



УДК 577.217.52

ОПЫТ ИЗУЧЕНИЯ МЕТОДАМИ СИСТЕМНОЙ БИОЛОГИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РОЛИ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ МОДИФИКАЦИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ РИБОСОМЫ

© 2011 г. П. В. Сергиев^{**}, И. А. Остерман^{*}, И. В. Прохорова^{*}, М. В. Нестерчук^{*},
О. В. Сергеева^{*}, А. Я. Головина^{*}, И. А. Дёмина^{**}, М. А. Галямина^{**},
М. В. Серебрякова^{**}, О. А. Донцова^{*}

^{*} Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского и химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Воробьевы горы, 1;

^{**} Научно-исследовательский институт физико-химической медицины Росздрава, Москва

Поступила в редакцию 06.07.2010 г. Принята к печати 16.08.2010 г.

В работе предложена разработанная нами методология изучения роли модификации бактериальной рибосомы в регуляции экспрессии генов. Модификация отдельных компонентов бактериальной рибосомы влияет на эффективность трансляции некоторых мРНК. Изменение белкового состава клетки, вызванное делецией генов, отвечающих за модификацию рибосомы, детектируется с помощью протеомного анализа. С помощью репортерных конструкций определяется стадия экспрессии генов, отвечающая за изменение количества того или иного белка. После определения тех мРНК, которые транслируются с разной эффективностью, в штамме, имеющем только немодифицированные рибосомы, и в штамме дикого типа мы определяем участок мРНК, отвечающий за наблюдаемые изменения. Предложенная методология также может быть использована для изучения других механизмов регуляции трансляции.

Ключевые слова: протеомика, трансляция, регуляция, экспрессия генов, *Escherichia coli*.

ВВЕДЕНИЕ

Функционирование живых систем основано на принципах построения организма согласно информации, закодированной в геноме. Кроме наследственной информации живые системы используют всю совокупность сведений, поступающих в различном виде из окружающей среды для адаптации экспрессии генов к внешним условиям существования организма. Согласно классической догме молекулярной биологии, за проявление свойств (фенотипа) организма отвечают белки, совокупность которых называется протеомом. Соотношение количества белков, закодированных в геноме, изменяется в зависимости от эффективности транскрипции – синтеза мРНК, и трансляции – синтеза белка. Для понимания функционирования живых систем необходимо знать все регуляторные механизмы, действующие на уровнях транскрипции и трансляции. Распространенная в настоящее время методика использования исключительно уровня транскрипции, как индикатора экспрессии генов, не учитывает влияние трансляции [1].

Биосинтез белка, или трансляция, осуществляется РНК-белковыми частицами – рибосомами. В ходе трансляции рибосома считывает мРНК при по-

мощи аминокислотированных тРНК. В состав рибосомы входят 16S рРНК, 23S рРНК и 5S рРНК, общей длиной более четырех с половиной тысяч нуклеотидов. Среди этих нуклеотидов есть 36 модифицированных [2]. Десять из них представляют собой псевдоуридины, а большинство остальных – нуклеотиды, метилированные по остаткам рибозы и гетероциклическим основаниям. За модификацию каждого нуклеотидного остатка, за редким исключением, ответствен отдельный высокоспецифичный фермент. Несмотря на то что модифицированные нуклеотиды изучаются в течение нескольких десятков лет, их функциональная роль до сих пор во многом остается загадкой. В последние годы значительный прогресс был достигнут в понимании функциональной роли модифицированных остатков ДНК, а также модифицированных аминокислотных остатков гистонов [3]. Этот прогресс заставляет по-новому взглянуть на возможную роль модифицированных остатков рибосомной РНК.

Традиционно, все рибосомы клеток одного вида считаются одинаковыми. Считается, что регуляция трансляции происходит за счет белковых факторов, связывающих мРНК, а также факторов инициации, элонгации и терминации. Тем не менее в научной литературе накапливаются сведения о том, что и рибосомы могут быть специализированы. Так, известно, что возбудители малярии меняют состав ри-

[#] Автор для связи (тел.: (495) 939-54-18; факс: (495) 939-31-81; эл. почта: petya@genebee.msu.su).



Рис. 1. Схема методологии изучения влияния модификации рРНК на экспрессию генов.

босом при смене хозяина с млекопитающего на комара и наоборот [4]. Специализация рибосом за счет изменения белкового состава документирована для дрожжей [5]. Также известны случаи регуляции трансляции при помощи модификации компонентов рибосомы. Наиболее изученным примером служит фосфорилирование рибосомного белка S6 эукариот [6].

Участие системы модификации рибосомной РНК бактерий в регуляции экспрессии генов может стать новым, не изученным ранее направлением биоорганической химии. Нам следует сразу различить два типа участия модифицированных нуклеотидов рРНК в регуляции экспрессии генов. Во-первых, модифицированные нуклеотиды могут быть необходимы для считывания некоторых мРНК, в то время как для считывания других мРНК оказываются не важными. При этом модификация рРНК происходит постоянно и степень модификации не меняется. В таком случае модификация данного нуклеотида необходима для экспрессии генов, но сама по себе не регулирует экспрессию. Во-вторых, может быть так, что степень модификации определенного нуклеотида рРНК меняется в зависимости от

того, что происходит с клеткой, и это изменение, в свою очередь, влияет на экспрессию генов. Тогда степень модификации рРНК регулирует экспрессию генов в строгом смысле слова. Для проверки первого случая достаточно показать, что инактивация гена модифицирующего фермента изменяет экспрессию генов. Для второго варианта необходимо также показать, что степень модификации соответствующего остатка меняется в зависимости от внешних условий.

