повышенной экспрессией регулируются DksA и строгим ответом. Более того, паттерн ДЭ генов в штамме I48S был схож с результатами, полученными для штамма *ΔdksA*. В частности, активность промоторов генов, кодирующих рРНК (*rrnB* P1), рибосомные белки (*rpsNp, rpsU* P2 и прочие), компоненты системы сборки флагеллы (*flhDp* и *fliAp1*) и ферменты биосинтеза жирных кислот (*fabHp*) также была значительно повышена в штамме Δ*dksA* в логарифмической фазе роста. Транскриптомный анализ штамма Δ*dksA* показал повышение экспрессии генов биосинтеза флагеллы и хемотаксиса, при этом была заметно снижена экспрессия генов, кодирующих компоненты систем ответа на стресс, что коррелирует с транскриптомом штамма I48S. Необходимо отметить, что DksA является ключевым активатором транскрипции генов биосинтеза аминокислот и его инактивация приводит к снижению их экспрессии, однако, данный метаболический путь был обогащен среди генов с повышенной экспрессии в штамме I48S. В то же время, в мутантном штамме практически не изменялся уровень синтеза мРНК, кодирующих регуляторы строго ответа RelA (отсутствие ДЭ), SpoT и DksA (незначительное повышение экспрессии).

Анализ ДЭ генов в стационарной фазе показал обогащение категории метаболических путей (9 генов) и категорий регуляции транскрипции (19 генов) и ответа на стресс (8 генов) для генов с повышенной и пониженной экспрессией, соответственно. В стационарной фазе 45% дифференциально экспрессированных генов кодировали белки с неизвестной функцией, что может частично объясняться тем, что метаболические пути, специфичные для стационарной фазы изучены намного более слабо, чем пути, отвечающие за рост клеток в логарифмической фазе. Среди наиболее интересных ДЭ генов можно отметить *raiA, rmf* и *sra. raiA* и *rmf* кодируют факторы гибернации рибосомы, необходимые для ингибирования трансляции в стационарной фазе. Функция Sra (также известного как рибосомный белок S22) не была полностью изучена, однако, известно, что S22 ассоциирован с рибосомами именно в стационарной фазе. Также мы проанализировали экспрессию гена *ssrS*, кодирующего 6S РНК, необходимую для подавления активности σ^{70} РНКП в стационарной фазе роста. По результатам полнотранскриптомного анализа и ОТ-кПЦР Мы обнаружили, что уровень 6S РНК был снижен в 1,5-2 раза в стационарной и логарифмической фазах роста (рис. 7).

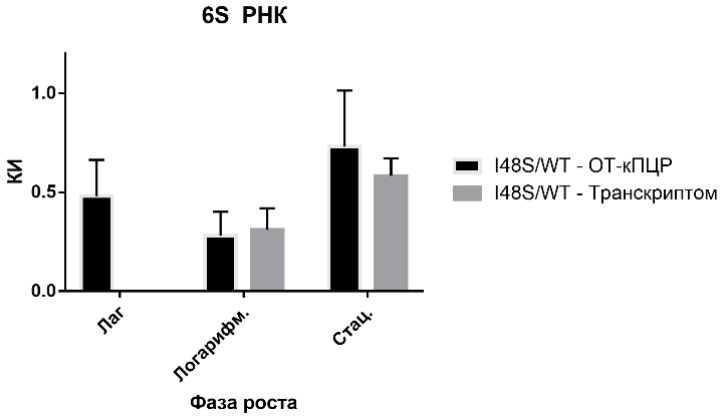


Рисунок 7. Анализ влияния мутации I48S на экспрессию гена *ssrS* в лаг, логарифмической и стационарной фазах роста с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией и секвенирования РНК. Абсолютные значения, полученные с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией, нормировались на уровень экспрессии гена *rrsA*, кодирующего 16S рРНК. Приведенные данные представляют собой средние значения и стандартные

отклонения для трех биологических реплик. Левые столбцы соответствуют результатам ОТ-кПЦР, правые полнотранскриптомному анализу.

Снижение экспрессии генов, необходимых для ингибирования трансляции и транскрипции в стационарной фазе, может частично объяснять повышенный уровень биосинтеза белка в штамме I48S, что в свою очередь, может приводить к снижению титра «спящих» клеток в культуре.

Влияние мутации I48S на *in vitro* активность РНК-полимеразы

Результаты из данной части диссертации получены совместно с сотрудниками лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов Института молекулярной генетики РАН (Кульбачинский А.В., Есюнина Д.М., Пупов Д.В., Петушков И.В.).

Наблюдаемые изменения в метаболической активности клеток I48S могут объясняться изменением активности РНКП, содержащей мутантную σ-субъединицу. Для того, чтобы понять механизм влияния мутации I48S на транскрипцию, мы выбрали один из наиболее изученных бактериальных промоторов, а именно *rrnB* P1, который контролирует экспрессию одного из семи оперонов рРНК *E. coli*. Особенностью данного промотора является его невероятно высокая активность в логарифмической фазе и практически полное ингибирование в стационарной фазе роста. В отличие от большинства промоторов, *rrnB* P1 образует крайне нестабильный комплекс с РНКП, что, с одной стороны, значительно облегчает уход полимеразы с промотора, а с другой стороны делает подобный комплекс крайне чувствительным к действию регуляторных факторов.

Эксперименты по сравнению активности холоферментов РНКП дикого типа и РНКП I48S проводились на плазмидной матрице, содержащей промотор *rrnB* P1, контролирующий экспрессию РНК длиной 88 п.о., терминация транскрипции которой осуществляется за счет терминатора hisT. Также данная плазмида содержит точку начала репликации pMB1, активность которой регулируется транскрипцией регуляторной РНК I длинной 105 п.о. Известно, что промотор РНК I образует крайне стабильные комплексы с РНКП, которые устойчивы к действию DksA и ppGpp. Таким образом, мы использовали отношение активности данных промоторов как меру регуляции промотора *rrnB* P1. Результаты эксперимента приведены на рис. 8.

Без добавления дополнительных регуляторных факторов холофермент РНКП I48S проявлял более высокую относительную активность на промоторе *rrnB* P1. В свою очередь, добавление 2 μM DksA несколько снижало относительную активность РНКП дикого типа, однако, не оказывало влияние на активность РНКП I48S. Добавление 200 μM ppGpp снижало активность обеих РНКП в схожей степени, при этом добавление ppGpp вместе с DksA снижало активность РНКП дикого типа и I48S в 2-2,5 раза. Важно отметить, что во всех описанных случаях остаточная активность РНКП I48S была выше остаточной активности РНКП дикого типа. Таким образом, мутация I48S приводит к повышенной активности РНКП полимеразы *in vitro*, как в присутствии, так и в отсутствии DksA и ppGpp.

