

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»



Казанский
федеральный
УНИВЕРСИТЕТ

ИНСТИТУТ ФИЗИКИ
Кафедра медицинской физики

Усачев Константин Сергеевич

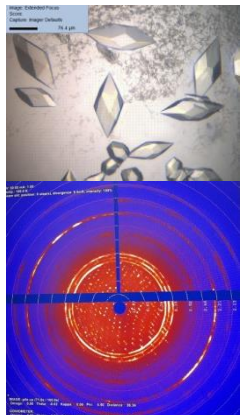
**Молекулярные механизмы действия факторов регуляции трансляции
HPF и EF-P из *Staphylococcus aureus* и антимикробных пептидов
протегринов по данным спектроскопии ядерного магнитного
резонанса, рентгеноструктурного анализа и криоэлектронной
микроскопии**

Специальность 03.01.02 – Биофизика

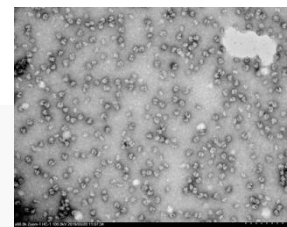
Диссертация на соискание ученой степени
доктора физико-математических наук

Казань – 2021

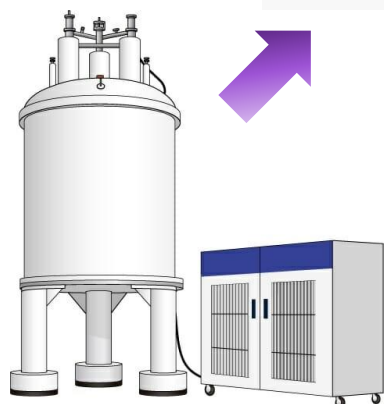
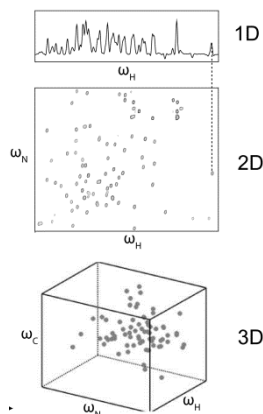
Рентгеноструктурный анализ



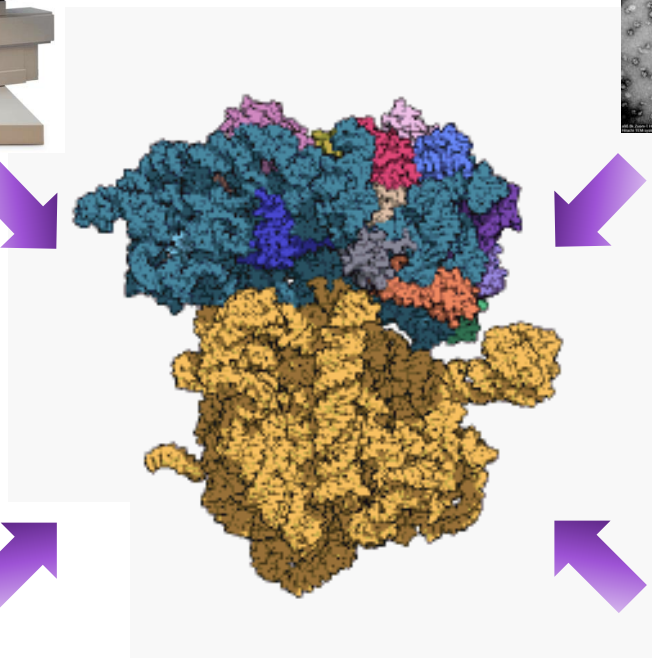
Криогенная просвечивающая электронная микроскопия (крио-ЭМ)



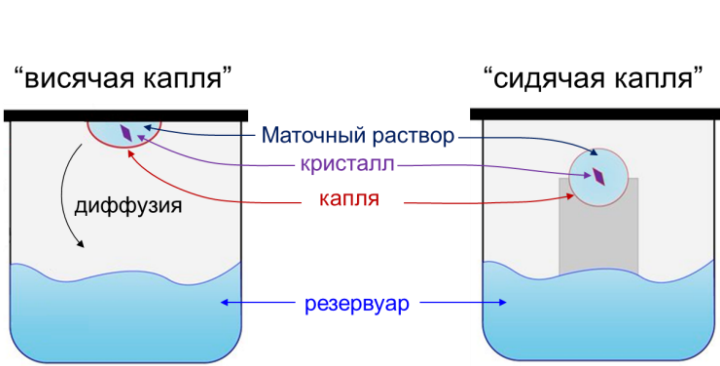
Спектроскопия ЯМР



Биоинформатика

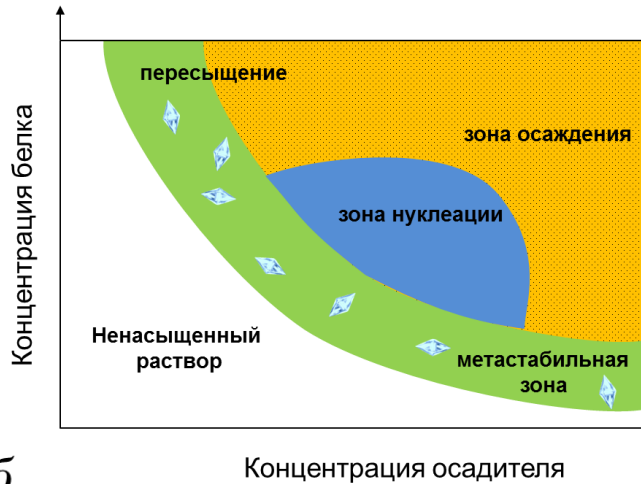


Биомолекулярная кристаллография



Методы кристаллизации белков

a



б

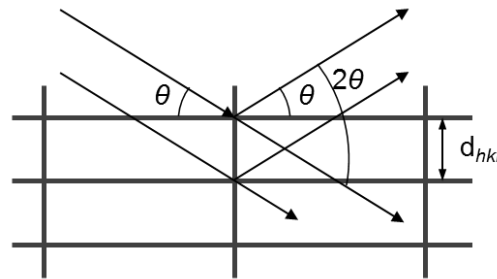
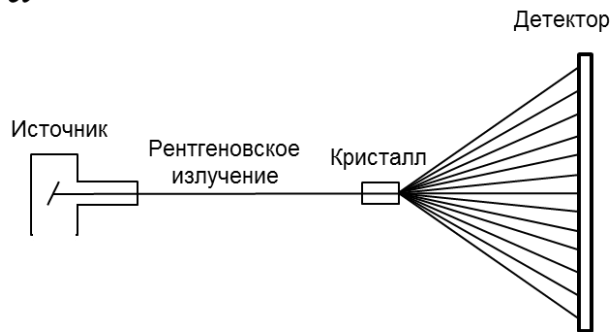
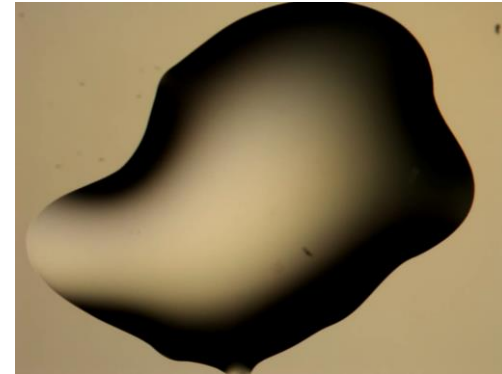
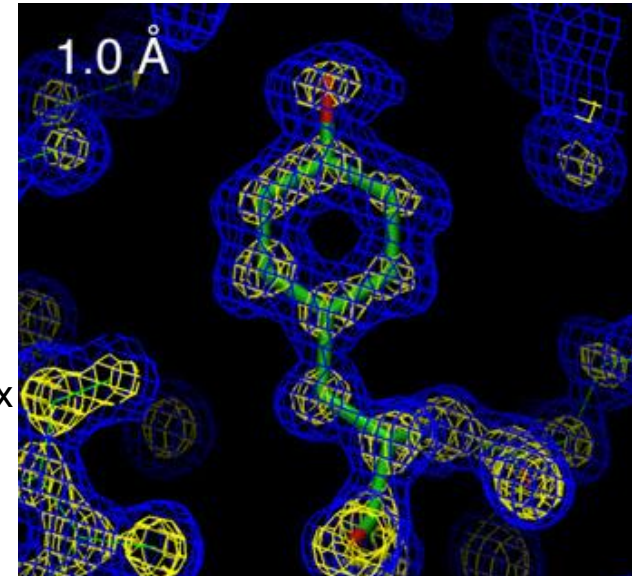


Схема устройства дифрактометра (а) и представление дифракции рассеянных рентгеновских лучей как отражение лучей от параллельных плоскостей (б).



Электронная плотность:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} |F_{hkl}| e^{i\varphi_{hkl}} e^{-i2\pi(hx+ky+lz)}$$

Биомолекулярная спектроскопия ЯМР

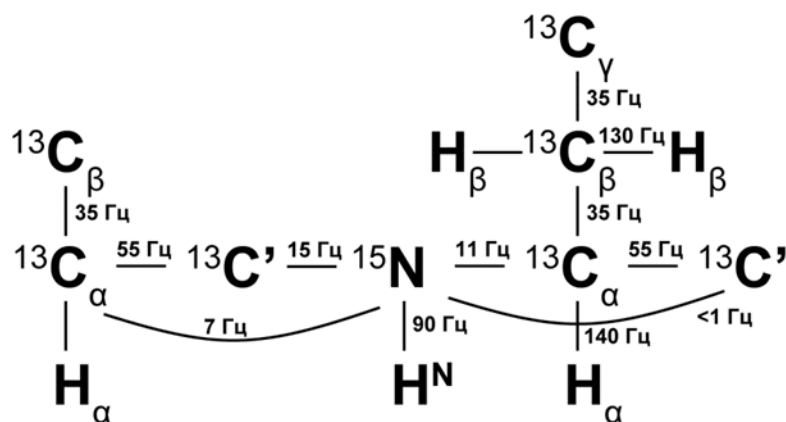
$$\left(\frac{S}{N}\right)_t \propto \frac{N_{\text{спинов}}}{V} \gamma_{\text{возб}} \gamma_{\text{рег}}^{3/2} B_0^{3/2} n_{\text{сканов}}^{1/2} \frac{1}{\sqrt{R_o(T_y T_o) + R_k(T_y T_k)}} t$$

где T это температура предусилителя (y), образца (o) и радиочастотной катушки (k), соответственно;

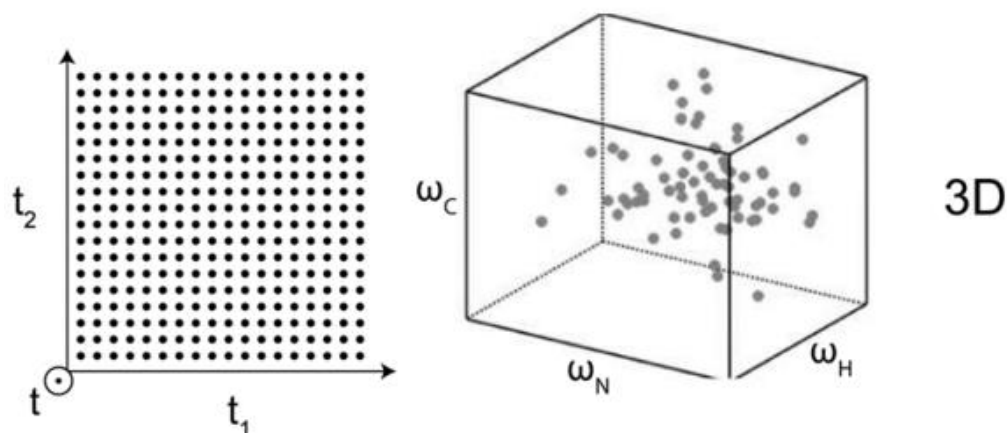
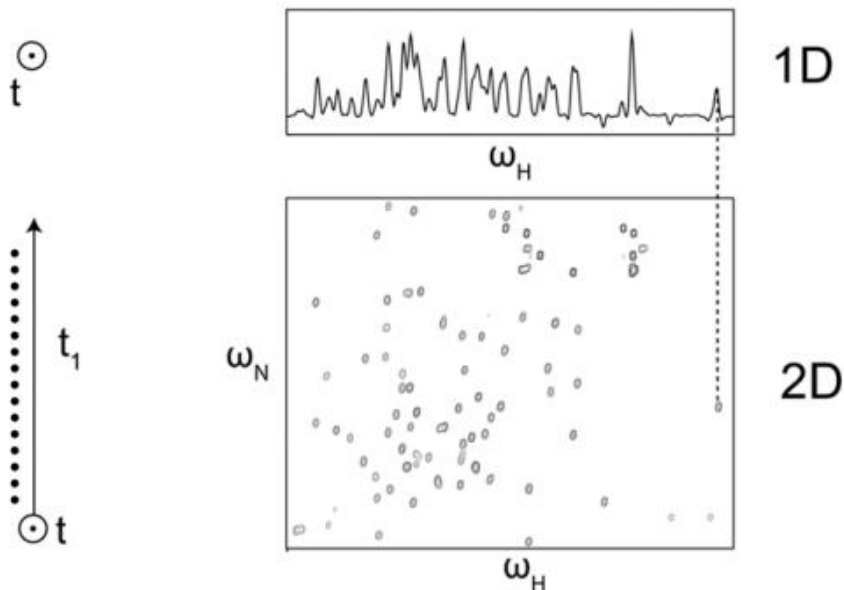
R_k - сопротивление катушки,

R_o - сопротивление образца, связанное с его проводимостью.

$\gamma_{\text{возб}}$ и $\gamma_{\text{рег}}$ - гиромагнитные отношения возбужденных и регистрируемых спинов соответственно, а $N_{\text{спинов}} / V$ - количество спинов в единице объема.

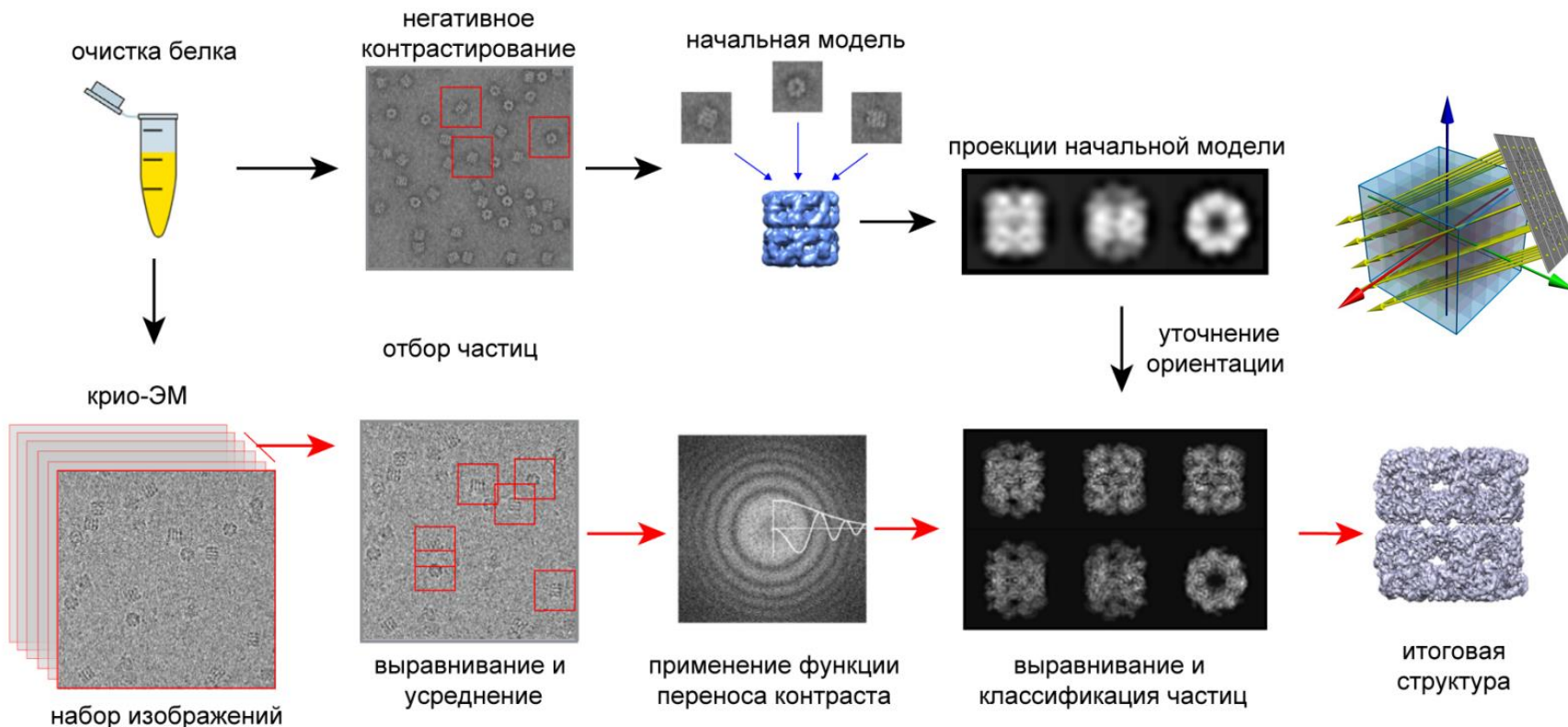
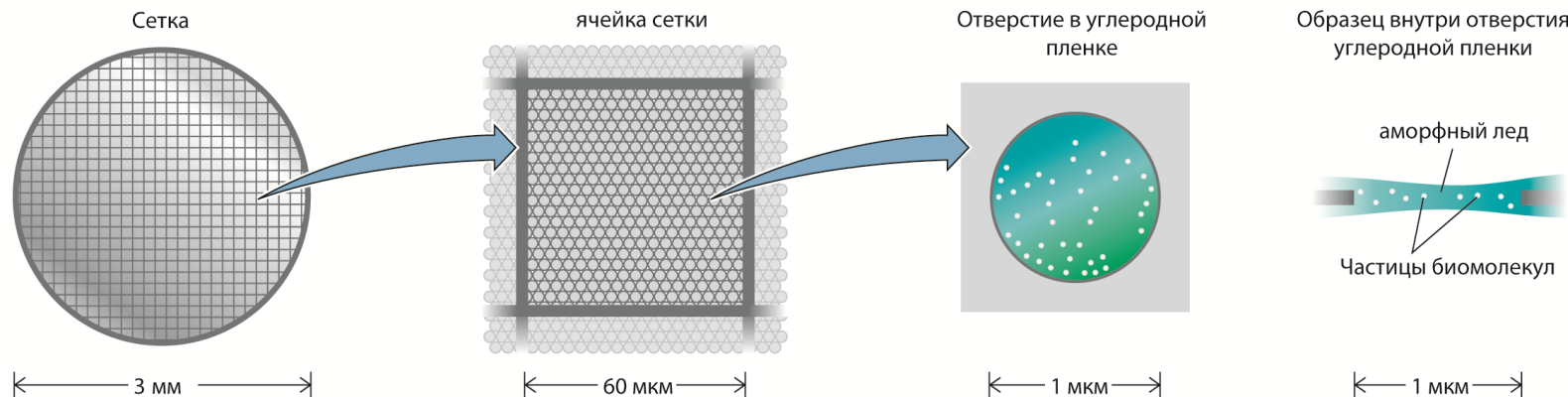


Значения констант спин-спинового взаимодействия между атомами основной и боковой цепи белка



Схематическое представление одномерного, двумерного и трехмерного спектров ЯМР белка

Криогенная просвечивающая электронная микроскопия





Contents lists available at ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meegid



Казанский
федеральный
УНИВЕРСИТЕТ

Research paper

Molecular epidemiology and antibiotic resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* circulating in the Russian Federation



Vladimir Gostev^a, Alexander Kruglov^b, Olga Kalinogorskaya^a, Olga Dmitrenko^c, Olga Khokhlova^d, Tatsuo Yamamoto^{e,f}, Yuri Lobzin^{a,g}, Irina Ryabchenko^b, Sergey Sidorenko^{a,g,*}

^a Scientific Research Institute of Children's Infections, Saint Petersburg, Russia

^b National Agency for Clinical Pharmacology and Pharmacy, Moscow, Russia

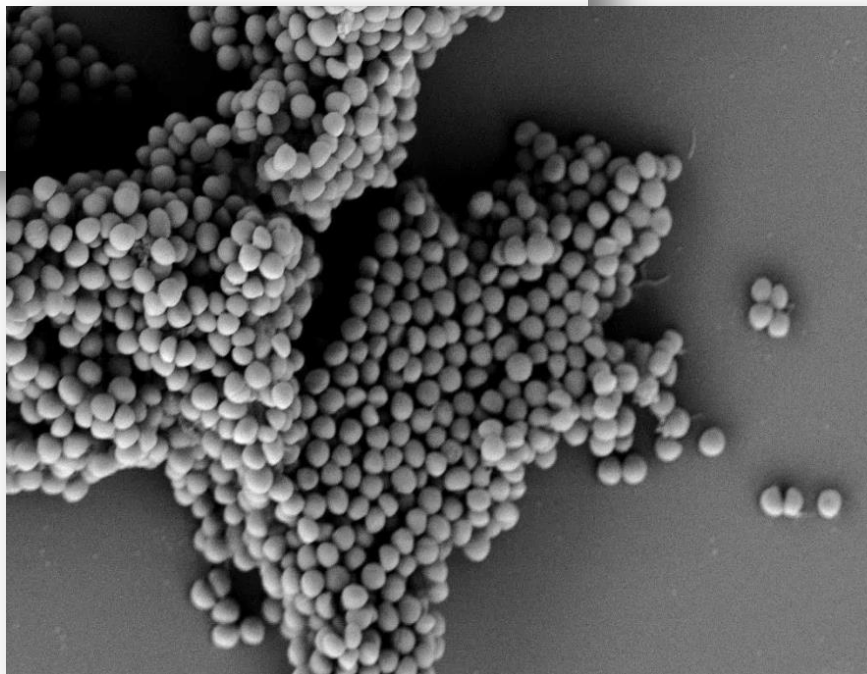
^c N. F. Gamaleya Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

^d State Medical University named after Professor V.F. Vajno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russia

^e Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata, Japan

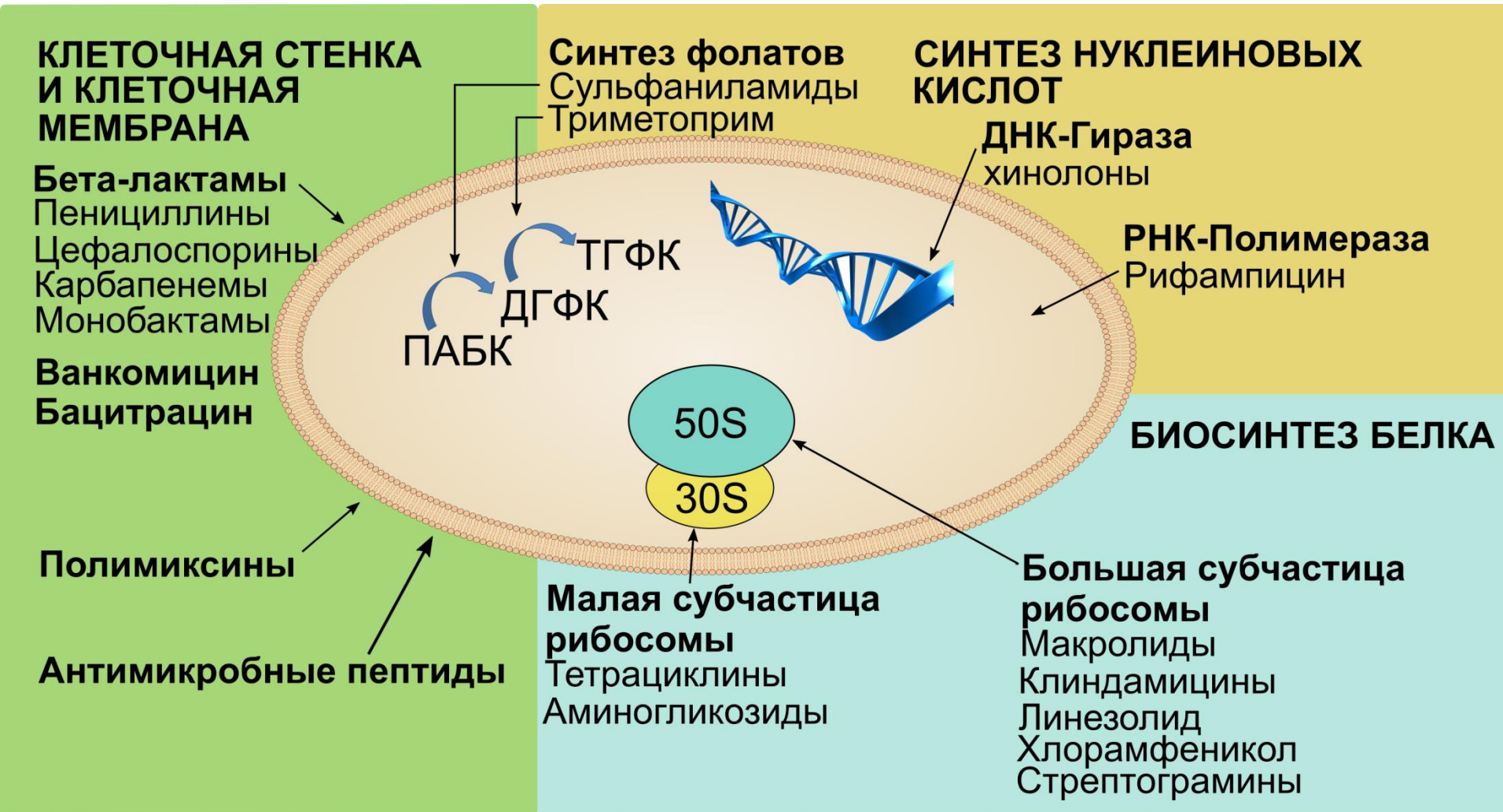
^f International Medical Education and Research Centre, Niigata, Japan