Инактивация генов ферментов, модифицирующих рРНК, не приводит к летальности у бактерий *Escherichia coli*. Следовательно, модификация рРНК не может быть незаменимой для выполнения базовых функций рибосомы. Заранее неизвестно, на трансляцию каких мРНК может влиять модификация рРНК. Это значит, что необходим системный подход, позволяющий изучать эффективность экспрессии всей совокупности генов без модификации рРНК. Далее мы опишем используемую нами методологию изучения роли модификации рРНК в регуляции экспрессии генов (рис. 1). В основе методологии лежит определение тех белков, количество которых зависит от модификации рРНК. Далее результаты такого определения проверяются с помощью независимых методов. Затем следует поиск стадии экспрессии генов, на которую влияет модификация рРНК. Если обнаруженное влияние не прямое, а опосредованное белками-регуляторами, то гены этих белков-регуляторов, в свою очередь, становятся объектом изучения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Инактивация генов рРНК метилтрансфераз. Чтобы изучить, как модификация рРНК влияет на экспрессию генов, необходимо иметь штамм дикого типа и штамм, отличающийся от штамма дикого типа только тем, что ген определенного модифицирующего белка инактивирован. Сейчас наиболее удобным методом инактивации генов *E. coli* служит метод Даценко-Воннера [7]. На первом этапе этот метод требует ПЦР-амплификации гена устойчивости к канамицину или хлорамфениколу с использованием специфических праймеров. У этих праймеров 5'-концевые части содержат 38-нуклеотидные цепочки, соответствующие участкам генома, последовательность между которыми необходимо заменить на ген устойчивости к антибиотику. Полученный ПЦР-продукт вводят в клетки с помощью электропорации. Для успешной интеграции в геном в клетки заранее вводят плазмиду рKD46, несущую $\alpha\beta$ -гены системы рекомбинации фага λ . Экспрессия этих генов осуществляется с промотора *agaBAD*, индуцируемого арабинозой. После отбора колоний, способных расти на канамицине или хлорамфениколе, в зависимости от того, какой ген был выбран для амплификации, клетки выращивают на твердой питательной среде при 42°C. Репликация плазмиды

pKD46 не может поддерживаться клеткой при повышенной температуре [7].

Несколько колоний, приобретших устойчивость к антибиотику, выращиваются в жидкой среде и используются для выделения геномной ДНК и суммарной РНК. Замена гена рРНК-модифицирующего фермента на ген устойчивости к антибиотику проверяется с помощью ПЦР с геномной ДНК. В случае, если замена гена подтверждается, отсутствие выбранной модификации в рРНК нужно подтвердить с помощью обратной транскрипции. Обратная транскриптаза останавливается перед нуклеотидами m^1G , m^2G , m^6A и m^3U . Наличие других модификаций можно подтвердить с помощью предварительной обработки РНК перед обратной транскрипцией.

Для идентификации псевдоуридина РНК обрабатывают гидразином, разрушающим только остатки уридина и не затрагивающим остатки псевдоуридина [8]. Для идентификации остатков m^7G РНК обрабатывают боргидридом натрия, а затем анилином [9]. В этих условиях нуклеотидная цепь разрывается по остаткам m^7G . Остатки m^5C можно идентифицировать, обработав РНК гидросульфитом натрия [10]. При этом остатки цитидина дезаминируются, а остатки 5-метилцитидина нет. При проведении обратной транскрипции в присутствии ddGTP остановка будет происходить только на остатках m^5C , не подвергшихся дезаминированию.

Некоторые модифицированные основания невозможно определить методом обратной транскрипции. Для их идентификации используется комбинированный метод. Сначала исследуемая область РНК вырезается с помощью олигонуклеотид-направленного разрезания РНКазой H и очищается с помощью электрофореза в полиакриламидном геле [11]. Очищенный фрагмент длиной 30–70 нт расщепляется РНКазой T1, специфичной к остаткам гуанозина, и полученный гидролизат анализируется с помощью MALDI-масс-спектрометрии [12]. Метилирование дает увеличение массы фрагментов на 14 Да и может быть легко обнаружено.

На основе метода Даченко-Воннера [7] была создана коллекция штаммов, в каждом из которых инактивирован один ген [13]. Использование этой коллекции, называемой по месту получения “Keio”, сильно облегчает работу. Однако при использовании этой коллекции необходимо с осторожностью подходить к получаемым результатам. Используя штамм JW5513 “Keio”-коллекции, в котором инактивирован ген метилтрансферазы *rlmG*, мы обнаружили в этом штамме повышенную экспрессию флагелина (*fliC*). Как оказалось впоследствии, повышенная экспрессия гена *fliC* не была связана с инактивацией гена *rlmG*, а была обусловлена вставкой мобильного генетического элемента ISS на расстоянии в 1.5 тыс. п.о. от оперона *flhDC*, регулирующего экспрессию генов, связанных с подвижностью

бактериальной клетки. Для избежания подобных артефактов можно рекомендовать проводить Р1-транскрипцию ДНК из штамма, содержащего инактивированную копию целевого гена в родительский штамм. Если наблюдаемый признак сопереносится в родительский штамм вместе с инактивированной копией целевого гена, причинно-следственную связь между признаком и инактивацией гена можно считать подтвержденной.

В нашей работе по изучению роли метилирования нуклеотидных остатков рРНК мы используем еще несколько контролей. Основным из них служит штамм, содержащий инактивированный ген рРНК метилтрансферазы, трансформированный плазмидой, кодирующей эту метилтрансферазу [14]. В таком штамме экспериментально наблюдаемые отличия от штамма дикого типа, вызванные инактивацией гена метилтрансферазы, должны исчезнуть. Использование плазмиды, в которой в ген метилтрансферазы внесена мутация, препятствующая ферментативной активности белка, позволяет дополнительно выявить, что важно для проявления фенотипа [15]. Если мутантная плаزمиды будет комплементировать инактивацию гена, значит, для проявления фенотипа нужна не метилтрансферазная, а какая-то другая функция изучаемого белка.

Сравнительный протеомный анализ для изучения роли модифицированных оснований рРНК. Модификация нуклеотидных остатков рибосомной РНК, скорее всего, может влиять на эффективность трансляции определенных мРНК. Для обнаружения различий в эффективности трансляции мРНК наилучшим методом служит протеомный анализ. Для анализа необходимо вырастить в одинаковых условиях клетки штамма дикого типа и клетки штамма, в котором инактивирован ген определенного фермента, модифицирующего рРНК. Клетки растворяют в смеси детергентов, обрабатывают смесью РНКазы и ДНКазы и модифицируют остатки лизина белков флуоресцентными красителями, *N*-гидроксисукцинимидными эфирами Су3 и Су5 [16]. При этом белки одного штамма модифицируются Су3, имеющим зеленую флуоресценцию, а белки другого штамма модифицируются Су5, флуоресцирующим красным светом.