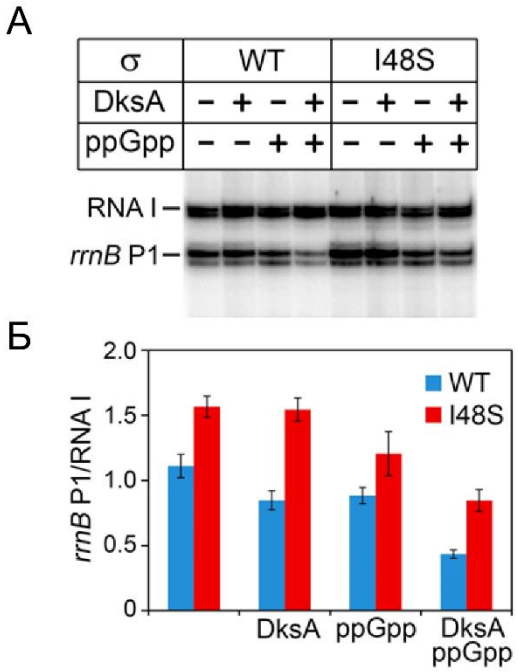


Рисунок 8. Активность холоферментов РНКП WT и I48S. (А) Электрофореграмма транскриптов РНК I и репортерной РНК *rrnB* P1, синтезированных *in vitro.* Наличие или отсутствие регуляторных факторов отмечено в таблице. (В) Уровень относительной активности РНКП WT и I48S.

Для изучения возможной причины повышенной устойчивости РНКП I48S к действию DksA, мы сравнили активность РНКП дикого типа и I48S при разных концентрациях DksA. Результаты исследования приведены на рис. 9.

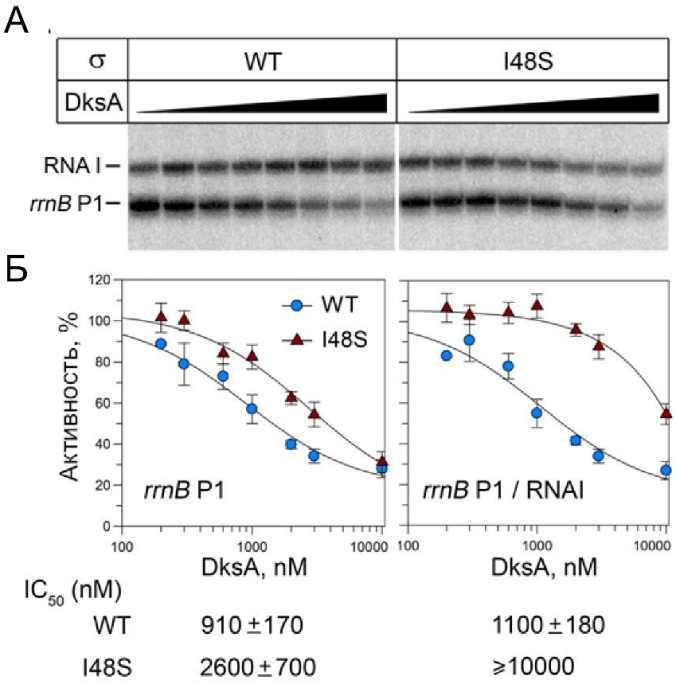


Рисунок 9. Устойчивость РНКП WT и I48S к действию DksA. (А) Электрофореграмма транскриптов РНК I и репортерной РНК *rrnB* P1, синтезированных *in vitro.* Возрастание концентрации DksA в реакции *in vitro* транскрипции схематично представлено в таблице. (В) Остаточная активности РНКП WT и I48S под действием DksA. Слева приведена остаточная активность промотора *rrnB P1*, справа приведена остаточная относительная активность *rrnB* P1 (rrnB P1/РНК I). Указаны концентрации полумаксимального ингибирования РНК-полимераз (IC_{50}).

Оказалось, что для достижения схожего уровня ингибирования, РНКП I48S требовалась значительно большая концентрация DksA (IC_{50} 910±170 нМ для РНКП дикого типа, против 2600±700 нМ для мутантной РНКП). В то же время, максимальный уровень ингибирования при высоких концентрациях DksA был практически одинаков для обеих РНКП, что позволяет предположить, что основной эффект мутации заключается в изменении аффинности РНКП к DksA. Что интересно, мы обнаружили, что синтез РНК I с помощью РНКП I48S также ингибировался при повышенных концентрациях DksA. Подобное свойство РНКП I48S приводило к тому, что относительная активность промотора *rrnB* P1 оставалась практически неизменной в диапазоне концентраций DksA до 10 μM ($IC_{50} \geq 10$ μM). Таким образом, мутация не только влияет на аффинность РНКП к DksA, но и, что более интересно, может изменять относительную чувствительность стабильных и нестабильных промоторных комплексов к действию DksA.

Для того, чтобы найти причину повышенной активности мутантной РНКП, мы сравнили время полужизни промоторных комплексов для РНКП дикого типа и I48S. Измерение проводили путем инкубации предварительно сформированных промоторных комплексов вместе с конкурирующей ДНК (Фрагмент ДНК, содержащий -10-элемент, имитирующий транскрипционную вилку и дуплекс ДНК, расположенной после точки начала транскрипции) или гепарином, с последующим измерением остаточной активности РНКП. Результаты эксперимента приведены на рис. 10.

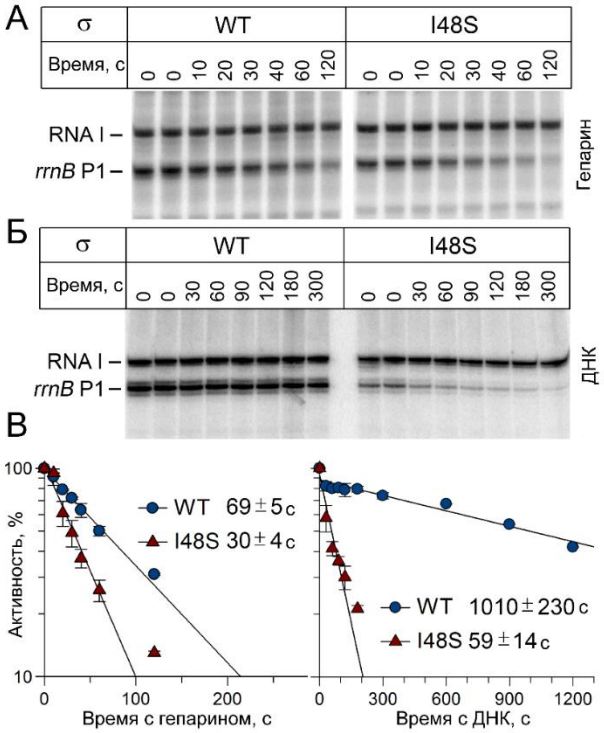


Рисунок 10. Время полужизни промоторных комплексов *rrnB* P1. (А,Б) Электрофореграмма транскриптов РНК I и репортерной РНК *rrnB* P1, синтезированных *in vitro*. В таблице отмечено время инкубации с гепарином или конкурирующей ДНК, соответственно. (В) Зависимость остаточной активности РНКП WT и I48S от времени инкубации с гепарином (слева) или конкурирующей ДНК (справа).