^g North-western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia



Изображения клеток *S. aureus*, полученных при помощи сканирующей электронной микроскопии 6

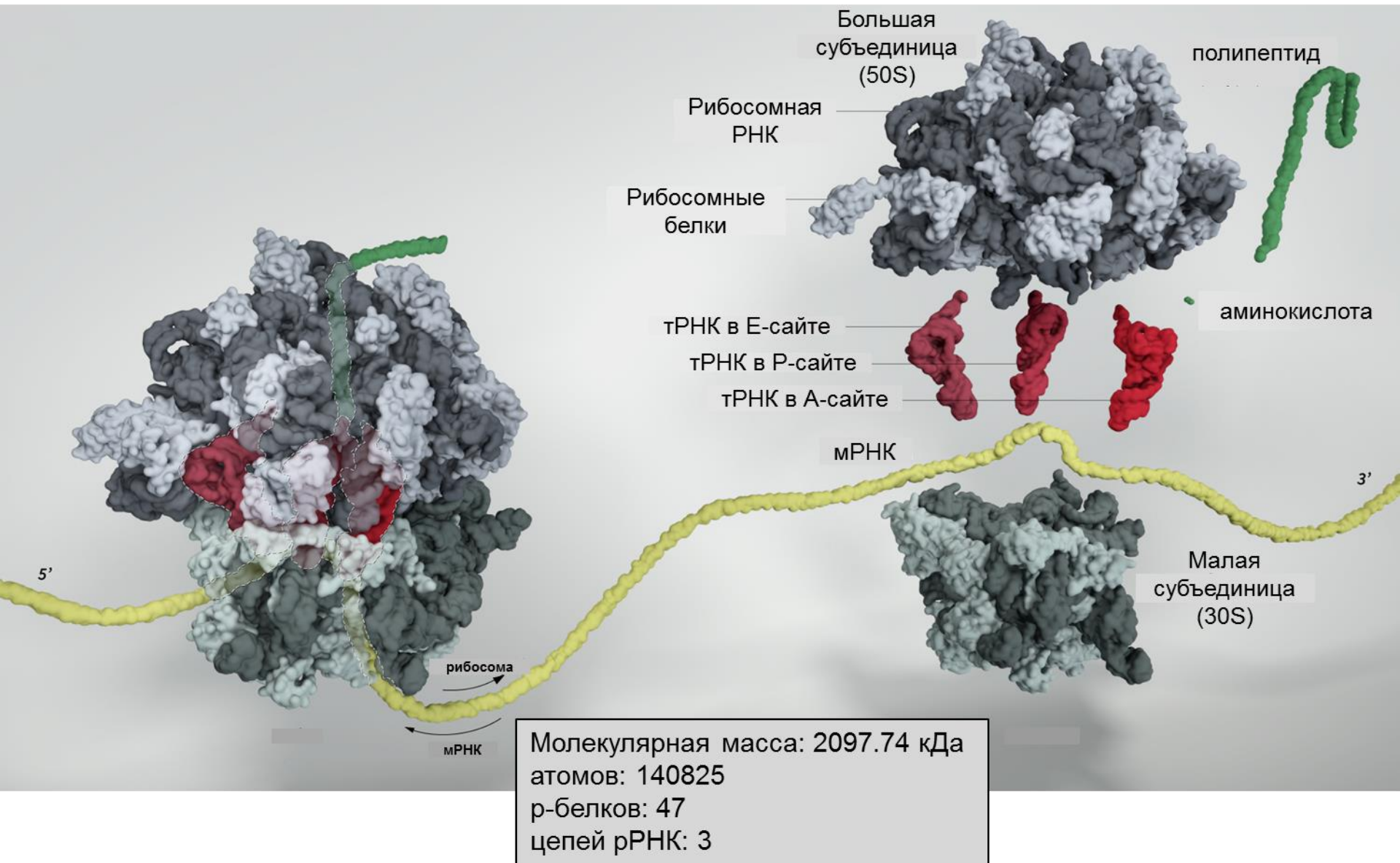
Механизмы устойчивости к антибиотикам у бактерий



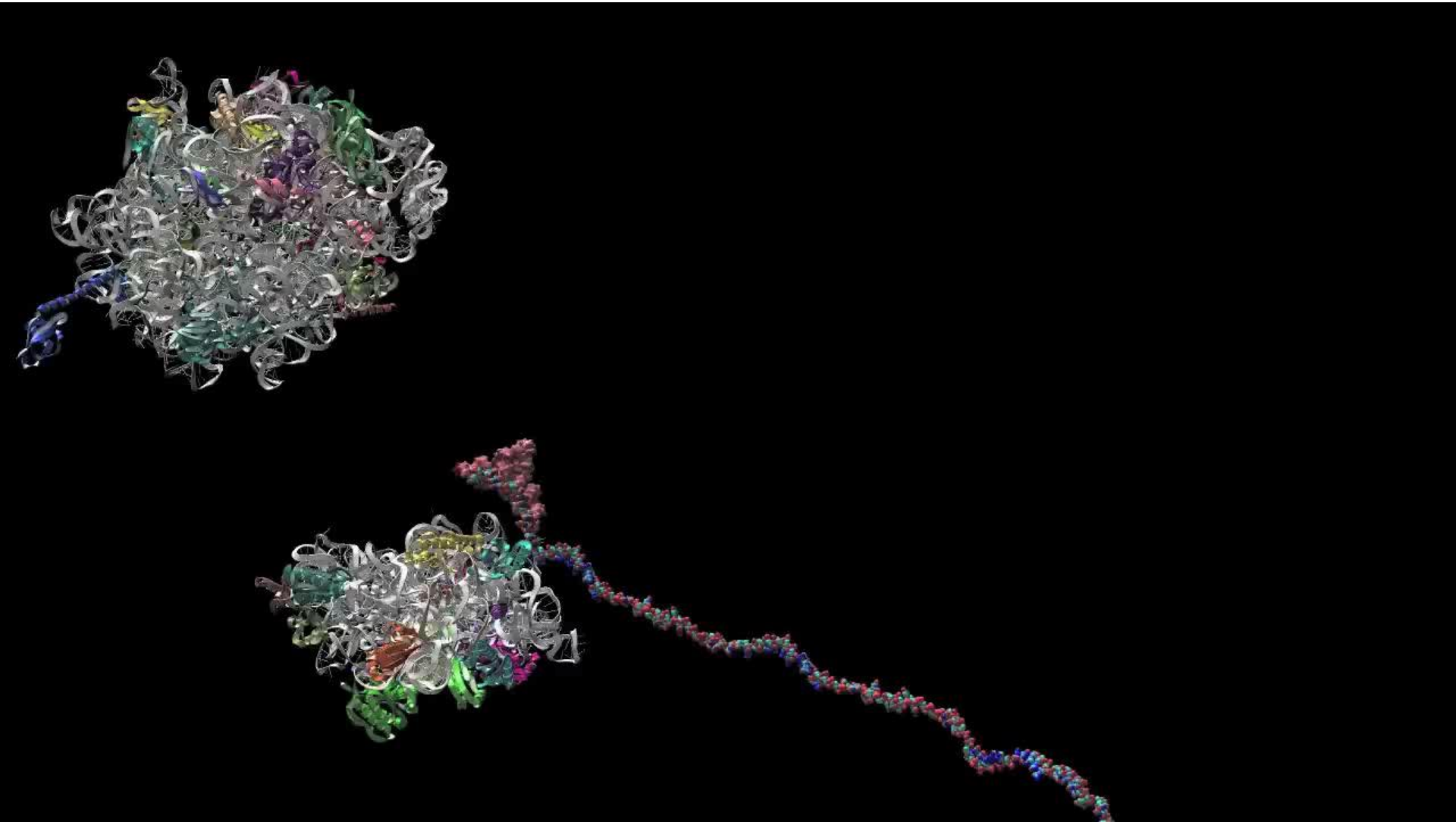
ПАБК - пара-аминобензойная кислота

ДГФК - дигидрофолиевая кислота

ТГФК - тетрагидрофолиевая кислота



Рибосома и биосинтез белка



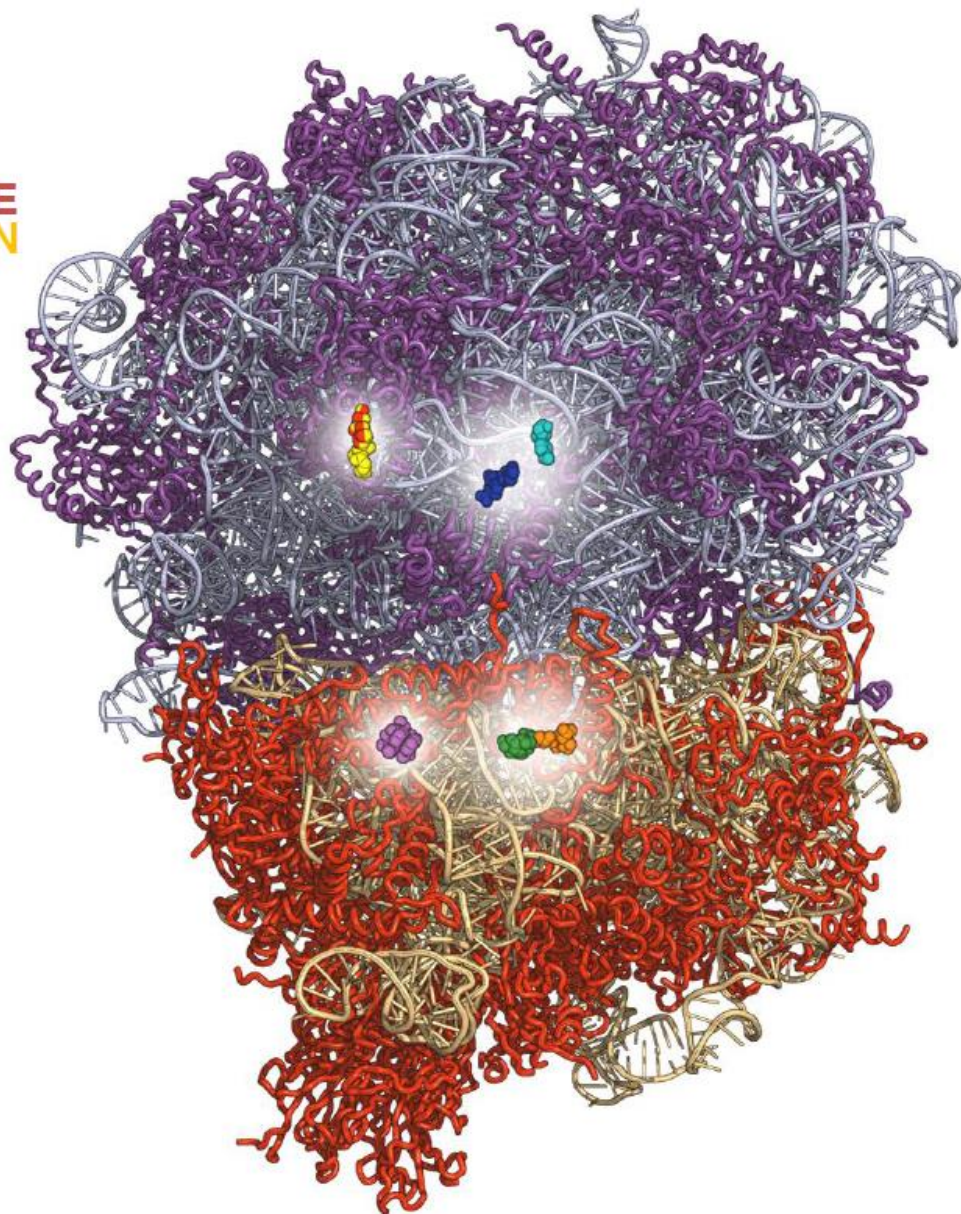
Сайты связывания антибиотиков

Е-сайт

CYCLOHEXIMIDE
LACTIMIDOMYCIN

ПТЦ

ANISOMYCIN
BLASTICIDIN S



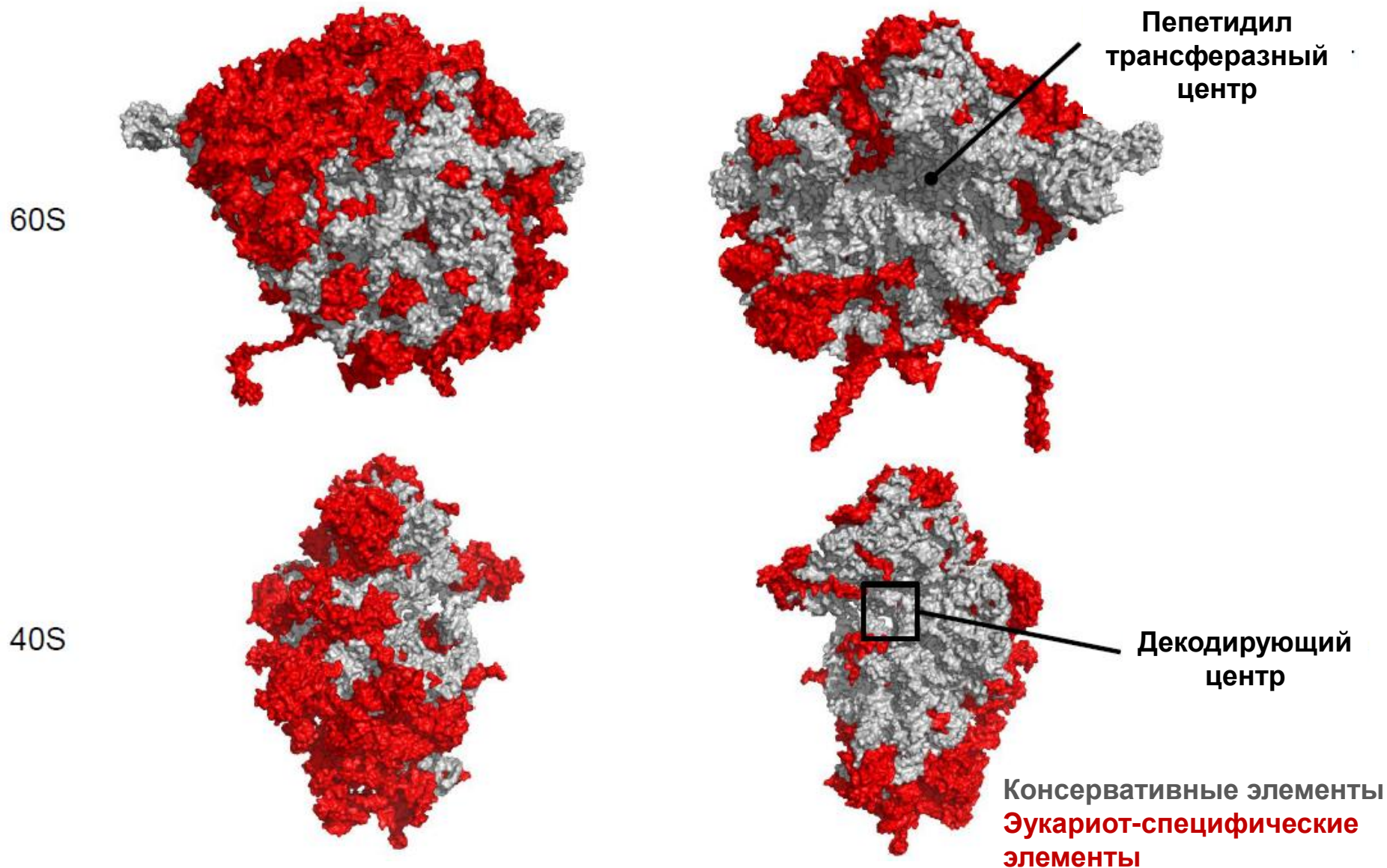
Декодирующий центр

GENETICIN (G418)
HYGROMYCIN B

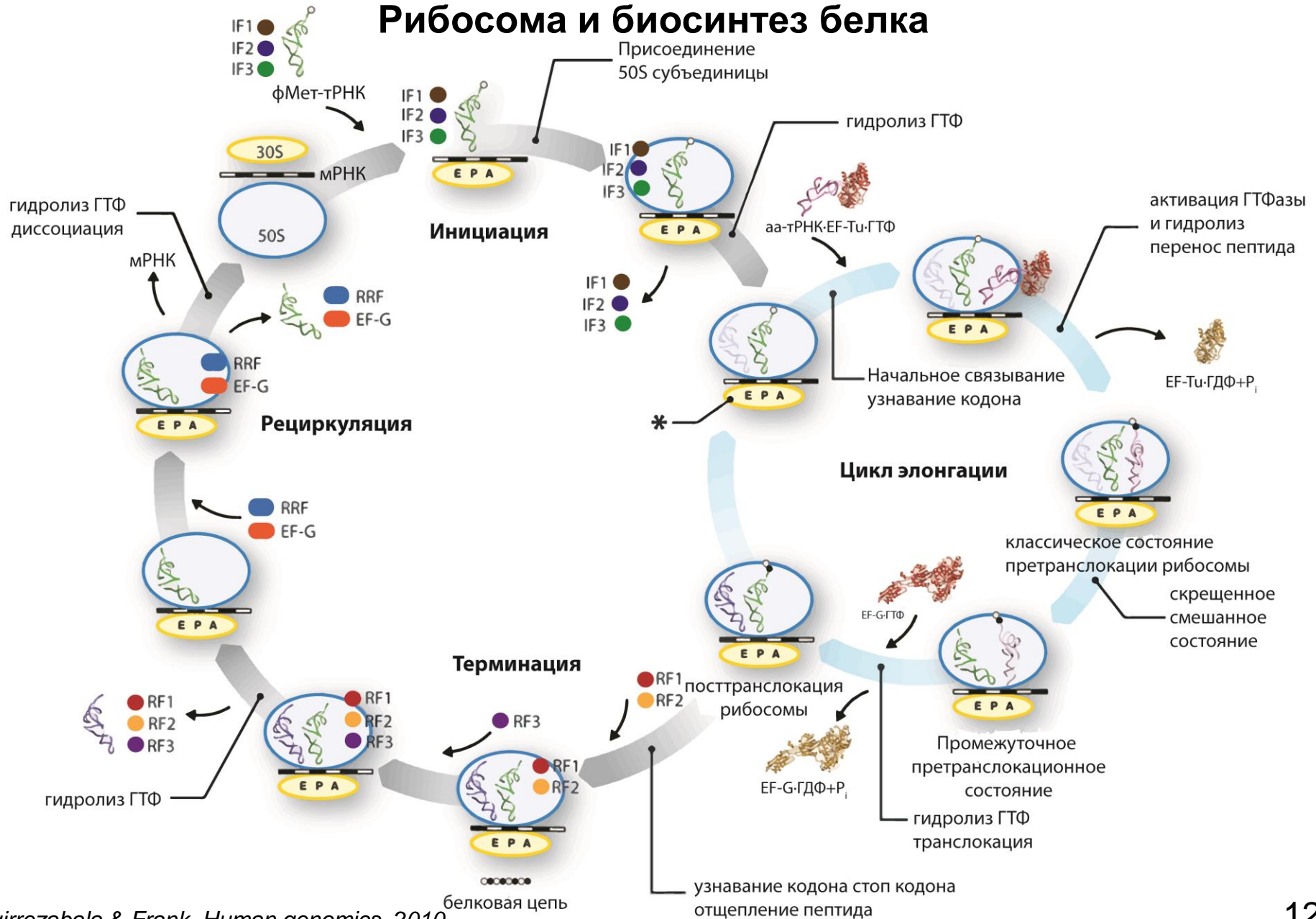
мРНК туннель

РАСТАМЫЦИН

Различия в структуре рибосом прокариот и эукариот



Рибосома и биосинтез белка



Цель работы:

изучение принципов структурной организации и механизмов функционирования аппарата синтеза белка бактерии *Staphylococcus aureus* и антимикробных пептидов протегринов для понимания механизмов регуляции трансляции и выявления новых мишеней для антибиотиков.

Для выполнения вышеописанной цели были поставлены следующие **задачи**:

- Определить механизм олигомеризации протегринов PG2, PG3, PG4, PG5 в мембраномоделирующем окружении на основе данных спектроскопии ЯМР высокого разрешения.
- Исследовать структуру и динамику факторов регуляции трансляции HPF и EF-P из *S. aureus* по данным спектроскопии ЯМР высокого разрешения, спектроскопии ЭПР, рентгеноструктурного анализа и просвечивающей криогенной электронной микроскопии.
- Установить с атомарным разрешением детали взаимодействия факторов регуляции трансляции HPF и EF-P с рибосомой *S. aureus*.
- Установить молекулярный механизм гибернации рибосом *S. aureus*.
- Определить детали механизма взаимодействия мРНК и тРНК с рибосомой *S. aureus*.
- Установить наличие и тип посттранскрипционных модификаций рРНК *S. aureus*.

Методы исследования:

Определение пространственной структуры и внутримолекулярной подвижности пептидов, белков, рибосом *Staphylococcus aureus* и ее комплексов с факторами регуляции трансляции было выполнено методами:

- спектроскопии ЯМР высокого разрешения на спектрометрах Avance II 500 МГц, Avance III 700 МГц с криодатчиком производства Bruker;
- спектроскопии ЭПР на спектрометре X-диапазона (9,6 ГГц) Elexsys 680 производства Bruker;
- макромолекулярной кристаллографии на монокристалльном дифрактометре Rigaku Synergy-S и на синхротронных источниках излучения Soleil (г. Сент-Обен, Франция) и ESRF (г. Гренобль, Франция)
- методом криогенной просвечивающей электронной микроскопии на микроскопе Titan Krios (FEI), оснащенного пушкой автоэлектронной эмиссии, при энергии ускорения электронов 300 КэВ (I.G.B.M.C., г. Страсбург, Франция).

При разработке методов выделения, очистки и кристаллизации исследуемых объектов использовали современные биохимические и биофизические методы для анализа структурного качества препаратов.