Модифицированные белки смешивают в равных пропорциях и разделяют с помощью двумерного электрофореза. В первом направлении белки разделяются по изоэлектрическим точкам с помощью изоэлектрофокусирования. Во втором направлении используют электрофорез в денатурирующих условиях в присутствии додецилсульфата натрия, разделяя белки по молекулярным массам. Теоретически, разрешающая способность каждого направления составляет около ста белковых зон, что, при использовании двух направлений последовательно, будет составлять 10 000 белковых зон. В реальности, подобное разрешение трудно достижимо в первую оче-

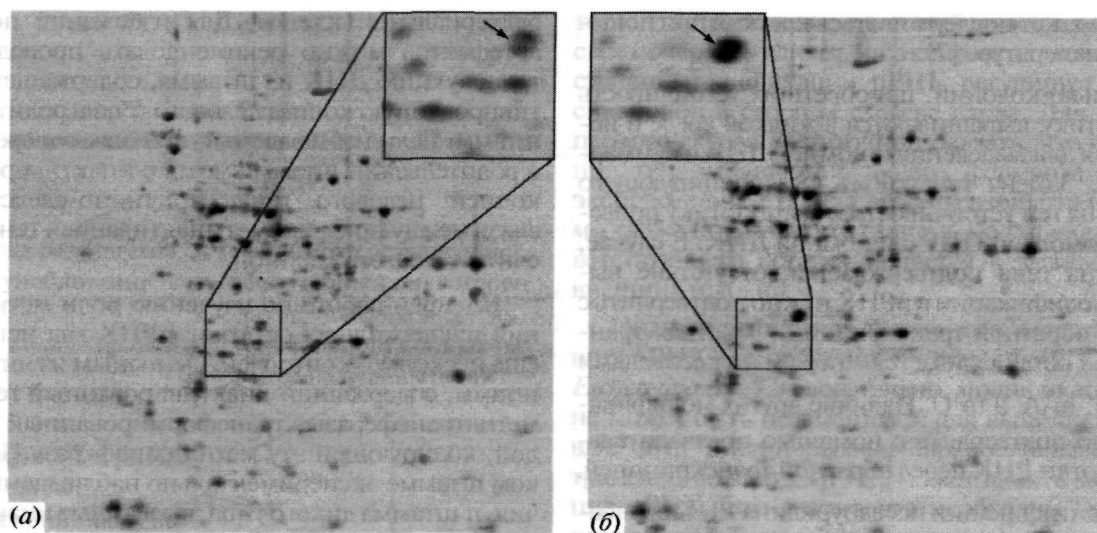


Рис. 2. Распределение флуоресценции белковых пятен после разделения протеома двумерным белковым гель-электрофорезом. Белки штамма дикого типа были предварительно окрашены красителем Су3, а белки штамма, в котором был инактивирован ген рРНК метилтрансферазы, окрашены красителем Су5. На рисунке представлены результаты сканирования двумерного геля с помощью сканера флуоресценции с использованием лазера, возбуждающего флуоресценцию зеленой части спектра, соответствующей флуоресценции Су3 (а) и красной части спектра, соответствующей флуоресценции Су5 (б). На вкладках представлены увеличенные фрагменты геля, показывающие пример белковых пятен, интенсивность которых зависит от метилирования рРНК.

редь из-за того, что большинство белков *E. coli* имеют достаточно близкие свойства. Кроме того, представленность белков в протеоме может варьировать в диапазоне нескольких порядков, что делает редкие белки трудно обнаруживаемыми.

Двумерный ПААГ, содержащий продукты разделения белков из двух штаммов, сканируют на сканере флуоресценции. Каждая белковая зона характеризуется определенным соотношением флуоресценции Су3 и Су5. Если интенсивности флуоресценции равны, значит, количества соответствующего белка в обоих штаммах равны. Превышение интенсивности красной (Су5) или зеленой (Су3) флуоресценции в 2 раза и более считается значимым и свидетельствует о том, что модификация рРНК положительно или отрицательно влияет на экспрессию соответствующего гена (рис. 2). Идентификация белковых зон проводится при помощи трипсинолиза в вырезанном фрагменте геля с последующим MALDI-масс-спектрометрическим анализом [17].

Подтверждение результатов протеомного анализа с помощью репортерных генетических конструкций и иммуноблоттинга. Причина изменения концентрации белка в мутантном штамме в сравнении со штаммом дикого типа и, обнаруженного с помощью протеомного анализа, может быть разной. Эта разница может быть обусловлена, например, небольшими случайными различиями в условиях выращивания. Для проверки того, что синтез определенного белка действительно происходит в разных штаммах с разной интенсивностью, нужно использовать дополнительные методы.

Проверку количества белка можно провести с помощью иммуноблоттинга, но только в том случае, если имеются антитела против этого белка. При изучении полного протеомного анализа клетки можно регистрировать изменения количеств практически любых белков, в том числе и тех, антитела на которые недоступны. Тем не менее в некоторых случаях дополнительный анализ с помощью иммуноблоттинга возможен (рис. 3).

Более универсальным может быть использование репортерных конструкций. Мы используем два типа репортерных конструкций. Первый тип (рACZ) создан на основе плазмиды рACYC184, в которой ген устойчивости к хлорамфениколу заменен на ген β -галактозидазы (*lacZ*) (рис. 4а) [12]. Перед геном *lacZ* встраиваем промотор, 5'-нетранслируемую область и кодирующую область гена, экспрессия которого меняется в мутантном штамме. Ко второму типу репортерных конструкций, используемых в нашей лаборатории, принадлежит плаزمида рAra2 (рис. 4б), созданная на основе рCDF-Duet1 [18], и ее производные. В этой плазмиде закодирован ген устойчивости к спектиномицину и стрептомицину и содержится участок начала репликации CloDF13, совместимый с большинством используемых в генной инженерии ориджинов репликации плазмид. В качестве репортерных генов используются гены люциферазы коралла (*Rluc*) и светлячка (*Fluc*) [19]. Обе люциферазы находятся под контролем идентичных *araBAD*-промоторов (*Para*). Люцифераза коралла (*Rluc*) служит внутренним контролем; ее промотор и 5'-нетранслируемая область не изменяются. Перед

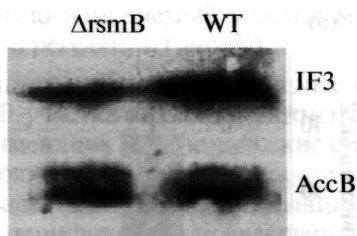


Рис. 3. Пример определения методом иммуноблоттинга соотношения количества определенного белка в штамме дикого типа и в штамме, лишенном гена рРНК-метилтрансферазы. В приведенном примере сравнивались количества фактора инициации трансляции IF3 в клетках дикого типа и в клетках, где был инактивирован ген рРНК метилтрансферазы *rsmB*. В качестве контроля использовался белок-носитель биотина AccB. Для детекции IF3 использовались антитела кролика к этому белку и вторичные антитела мыши к антителам кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена. Для детекции AccB использовали конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена.