Как и ожидалось, активность промотора РНК I, который образует стабильный комплекс с РНКП, была неизменна для обеих РНК-полимераз. В противоположность этому, на промоторе *rrnB* P1 мутантная РНКП образовывала комплексы с заметно меньшим временем полужизни, чем

РНКП дикого типа. Как видно, конкурирующая ДНК, содержащая фрагмент ДНК, расположенный после точки начала транскрипции, вызывает вытеснение промоторной ДНК из образованных комплексов намного эффективнее, чем гепарин. Можно предположить, что мутация I48S нарушает взаимодействие между РНКП и участком ДНК, расположенным после точки начала транскрипции на стадии инициации транскрипции. Таким образом, можно сделать вывод о том, что мутация I48S приводит к значительной дестабилизации взаимодействия между РНКП и промотором. Известно, что другие мутации в регионе 1.1 (G52A и D61A) также приводили к дестабилизации промоторных комплексов, что косвенно подтверждает достоверность полученных нами результатов.

Как известно, в свободном состоянии σ^{70}-субъединица принимает компактную конформацию, которая препятствует связыванию промоторной ДНК. Мы проверили, насколько мутация I48S может влиять на ДНК-связывающие свойства свободной σ^{70}-субъединицы. С помощью метода УФ-сшивок была проанализирована способность σ^{70} связывать одноцепочечный ДНК-олигонуклеотид, содержащий -10-элемент промотора (TATAAT). Результаты эксперимента приведены на рис. 11.

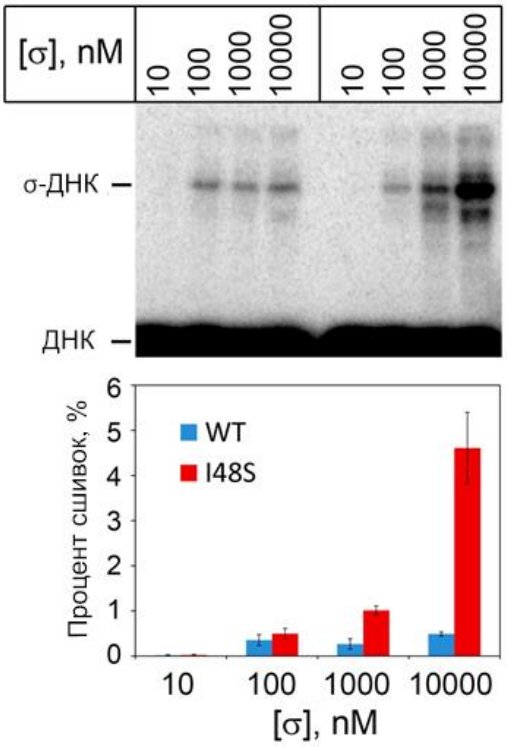


Рисунок 11. ДНК-связывающие свойства свободной σ^{70}. Сверху приведена электрофореграмма продуктов реакции после обработки УФ. Отмечено положение свободного ДНК-олигонуклеотида и комплекса σ^{70}-субъединицы с ДНК-олигонуклеотидом. Снизу приведен анализ электрофореграммы с указанием процентного содержания комплекса σ^{70}-субъединицы с ДНК-олигонуклеотидом.

Было обнаружено, что мутация значительно стимулирует взаимодействие между свободной σ^{70} и одноцепочечной последовательностью промотора. Данные результаты позволяют предположить, что мутация может нарушать конформацию σ^{70} и приводить к экспозиции ДНК-связывающего региона σ-фактора. Однако, остается неясным насколько демаскировка ДНК-связывающего домена может влиять на эффективность распознавания промоторов мутантной РНКП.

Дополнительным подтверждением предыдущих данных является результат регистрации спектров кругового дихроизма σ^{70} с мутацией I48S и без нее (рис. 12). Нами было обнаружено изменение в спектрах КД в районе 195-220 нм, что свидетельствует о структурных изменениях в свободной σ^{70}. Несмотря на достоверность наблюдаемых изменений, достаточно сложно сделать однозначный вывод о природе нарушений в структуре мутантной σ^{70}.

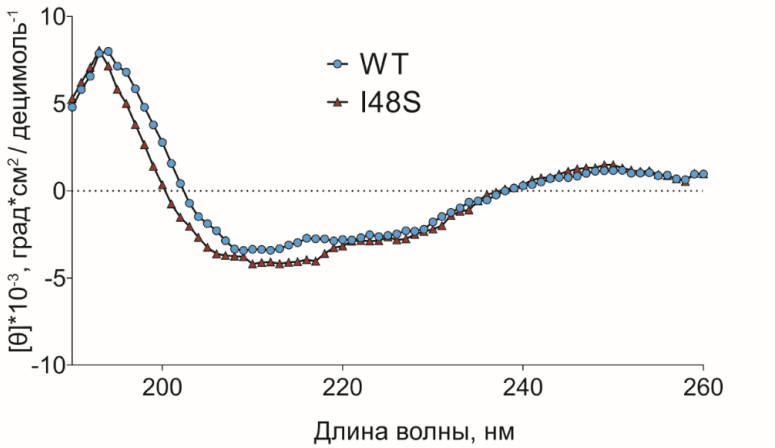


Рисунок 12. Анализ изменений в конформации свободной σ^{70} с помощью регистрации спектров кругового дихроизма. Спектры (190-260 нм) регистрировались при помощи 5 сканирований для каждого образца.

Поскольку повышение активности мутантной РНКП может объясняться нарушением множества процессов, связанных с инициацией транскрипции, были проверены и другие возможные нарушения в функционировании РНКП, однако значимых различий между РНКП дикого типа и I48S обнаружено не было. В рамках данных экспериментов были проанализированы следующие параметры: аффинность σ-субъединицы к минимальному ферменту РНКП, чувствительность к концентрации инициаторных нуклеотидов, эффективность диссоциации σ-субъединицы при переходе к элонгации, чувствительность к действию 6S РНК, а также стабильность самой σ^{70}-субъединицы.

Получение делеции гена *rimK*

Ранее в нашей лаборатории было показано, что АТФ-зависимая L-глутамат лигаза RimK модифицирует белок S6 в стационарной фазе роста бактериальной культуры. Более того, с помощью *in vitro* реакции модификации S6 было обнаружено, что подобная модификация происходит только с S6 в составе малой субъединицы или собранных 70S рибосом. Поскольку в предыдущих исследованиях использовался штамм Δ*rimK,* содержащий мутацию I48S, приводящую к кардинальному нарушению метаболизма *E. coli*, все результаты полученные *in vivo* оказались недостоверными. Первой задачей на пути изучения функциональной роли олигоглутамилирования S6 стало получение штамма Δ*rimK* без сторонних мутаций.

При помощи метода P1 трансдукции нами был получен новый штамм с делецией гена *rimK* на основе штамма *E. coli* - BW25113 *rpoD-WT-Cm* (подробно описан ранее). Новый штамм был проверен при помощи ПЦР с праймерами на участок хромосомы, в котором закодирован ген *rimK*. В случае замены гена фермента на ген устойчивости к канамицину должен был быть получен более длинный ПЦР-продукт. Гель-электрофорез ПЦР-продуктов приведен на рис. 13.