Раздел 1. Структурные исследования антимикробных пептидов протегринов

Раздел 2. Молекулярный механизм гибернации рибосом *S. aureus*

Раздел 3. Структурно-функциональный анализ элонгационного фактора P из *S. aureus*

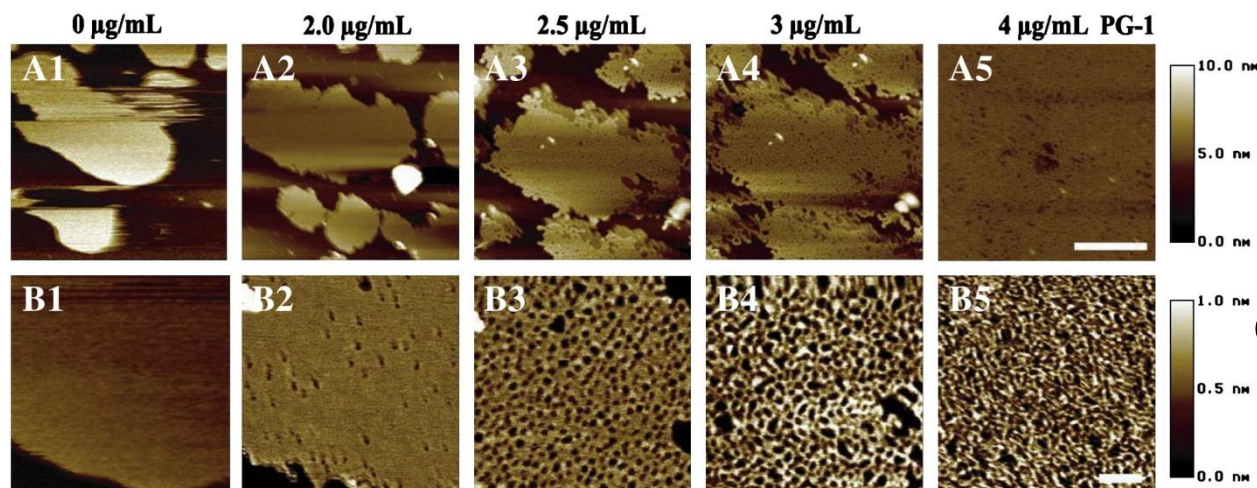
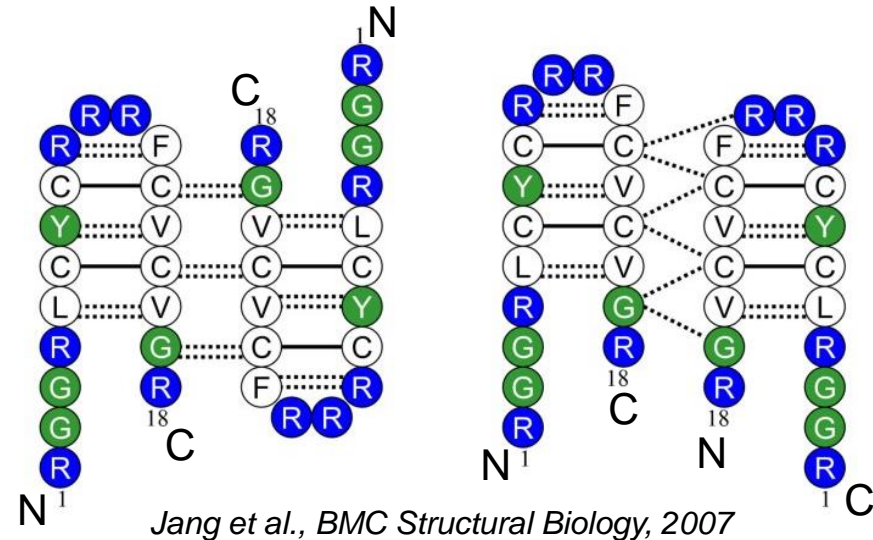
Раздел 4. Структурные исследования комплекса 70S рибосомы *S. aureus* с лигандами

Раздел 1. Структурные исследования антимикробных пептидов протегринов

1. Структурные исследования антимикробных пептидов протегринов

Аминокислотная последовательность

PG-1	R	G	G	R	L	C	Y	C	R	R	R	F	C	V	C	V	G	R
PG-2	R	G	G	R	L	C	Y	C	R	R	R	F	C	I	C	V		
PG-3	R	G	G	G	L	C	Y	C	R	R	R	F	C	V	C	V	G	R
PG-4	R	G	G	R	L	C	Y	C	R	G	W	I	C	F	C	V	G	R
PG-5	R	G	G	R	L	C	Y	C	R	P	R	F	C	V	C	V	G	R



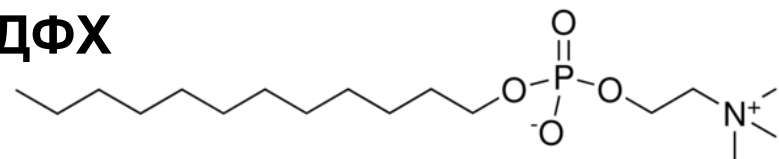
Данные атомно-силовой
микроскопии
формирования пор PG-1
в липидных бислоях

1. Структурные исследования антимикробных пептидов протегринов

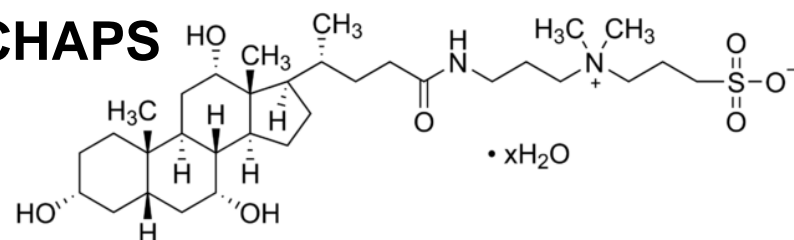
Аминокислотная последовательность

PG-1	R	G	G	R	L	C	Y	C	R	R	R	F	C	V	C	V	G	R
PG-2	R	G	G	R	L	C	Y	C	R	R	R	F	C	I	C	V		
PG-3	R	G	G	G	L	C	Y	C	R	R	R	F	C	V	C	V	G	R
PG-4	R	G	G	R	L	C	Y	C	R	G	W	I	C	F	C	V	G	R
PG-5	R	G	G	R	L	C	Y	C	R	P	R	F	C	V	C	V	G	R

ДФХ



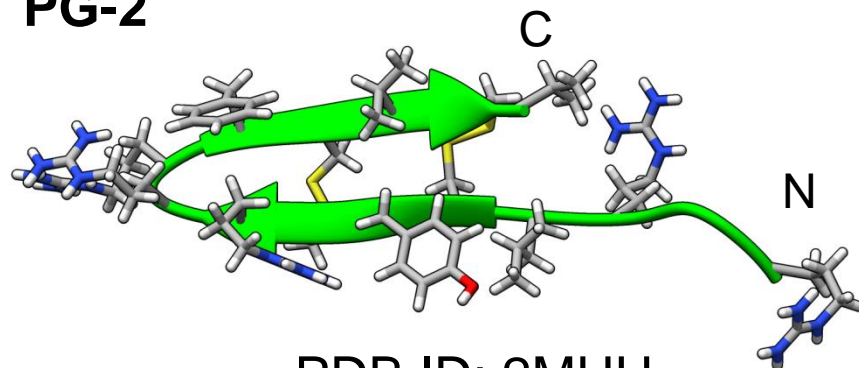
CHAPS



	PG-2	PG-3	PG-4	PG-5
Всего ЯЭО контактов	174	155	145	164
Дальнего диапазона ($ i-j > 4$)	11	0	11	5
Среднего диапазона ($ i-j = 2,3,4$)	8	11	15	5
Последовательные ($ i-j = 1$)	28	90	51	65
Внутриостаточные	127	54	68	89
Межмолекулярные	0	12	15	6
Водородные связи	6	6	6	6
Ограничений на двугранные углы ϕ, ψ	30	28	25	25
Статистика Рамачадрана				
Наиболее предпочтительная область (%)	78,6	77,8	84,5	72,8
Разрешенная область (%)	100,0	100,0	99,7	100
Среднеквадратичное отклонение атомов основной цепи в ансамбле из 10 структур (Å)	$0,64 \pm 0,1$ Å	$0,41 \pm 0,1$ Å	$0,79 \pm 0,1$ Å	$0,65 \pm 0,1$ Å

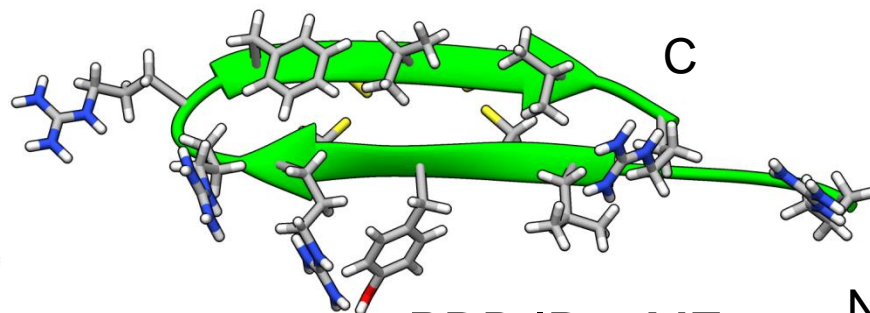
1. Структурные исследования антимикробных пептидов протегринов

PG-2



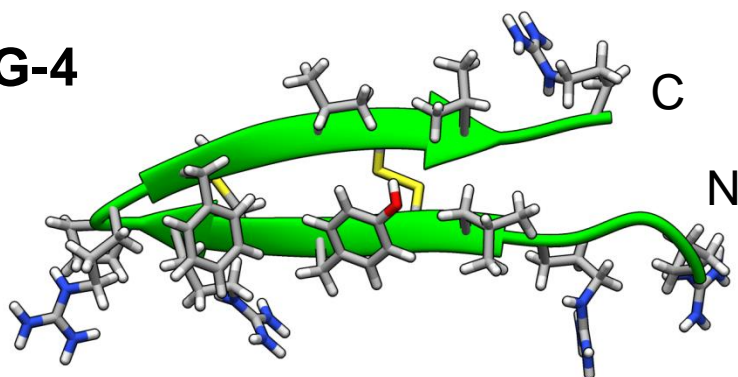
PDB ID: 2MUH

PG-3



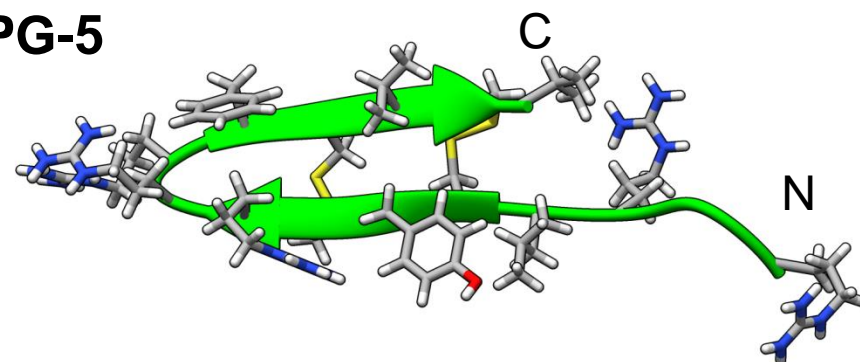
PDB ID: 2MZ6

PG-4



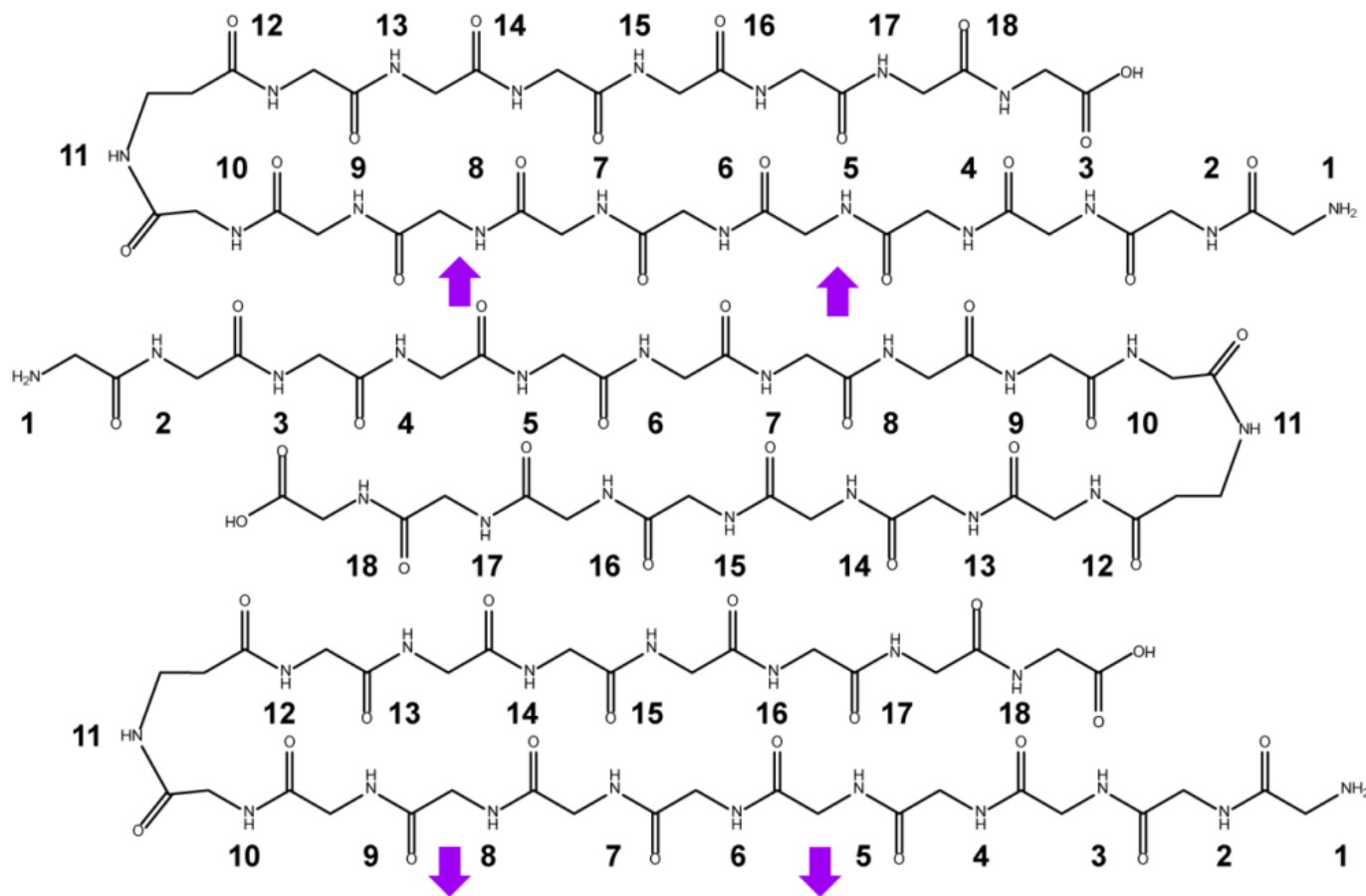
PDB ID: 6QKF

PG-5



PDB ID: 2NC7

1. Структурные исследования антимикробных пептидов протегринов



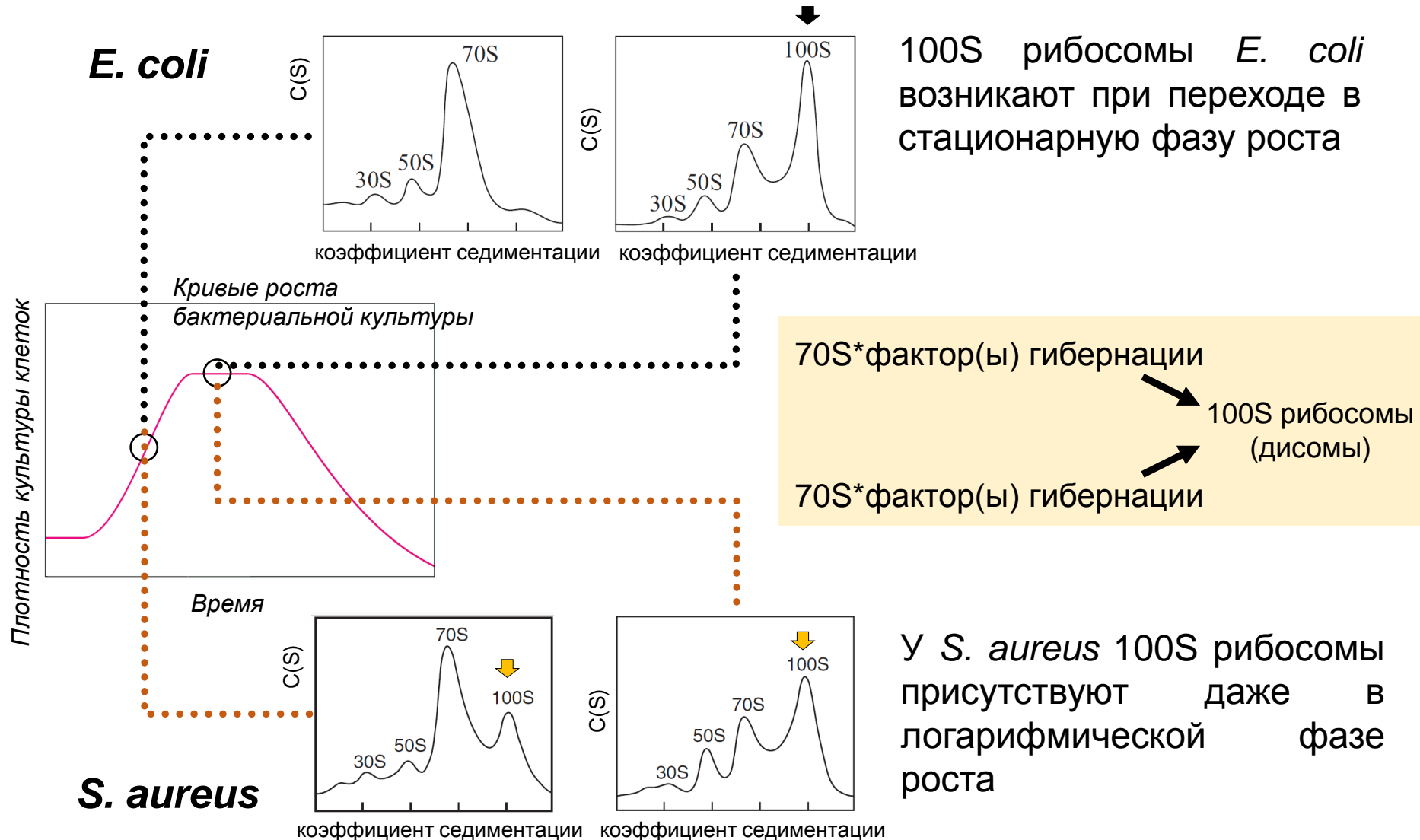
1. Структурные исследования антимикробных пептидов протегринов

Результаты и выводы:

- Впервые определена пространственная структура антимикробных пептидов протегринов PG2, PG3, PG4, PG5 в мембраномоделирующем окружении на основе мицелл и плоских амфифилов.
- На основе данных спектроскопии ЯМР установлено наличие процесса димеризации протегринов в мембраномоделирующем окружении
- Предложен молекулярный механизм формирования протегринами трансмембранных пор нарушающих клеточный гомеостаз.

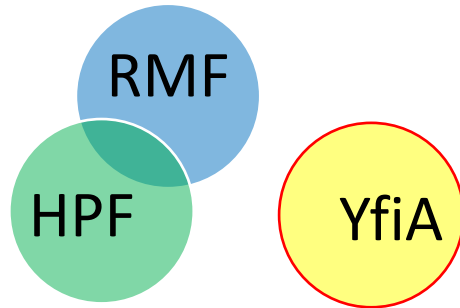
Раздел 2. Молекулярный механизм гибернации рибосом *S. aureus*

2. Молекулярный механизм гибернации рибосом *S. aureus*



2. Молекулярный механизм гибернции рибосом *S. aureus*

Escherichia coli
Salmonella typhimurum
Klebsiella pneumonia
Pactobacterium carotovorum



образование 100S

(A)

RMF_EC01	MKRQKRDRLERAHGQYQAGIAGRSKEMCPYOTLNORSQWLGWREAMADVMA :	55
RMF_kpne0	MKRQKRDRLERAHGQYQAGIAGRSKEMCPYQSLNORSWLGWREAMEDRVLT :	55
RMF_styp1	MKRQKRDRLERAHGQYQAGIAGRSKEMCPYOTLNORSYWLGGWREAMEDRAVMA :	55
RMF_pcar1	MKRQKRDRLERAHGQYQAGIAGRSKEMCPYQSLNORSYWLGGWREAMEDRAVTA :	55
RMF_smarc	MKRQKRDRLERAHGQYQAGIAGRSKEMCPYQSLNORSYWLGGWREAMEDRAVTA :	55
RMF_pmir0	MKRQKRDRLERAHGQYQAGIAGRSKEMCPYQSLNORSYWLGGWREAMEDRAVTA :	56

(B)

HPF_EC01	MQLNITGNHVEITAEALREFVYAKFAKLEQYFDRINQVYVVLKVEKYT	HTSDATLHVNGGEIHASAE : 67
HPF_styp1	MQLNITGNHVEITAEALREFVYAKFAKLEQYFDRINQVYVVLKVEKYT	HTSDATLHVNGGEIHASAE : 67
HPF_smarc	MQLNITGNHVEITAEALREFVYAKFAKLEQYFDRINQVYVVLKVEKYT	HTSDATLHVNGGEIHASAE : 67
HPF_pmir0	MQLNITGNHVEITAEALREFVYAKFAKLEQYFDRINQVYVVLKVEKYT	HTSDATLHVNGGEIHASAE : 67
HPF_kpne0	MQLNITGNHVEITAEALREFVYAKFAKLEQYFDRINQVYVVLKVEKYT	HTSDATLHVNGGEIHASAE : 67
HPF_pcar1	MQLNITGNHVEITAEALREFVYAKFAKLEQYFDRINQVYVVLKVEKYT	HTSDATLHVNGGEIHASAE : 67
HPF_bmu0	MQLNITGNHVEITAEALREFVYAKFAKLEQYFDRINQVYVVLKVEKYT	HTSDATLHVNGGEIHASAE : 67
HPF_EC01	QDMYAAIDGLIDKLARQLTKHKDKLKH	: 95
HPF_styp1	QDMYAAIDGLIDKLARQLTKHKDKLKH	: 95
HPF_smarc	QDMYAAIDGLIDKLARQLTKHKDKLKH	: 95
HPF_pmir0	QDMYAAIDGLIDKLARQLTKHKDKLKH	: 95
HPF_kpne0	QDMYAAIDGLIDKLARQLTKHKDKLKH	: 95
HPF_pcar1	QDMYAAIDGLIDKLARQLTKHKDKLKH	: 95
HPF_bmu0	QDMYAAIDGLIDKLARQLTKHKDKLKH	: 95
	GMLYAAIDGLIDKLARQLTKHKDKLKH	: 119

Staphylococcus aureus
Lactobacillus species
Listeria monocytogenes
Thermus thermophilus
Bacillus subtilis

длинный HPF

образование 100S

LpHPF	MLTYNVRGENIEVTEAIRSYVEKRIKLNKFFG-GSVTATAHVNK-VYSDKTAKVEVTIPLSFLTLRAEE :	69
LcHPF	MLTYNVRGENIEVTEAIRSYVEKRIKLNKFFG-GSVTATAHVNK-VYSDKTAKVEVTIPLSFLTLRAEE :	69
LpHPF	MLNFINRGENIEVTEAIRSYVEKRIKLNKFFG-GSVTATAHVNK-VYSDKTAKVEVTIPLSFLTLRAEE :	69
LdHPF	MLTYNVRGENIEVTEAIRSYVEKRIKLNKFFG-GSVTATAHVNK-VYSDKTAKVEVTIPLSFLTLRAEE :	69
LaHPF	MLTYNVRGENIEVTEAIRSYVEKRIKLNKFFG-GSVTATAHVNK-VYSDKTAKVEVTIPLSFLTLRAEE :	69
SaHPF	MLTYNVRGENIEVTEAIRSYVEKRIKLNKFFG-GSVTATAHVNK-VYSDKTAKVEVTIPLSFLTLRAEE :	69
ThHPF	MLTYNVRGENIEVTEAIRSYVEKRIKLNKFFG-GSVTATAHVNK-VYSDKTAKVEVTIPLSFLTLRAEE :	69
SyHPF	MLTYNVRGENIEVTEAIRSYVEKRIKLNKFFG-GSVTATAHVNK-VYSDKTAKVEVTIPLSFLTLRAEE :	69
EcHPF	MLTYNVRGENIEVTEAIRSYVEKRIKLNKFFG-GSVTATAHVNK-VYSDKTAKVEVTIPLSFLTLRAEE :	69
LpHPF	DLTSPYASIDLVTDKLERQVRKFKTK-INRKSREKGFQIDIDATAPEPKPAED-DDNLTVVTRKRV :	135
LcHPF	DLTSPYASIDLVTDKLERQVRKFKTK-INRKSREKGFQIDIDATAPEPKPAED-DDNLTVVTRKRV :	135
LpHPF	DLTSPYASIDLVTDKLERQVRKFKTK-INRKSREKGFQIDIDATAPEPKPAED-DDNLTVVTRKRV :	135
LdHPF	DLTSPYASIDLVTDKLERQVRKFKTK-INRKSREKGFQIDIDATAPEPKPAED-DDNLTVVTRKRV :	135
LaHPF	DLTSPYASIDLVTDKLERQVRKFKTK-INRKSREKGFQIDIDATAPEPKPAED-DDNLTVVTRKRV :	135
SaHPF	DLTSPYASIDLVTDKLERQVRKFKTK-INRKSREKGFQIDIDATAPEPKPAED-DDNLTVVTRKRV :	135
ThHPF	DLTSPYASIDLVTDKLERQVRKFKTK-INRKSREKGFQIDIDATAPEPKPAED-DDNLTVVTRKRV :	135
SyHPF	DLTSPYASIDLVTDKLERQVRKFKTK-INRKSREKGFQIDIDATAPEPKPAED-DDNLTVVTRKRV :	135
EcHPF	DLTSPYASIDLVTDKLERQVRKFKTK-INRKSREKGFQIDIDATAPEPKPAED-DDNLTVVTRKRV :	135
LpHPF	SLKPMDSQEAIDQMDMLGHNFIFEDADTNGTSIVYKRRDGRYGLIETDE :	185
LcHPF	SLKPMDSQEAIDQMDMLGHNFIFEDADTNGTSIVYKRRDGRYGLIETDE :	185
LpHPF	SLKPMDSQEAIDQMDMLGHNFIFEDADTNGTSIVYKRRDGRYGLIETDE :	185
LdHPF	SLKPMDSQEAIDQMDMLGHNFIFEDADTNGTSIVYKRRDGRYGLIETDE :	185
LaHPF	SLKPMDSQEAIDQMDMLGHNFIFEDADTNGTSIVYKRRDGRYGLIETDE :	185
SaHPF	SLKPMDSQEAIDQMDMLGHNFIFEDADTNGTSIVYKRRDGRYGLIETDE :	185
ThHPF	SLKPMDSQEAIDQMDMLGHNFIFEDADTNGTSIVYKRRDGRYGLIETDE :	185
SyHPF	SLKPMDSQEAIDQMDMLGHNFIFEDADTNGTSIVYKRRDGRYGLIETDE :	185
EcHPF	SLKPMDSQEAIDQMDMLGHNFIFEDADTNGTSIVYKRRDGRYGLIETDE :	185

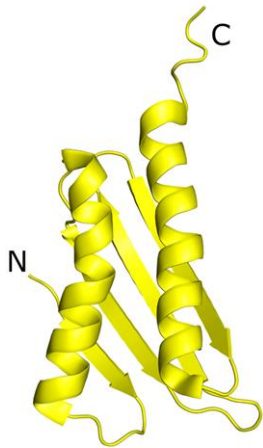
2. Молекулярный механизм гибернации рибосом *S. aureus*

Белки стресса *E. coli*

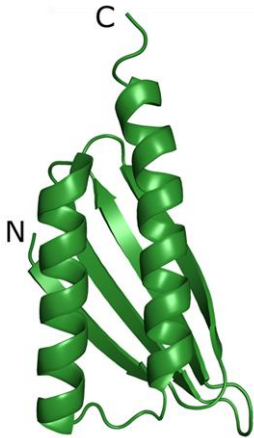
YfiA
(113 a.o.)