геном люциферазы светлячка (*Fluc*) мы встроили регуляторные области генов, кодирующих белки, выявленные с помощью протеомного анализа. Изменение экспрессии репортерного гена *Fluc* в штамме, лишенном модификации рРНК, должно совпадать с изменением экспрессии гена, чья регуляторная область встроена перед геном *Fluc*. Если экспрессия репортерного гена в мутантном штамме меняется в

соответствии с полученными ранее с помощью анализа протеомы результатами, мы считаем такое изменение значимым (рис. 5а).

Поиск значимой для регуляции стадии экспрессии генов. Особенность протеомного анализа заключается в том, что с его помощью можно определить изменение количества белков клетки, но нельзя понять, на какой стадии экспрессии гена происходят эти изменения. Теоретически, количество определенного белка в клетке может меняться из-за изменения уровня транскрипции и трансляции, а также из-за изменения стабильности мРНК или белка. Мы изучаем влияние модификаций рРНК на экспрессию генов и полагаем, что такое влияние должно сказываться на трансляции. Тем не менее, возможно, что изменение эффективности трансляции некоторых мРНК приведет к изменению количества белков, способных, в свою очередь, влиять на экспрессию других генов. В результате, с помощью протеомного анализа мы будем выявлять как изменение экспрессии генов, вызванное различием в эффективности трансляции, так и те изменения, которые будут следствием работы регуляторных каскадов.

С помощью репортерных конструкций мы выясняем, с чем связано изменение количества того или иного белка в отсутствие модификации рРНК. Если разница в экспрессии гена обусловлена действием промотора (рис. 5б), то, по всей видимости, изменяется уровень транскрипции. Если изменение коли-

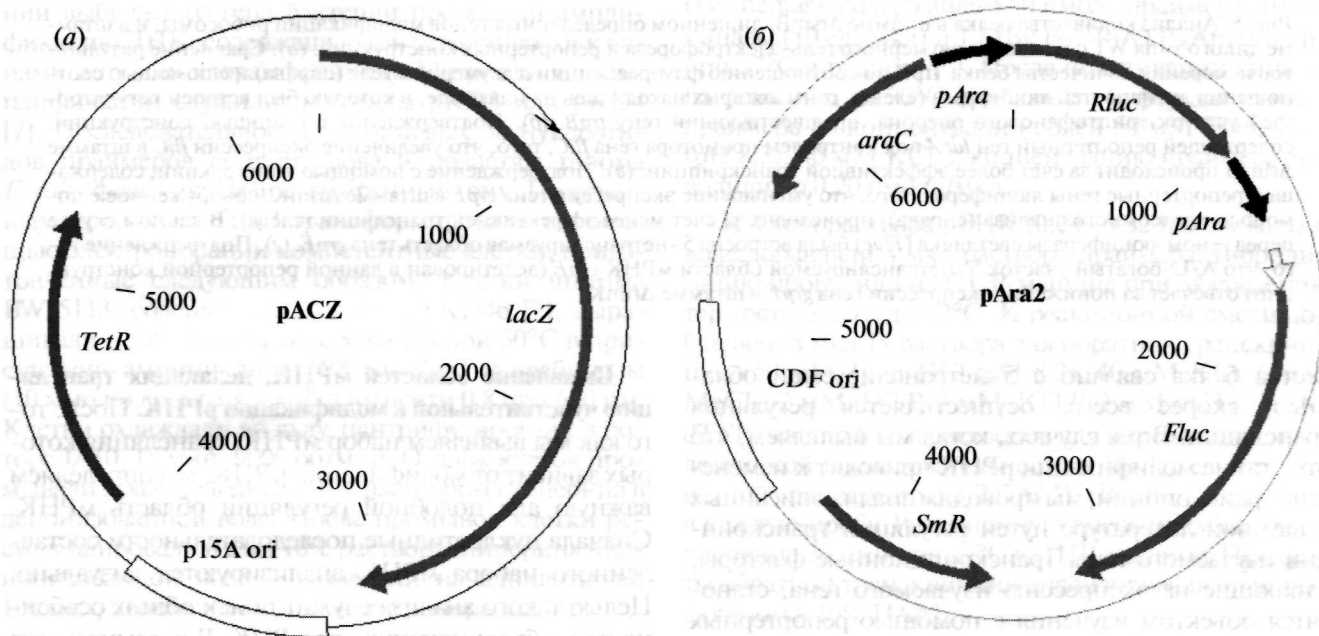


Рис. 4. Схемы используемых репортерных плазмид. (а) Карта плазмиды pACZ, созданной на основе pACYC184. На карте отмечены гены устойчивости к тетрациклину (*TetR*), β-галактозидазы (*lacZ*) и участок начала репликации p15A. (б) Карта плазмиды pAra2, созданной на основе pCDF-Duet1. На карте отмечены гены устойчивости к спектиномицину и стрептомицину (*SmR*), арабинозного репрессора (*araC*) и люцифераз светлячка (*Fluc*) и коралла (*Rluc*). Указано расположение промоторов (*pAra*), регулируемых арабинозным репрессором, и участок начала репликации CloDF13 (pCDF ori).