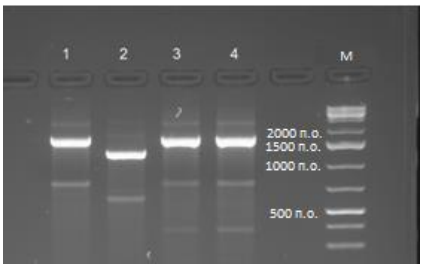


Рисунок 13. Результат проверки штаммов на делецию гена *rimK* методом ПЦР. *1 – штамм ΔrimK из KeiO-коллекции, 2 – дикий тип, 3 – штамм ΔrimK после трансдукции (клон 1), 4 - штамм ΔrimK после трансдукции (клон 2).*

Дополнительной проверкой делеции гена *rimK* стал иммуноблоттинг суммарного белка из штаммов *ΔrimK* и дикого типа с помощью антител на рибосомный белок S6. В случае нокаута, белок S6 не имеет модификации в стационарной фазе и должен обладать большей подвижностью при белковом гель-электрофорезе в денатурирующих условиях. Результаты иммуноблоттинга приведены на рис. 14

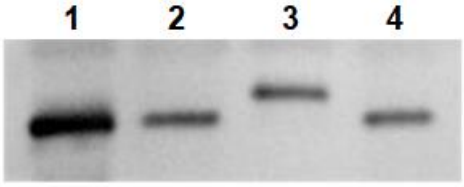


Рисунок 14. Иммуноблоттинг белка S6. 1, 2 – образцы из штамма *ΔrimK* в стационарной и логарифмической фазах, соответственно; 3, 4 - образцы из штамма WT в стационарной и логарифмической фазах, соответственно.

Видно, что в образцах, полученных из клеток Δ*rimK* в стационарной фазе, белок S6 мигрирует в геле с большей скоростью, чем белок S6 из клеток дикого типа, следовательно, обладает меньшей массой и не имеет модификации на С-конце. Это является независимым доказательством того, что мы получили нокаут гена *rimK*. Таким образом, мы создали новый штамм *E. coli* - BW25113 *rpoD-WT-Cm, ΔrimK::kan (*далее *ΔrimK),* а также подтвердили тот факт, что модификация S6 происходит именно в стационарной фазе роста.

Определение статуса модификации белка S6 в стационарной фазе

Для исследования числа остатков глутаминовой кислоты, присоединяемых к S6, мы выделяли рибосомы из клеток штаммов дикого типа и *ΔrimK,* находящихся в логарифмической и стационарной фазах. После этого проводили одномерный гель-электрофорез рибосом в денатурирующих условиях, вырезали из геля зону, соответствующую по массе белку S6, обрабатывали трипсином и проводили масс-спектрометрический анализ «отпечатков пептидных масс». Как и ожидалось, спектры рибосом нокаутного штамма не содержали пептидов, соответствующих модифицированному белку S6. Однако, оказалось, что 2 модифицированных изоформы белка S6 присутствуют и в логарифмической фазе. В случае стационарной фазы, белок S6 из дикого типа представлен в виде 4 изоформ, соответствующих последовательно модифицированному белку S6. Что особенно важно, в стационарной фазе отсутствует немодифицированая форма S6. Полученные спектры рибосомного белка S6 приведены на рис. 15

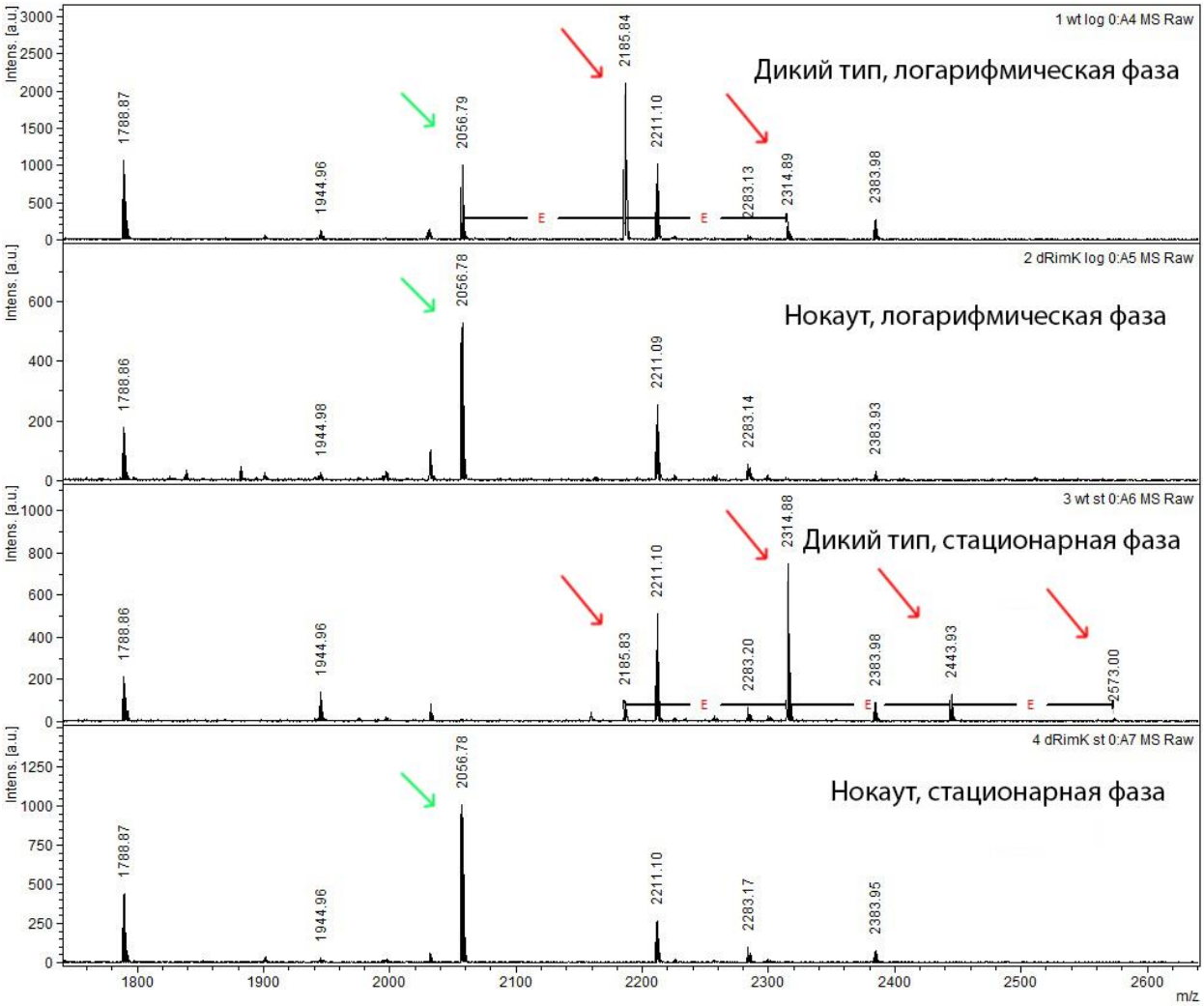


Рисунок 15. Масс-спектры рибосомного белка S6, выделенного из штаммов дикого типа и *ΔrimK*. Красными стрелками отмечены пептиды, содержащие дополнительные остатки глутаминовой кислоты, зелеными стрелками отмечен пептид, соответствующий немодифицированному С-концу S6.