**Ribosome
Modulation
Factor (55 a.o.)**

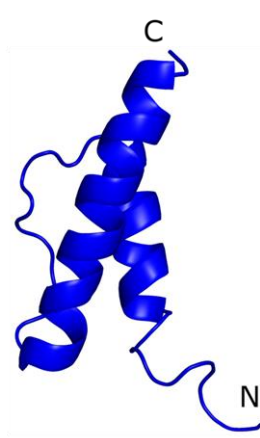
**Hibernation
Promoting
Factor (95 a.o.)**



YfiA



HPF

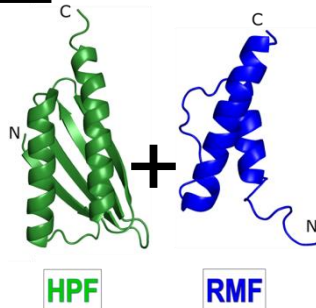


RMF

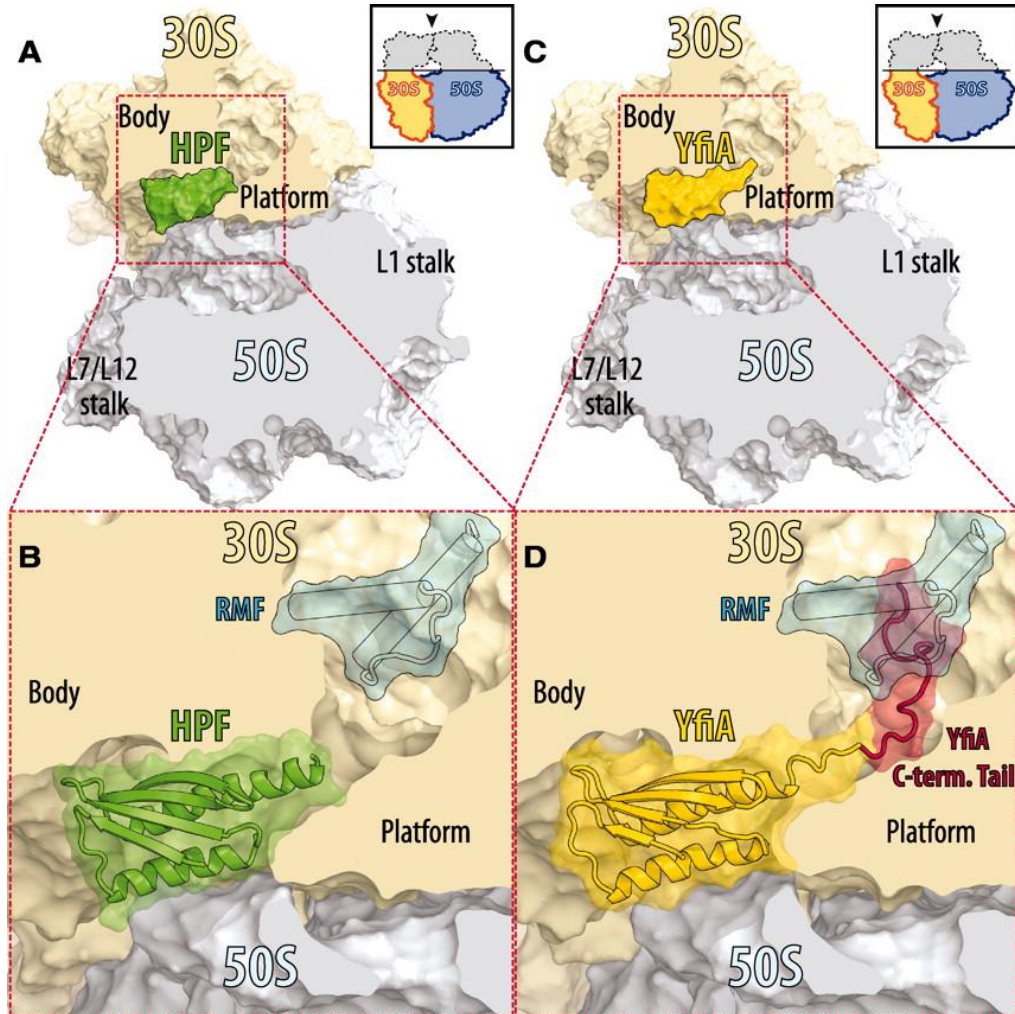
Длинный HPF *S. aureus*

SaHPF

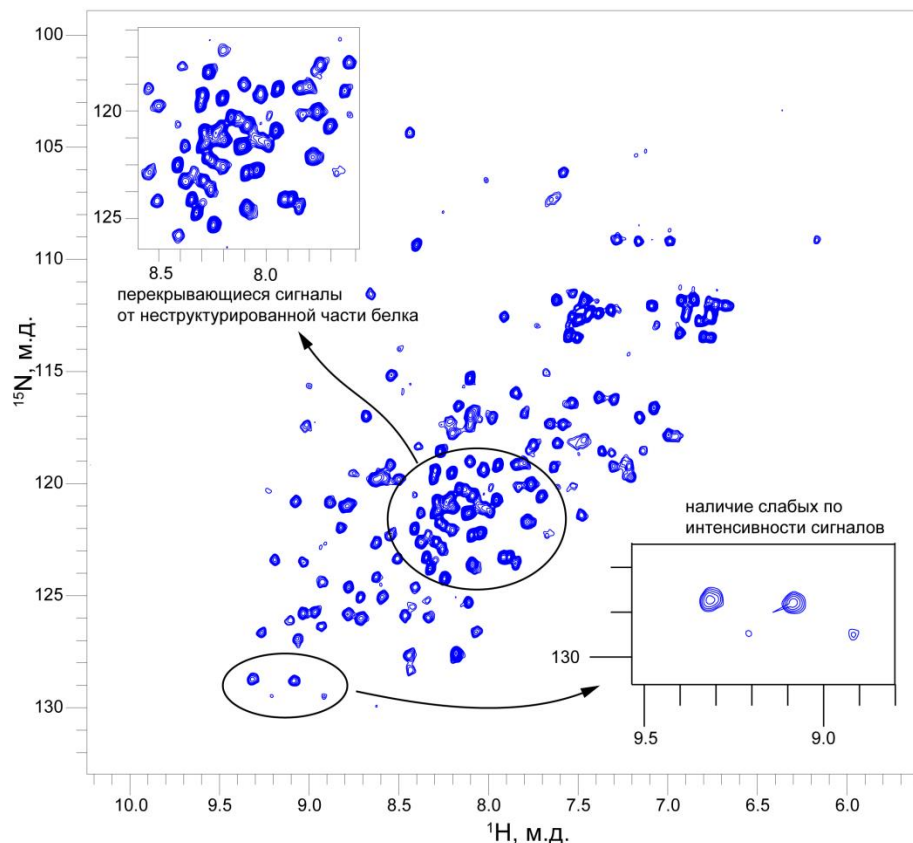
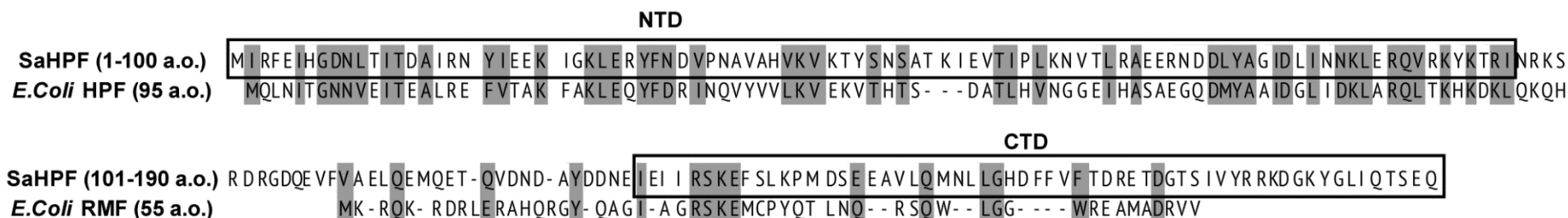
?



Локализация HPF, RMF и YfiA на рибосоме



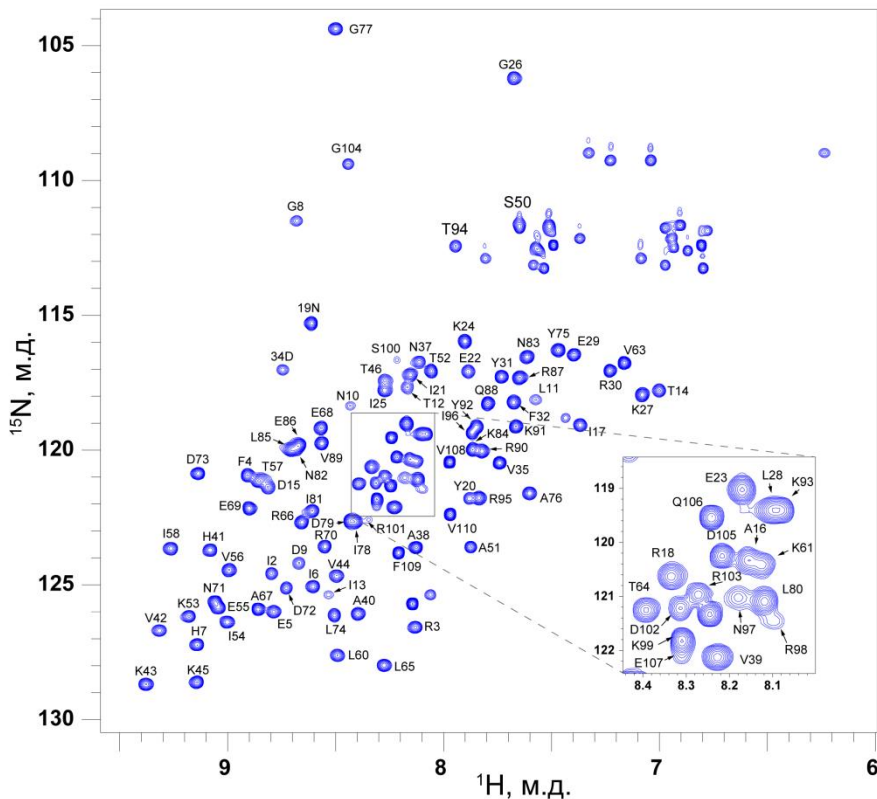
2. Молекулярный механизм гибернации рибосом *S. aureus*



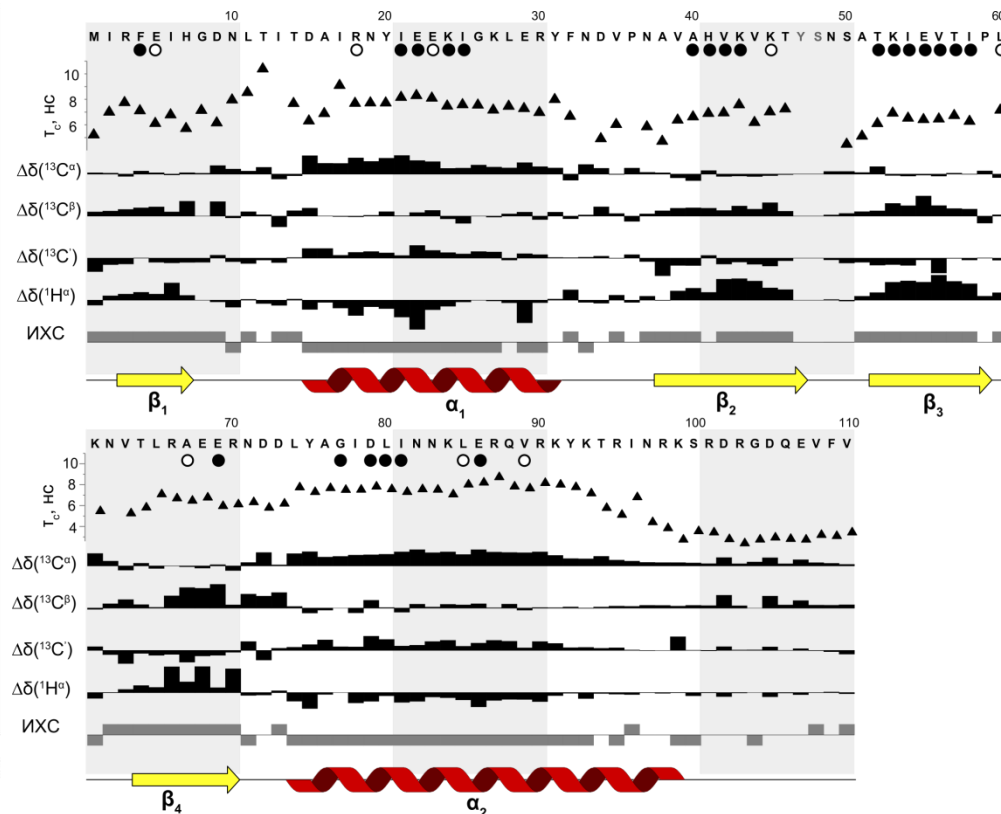
^1H – ^{15}N HSQC-спектр ЯМР (700 МГц) белка SaHPF, меченого по изотопам $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$, (0,1 мМ) в фосфатном буфере с 250 мМ NH_4Cl , $T = 298\text{ K}$

Аюпов Р., Усачев К. и др., Уч. Зап. Каз. ун-та, 2017

2. Молекулярный механизм гибернации рибосом *S. aureus*

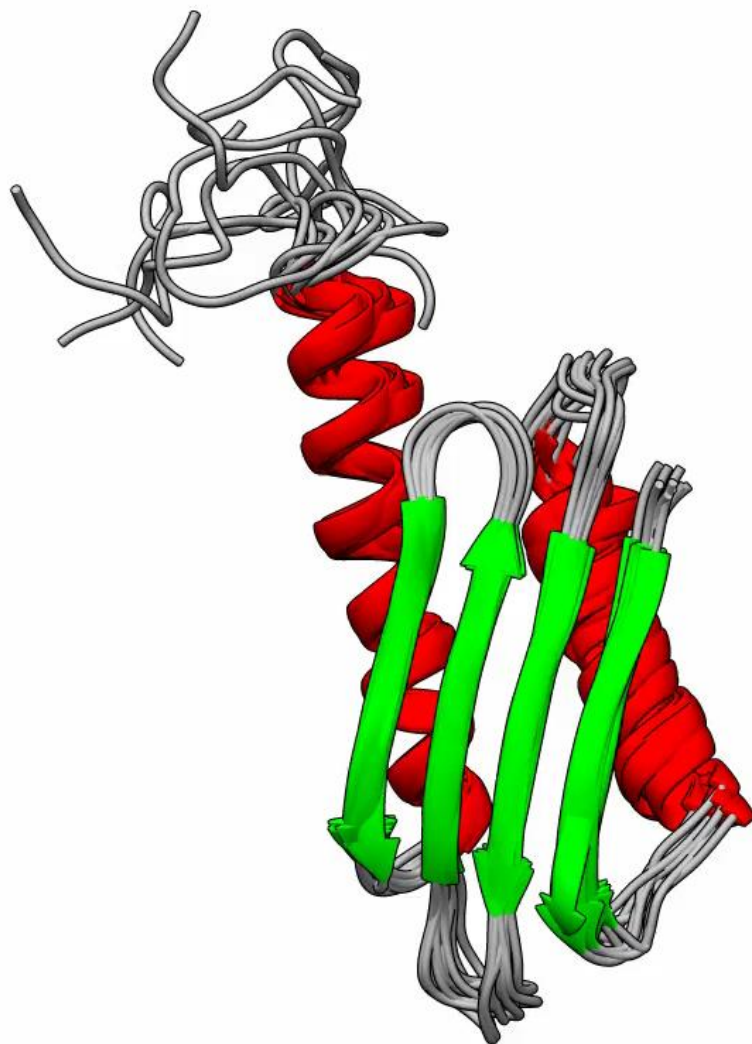


^1H – ^{15}N HSQC-спектр ЯМР (700 МГц) белка SaHPF-NTD, меченого по изотопам $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$, (1,62 мМ) в фосфатном буфере с 200 мМ NH_4Cl , $T = 308\text{ K}$



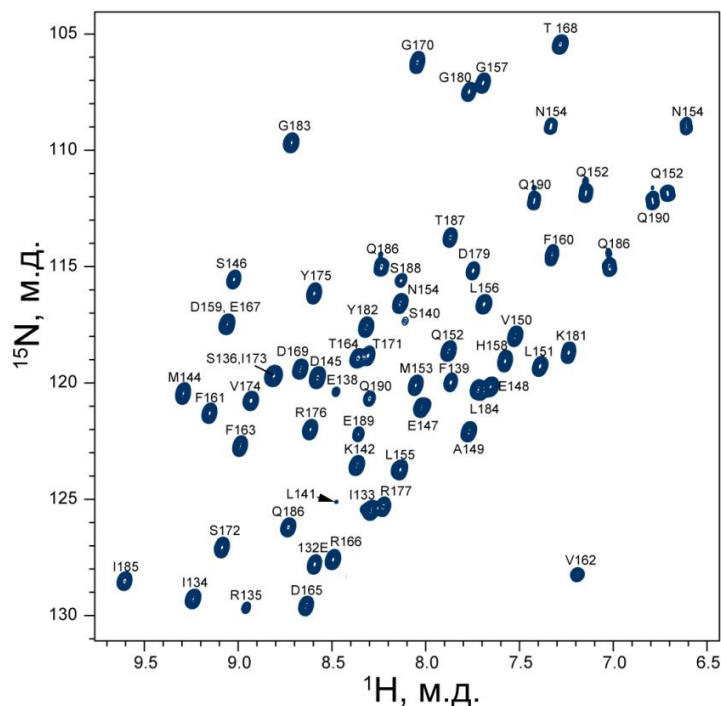
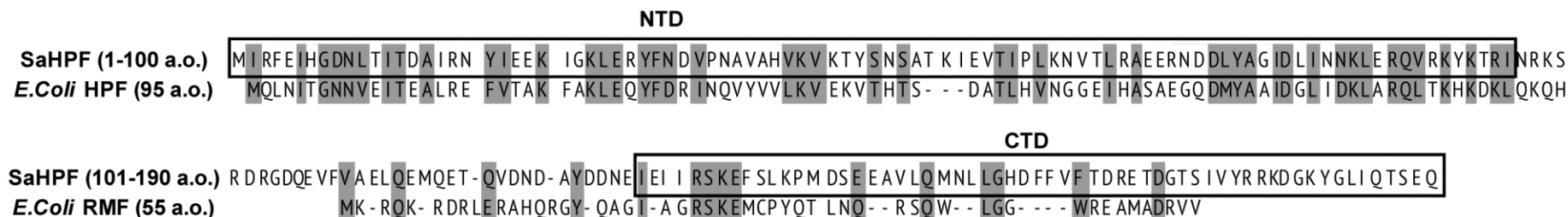
Индексы химического сдвига для аминокислотных остатков белка SaHPF-NTD. Величины времени корреляции молекулярного движения τ_c полученные по данным T_1/T_2 релаксации показаны треугольниками. Амидные протоны со средней и медленной скоростью обмена на дейтерий отмечены черными и белыми кругами соответственно.

2. Молекулярный механизм гибернации рибосом *S. aureus*



Всего ЯЭО контактов	1724
Дальнего диапазона ($ i-j > 4$)	222
Среднего диапазона ($ i-j = 2,3,4$)	213
Последовательные ($ i-j = 1$)	473
Внутриостаточные	816
Водородные связи	102
Ограничений на двугранные углы ϕ, ψ	90
Статистика Рамачадрана	
Наиболее предпочтительная область (%)	88,9
Разрешенная область (%)	100,0
Среднеквадратичное отклонение атомов основной цепи в ансамбле из 10 структур (Å)	$0,60 \pm 0,1 \text{ Å}$

2. Молекулярный механизм гibernации рибосом *S. aureus*

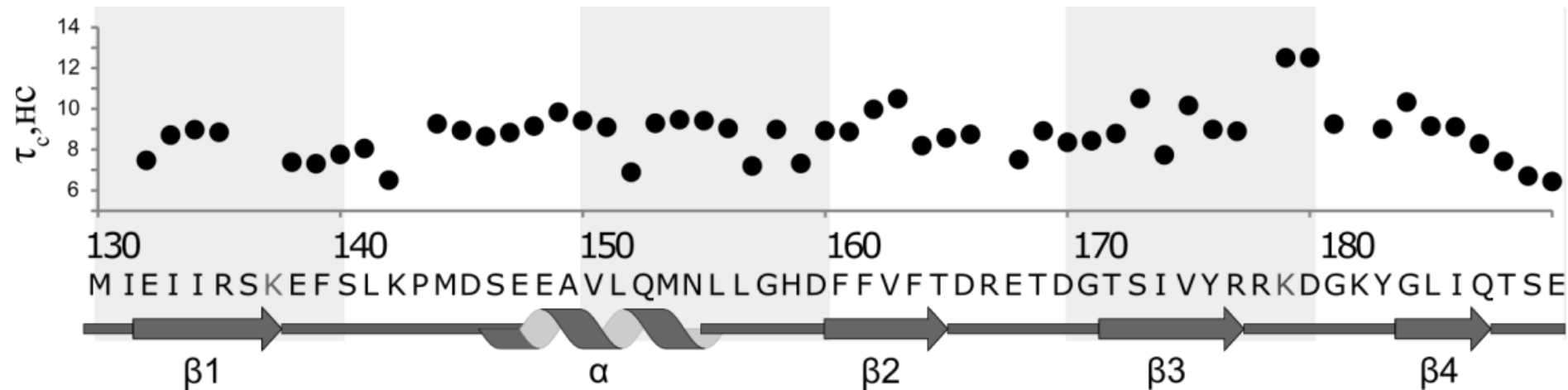


Всего ЯЭО контактов	1355
Дальнего диапазона ($ i-j > 4$)	502
Среднего диапазона ($ i-j = 2,3,4$)	145
Последовательные ($ i-j = 1$)	244
Внутриостаточные	464
Водородные связи	27 x 2
Ограничений на двугранные углы ϕ, ψ	57, 57
Статистика Рамачадрана	
Наиболее предпочтительная область (%)	90.2
Разрешенная область (%)	100.0
Среднеквадратичное отклонение атомов основной цепи в ансамбле из 10 структур (Å)	$0.82 \pm 0.2 \text{ Å}$

^1H - ^{15}N HSQC-спектр ЯМР (700 МГц) белка SaHPF-CTD, меченого по изотопам $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$, (2,00 мМ) в фосфатном буфере с 200 мМ NH_4Cl , $T = 308 \text{ K}$

Khusainov I., Vicens Q., Ayupov R., Usachev K. et al.,
The EMBO Journal, 2017

2. Молекулярный механизм гибернации рибосом *S. aureus*



Величины времени корреляции молекулярного движения τ_c полученные по данным T_1/T_2 релаксации. Снизу показано положение элементов вторичной структуры.

Для SaHNP-CTD $\tau_c = 8,20 \pm 0,7$ нс

Для белка длиной 60 а.о. (при 35 °C) расчетное значение $\tau_c = 3,8$ нс



SaHNP-CTD присутствует в растворе в виде гомодимера?

31

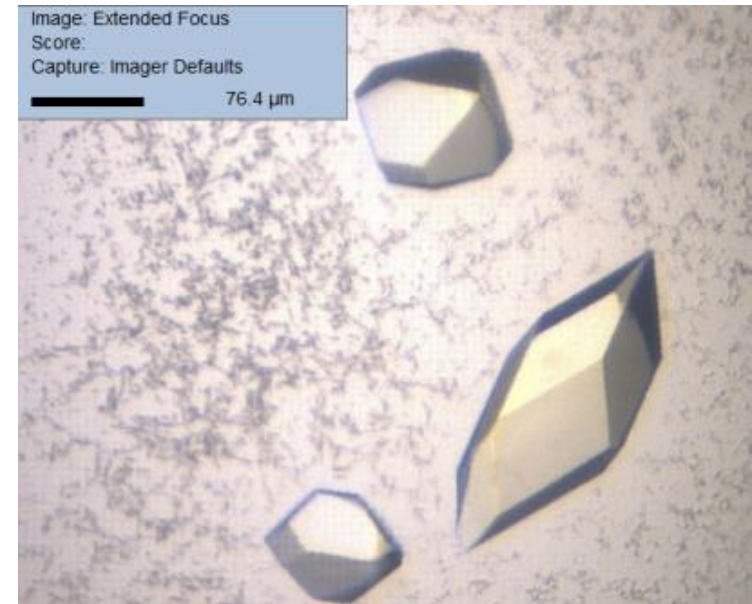
2. Молекулярный механизм гибернации рибосом *S. aureus*

Монокристаллы SaHPF-CTD, пригодные для экспериментов по рентгеноструктурному анализу, были получены в следующих условиях:

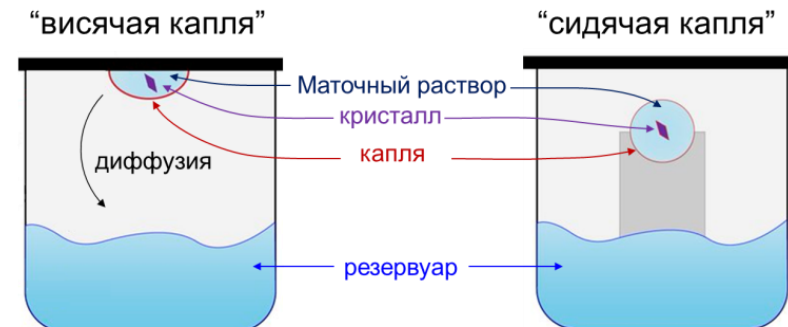
0,15 М лимонная кислота pH = 4,0, 24% полиэтиленгликоль (6000).