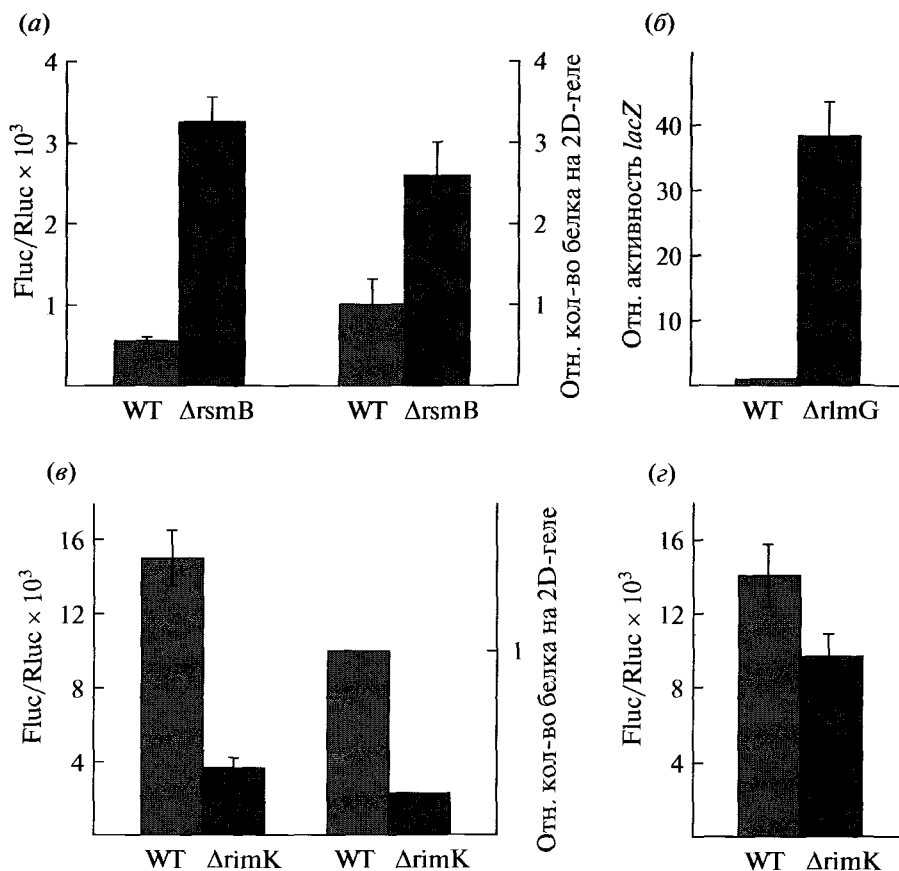


Рис. 5. Анализ количества белка в штамме $\Delta rsmB$, лишенном определенных генов модификации рибосомы, и в штамме дикого типа WT с помощью двумерного гель-электрофореза и репортерных конструкций. (а). Сравнение результатов измерения количества белка TrpB по соотношению флуоресценции в двумерном геле (справа) и с помощью соотношения активностей люцифераз (слева), гены которых находились на плазмиде, в которую был встроены регуляторный участок триптофанового оперона, предшествующий гену *trpB*. (б). Подтверждение с помощью конструкции, содержащей репортерный ген *lacZ* под контролем промотора гена *flhC*, того, что увеличение экспрессии *flhC* в штамме $\Delta rlmG$ происходит за счет более эффективной транскрипции. (в). Подтверждение с помощью конструкции, содержащей репортерные гены люцифераз, того, что уменьшение экспрессии гена *grpE* в штамме $\Delta rimK$, обнаруженное с помощью протеомного анализа (справа), происходит за счет менее эффективной трансляции (слева). В данном случае перед геном люциферазы светлячка (*Fluc*) была встроена 5'-нетранслируемая область гена *grpE*. (г). Подтверждение того, что A/U-богатый участок 5'-нетранслируемой области мРНК *grpE* (делетирован в данной репортерной конструкции) отвечает за понижение экспрессии гена *grpE* в штамме $\Delta rimK$.

чества белка связано с 5'-нетранслируемой областью, скорее всего, осуществляется регуляция трансляции. В тех случаях, когда мы выявляем, что отсутствие модификации рРНК приводит к изменению транскрипции, мы проводим анализ описанных в научной литературе путей регуляции транскрипции изучаемого гена. Транскрипционные факторы, влияющие на экспрессию изучаемого гена, становятся объектом изучения с помощью репортерных конструкций. Для генов этих транскрипционных факторов также проводится поиск той стадии экспрессии, на которую влияет модификация рРНК. "Продвигаясь" таким способом по регуляторным путям бактерии, мы выявляем мРНК, на трансляцию которых влияет модификация рРНК (рис. 5в).

Выявление областей мРНК, делающих трансляцию чувствительной к модификации рРНК. После того как мы выявляем набор мРНК, трансляция которых зависит от модификации рРНК, мы определяем важную для подобной регуляции область мРНК. Сначала нуклеотидные последовательности составленного набора мРНК анализируются визуально. Целью такого анализа служит поиск общих особенностей, объединяющих эти мРНК. В плаزمиде, где экспрессия репортерного гена зависит от 5'-нетранслируемой области изучаемых мРНК, мы вносим мутации, изменяющие эту область. Если в результате изменения 5'-нетранслируемой области исчезает зависимость экспрессии гена от модификации рРНК,

значит, именно изменяемый участок мРНК важен для подобной регуляции (рис. 5з).

Модифицированные нуклеотидные остатки рибосомного Р-участка оказались важны для экспрессии генов, имеющих неканонические стартовые кодоны. В свою очередь, модификация рибосомных белков оказалась важной для трансляции мРНК, содержащей специфические последовательности в 5'-нетранслируемой области.