После проверки эффективности такого подхода к идентификации статуса модификации, мы решили узнать, что происходит с С-концом белка S6 с течением времени. Возможно, в длительной стационарной фазе исчезают все изоформы белка, кроме формы с 4 дополнительными аминокислотами?

Для выяснения статуса модификации в долговременной стационарной фазе клетки дикого типа и штамма *ΔrimK* выращивали в течение 8 дней, каждый день отбирая часть культуры. Из полученных образцов мы выделяли рибосомы и повторяли операцию, описанную выше для идентификации статуса модификации белка S6 в стационарной фазе. Начиная с 5 дня инкубации клеток в стационарной фазе обнаружить белок S6 в клетках не удается. Вероятно, причина этого кроется в его деградации. В первые 4 дня на спектрах не обнаруживается пик, соответствующий мономодифицированному белку S6, в остальном паттерн модификации не изменяется. Масс-спектры рибосомного белка S6 при инкубации в стационарной фазе в течение 4 дней приведены на рис. 16.

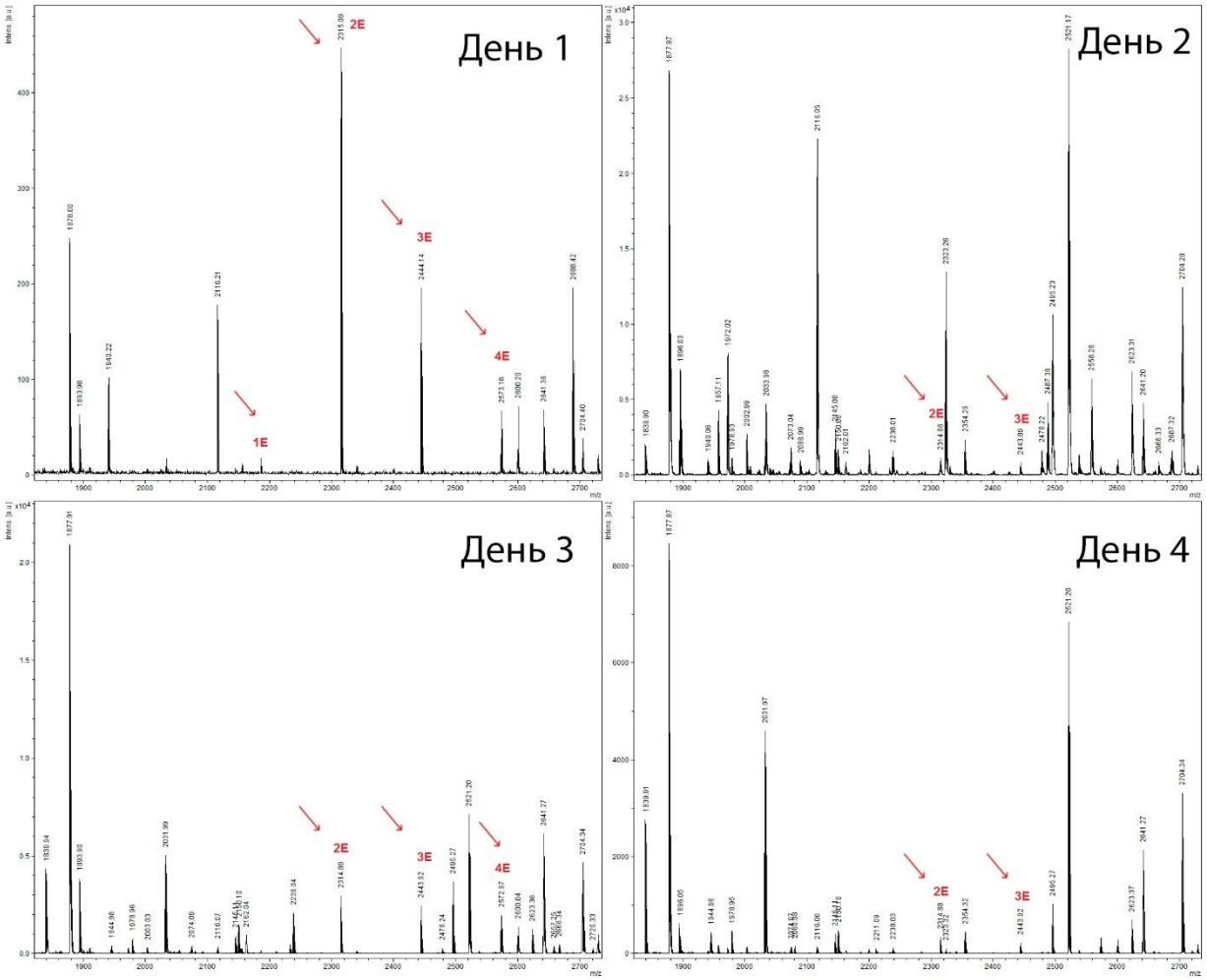


Рисунок 16. Масс-спектры рибосомного белка S6, выделенного из клеток, находящихся в долговременной стационарной фазе. Красными стрелками отмечены пептиды, содержащие дополнительные остатки глутаминовой кислоты.

Отсутствие значимых изменений в статусе модификации белка S6 при долговременной стационарной фазе косвенно подтверждает, что функциональная значимость модификации обуславливается скорее самим фактом наличия дополнительных остатков глутаминовой кислоты, нежели их определенным количеством.

Изучение регуляции экспрессии гена *rimK*

Следующий вопрос, который нас заинтересовал – если модификация присутствует и в логарифмической, и в стационарной фазе, то может ли это означать, что экспрессия гена *rimK* происходит в обеих фазах? В таком случае не ясно, почему в клетках логарифмической фазы отсутствует полностью модифицированный белок. Для поиска ответа на этот вопрос мы решили измерить уровень экспрессии *rimK* в зависимости от фазы роста бактериальной культуры.

Для исследования регуляции экспрессии RimK мы воспользовались репортерной конструкцией, содержащей ген флуоресцентного белка Fast Fluorescence Timer (FastFT), спектральные свойства которого подробно описаны ранее в тексте диссертации. Основой для создания такого репортера стала плазмида, кодирующая белок FastFT под контролем фагового промотора T5, узнаваемого клеточной РНК-полимеразой. На первой стадии клонирования мы

создали три сайта рестрикции в регуляторной области гена *FastFT,* что позволило в дальнейшем независимо менять регуляторные участки этого гена.