Эксперименты по рентгеноструктурному анализу проводились на линии Proxima1 синхротрона Soleil (Франция).

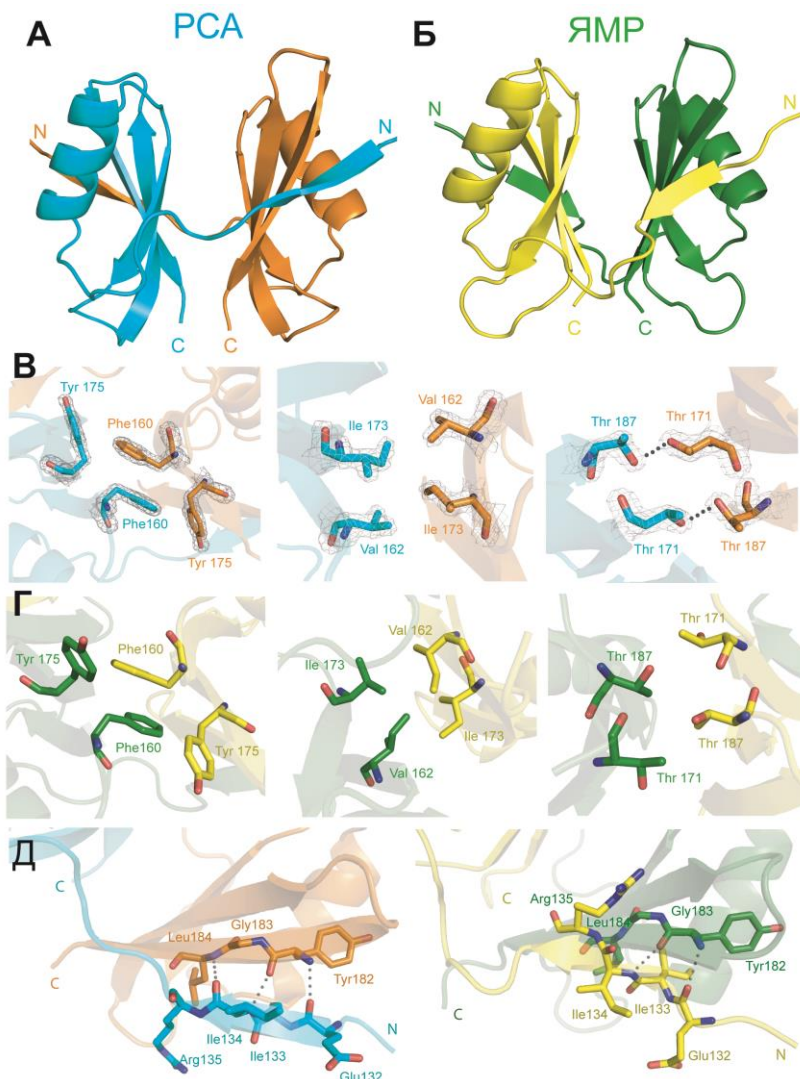
Определение фаз структурных факторов проводилось с помощью метода молекулярного замещения. В качестве начальной модели использовалась структура белка-гомолога Lmo2511 из *Listeria monocytogenes*, 2.4 Å (PDB ID: 3K2T)



Кристаллы белка SaHPF-CTD



2. Молекулярный механизм гибернации рибосом *S. aureus*



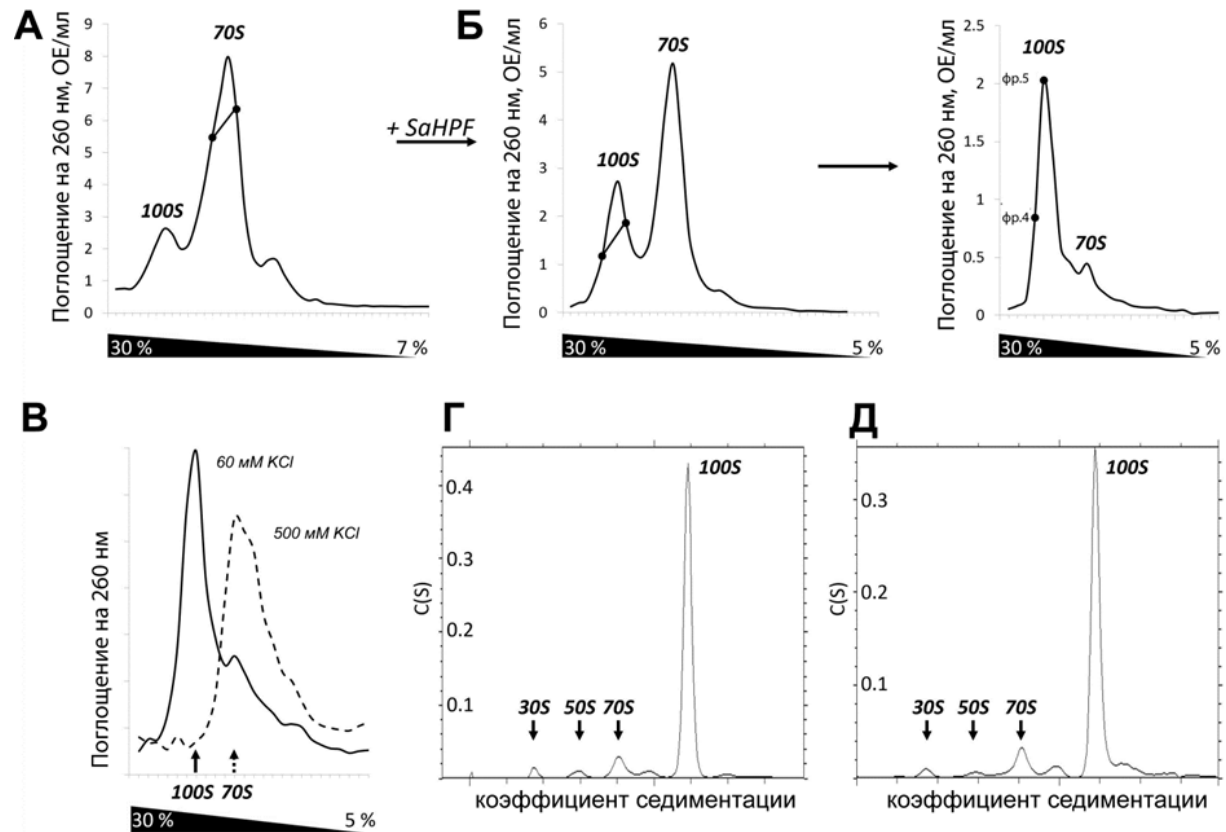
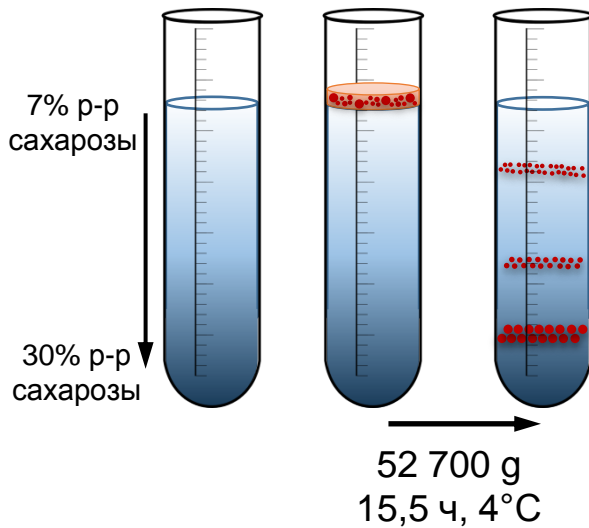
Сбор дифракционных данных

Пространственная группа	P 4 ₁ 2 ₁ 2
Параметры элементарной ячейки	
a,b,c (Å)	45,85 45,85 117,64
$\alpha=\beta=\gamma(^{\circ})$	90
Область разрешения (Å)	19,79 – 1,6 (1,657 – 1,6)
R _{merge} (%)	4,46 (63,17)
R _{pim} (%)	1,30 (17,77)
Среднее значение I/ σ (I)	28,12 (4,06)
Полнота набора (%)	99,84 (99,70)
Избыточность набора данных	13,1 (13,5)

Уточнение структуры

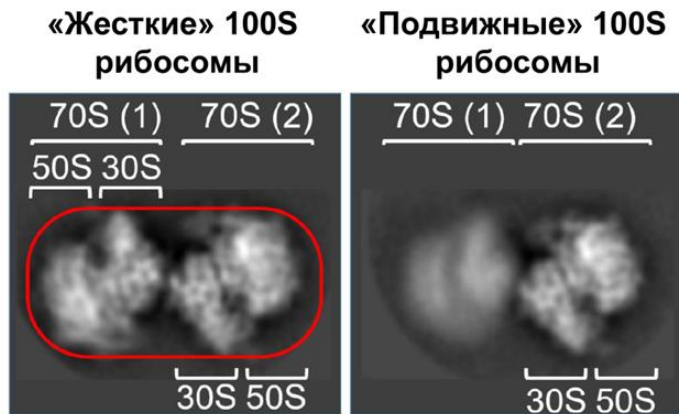
Область разрешения (Å)	19,79 – 1,6
Количество отражений	17 332
R _{work} / R _{free} (%)	15,93/18,34
Количество неводородных атомов	1062
Белка	1003
Воды	59
Средние тепловые B-факторы (Å ²)	34,67
Белка	34,27
Воды	41,49
Среднеквадратичные отклонения	
Длин связей (Å)	0,013
Углов связей (°)	1,14
Статистика Рамачадрана	
Наиболее предпочтительная область (%)	100,00

2. Молекулярный механизм гибернации рибосом *S. aureus*



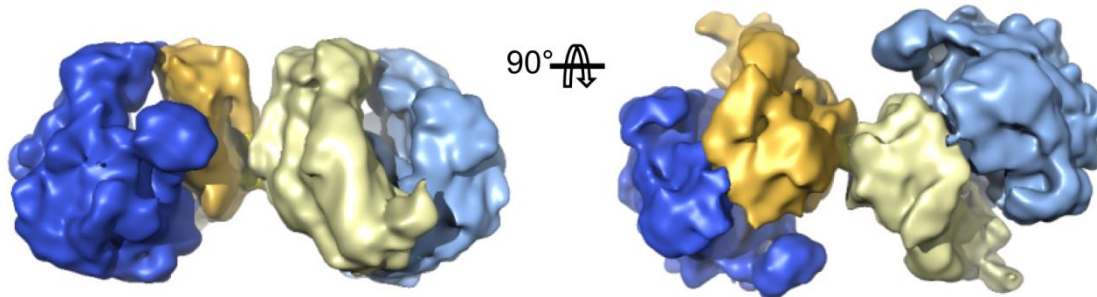
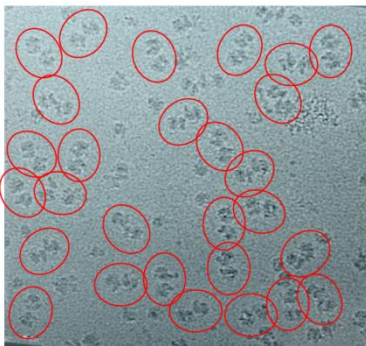
Выделение и очистка 100S рибосом *S. aureus*

2. Молекулярный механизм гибернации рибосом *S. aureus*



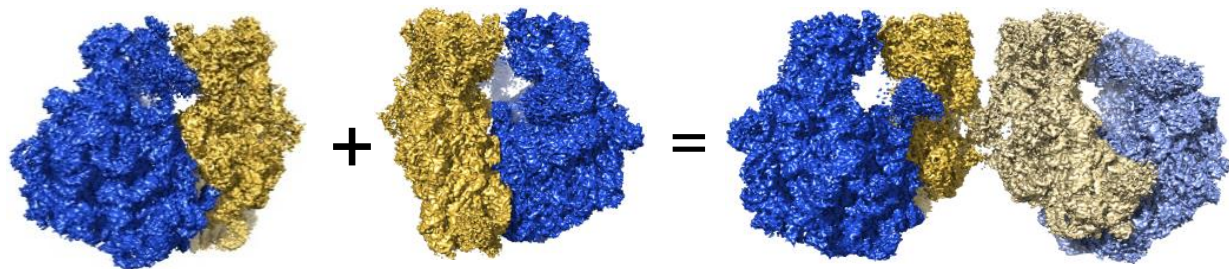
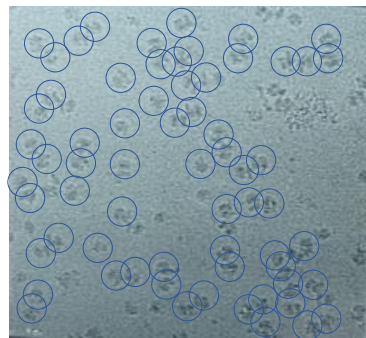
Titan Krios

1.



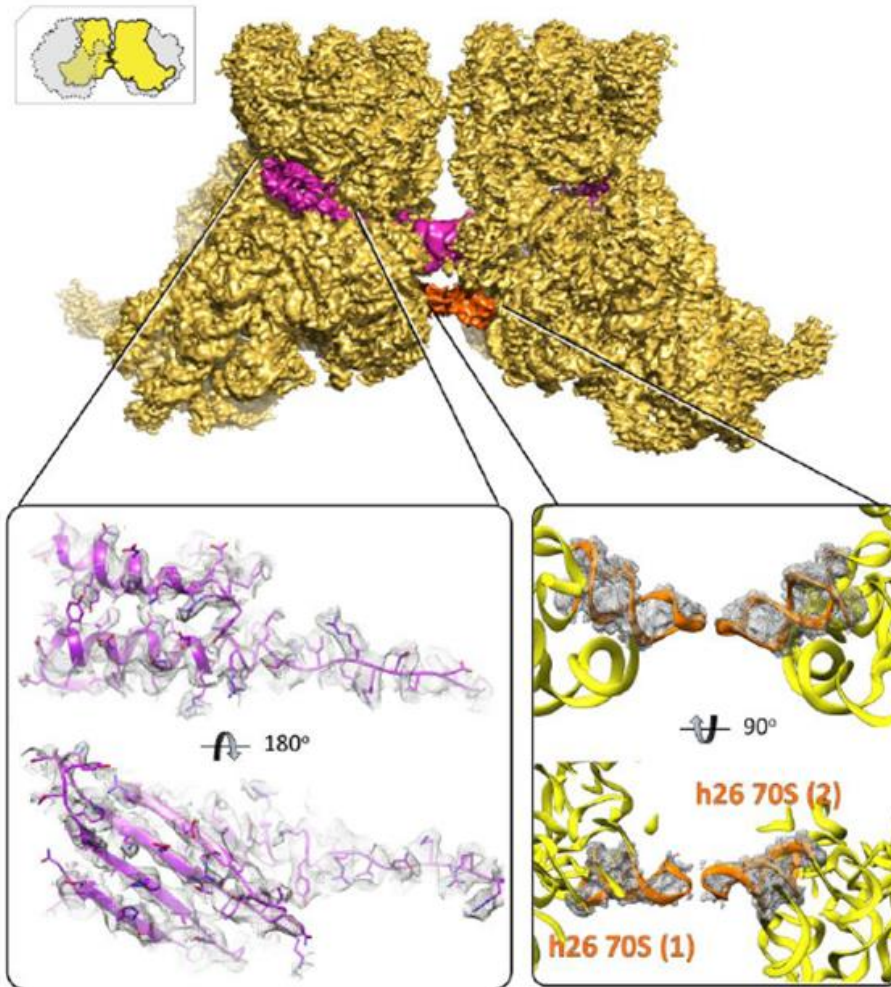
9 Å

2.



3,7 Å

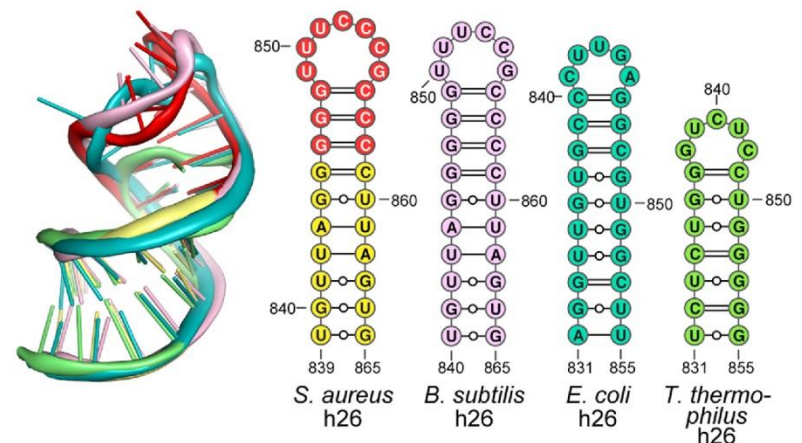
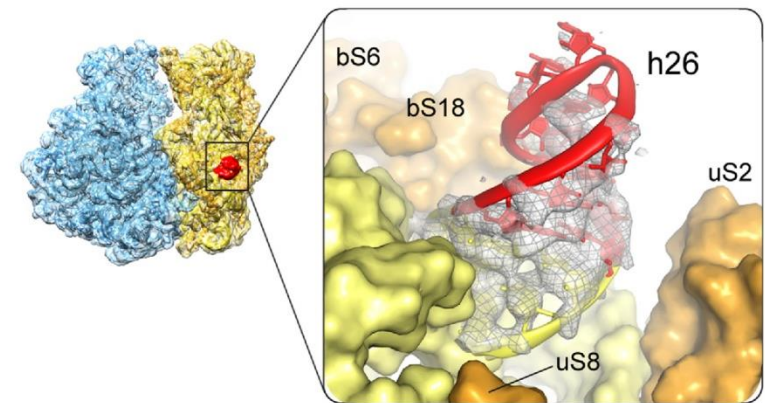
2. Молекулярный механизм гибернации рибосом *S. aureus*



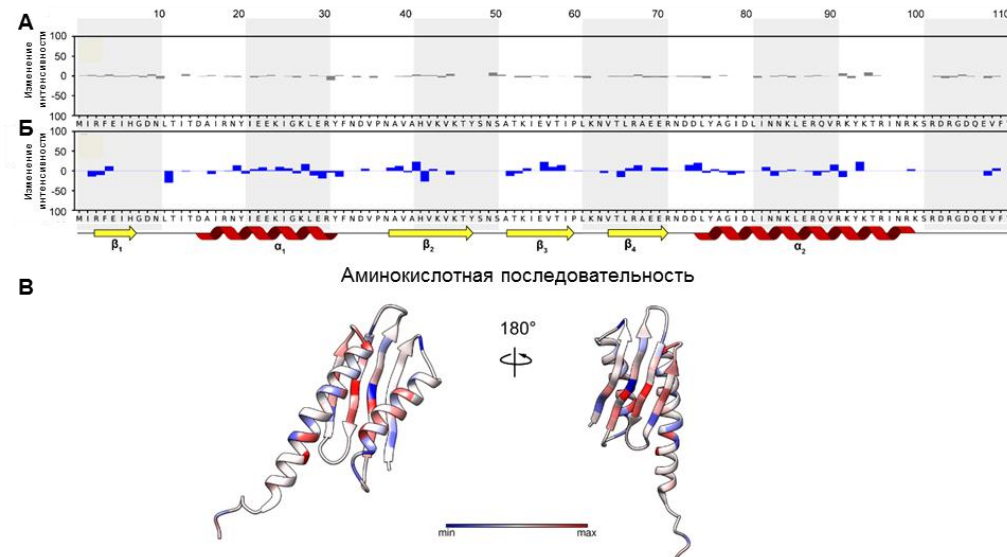
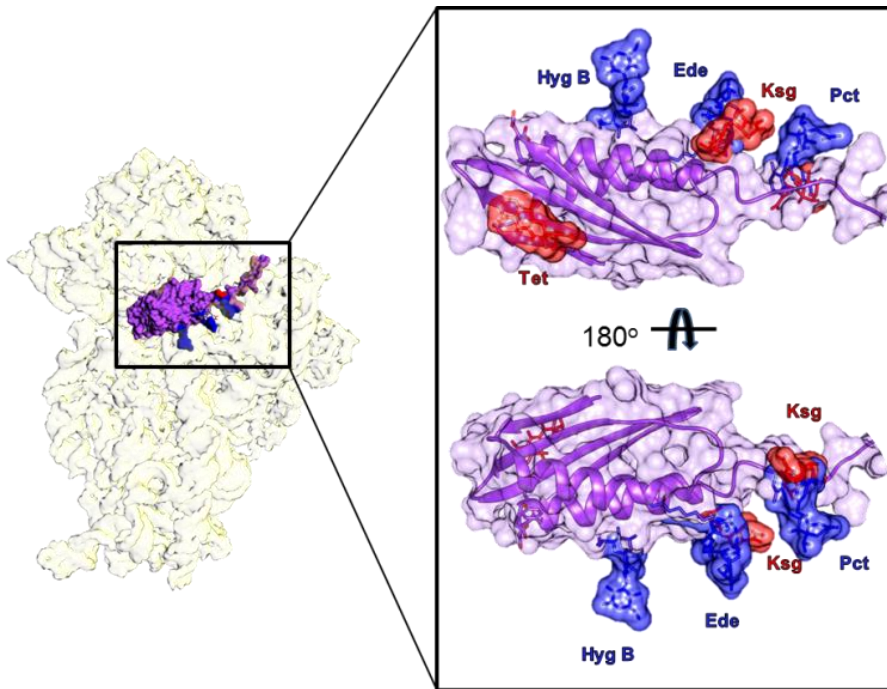
N-концевой домен HPF

спираль рРНК h26
малой субъединицы
рибосомы *S. aureus*

спираль рРНК h26 в *S. aureus* удлинена по сравнению с другими бактериями (*B. subtilis*, *E. coli*, *T. thermophilus*)



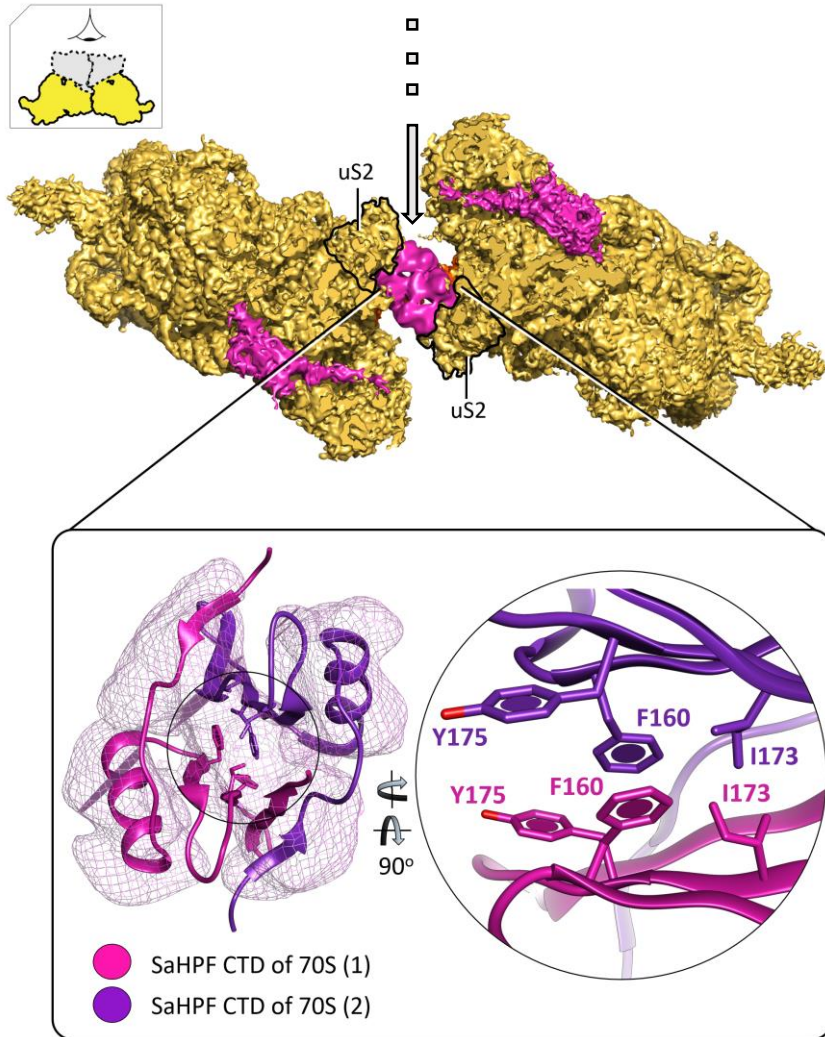
2. Молекулярный механизм гибернации рибосом *S. aureus*



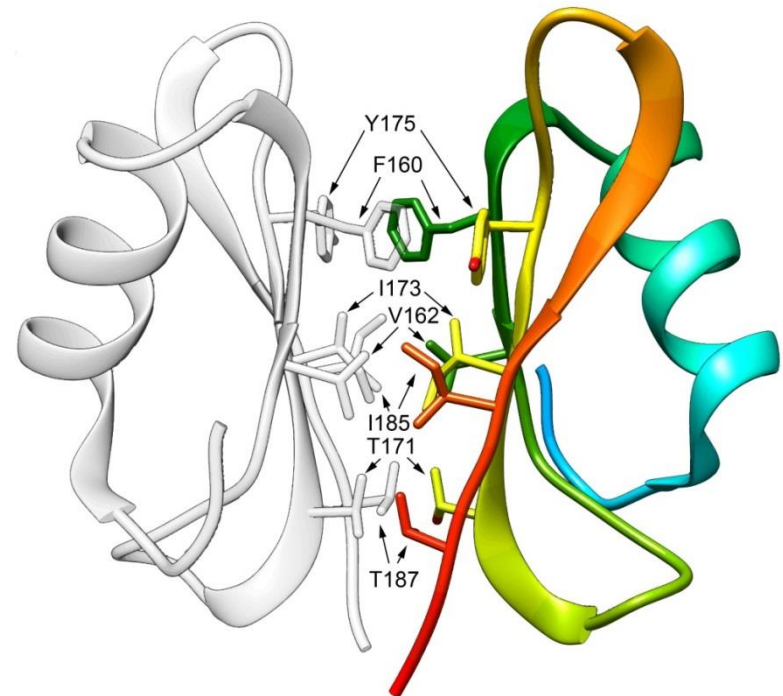
Результаты эксперимента ЯМР ^1H - ^{15}N HET-SOFAST HSQC. По вертикали отложено изменение интенсивностей сигналов амидных групп (λ_{noe}) белка SaHPF-NTD (120 мкМ) меченого по изотопам ^{15}N в отсутствии (а) и в присутствии (б) 70S рибосом *S. aureus* (54 мкМ). Структура белка SaHPF-NTD раскрашенная по величине λ_{noe} .