Заключение. Нами разработана методология изучения влияния модификации рибосом на экспрессию генов. Использование протеомного анализа позволяет выявить множество генов, на экспрессию которых влияет та или иная модификация рибосомы. Это влияние может быть как прямым, так и опосредованным — через регуляторные каскады бактериальной клетки. Использование репортерных конструкций позволяет разделить эти два типа генов. Более того, с использованием репортерных конструкций, кодирующих мутантные варианты регуляторных областей мРНК, можно выявить участки мРНК, необходимые для регуляции экспрессии с помощью модификации рибосом. Разработанная методология может быть полезной для изучения регуляции трансляции бактериальной клетки и интеграции трансляционной регуляции в сигнальные пути клетки.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Инактивация генов *Escherichia coli*. Для инактивации выбранного гена бактерии проводили амплификацию ДНК, содержащую ген устойчивости к канамицину или хлорамфениколу. Матрицей для амплификации служили плазмиды рKD3 или рKD4 [7]. Последовательности 5'-концевых 38 нуклеотидов праймеров соответствовали областям генома *E. coli*, фланкирующим выбранный ген. Полученным продуктом ПЦР трансформировали с помощью электропорации компетентные клетки, приготовленные следующим образом. Клетки штамма BW25113, содержащие плазмиду рKD46 [7], выращивали в 500 мл богатой среды LB при 30°C в присутствии ампициллина (100 мкг/мл) и арабинозы (10 ммоль) до оптической плотности 0.8 при 600 нм. Клетки охлаждали во льду, центрифугировали в роторе JA10, 15 мин, 9000 об/мин. Осадок клеток промывали 3 раза холодным 10% раствором глицерина в деионизованной воде. После промывок клетки ресуспендировали в 2 мл 10% раствора глицерина в деионизованной воде и разделяли на аликвоты по 100 мкл, используемые для электропорации.

После электропорации к клеткам добавляли 500 мкл среды SOC (2% триптон, 0.5% дрожжевой экстракт, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂, 20 mM глюкоза) и инкубировали 2 ч при 37°C. Затем клетки высевали на агаризованную среду, содержащую канамицин (50 мкг/мл) или хло-

рамфеникол (34 мкг/мл), и выращивали сутки при 37°C. Полученные колонии пересеивали на агаризованной среде без антибиотика и инкубировали при 42°C ночь. Проверяли, что выросшие колонии сохраняли устойчивость к канамицину (или хлорамфениколу) и теряли устойчивость к ампициллину. Из клеток выделяли геномную ДНК и анализировали с помощью ПЦР, используя праймеры, комплементарные областям генома, фланкирующим выбранный для инактивации ген.

Выделение рРНК и ее обратная транскрипция. Растили клетки в 10 мл среды LB при 37°C в течение ночи. Клетки центрифугировали в роторе JA20, 15 мин, 10000 об/мин. Осадок клеток ресуспендировали в 500 мкл буфера для экстракции суммарной РНК (300 mM NaOAc, 0.5% (w/v) SDS). Выдерживали 15 мин при 0°C, добавляли 250 мкл насыщенного раствора NaCl. Выпавший осадок отделяли центрифугированием. К супернатанту добавляли 750 мкл фенола. После экстракции к водной фазе добавляли 2 мл спирта. РНК осаждали при -20°C 1 ч, центрифугировали 14000 об/мин 15 мин при 4°C, полученный осадок промывали 70% (v/v) этанолом, высушивали в вакууме, растворяли рРНК в воде и определяли поглощение A_{260} .

Для анализа метилирования рРНК проводили обратную транскрипцию. На 5'-конец олигодезоксирибонуклеотида, комплементарного определенной области рРНК, вводили радиоактивный остаток [³²P]фосфорной кислоты. Реакцию проводили в 20 мкл буфера для полинуклеотидкиназы (Fermentas), содержащего 50 пмоль праймера, 10 ед. киназы (10 ед./мкл) и 1 МБк [γ -³²P]АТФ (Amersham) при 37°C в течение 1 ч. После инактивации киназы нагреванием до 70°C прибавляли буфер для отжига праймера до концентрации солей 50 mM Трис-НСl (рН 8.3), 40 mM KCl, а концентрацию праймера доводили до 0.20 пмоль/мкл.

К 4 мкл раствора рРНК (0.24–0.32 пмоль/мкл) в воде добавляли 4 мкл раствора праймера. Гибридизацию проводили на ПЦР-машине при охлаждении термостата с 70 до 42°C. К реакционной смеси добавляли 8 мкл 1х раствора для обратной транскрипции (50 mM Трис-НСl (рН 8.3), 40 mM KCl, 6 mM MgCl₂, 2 mM dATP, 2 mM dGTP, 2 mM dCTP, 2 mM dTTP) или по 8 мкл растворов для определения нуклеотидной последовательности и по 1.2 ед. акт. обратной транскриптазы RT AMV (Roche, 25 ед./мкл) в каждую пробу. Реакционную смесь инкубировали в течение 30 мин при 42°C в ПЦР-машине. Продукты обратной транскрипции анализировали электрофорезом в 10% ПААГ.

Двумерный белковый электрофорез. Образцы клеток, находящихся в логарифмической фазе роста ($A_{600} \approx 0.6$), 3 раза промывали Трис-солевым буфером (ТБС) (50 mM Трис-НСl рН 7.6, 150 mM NaCl), растворяли в смеси неионных детергентов (CHAPS(30%)/NP40(10%)) и разрушали (заморажи-

вание в жидком азоте/размораживание в водяной бане, 37°C, 5 циклов), затем добавляли смесь нуклеаз. Лизированные клетки растворяли в буфере для изоэлектрофокусировки (ИЭФ) (30 мМ Трис-НСl pH 8.5, 7 М мочевины, 2 М тиомочевина, 4% CHAPS/NP40) и центрифугировали 5 мин при ускорении $\geq 8000 g$. Суммарную концентрацию белков в полученных образцах оценивали по методу Бредфорд [20]. Затем проводили мечение белков одного из образцов гидроксисукцинимидным эфиром флуоресцентного красителя Су3, а другого гидроксисукцинимидным эфиром флуоресцентного красителя Су5 (BioDye, Россия); на 50–100 мкг суммарного белка брали по 400 пмоль красителя, реакцию проводили в течение 30 мин во льду в темном месте. Останавливали окрашивание добавлением 10 нмоль лизина. Окрашенные образцы белков (примерно 2 мкг) разделяли в одномерном SDS-ПААГ-геле, поочередно детектировали флуоресценцию Су3 и Су5 при помощи сканера флуоресценции (Fuji).