Следующей стадией клонирования стала замена регуляторных участков гена *FastFT* на регуляторные области гена *rimK.* Используя созданные нами сайты рестрикции, мы создали пять репортерных конструкций на основе гена *FastFT*:

1. Контрольная плазмида с неизмененной регуляторной областью
2. Конструкция Prom-UTR-RimK-FastFT – в некодирующую область гена *FastFT* клонированы промотор, 5'-НТО и кодирующая область гена *rimK* без стоп-кодона, то есть был создан гибридный белок на основе RimK и FastFT
3. Конструкция Prom-UTR-FastFT – в некодирующую область гена *FastFT* клонированы промотор и 5'-НТО гена *rimK*
4. Конструкция UTR-FastFT - в некодирующую область гена *FastFT* клонирована 5'-НТО гена *rimK*
5. Конструкция Prom(*rpoS*)-UTR(*rpoS*)-FastFT - в некодирующую область гена *FastFT* клонированы промотор и 5'-НТО гена *rpoS.*

Таким образом, конструкции 2,3 и 4 позволяют оценить активность и влияние каждого регуляторного элемента гена *rimK* на экспрессию кодирующей части гена за счет того, что под их контролем находится экспрессия гена флуоресцентного белка. Отдельно стоит остановиться на последнем репортере. Его особенностью является то, что регуляторная область для него была взята из гена *rpoS,* кодирующего σ^{38}-субъединицу РНК-полимеразы, который активен исключительно в стационарной фазе, что позволило использовать данный репортер, как контроль наступления стационарной фазы в популяции.

Полученными плазмидами был трансформирован исследуемый штамм. Штаммы с репортерными плазмидами высевали в среду LB и растили 48 часов, после чего разбавляли свежей средой и анализировали при помощи проточной цитофлуориметрии, регистрируя количество синей и красной форм белка в каждой отдельной клетке. Измерение уровня флуоресценции проводилось каждые 50 минут в течение 6 часов. Уровень и характер экспрессии гена *FastFT* во всех репортерных штаммах сравнивали с контрольным репортером.

Первое, что мы заметили – это то, что картина флуоресценции клеток с репортерной конструкцией №4 полностью соответствует клеткам с контрольной конструкцией под регуляцией промотора T5. Из этого можно сделать вывод о том, что 5'-НТО гена *rimK* либо никак, либо очень слабо влияет на экспрессию флуоресцентного белка. Следовательно, регуляция экспрессии *rimK* осуществляется не на стадии инициации трансляции.

На следующем этапе работы мы сосредоточились на изучении репортерных конструкций №2,3 и 5. При инкубации культуры в течение двух дней без смены питательной среды экспрессия *FastFT* останавливается, о чем свидетельствует то, что в клетке присутствует только зрелая форма белка. При разбавлении культуры свежей средой можно наблюдать появление в клетках всех репортеров новосинтезированного синего белка. Согласно полученным данным, ген *rimK* способен экспрессироваться не только в стационарной фазе, но и в лаг фазе, что объясняет наличие модификации в логарифмической фазе. В целом, результаты эксперимента показывают, что уровень синтеза белка FastFT под контролем промотора *rimK,* сохраняется примерно на одинаковом уровне на всех фаза роста, в отличие от репортерной конструкции под контролем

промотора *rpoS*, экспрессия которого полностью отсутствует в логарифмической фазе. Важно отметить, что конструкции №2 и №3, содержащие полный регуляторный участок гена *rimK* и отличающиеся наличием в конструкции №2 гибридного белка RimK и FastFT, практически не отличаются картиной флуоресценции, что означает отсутствие обратной связь между экспрессией гена и количеством белка в клетке. Результаты цитофлуориметрии приведены на рис. 17.

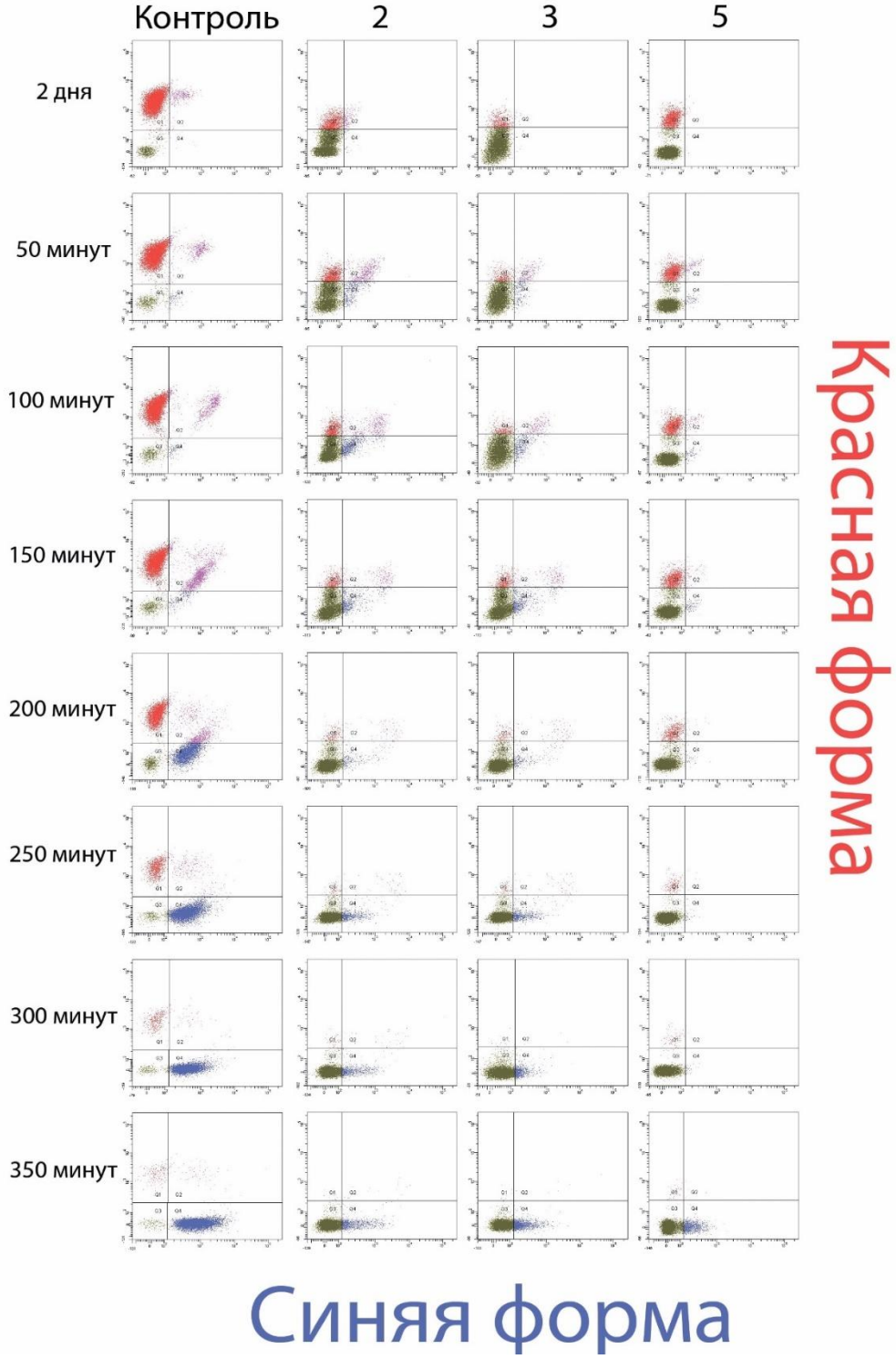


Рисунок 17. Результаты проточной цитофлуориметрии штамма с репортерной конструкцией №4, в сравнении с контрольным репортером

Уровень экспрессии гена *rimK* на разных стадиях роста бактериальной культуры был также проанализирован с помощью метода количественной ПЦР с обратной транскрипцией. В качестве контрольных генов, экспрессия которых чувствительна к фазе роста, использовались *glnS,* кодирующий глутамин тРНК-лигазу (контроль для логарифмической фазы), и *rmf*, кодирующий фактор гибернации рибосом (контроль для стационарной фазы). Нормировка уровня экспрессии между разными образцами проводилась с помощью пары олигонуклеотидов, комплементарных 16S рРНК. Результаты эксперимента приведены на рис. 18.