Положение N-концевого домена белка SaHPF и антибиотиков в активных сайтах рибосомы *S. aureus* (Hyg B- гигромицин B; Tet- тетрациклин; Ede – эдеин; Ksg – касугамицин; Pct - пактамицин).

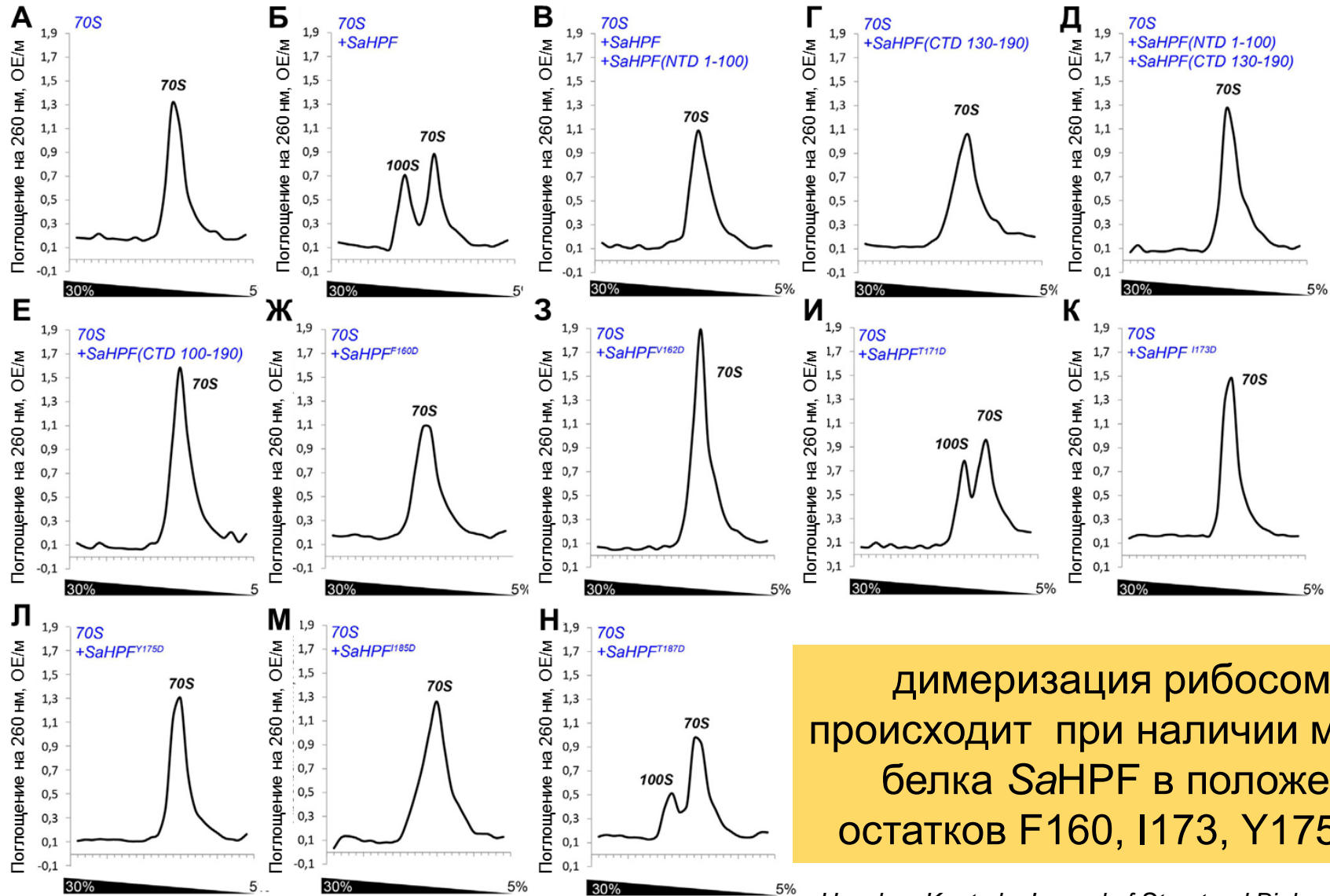
2. Молекулярный механизм гибернации рибосом *S. aureus*



С-концевой домен SaHPF располагается рядом с рибосомным белком uS2 и образует дополнительный контакт, стабилизирующий димер рибосомы за счет белок-белкового взаимодействия.

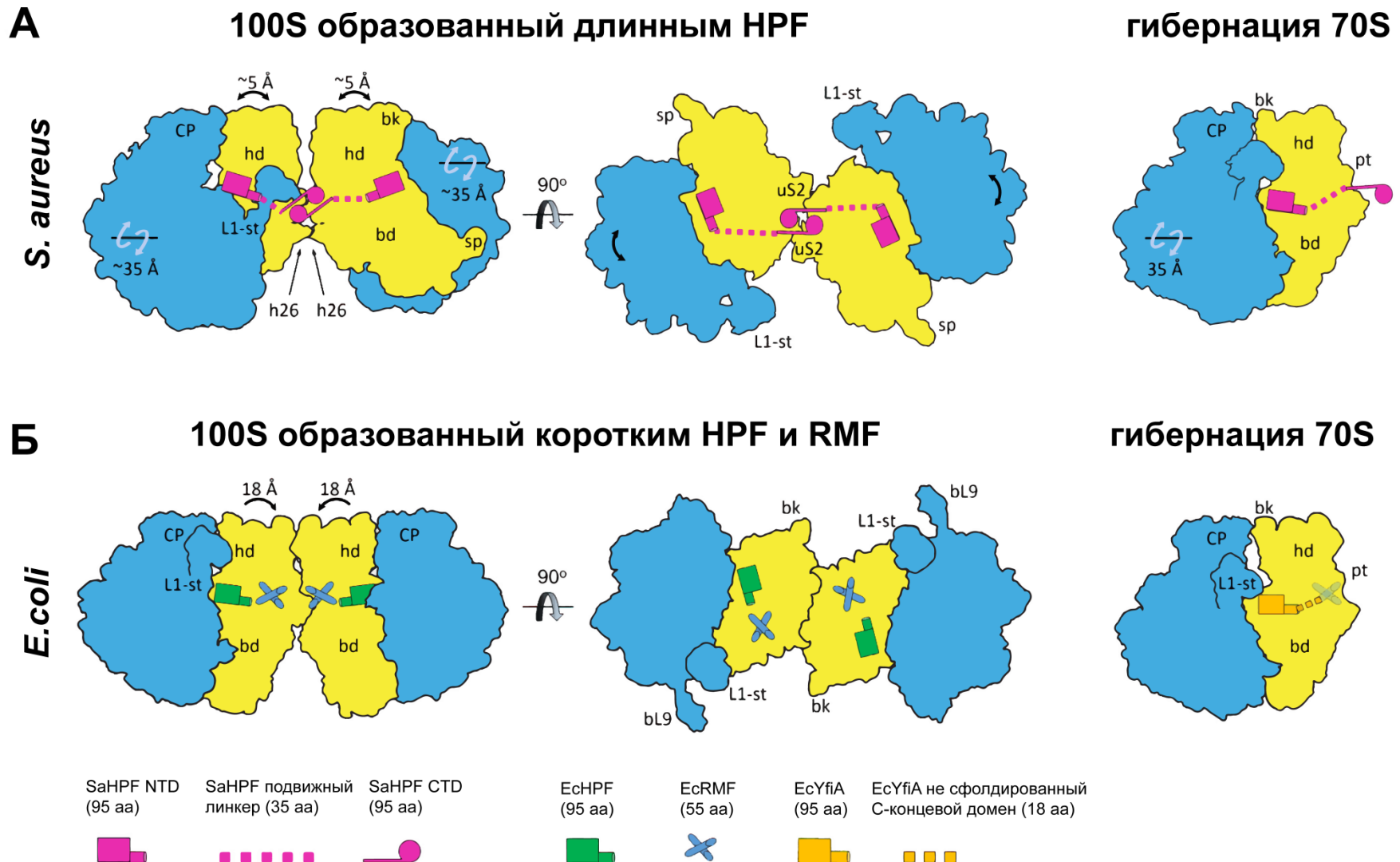


2. Молекулярный механизм гибернации рибосом *S. aureus*



димеризация рибосом не происходит при наличии мутаций белка SaHPF в положении остатков F160, I173, Y175, I185

2. Молекулярный механизм гибернации рибосом *S. aureus*



2. Молекулярный механизм гибернации рибосом *S. aureus*

Результаты и выводы:

- Впервые определена структура 100S димера рибосом *Staphylococcus aureus* с разрешением 3,7 Å.
- Установлен новый механизм формирования 100S димеров рибосом за счет их связывания с удлинённой формой белка HPF и показано различие с механизмом гибернации рибосом γ -протеобактерий.
- Показано, что связывание N-концевого домена фактора гибернации SaHPF с декодирующим центром рибосомы *Staphylococcus aureus* может обеспечивать неспецифическую устойчивость к гигромицину В, тетрациклину, эдеину, пактамицину и касугамицину.
- Показаны на основе точечных мутаций ключевые для димеризации и формирования 100S рибосом *S. aureus* аминокислотные остатки в интерфейсе димера белка HPF. Данные участки белка могут являться потенциальными мишенями для разработки новых ингибиторов механизма гибернации рибосом.

Раздел 3. Структурно-функциональный анализ элонгационного фактора Р из *S. aureus*

A

5' 3'

P P P

A-tRNA

P-tRNA

NC

B

5' 3'

drop-off and/or rescue

C

G72 A73 C74 C75 A76

L27

Pro-tRNA^{Pro} (A-site)

Pep-tRNA^{Pro} (P-site)

G2061

D

5' 3'

P P P

E-site codon Loop I

L1

E

G72 A73 C74 C75 A76

L27

Pro-tRNA^{Pro} (A-site)

Pep-tRNA^{Pro} (P-site)

G2061

F


G72 A73 C74 C75 A76

L27

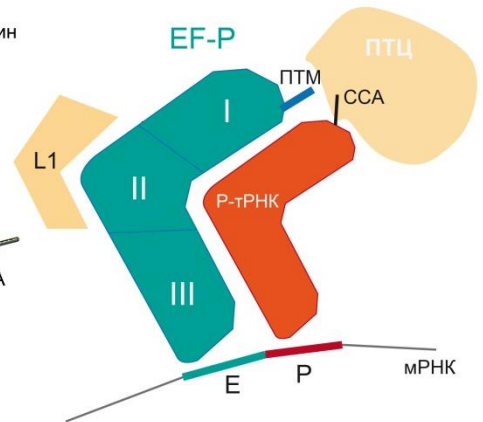
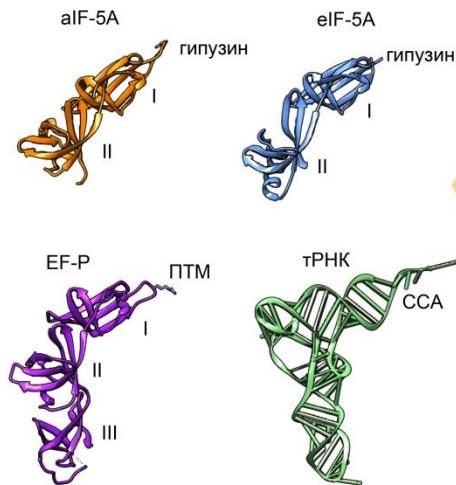
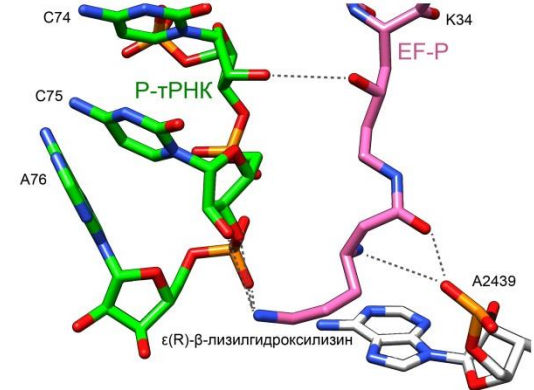
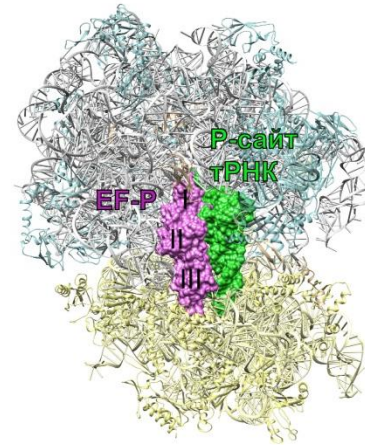
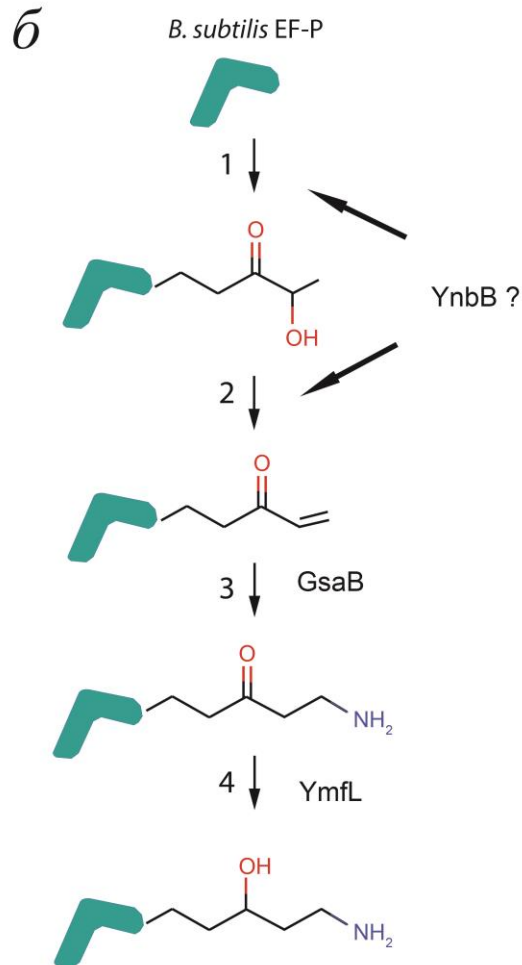
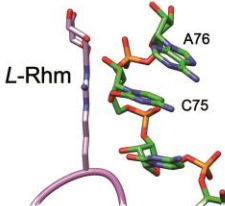
Pro-tRNA^{Pro} (A-site)

Pep-tRNA^{Pro} (P-site)

G2061

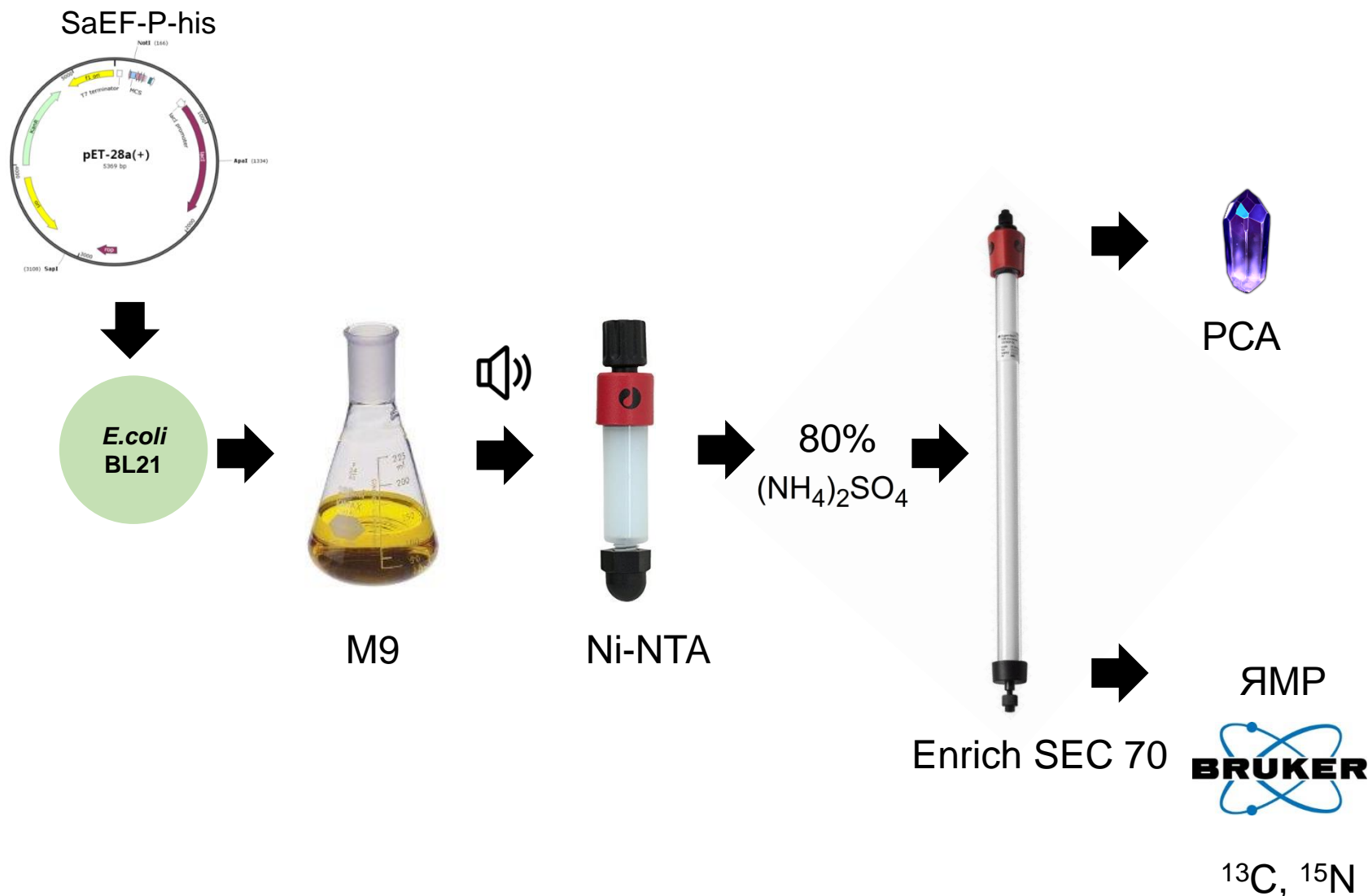
 Пролин 4

a L-Рамнозилирование β-Лизинилирование Гипузинирование

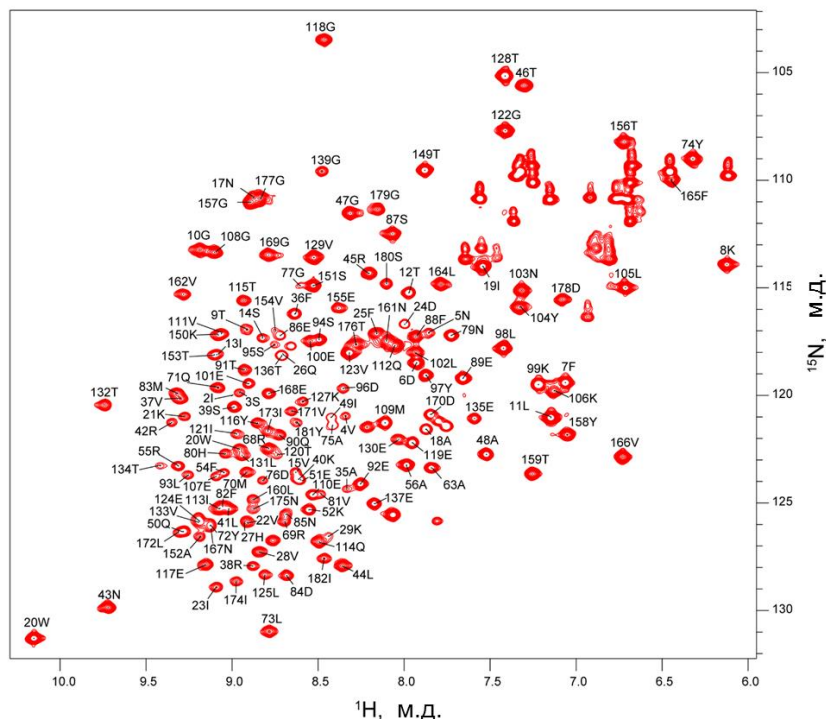


Типы модификаций EF-P и IF5A Механизм связывания EF-P с рибосомой

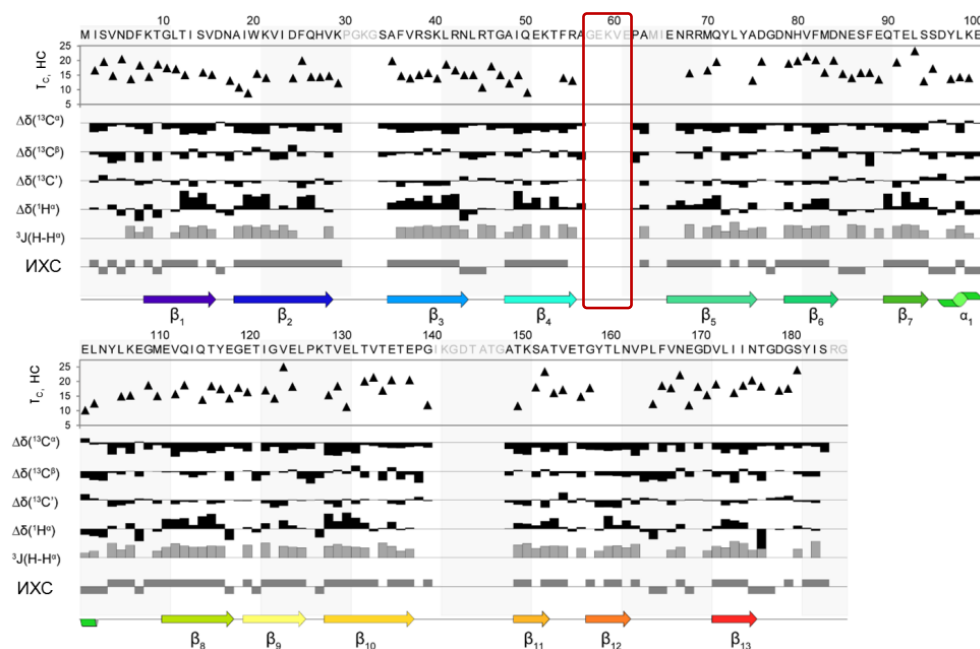
3. Структурно-функциональный анализ элонгационного фактора Р из *S. aureus*