Для ИЭФ смешивали равные количества сравниваемых белковых образцов, выровненные по суммарной величине флуоресценции, перед нанесением к смеси добавляли дитиотреит до 1% и амфолины 3–10 (BioRad) до 1%. ИЭФ проводили в камере для электрофореза Protean II xi 2-D Cell (BioRad) с использованием стеклянных капилляров длиной 180 мм, заполненных 4% ПААГ (8 М мочевины, 5% амфолины 3–10 (BioRad), 2.4% CHAPS/NP40). Для ИЭФ использовали следующую программу: линейный градиент до 600 В – 6 ч, затем 700 В – 10 ч и 900 В – 10 ч. Полученные после ИЭФ гели, извлекали из капилляров и выдерживали в течение 30 мин в буфере для уравнивания (6 М мочевины, 30% глицерин, 125 мМ Трис-НСl pH 6.8, 2% SDS). Затем разделяли белки по массам в стандартном 12% SDS-ПААГ-геле в камере для электрофореза Protean II xi 2-D Cell (BioRad), используя следующую программу (для двух гелей одновременно): 30 мА – 20 мин, 70 мА – 2 ч, 60 мА – 4 ч. Детекцию белков осуществляли при помощи сканера флуоресценции (Fuji). Расчет соотношений белков в образцах проводили по соотношению флуоресценции Су3 и Су5.

Идентификация белковых зон при помощи MALDI-масс-спектрометрического анализа. После электрофореза белки были зафиксированы в геле в растворе 10% уксусной кислоты и 20% этилового спирта. Затем проводилось окрашивание серебром с использованием тиосульфата натрия по стандартной методике [21]. Белковые зоны, которые необходимо было идентифицировать, вырезали из геля, очищали от красителя, высушивали и обрабатывали трипсином с дальнейшей экстракцией пептидов из геля [17]. Полученные образцы (0.2–1 мкл) смешивали на матрице с равным объемом раствора 2,5-дегидробензойной кислоты (Sigma) (20 мг/мл) в 20% ацетонитриле и 0.1% трифторуксусной кислоты и высушивали на воздухе. Масс-спектры были получены с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометра Ul-

traflex II (Bruker). Белки определяли по наборам масс протеолитических пептидов, при поиске использовали базу данных US National Center for Biotechnological Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), содержащую полные геномы исследуемых штаммов *E. coli*.

Детектирование белков при помощи Вестерн-блот-анализа. Белки разделяли в 10–12% SDS-ПААГ. Замачивали нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad) в буфере для переноса (25 мМ Трис, 250 мМ глицин, 0.1% SDS, 10% EtOH) 2 мин, промывали. Гель помещали на 3 листа фильтровальной бумаги Watman 3MM, смоченные в буфере для переноса, накрывали мембраной, 3 листами фильтровальной бумаги Watman 3MM, также смоченными в буфере для переноса. Перенос проводили при 100 мА 2 ч. Далее все процедуры проводили при комнатной температуре. Мембрану блокировали в 5% растворе BSA в TBST (20 мМ Трис, 126 мМ NaCl) (1 мл/см²) 1–12 ч. Для визуализации белков мембрану в течение 1 ч инкубировали с первичными антителами. Затем мембрану промывали TBST 3 раза по 15 мин, и инкубировали в течение 1 ч со вторичными антителами, специфичными к первичным антителам. Для проявления использовали ECLTM Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare). Детекцию проводили с помощью рентгеновской пленки.

Создание репортерных конструкций. Для создания репортерной конструкции рACZ в плазмиду рACYC184 [22] по участкам узнавания эндонуклеаз рестрикции NcoI и Bst1107I вставляли амплифицированный с геномной ДНК *E. coli* ген *lacZ*. В плазмиду рACZ регуляторные участки изучаемых генов встраивали по участкам узнавания эндонуклеаз рестрикции ScaI и NcoI.

Для создания репортерных конструкций, содержащих гены люциферазы коралла (*Rluc*) и светлячка (*Fluc*), была использована плаزمиды рCDF-Duet1 (Novagen), несущая гены устойчивости к антибиотикам стрептомицин и спектиномицин и ориджин репликации CloDF13. Гены люциферазы были амплифицированы методом ПЦР с плазмиды рЕТ-JD, производного плазмиды рYDL [23], и встроены в рCDF-Duet1. Фрагмент ДНК длиной 1230 п.о., кодирующий арабинозный промотор araBAD и ген репрессора araC, был получен методом ПЦР с плазмиды рKD46 [7] и встроен перед геном *Rluc* с помощью рестрикции и последующего лигирования. Аналогично, фрагмент ДНК длиной 350 п.о., кодирующий арабинозный промотор araBAD, был получен методом ПЦР с плазмиды рKD46 и встроен перед геном *Fluc*. Для изучения влияния определенной последовательности на экспрессию белков-репортеров интересующий фрагмент ДНК получали методом ПЦР с геномной ДНК и встраивали перед геном люциферазы светлячка *Rluc* или же использовали метод направленного мутагенеза (Stratagene). Для клонирования был использован штамм JM109, все этапы были подтверждены секвенированием.

Измерение активности ферментов Rluc, Fluc и LacZ, кодируемых репортерными плазмидами. Для измерения активности белков люцифераз коралла (Rluc) и светлячка (Fluc) соответствующие репортерные конструкции были трансформированы в штаммы дикого и мутантного типов. Культуры единичных колоний выращивали 12–18 ч при постоянном перемешивании при 37°C. После этого культуры были разведены до 0.05–0.1 ОЕ₆₀₀/мл свежей средой LB, содержащей 50 мкг/мл стрептомицина и 50 мкг/мл спектиномицина, инкубированы при постоянном перемешивании 2 ч и разведены вновь свежей средой LB, содержащей 50 мкг/мл стрептомицина, 50 мкг/мл спектиномицина и 1 ммоль арабинозы. После инкубирования в течение 2 ч клетки были отцентрифугированы 5 мин при 13000 об/мин, ресуспензированы в лизирующем буфере и заморожены [24]. Для измерения активности люцифераз по 10 мкл лизатов было проанализировано с помощью набора реактивов, предоставляемых фирмой “Promega”. Измерение люминесценции проводили в относительных единицах. Активность люциферазы коралла служила внутренним контролем и отношение активностей Fluc/Rluc было рассчитано. Для получения значений стандартного отклонения измерения были проведены для лизатов культур, полученных из трех различных колоний.