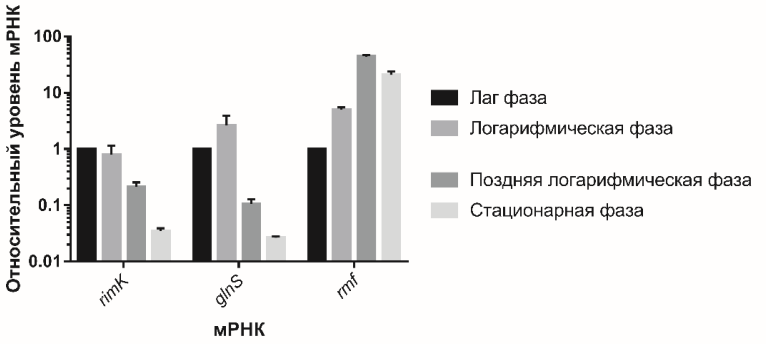


Рисунок 18. Результаты анализа экспрессии *rimK* методом количественного ПЦР с обратной транскрипцией

В отличие от *glnS*, экспрессия *rimK* не усиливалась при переходе в логарифмическую фазу, однако, сохранялась на достаточно высоком уровне. Более того, уровень мРНК *rimK* снижался с переходом к стационарной фазе, что ярко контрастирует с экспрессией *rmf,* которая заметно повышалась при завершении логарифмической и переходе к стационарной фазе.

Поиск причины неконститутивности модификации S6

Согласно полученным результатам, специфичность модификации к стационарной фазе роста не может объясняться экспрессией гена *rimK*, что позволяет предположить наличие регуляторного механизма, влияющего либо на активность RimK, либо на появление в стационарной фазе дополнительных факторов, позволяющих осуществить модификацию. Для проверки гипотезы о зависимости модификации от факторов, специфичных для стационарной фазы, мы трансформировали клетки дикого типа и *ΔrimK* плазмидой с конститутивной экспрессией *rimK.* В качестве контроля использовалась аналогичная плазмида с геном, кодирующим белок RimK с мутациями в АТФ-связывающем сайте, которые полностью ингибировали его активность (R211G, S212I, N213A). Полученные клетки выращивали до логарифмической фазы и анализировали статус модификации методом иммуноблоттинга. Результаты данного анализа приведены на рис. 19.

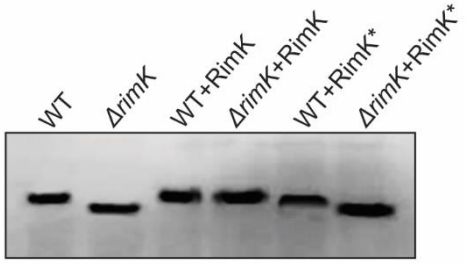


Рисунок 19. Иммуноблоттинг белка S6 в логарифмической фазе. Штамм подписан над дорожкой мембраны. Образцы WT и *ΔrimK* были собраны в стационарной фазе для контроля. RimK – фермент с аминокислотной последовательностью дикого типа, RimK*-фермент с инактивированным АТФ-связывающим сайтом.

Полученные данные свидетельствуют о том, что повышенный синтез RimK в логарифмической фазе приводит к полной модификации S6, в свою очередь, как и ожидалось, инактивированный фермент не модифицирует S6. Таким образом, при повышенной экспрессии *rimK*, олигоглутамилирование S6 может происходить и в логарифмической фазе роста.

Как известно, стационарная фаза характеризуется ингибированием транскрипции и трансляции. Логично предположить, что ингибирование биосинтеза белка может являться причиной появления модификации S6 в стационарной фазе, в то время как активно транслирующие рибосомы могут быть «защищены» от подобной модификации. Для проверки нашей гипотезы мы обрабатывали клетки дикого типа различными антибиотиками, вызывающими ингибирование трансляции и транскрипции, после чего из полученных образцов выделяли суммарный белок и анализировали статус модификации S6 методом иммуноблоттинга. Результаты анализа приведены на рис. 20

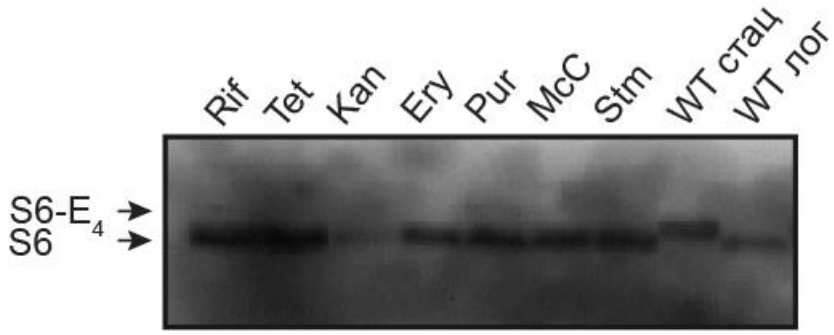


Рисунок 20. Иммуноблоттинг белка S6 в логарифмической фазе после обработки антибиотиками. В качестве контроля использовались клетки дикого типа и *ΔrimK* из стационарной фазы. Тип антибиотика подписан над дорожкой мембраны.

Ингибирование РНК-полимеразы рифампицином, индукция строгого ответа с помощью микроцина Ц, ингибирование трансляции с помощью тетрациклина, эритромицина или пуромицина не вызывало появления модификации S6. Схожим образом, индукция ошибок трансляции канамицином или стрептомицином не приводила к появлению модификации в логарифмической фазе роста. Таким образом, можно сделать вывод о том, что модификация белка S6 не связана с остановкой активного процесса трансляции или транскрипции при переходе к стационарной фазе роста.

Известно, что активность RimK из *Pseudomonas fluorescens* активируется малой сигнальной молекулой цикло-ди-ГМФ. Для проверки релевантности данного механизма регуляции активности RimK *E. coli* мы изучили статус модификации S6 в штаммах с инактивированными цикло-ди-ГМФ фосфодиэстеразами pdeR и pdeF, а также в штамме с инактивированной дигуанилат циклазой DgcM. Как видно из результатов анализа методом иммуноблоттинга (рис.21), в данных штаммах статус модификации S6 не изменяется.