3. Структурно-функциональный анализ элонгационного фактора Р из *S. aureus*

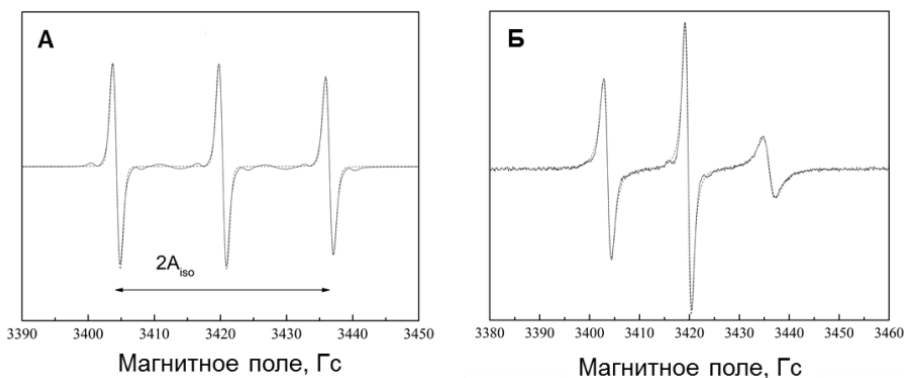
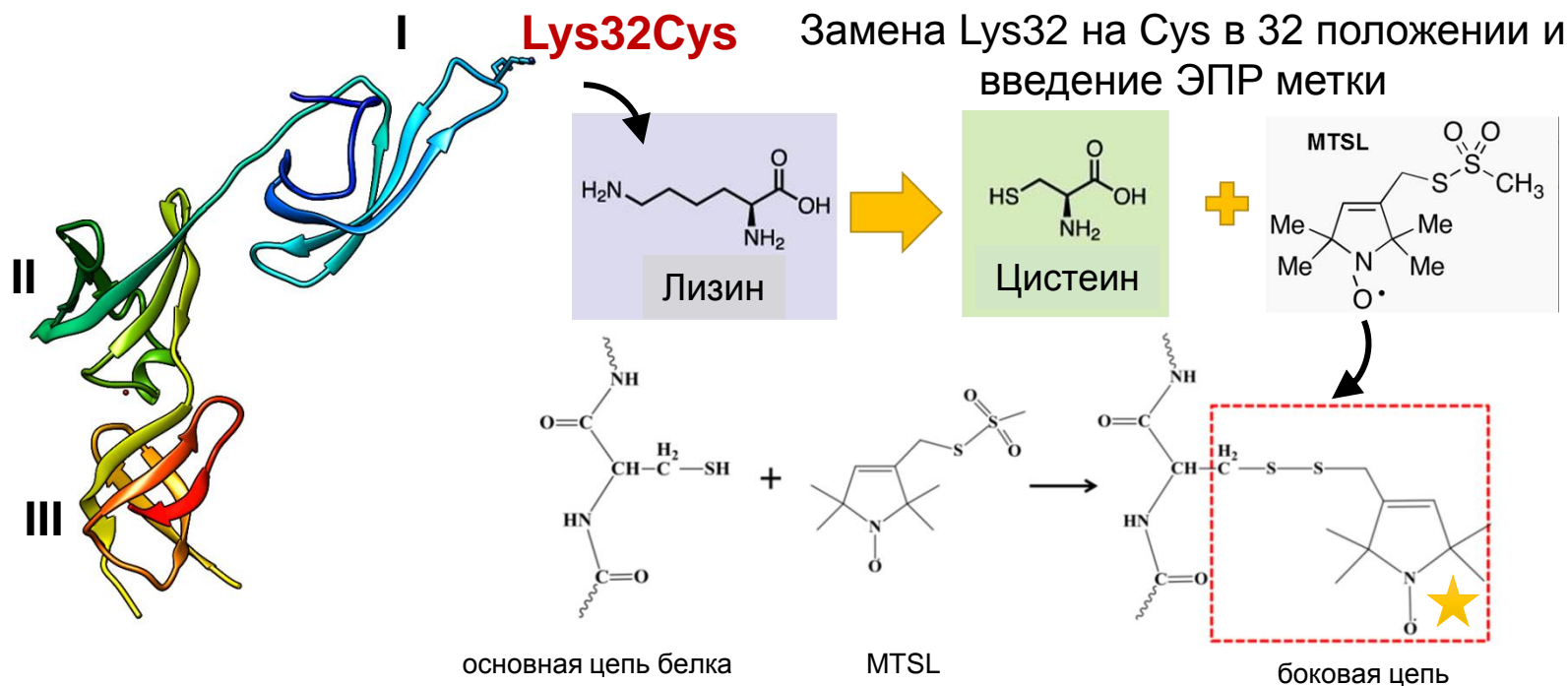


^1H - ^{15}N HSQC-спектр ЯМР (700 МГц) белка *SaEF-P*, (1,3 мМ) в растворе фосфатного буфера, pH 7.6, 200 мМ NH_4Cl , T = 308 К



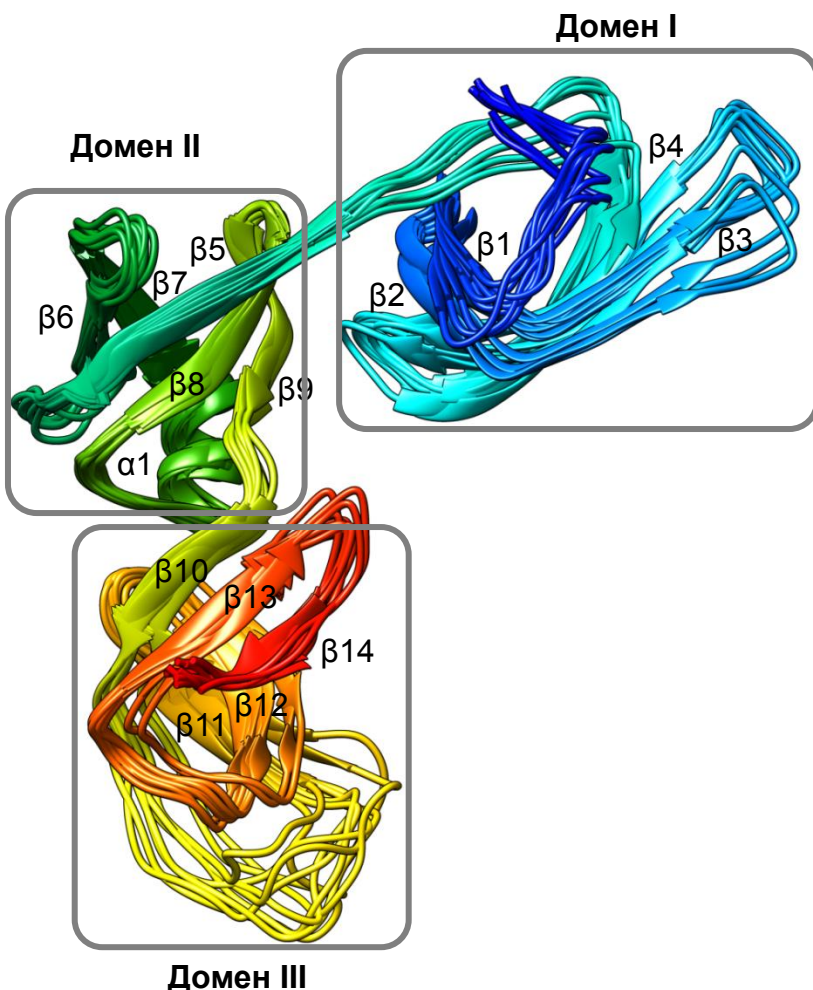
**Индексы химического сдвига для
аминокислотных остатков белка SaEF-P.**
Величины времени корреляции молекулярного
движения τ_c полученные по данным T_1/T_2
релаксации показаны треугольниками

3. Структурно-функциональный анализ элонгационного фактора Р из *S. aureus*



Для полученного образца белка в спектрах ЭПР наблюдалось уширение линии, обусловленное более медленным вращением молекулы белка по сравнению со свободной меткой, то есть происходило неполное усреднение по движению g- и A-компонент ($\Delta V_{pp} + 1 = 1.62$ Гс, $\Delta V_{pp0} = 1.41$ Гс, $\Delta V_{pp} - 1 = 2.54$ Гс), что означает, что спиновая метка была связана с белком. Время корреляции молекулярного движения метки MTSL, связанной с SaEF-P составляло $\tau_R = 8 \cdot 10^{-10}$ с

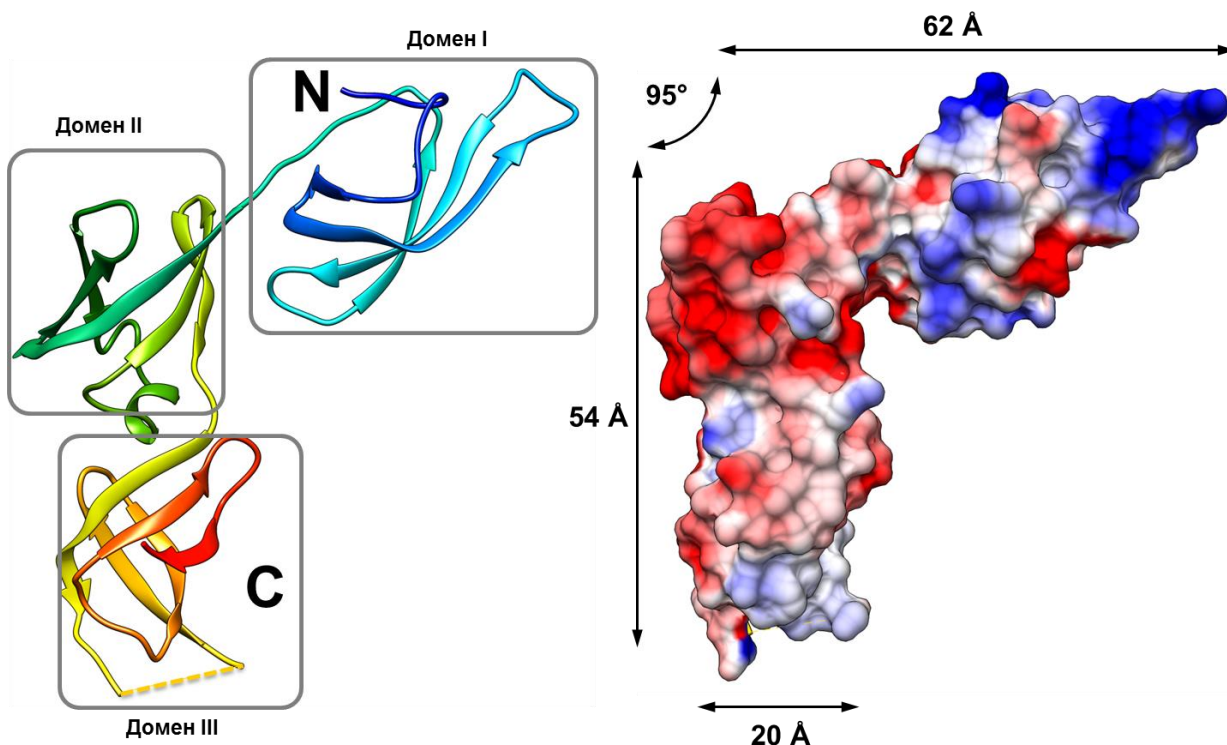
3. Структурно-функциональный анализ элонгационного фактора P из *S. aureus*



Всего ЯЭО контактов	4485
Дальнего диапазона ($ i-j > 4$)	1620
Среднего диапазона ($ i-j = 2,3,4$)	1746
Последовательные ($ i-j = 1$)	1224
Внутриостаточные	1119
Водородные связи	162
Ограничений на двугранные углы	
ϕ, ψ	201
Данные карты Рамачандрана	
Остатков в наиболее предпочтительных областях (%)	90.6
Остатков в разрешенных областях (%)	100.0
Среднеквадратичное отклонение атомов основной цепи в ансамбле из 10 структур (Å)	1.34 ± 0.27

Структура SaEF-P полученная методом спектроскопии ЯМР

3. Структурно-функциональный анализ элонгационного фактора P из *S. aureus*



Структура SaEF-P полученная методом PCA (1.48 Å)



Монокристаллы SaEF-P, пригодные для экспериментов по рентгеноструктурному анализу, были получены в следующих условиях: 0,2 М имидазол малат, pH = 5,5, 24% полиэтиленгликоль (600).

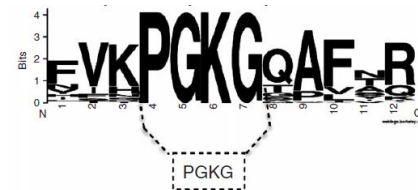
Эксперименты по рентгеноструктурному анализу проводились на линии Gemini синхротрона ESRF (Франция).

Сбор дифракционных данных

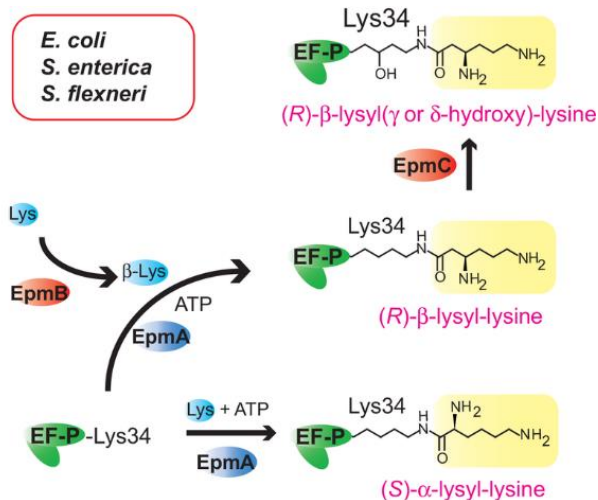
Пространственная группа	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Параметры элементарной ячейки	
a,b,c (Å)	30.27, 43.46, 126.34
$\alpha=\beta=\gamma(^{\circ})$	90
Область разрешения (Å)	41,1 - 1,48 (1,533 - 1,48)
R _{merge} (%)	0.04586 (0.7515)
R _{pim} (%)	0.01906 (0.3024)
Среднее значение I/σ(I)	20.44 (2.97)
Полнота набора (%)	99.88 (99.82)
Избыточность набора данных	6.9 (7.1)

Уточнение структуры

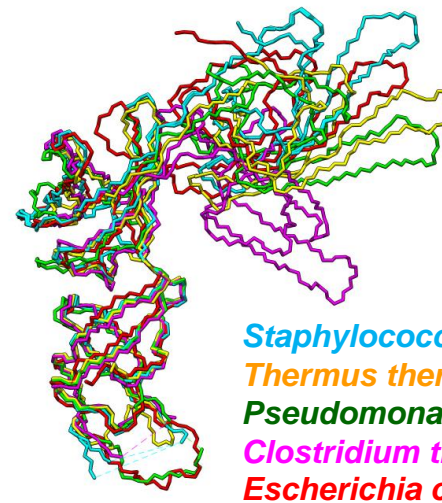
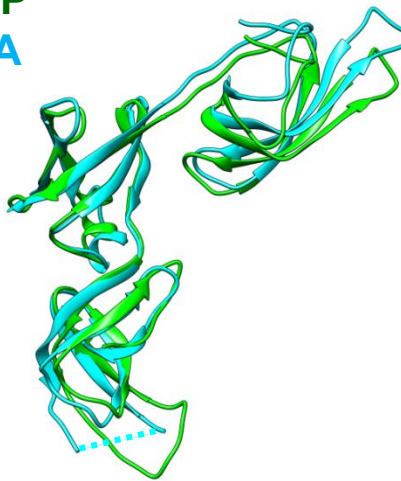
Количество отражений	28699 (2812)
R _{work}	0.1794 (0.2188)
R _{free}	0.2211 (0.2894)
Количество неводородных атомов	2012
Белка	1919
Воды	93
Средние тепловые B-факторы (Å ²)	27,44
Белка	27,03
Воды	35,77
Среднеквадратичные отклонения	
Длин связей (Å)	0,007
Углов связей (°)	0,88
Статистика Рамачадрана	
Наиболее предпочтительная область	98,86



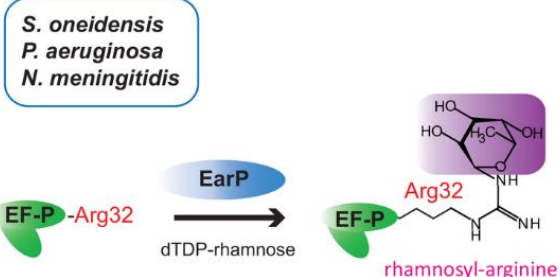
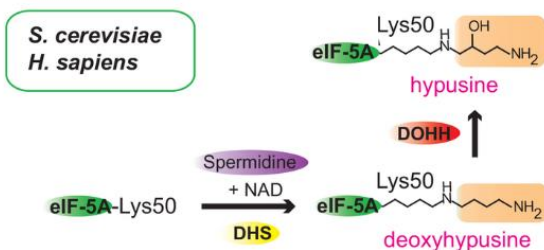
MISVNDFKTG LTISVDNAIW KVIDFQHVK **P GKG**SAFVRSK LRNLRTGAIQ 50
 EKTFRAGEKV EPAMIENRRM QYLYADGDNH VFMDNESFEQ TELSSDYLKE 100
 ELNYLKEGME VQIQTYEGET IGVELPKTVE LTVTETEPGI KGDTATGATK 150
 SATVETGYTL NVPLFVNEGD VLIINTGDGS YISRG



ЯМР
PCA



Staphylococcus aureus
Thermus thermophilus
Pseudomonas aeruginosa
Clostridium thermocellum
Escherichia coli



Domain I

Domain II

Domain III

Species and Residues:

- S. aureus* 177: G D G S Y I S R G - -
- B. sub* 177: T D G S Y V S R G - -
- C. therm* 177: R T G E Y M V R G - -
- E. coli* 179: R S G E Y V S R V K -
- T. therm* 176: R T G E Y V S R A - -
- P. aeru* 178: R T G E Y K S R V K A

Golubev A., ..., Usachev K., FEBS Open Bi

Golubev A., ..., Usachev K., FEBS Open Bio, 2020

3. Структурно-функциональный анализ элонгационного фактора Р из *S. aureus*

Cloning in *E. coli*



S. aureus

Lyz-HIS

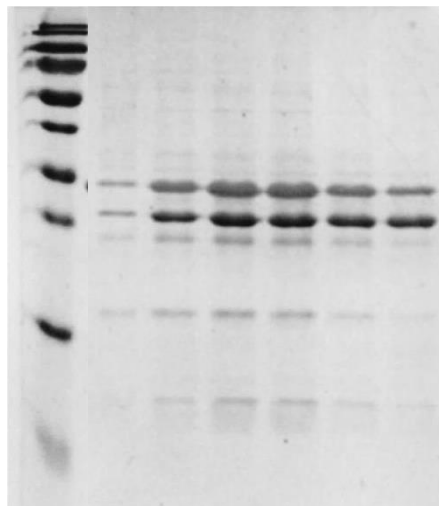
Ni-NTA

Mono Q

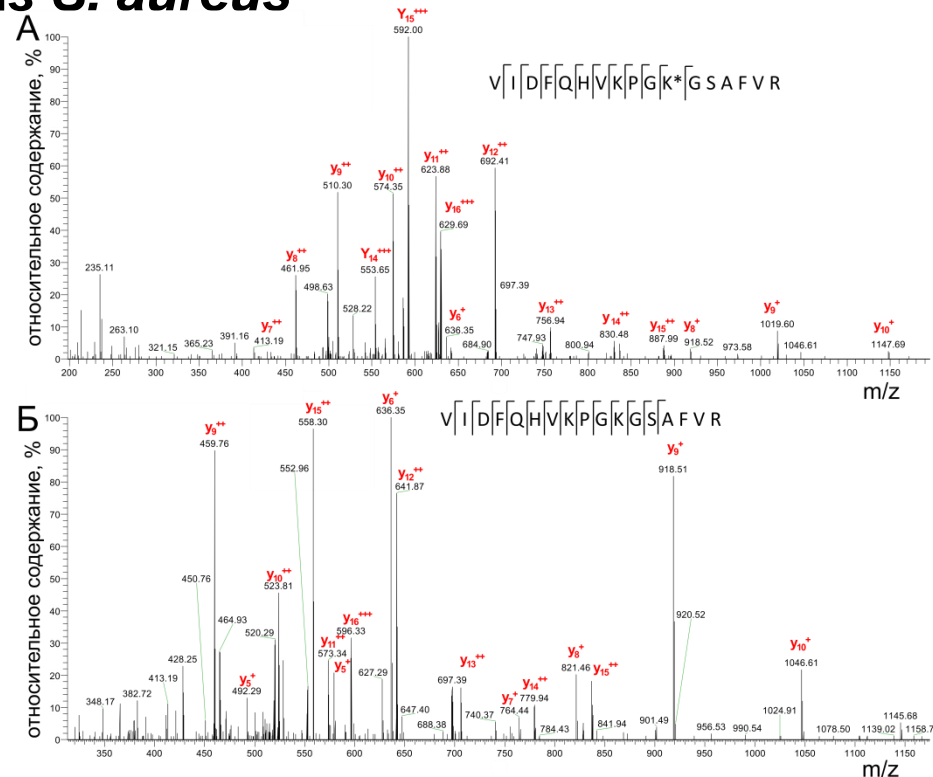
mSaEF-P

MS

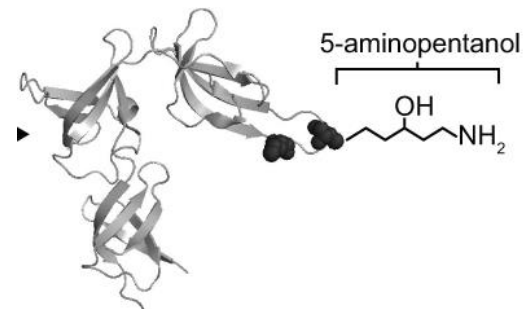
Lyz-HIS



← modified
← unmodified



Результаты масс-спектрометрического анализа EF-P из *S. aureus*.



3. Структурно-функциональный анализ элонгационного фактора Р из *S. aureus*

Результаты и выводы:

- Впервые определена структура элонгационного фактора Р из бактерии *Staphylococcus aureus* с высоким разрешением
- Показано, что высоко консервативный остаток Lys32 имеет посттрансляционную модификацию 5-аминопентанол, которая способствует образованию пептидной связи в процессе биосинтеза белков с полипролиновыми участками.

Раздел 4. Структурные исследования комплекса 70S рибосомы *S. aureus* с лигандами

4. Структура 70S рибосомы *S. aureus* с лигандами

6662 изображений

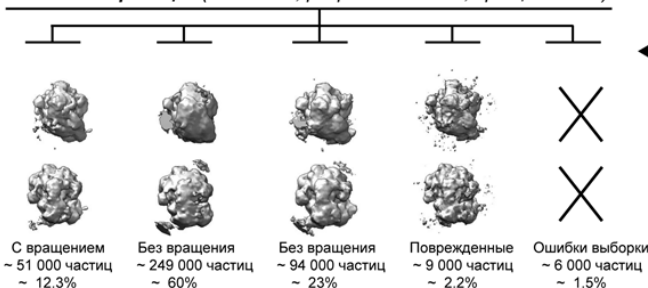
Выбор частиц

Ручная выборка
1300 частиц
Шаблон для автоматической
выборки
Изображения с высоким контрастом

Автоматическая выборка
555 500 частиц
Грубая оценка,
наличие ошибок в выборке частиц

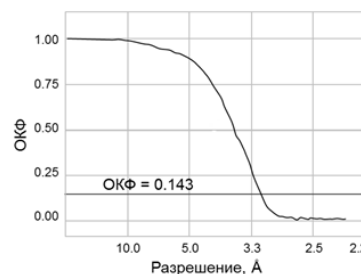
Извлечение частиц
Размер ячейки
300 пикс.
(330 Å)
Размер (1.1 Å²/пикс) 5X выборка (5.5 Å²/пикс)
Размер ячейки
60 пикс.
(330 Å)

3D классификация (5 классов, разрешение 20 Å, вращение 15°)

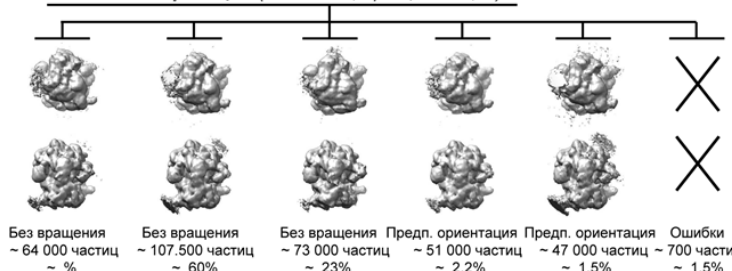


2D классификация (110 классов)

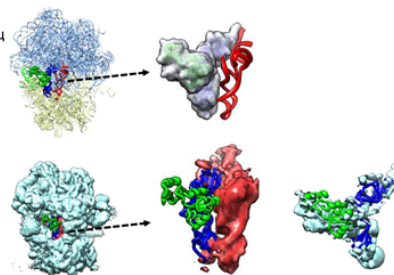
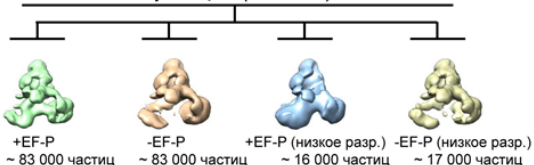
411 700 частиц
из 73 классов
исключены частицы с
ошибочной выборкой



3D классификация (5 классов, вращение 7,5°)



3D классификация (4 класса)



Сбор данных

Микроскоп

Камера

Напряжение (кВ)

Titan Krios S-FEG

CMOS (Gatan K2)

300

Продолжение Таблицы 3.8.