Измерение β-галактозидазной активности *in vivo*. Ночную культуру клеток, трансформированных плазмидой, кодирующей исследуемый ген или участок гена, сшитый с геном белка β-галактозидазы, выращивали в присутствии антибиотика тетрациклина, разбавляли в 100 раз средой LB с тетрациклином и инкубировали при умеренном перемешивании при 37°C до значений A₆₀₀, равных 0.3–0.8. К 0.8 мл буфера Z (16.1 г/л Na₂HPO₄ · 7H₂O, 5.5 г/л NaH₂PO₄ · H₂O, 0.75 г/л KCl, 0.246 г/л MgSO₄ · 7H₂O; (pH 7.0)) добавляли 2 капли хлороформа, 1 каплю 0.1% раствора SDS и 0.2 мл клеток и перемешивали на Vortex 10 с. К полученной смеси добавляли 0.2 мл раствора субстрата *o*-нитрофенил-β-D-галактопиранозиды (Sigma) (4 мг/мл в воде) и быстро встряхивали [25]. С этого момента засекали время начала реакции и, при появлении желтой окраски, останавливали реакцию добавлением 0.5 мл 1 М Na₂CO₃. Клетки осаждали центрифугированием (8 мин; 5000 об/мин) и измеряли оптическое поглощение супернатанта при длине волны 420 нм. Активность β-галактозидазы вычисляли по формуле: $[A_{420}1000]/[t \cdot v \cdot A_{600}]$, где *t* – время (в мин); *v* – объем добавленной среды с клетками (в мл).

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была поддержана грантами РФФИ № 10-04-01345-а, 09-04-12064-офи_м, грантом Президента России МД-1339.2009.4, ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России”

НК-29П П800, грантом Human Frontiers Science Program RGY0088/2008.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Maier T., Güell M., Serrano L. // FEBS Lett. 2009. V. 583. P. 3966–3973.
2. Sergiev P.V., Bogdanov A.A., Dontsova O.A. // Nucleic Acids Res. 2007. V. 35. P. 2295–2301.
3. Berger S.L. // Nature. 2007. V. 447. P. 407–412.
4. Li J., McConkey G.A., Rogers M.J., Waters A.P., McCuichan T.R. // Exp. Parasitol. 1994. V. 78. P. 437–441.
5. Komili S., Farny N.G., Roth F.P., Silver P.A. // Cell. 2001. V. 31. P. 557–571.
6. Meyuhos O. // Int. Rev. Cell. Mol. Biol. 2008. V. 268. P. 1–37.
7. Datsenko K.A., Wanner B.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 7. P. 6640–6645.
8. Bakin A., Ofengand J. // Biochemistry. 1993. V. 32. P. 9754–9762.
9. Zueva V.S., Mankin A.S., Bogdanov A.A., Barantova L.A. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 146. P. 679–687.
10. Motorin Y., Lyko F., Helm M. // Nucleic Acids Res. 2010. V. 38. P. 1415–1430.
11. Sergiev P., Dokudovskaya S., Romanova E., Topin A., Bogdanov A., Brimacombe R., Dontsova O. // Nucleic Acids Res. 1998. V. 26. P. 2519–2525.
12. Sergiev P.V., Serebryakova M.V., Bogdanov A.A., Dontsova O.A. // J. Mol. Biol. 2008. V. 375. P. 291–300.
13. Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K.A., Tomita M., Wanner B.L., Mori H. // Mol. Systems Biol. 2006. V. 2. P. 2006.0008.
14. Kitagawa M., Ara T., Arifuzzaman M., Ioka-Nakamichi T., Inamoto E., Toyonaga H., Mori H. // DNA Res. 2005. V. 12. P. 291–299.
15. Gutgsell N.S., Deutscher M.P., Ofengand J. // RNA. 2005. V. 11. P. 1141–1152.
16. Golovina A.Y., Sergiev P.V., Golovin A.V., Serebryakova M.V., Demina I., Govorun V.M., Dontsova O.A. // RNA. 2009. V. 15. P. 1134–1141.
17. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. // Anal. Chem. 1996. V. 68. P. 850–858.
18. Kim J.S., Raines R.T. // Protein Science. 1993. V. 2. P. 348–356.
19. Grentzmann G., Ingram J.A., Kelly P.J., Gesteland R.F., Atkins J.F. // RNA. 1998. V. 4. P. 479–486.
20. Bradford J.K. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.
21. Blum H., Beier H., Gross H.J. // Electrophoresis. 1987. V. 8. P. 93–99.
22. Rose R.E. // Nucleic Acids Res. 1988. V. 16. P. 355.
23. Harger J.W., Dinman J.D. // RNA. 2003. V. 9. P. 1019–1024.
24. Kramer E.B., Farabaugh P.J. // RNA. 2007. V. 13. P. 87–96.
25. Cupples C.G., Miller J.H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 5345–5349.

Systems Biology Approach to the Functional Role of Enzymatic Modification of Bacterial Ribosome

P. V. Sergiev^{**}, I. A. Osterman^{*}, I. V. Prokhorova^{*}, M. V. Nesterchuk^{*}, O. V. Sergeeva^{*},
A. Ya. Golovina^{*}, I. A. Demina^{**}, M. A. Galyamina^{**}, M. V. Serebryakova^{**}, and O. A. Dontsova^{*}

[#]Phone: +7 (495) 939-54-18; fax: +7 (495) 939-31-81; e-mail: petya@genebee.msu.su

^{*}Belozersky Institute for Physico-Chemical Biology and Department of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University, Vorob'evy gory, 1, Moscow, 119992, Russia

^{**}Institute for Physico-Chemical Medicine of Health and Social Development Ministry, Moscow

In this work we describe methodology for studying the role of bacterial ribosome modification in the regulation of gene expression. Ribosomal components modification influences translation efficiencies of certain mRNAs. Proteome analysis allows us to identify cellular protein composition change caused by ribosome modification gene knockout. Particular stage of gene expression responsible for certain protein concentration change could be found using reporter constructs. After identification of mRNA species, whose translation is influenced by ribosome modification we can determine exact mRNA region responsible for the observed changes. The developed methodology can be applied for studying other translational control mechanisms.

Key words: proteomics, translation, regulation, gene expression, Escherichia coli.