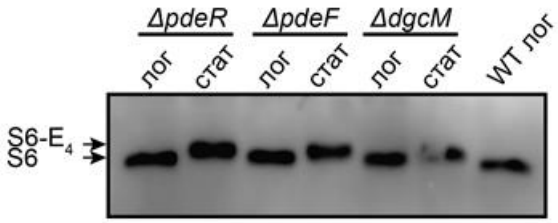


Рисунок 21. Иммуноблоттинг белка S6 в штаммах с инактивированными генами метаболизма цикло-ди-ГМФ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наши данные свидетельствуют о том, что посттрансляционное добавление остатков глутаминовой кислоты на С-конец S6 происходит в стационарной фазе роста. Исследование экспрессии *rimK* опровергло гипотезу о регуляции появления модификации за счет специфичности синтеза RimK к стационарной фазе роста. Ингибирование процесса трансляции и транскрипции действием антибиотиков также не приводило к появлению модификации в логарифмической фазе роста. Единственным стимулом, способным вызвать олигоглутамилирование S6, был переход культуры клеток в стационарную фазу. Более того, эксперимент по синтезу RimK с плазмидного вектора показал, что при повышенном уровне RimK полная модификация S6 может происходить и в логарифмической фазе роста независимо от факторов, ассоциированных со стационарной фазой. На основе наших данных, мы предполагаем, что появление модификации может быть вызвано не каким-то конкретным регуляторным механизмом, а кинетикой биосинтеза рибосом. В логарифмической фазе роста, ген *rpsF* активно экспрессируется вместе с другими генами, кодирующими компоненты трансляционного аппарата. Поскольку концентрация RimK во всех фазах роста чрезвычайно низка, он не способен эффективно модифицировать стремительно растущий пул рибосом. При переходе в стационарную фазу, биосинтез рибосом ингибируется, что позволяет RimK осуществить модификацию S6 в составе ранее собранных рибосом. Отсутствие какого-либо характерного фенотипа штамма *ΔrimK* может объясняться существованием дополнительных регуляторных путей, дублирующих функцию олигоглутамилирования S6 в стационарной фазе.

Намного более интересным, с точки зрения проявляемого фенотипа, оказалось изучение штамма I48S. Существенные изменения в транскриптоме клеток I48S приводят к нарушению регуляции ключевых процессов, необходимых для выживания и ответа на стресс, что проявляется во множественных аномалиях данного штамма.

Наши результаты свидетельствуют о том, что мутация I48S может ремоделировать клеточную транскрипцию за счет изменения силы взаимодействия РНКП с промоторами и изменения чувствительности РНКП к действию факторов строгого ответа, что позволяет сделать

предположение о наличии ранее неизвестной функции региона 1.1 в регуляции транскрипции и ответа на стресс. Характерные нарушения в экспрессии регулонов σ-факторов в клетках I48S может объясняться тем, что регион 1.1 может быть необходимым для поддержания баланса в конкуренции между основным и минорными σ-факторами в разных фазах роста. Полученные нами результаты, совместно с литературными данными, свидетельствуют о возможности существования дополнительной функции DksA, необходимой для регуляции транскрипции в логарифмической фазе, независимо от строго ответа.

Можно предположить, что мутация I48S нарушает функцию региона 1.1 как регулятора транскрипции генов с разной стабильностью промоторных комплексов (или даже синергичной регуляции совместно с DksA), однако, нельзя отрицать и факт того, что подобная мутация может в целом нарушать структуру σ^{70}-фактора или комплекса σ^{70} с минимальным ферментом РНКП. Безусловно, для лучшего понимания данной проблемы потребуются дальнейшие исследования.

ВЫВОДЫ

1. Фенотипические особенности штамма *ΔrimK* из Keio коллекции вызваны мутацией T143G в гене *rpoD.*
2. Мутация I48S σ^{70}-фактора *E. coli* приводит к ремоделированию регуляции транскрипции за счет изменения силы взаимодействия РНК-полимеразы с промоторами.
3. Мутация I48S σ^{70}-фактора *E. coli* приводит к изменения чувствительности РНКП к действию факторов строгого ответа.
4. Мутация I48S σ^{70}-фактора *E. coli* приводит к нарушению регуляции правильного распределения ресурсов при выходе из стационарной фазы и продлению лаг фазы.
5. Мутация I48S σ^{70}-фактора *E. coli* приводит к повышенной чувствительности бактериальных клеток к антибиотикам в лаг фазе.
6. Олигоглутамилирование рибосомного белка S6 вызывается наступлением стационарной фазы, при этом, модификация S6 может происходить независимо от наличия специфичных факторов стационарной фазы.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.02.03 по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия (химические науки):

1. **Pletnev P.**, Pupov D., Pshanichnaya L., Esyunina D., Petushkov I., Nesterchuk M., Osterman I., Rubtsova M., Mardanov A., Ravin N., Sergiev P., Kulbachinskiy A., Dontsova O. Rewiring of growth-dependent transcription regulation by a point mutation in region 1.1 of the housekeeping σ factor // Nucleic Acids Res. 2020. №. 48(19), С. 10802-10819. IF 11,502 (Web of Science).
2. **Pletnev P.**, Nesterchuk M., Rubtsova M., Serebryakova M., Dmitrieva K., Osterman I., Bogdanov A., Sergiev P. Oligoglutamylation of *E. coli* ribosomal protein S6 is under growth phase control // Biochimie. 2019. №. 167, С. 61-67. IF 3,413 (Web of Science).
3. **Pletnev P.**, Osterman I., Sergiev P., Bogdanov A., Dontsova O. Survival guide: *Escherichia coli* in the stationary phase // Acta Naturae (англоязычная версия). 2015 №4 (7), С. 22-33. IF 1,360 (Web of Science).

Тезисы докладов и материалы конференций:

1. Sergiev P., Dontsova O., Golovina A., Averina O., Permyakov O., Sergeeva O., Nesterchuk M., Rubtsova M., Deykin A., Chugunova A., Laptev I., **Pletnev P.**, Navalayeu T., Petryukov K., Shvetsova E., Loseva E., Bogdanov A., Polikanov Y., Osterman I. Modification of translation apparatus: in a search for a functional role – доклад (представлялся Сергиевым П. В.), Ribosomes and Translation, Россия, Петергоф, 13.05.2018–16.05.2018.
2. Petr Sergiev, Ilya Osterman, **Philipp Pletnev**, Sergey Evfratov, Anna Golovina, Mikhail Nesterchuk, Alexandra Pogorelskaya, Marina Serebryakova, Maria Rubsova, Ekaterina Andreianova, et al. Towards Understanding the Functional Role of Ribosomal Components Modification in *Escherichia coli* – доклад (представлялся Сергиевым П. В.), EMBO Conference: Ribosome Structure and Function, France, Strasbourg, 06.07.2016-10.07.2016.
3. **Pletnev P**., Nesterchuk M., Rubtsova M., Serebryakova M., Dmitrieva K., Osterman I., Bogdanov A., Sergiev P. Functional role of ribosomal protein S6 oligoglutamylation in *Escherichia coli* – постерная сессия, Ribosomes and Translation, Россия, Петергоф, 13.05.2018–16.05.2018.