Увеличение

Размер пикселя (Å/пиксель)

Диапазон дефокусировки (мкм)

Суммарная доза облучения (ē/Å²)

Доза на кадр

96,000 X

1,10

(-1,5) – (-3,3)

60

~ 1,5

Уточнение структуры

Общее число частиц

Число частиц, используемое для 3D реконструкции

Разрешение (Å; ОКФ = 0.143)

Среднеквадратичные отклонения

Длин связей (Å)

Углов связей (°)

Хиральности (°)

Атомов СА основной цепи

6662

80 000

3,2

0,007

0,901

0

27 (0,53%)

Подтверждение структуры

Число стериических перекрытий атомов (> 0.4 Å на 1 000 атомов)

Белки

оценка MolProbity

Наиболее предпочтительных ротамеров

Статистика Рамачадрана

Наиболее предпочтительная область (%)

Запрещенная область (%)

Число некорректных водородных связей

Число некорректных двугранных углов

Цис-пролиновых остатков

Цис-не пролиновых остатков

РНК

Корректное положение изломов плоскости углеводного кольца

Корректные конформации атомов основной цепи

Число некорректных водородных связей

Число некорректных двугранных углов

2,52

1,39

4191 (92,95%)

4956 (94,94%)

1 (0,02%)

0 (0,00%)

30 (0,05%)

0 (0,00%)

0 (0,00%)

0 (0,00%)

0 (0,00%)

0 (0,00%)

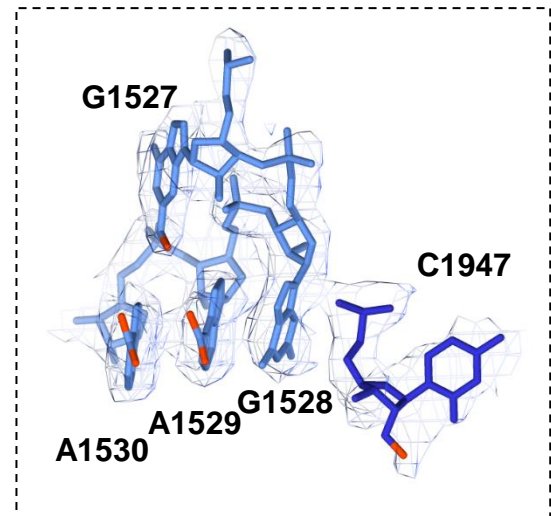
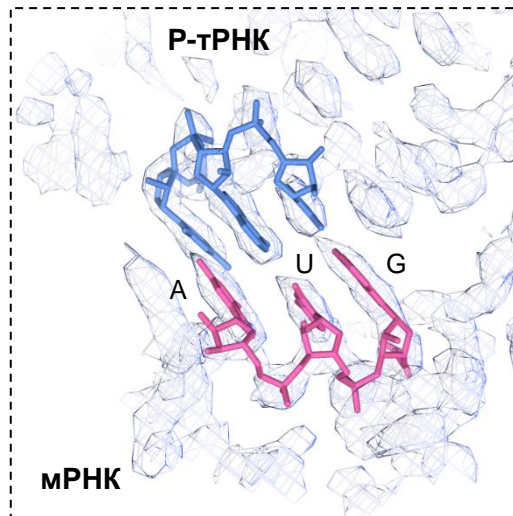
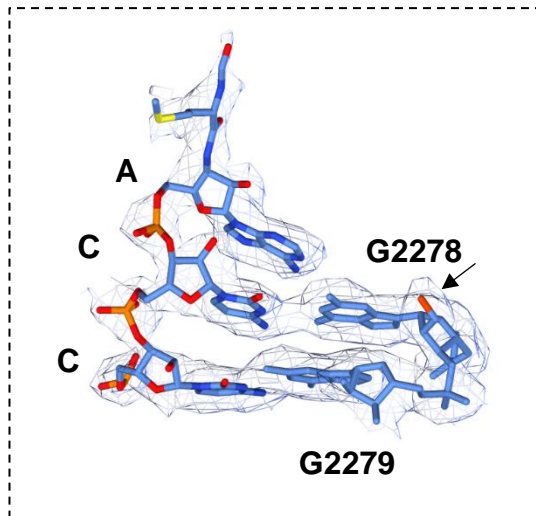
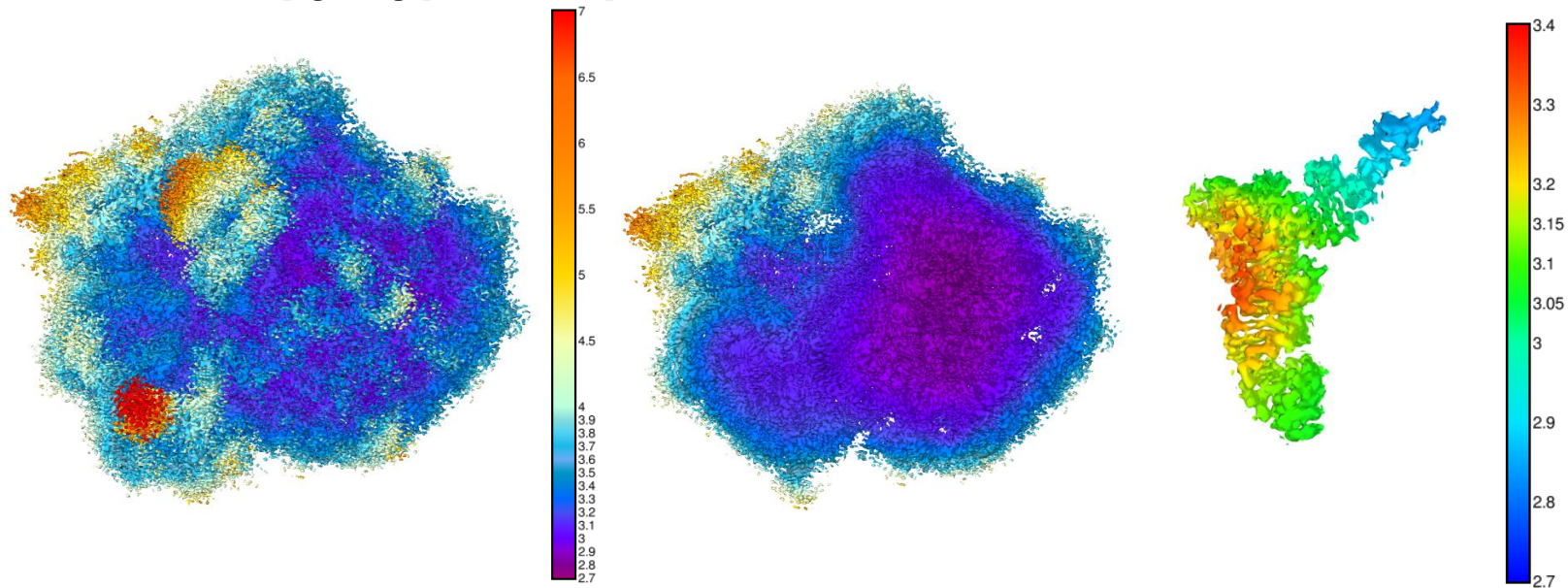
12 (0,28%)

952 (20,60%)

1 (0,00%)

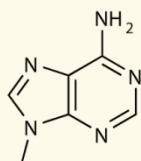
8 (0,00%)

4. Структура 70S рибосомы *S. aureus* с лигандами

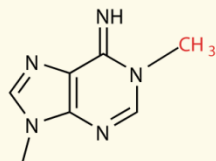


4. Структура 70S рибосомы *S. aureus* с лигандами

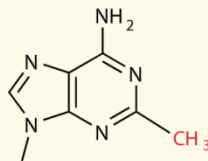
A



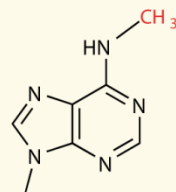
Аденозин (A)



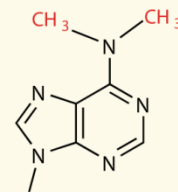
1-Метиладенозин (m¹A)



2-Метиладенозин (m²A)

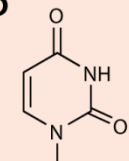


N⁶-Метиладенозин (m⁶A)

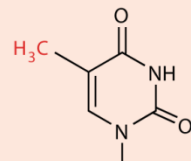


N⁶,N⁶-Диметиладенозин (m₂⁶A)

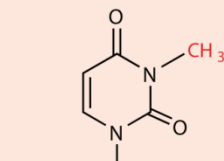
Б



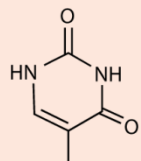
Уридин (U)



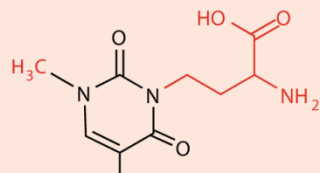
5-Метилуридин (m⁵U)



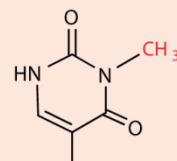
3-Метилуридин (m³U)



Псевдоуридин (Ψ)

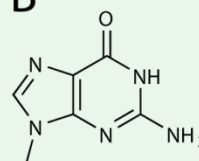


1-Метил-3-(3-амино-3-карбоксипропил)-псевдоуридин (m¹аср³Ψ)

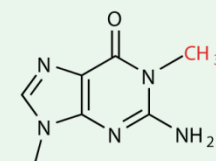


3-Метилпсевдоуридин (m³Ψ)

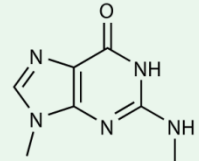
В



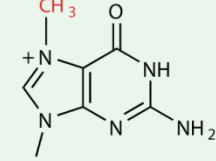
Гуанозин (G)



1-Метилгуанозин (m¹G)

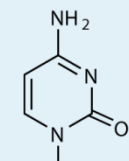


N²-Метилгуанозин (m²G)

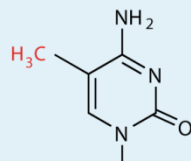


7-Метилгуанозин (m⁷G)

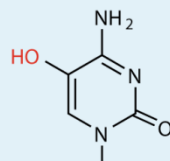
Г



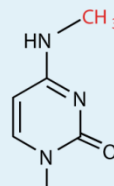
Цитидин (C)



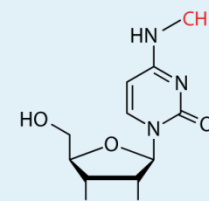
5-Метилцитидин (m⁵C)



5-Гидроксцитидин (ho²C)

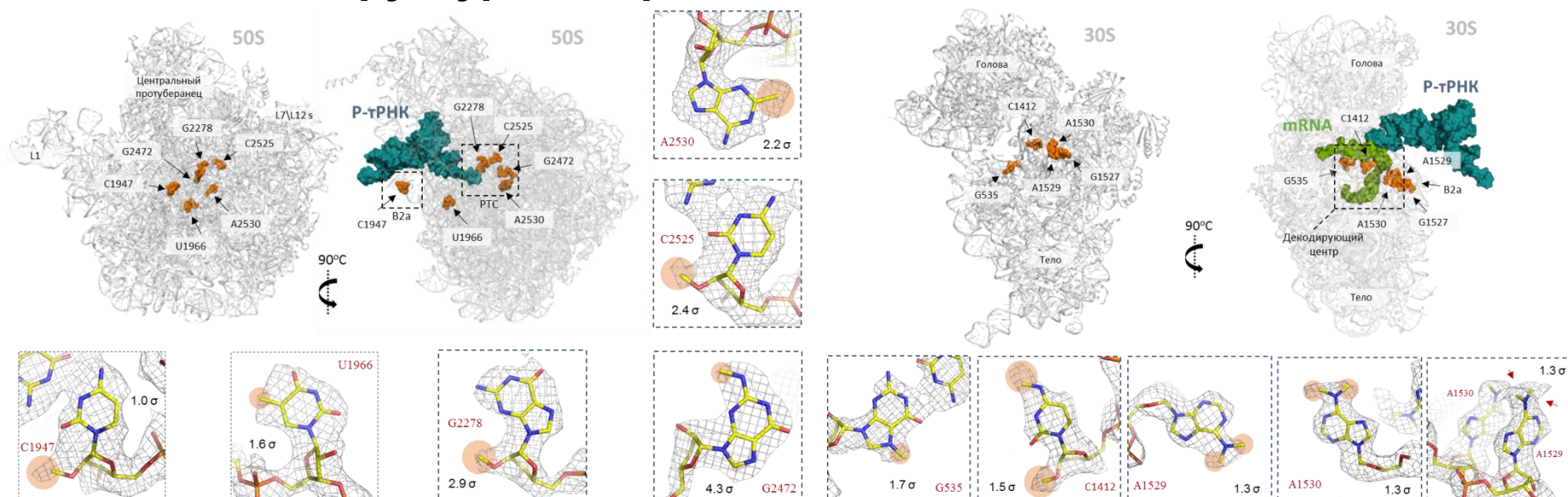


N⁴-Метилцитидин (m⁴C)

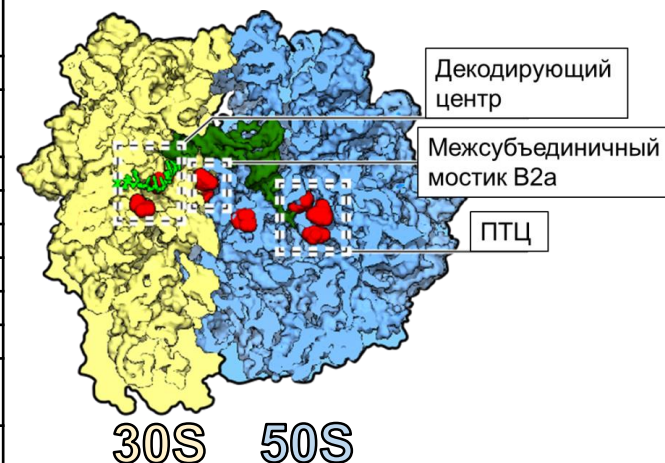


N⁴-2'-О-диметилцитидин (m⁴Cm)

4. Структура 70S рибосомы *S. aureus* с лигандами



Положение в E. coli	Положение в S. aureus	Тип модификации	Расположение модификации
23S рРНК			
-	C1947	2'-О-Метилцитидин	H69, межсубъединичный мостик
U1939	U1966	5-Метилуридин	ПТЦ, А-сайт
G2251	G2278	2'-О-Метилгуанозин	ПТЦ, Р-сайт
G2445	G2472	N2-Метилгуанозин	ПТЦ
C2498	C2525	2'-О- Метилцитидин	ПТЦ, ССА-конец Р-тРНК
A2503	A2530	2-Метиладенозин	ПТЦ, А-сайт
16S рРНК			
G527	G535	N7- Метилгуанозин	А-сайт, сайт связывания стрептомицина
C1402	C1413	N4, О 2' Диметилцитидин	Р-сайт, декодирующий центр
A1518	A1530	N6-Диметиладенозин	Р-сайт, декодирующий центр
A1519	A1531		



Golubev A., ..., Usachev K., *FEBS Letters*, 2020

4. Структура 70S рибосомы *S. aureus* с лигандами

Результаты и выводы:

- Определена структура 70S рибосомы *Staphylococcus aureus* с лигандами (мРНК и тРНК^{фМет}) разрешением 3,2 Å.
- Установлено наличие 10 модификаций нуклеотидов рРНК *S. aureus*, расположенных вблизи функциональных центров рибосомы (ПТЦ, декодирующий центр и межсубъединичный мостик).

ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ РАБОТЫ



1. По результатам исследования методом спектроскопии ЯМР высокого разрешения антимикробных пептидов протегринов установлен механизм их олигомеризации в мембраноподобных средах и предложена модель формирования трансмембранных пор.
2. Впервые на основе методов криогенной просвечивающей электронной микроскопии и спектроскопии ЯМР показан механизм гибернации рибосом *Staphylococcus aureus* за счет взаимодействия удлиненной формы белка HPF с рибосомой. Показано, что связывание N-концевого домена фактора гибернации SaHPF с декодирующим центром рибосомы *Staphylococcus aureus* может обеспечивать неспецифическую устойчивость к антибиотикам: гигромицину В, тетрациклину, эдеину, пактамицину и касугамицину.
3. Используя комплексный подход, включающий методы молекулярной биологии, биохимии и физические методы исследования вещества (рентгеновская макромoleкулярная кристаллография, спектроскопия ЯМР, криогенная просвечивающая электронная микроскопия) впервые установлено, что аминокислотные остатки F160, V162, I173, Y175, I185 играют ключевую роль в димеризации белка SaHPF и формировании 100S рибосом *S. aureus* и могут являться потенциальными мишенями для разработки ингибиторов механизма гибернации рибосом.
4. Впервые установлено, что в структуре элонгационного фактора P из *S. aureus* имеется посттрансляционная модификация 5-аминопентанол у высоко консервативного остатка Lys32, которая обеспечивает процесс образования пептидной связи при биосинтезе белков с полипролиновыми участками. Ингибирование работы ферментов модификаторов EF-P может выступать в качестве мишени для разработки антибактериальных препаратов, снижающих патогенные свойства золотистого стафилококка, за счет остановки синтеза белков, содержащих полипролиновые мотивы.
5. На основе данных криогенной просвечивающей электронной микроскопии впервые получена с высоким разрешением структура комплекса 70S рибосомы *S. aureus* с мРНК и тРНК^{фМет}, и обнаружено наличие 10 посттранскрипционных модификаций нуклеотидов рРНК, располагающихся вблизи функциональных центров (ПТЦ, декодирующий центр и межсубъединичный мостик). Ферменты, участвующие в образовании посттранскрипционных модификаций рРНК, могут выступать в качестве мишеней для разработки антистафилококковых препаратов, поскольку потеря модификаций может привести к нарушению в строении активных сайтов рибосомы и остановке биосинтеза белка у золотистого стафилококка.

ОПУБЛИКОВАННЫЕ РАБОТЫ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях:

1. **Usachev K.S.**, Efimov S.V., Kolosova O.V., Filippov A.V., Klochkov V.V. High-resolution NMR structure of the antimicrobial peptide protegrin-2 in the presence of DPC micelles // **Journal of Biomolecular NMR**. - 2015. - V. 61. - P. 227-234.
2. **Usachev K.S.**, Efimov S.V., Kolosova O.A., Klochkova E.A., Aganov A.V., Klochkov V.V. Antimicrobial peptide protegrin-3 adopt an antiparallel dimer in the presence of DPC micelles. A high-resolution NMR study // **Journal of Biomolecular NMR**. - 2015. - V.62. - P. 71-79.
3. Kolosova O.A., **Usachev K.S.**, Aganov A.V., Klochkov V.V. Antimicrobial Peptide Protegrins Interact with DPC Micelles by Apolar Hydrophobic Cluster: Structural Studies by High-Resolution NMR Spectroscopy // **BioNanoScience**. - 2016. - V. 6. - P. 317–319.
4. **Usachev K.S.**, Kolosova O.A., Klochkova E.A., Yulmetov A.R., Aganov A.V., Klochkov V.V. Oligomerization of the antimicrobial peptide protegrin-5 in membrane mimicking environment. Structural studies by high-resolution NMR spectroscopy // **European Biophysics Journal**. - 2017. - V.46. - P.293-300.
5. Khusainov I., Vicens Q., Ayupov R., **Usachev K.**, Myasnikov A., Simonetti A., Validov Sh., Kieffer B., Yusupova G., Yusupov M., Hashem Y. Structures and dynamics of hibernating ribosomes from *Staphylococcus aureus* mediated by intermolecular interactions of HPF // **The EMBO journal**. - 2017. - V. 36. - P. 2073-2087.
6. Аюпов Р.Х., **Усачев К.С.**, Киффер Б., Юсупов М.М. Выделение, очистка и анализ структуры методом спектроскопии ЯМР белка HPF из *S. aureus* // **Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные Науки**. - 2017. - Т. 152, № 2. - С.332-341.
7. **Usachev K.S.**, Ayupov R.Kh., Validov Sh. Z., Khusainov I. Sh., Yusupov M.M. NMR assignments of the N-terminal domain of *Staphylococcus aureus* Hibernation Promoting Factor (SaHPF) // **Biomolecular NMR Assignment**. - 2018. - V. 12. - P. 85-89.
8. **Usachev K.S.**, Golubev A.A., Validov Sh.Z., Klochkov V.V., Aganov A.A., Khusainov I. Sh., Yusupov M.M. Backbone and side chain NMR assignments for the ribosome Elongation Factor P (EF-P) from *Staphylococcus aureus* // **Biomolecular NMR Assignment**. 2018. - V. - 12. - P. 351-355.
9. Голубев А.А., Валидов Ш.З., **Усачев К.С.**, Юсупов М.М. Элонгационный фактор Р: новые механизмы работы и эволюционное разнообразие регуляции трансляции (Обзор) // **Молекулярная биология**. - 2019. - Т.53, - №4. - С. 561-573.
10. **Usachev K.S.** Klochkova E.A., Golubev A.A., Validov S.Z., Murzakhanov F.F., Gafurov M.R., Klochkov V.V., Aganov A.V., Khusainov I.Sh., Yusupov M.M. Structural Dynamics of a SpinLabeled ribosome Elongation Factor P (EF-P) from *Staphylococcus aureus* by EPR Spectroscopy // **Springer Nature Applied Science**. - 2019. - V. 1. - article number 442.
11. **Usachev K.S.**, Validov S.Z., Khusainov I.Sh., Klochkov V.V., Aganov A.V., Yusupov M.M. Solution structure of the N-terminal domain of the *Staphylococcus aureus* Hibernation Promoting Factor // **Journal of Biomolecular NMR**. - 2019. - V. - 73, № 5. - P. 223-227.
12. **Усачев К.С.**, Юсупов М.М., Валидов Ш.З. Гибернация – стадия функционирования рибосом (Обзор) // **Биохимия**. – 2020. – Т. 85(11). – С. ??-??
13. **Usachev K.S.**, Fatkhullin B.F., Klochkova E.A., Miftakhov A.K., Golubev A.S., Bikmullin A.G., Nurullina L.I., Garaeva N.S., Islamov D.R., Gabdulkhakov A.G., Lekontseva N.V., Tishchenko S.V., Balobanov V.A., Khusainov I.Sh., Yusupov M.M., Validov Sh.Z. Dimerization of long Hibernation Promoting Factor from of *Staphylococcus aureus*: structural analysis and biochemical characterization // **Journal of Structural Biology**. - 2020. - V. 209, №1. - article number 107408.
14. Golubev A., Fatkhullin B., Gabdulkhakov A., Bikmullin A., Nurullina L., Garaeva N., Islamov D., Klochkova E., Klochkov V., Aganov A., Khusainov I., Validov Sh., Yusupova G., Yusupov M., **Usachev K.** NMR and crystallographic structural studies of the Elongation Factor P from *Staphylococcus aureus* // **European Biophysics Journal**. – 2020. – V. 49. – P. 223-230.
15. Golubev A., Fatkhullin B., Khusainov I., Jenner L., Gabdulkhakov A., Validov Sh., Yusupova G., Yusupov M., **Usachev K.** Cryo-EM structure of the ribosome functional complex of the human pathogen *Staphylococcus aureus* at 3.2 Å resolution // **FEBS Letters**. – 2020. – V. ?.- P. ?-?.
16. Golubev A., Negroni L., Krasnovid F., Validov Sh., Yusupova G., Yusupov M., **Usachev K.** Posttranslational modification of Elongation Factor P from *Staphylococcus aureus* // **FEBS Open Bio**. – 2020. – V. 10. – P. 1342-1347.

ОПУБЛИКОВАННЫЕ РАБОТЫ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Избранные тезисы докладов на научных конференциях:

17. Khusainov I., Validov S., Ayupov R., **Usachev K.**, Yusupov M. Hibernating ribosomes of *Staphylococcus aureus* as a potential target for new therapeutics // **FEBS OpenBio**. - 2018. - V. 8 (S1). - P. 430.
18. **Usachev K.**, Validov S., Khusainov I., Ayupov R., Klochkov V., Aganov A., Kieffer B., Yusupov M. *Staphylococcus aureus* hibernation promoting factor interaction with 70S ribosome determined by high resolution NMR spectroscopy // **FEBS OpenBio**. - 2018. - V. 8 (S1). - P. 433.
19. **Usachev K.S.**, Bikmullin A.G., Fatkhullin B.F., Khusainov I.S., Gabdulkhakov A.G., Validov S.Z., Klochkov V.V., Aganov A.V., Kieffer B., Yusupov M.M. Solution NMR structure of Hibernation Promoting Factor reveals detailed interface of ribosome dimerization in *Staphylococcus aureus* // **Molecular Biology of the Cell**. – 2018 - V. 29, № 26. - P. 629-630.
20. Fatkhullin B.F., Gabdulkhakov A.G., Lekontceva N., Tischenko S.V., Khusainov I.S., Validov S.Z., Finkelstein A., **Usachev K.S.**, Yusupov M.M. Crystal structure of C-terminal domain homodimer of Hibernation Promoting Factor from *Staphylococcus aureus* // **Molecular Biology of the Cell**. - 2018 - V. 29, № 26. - P. 630.
21. Golubev A., Blokhin D., Khusainov I., Validov Sh., Yusupov M., **Usachev K.** Analysis of the polyproline protein content of *Staphylococcus aureus* // **Molecular Biology of the Cell**. - 2018 - V. 29, № 26. - P. 604-605.
22. Validov Sh., Golubev A., Khusainov I., **Usachev K.** Elongation factor P: on the journey to a new type of post translational modification // **Molecular Biology of the Cell**. - 2018 - V. 29, № 26. - P. 605-606.
23. Kolosova O., **Usachev K.**, Klochkova E., Klochov V. Structure investigations of PG-4 by High Resolution NMR spectroscopy // **Molecular Biology of the Cell**. - 2018 - V. 29, № 26. - P. 561.
24. **Усачев К.С.**, Хусаинов И.Ш., Фатхуллин Б.Ф., Валидов Ш.З., Клочков В.В., Аганов А.В., Юсупов М.М. Структурные исследования механизма гибернации рибосом *Staphylococcus aureus* с целью поиска новых мишеней для антибиотиков // **Наука и инновационные технологии**. - 2018. - Т. 3, № 8. - С. 64-66.
25. **Usachev K.**, Khusainov I., Fatkhullin B., Validov Sh., Yusupov M. Structural and functional studies of the *Staphylococcus aureus* ribosome hibernation // **International Journal of Biomedicine**. - 2019. - V. 9(S1). - P. 11-12.



Спасибо за внимание!