

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
ИНСТИТУТ ФИЗИКИ
Кафедра медицинской физики

На правах рукописи



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**

03.01.02 – Биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ

На соискание ученой степени доктора физико-математических наук

Научные консультанты:
д.х.н., проф. Клочкин В.В.
к.б.н., в.н.с. Юсупов М.М.

Казань – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	6
Глава 1. Обзор литературы	17
1.1. Структурные методы исследования биомолекул и макромолекулярных комплексов	18
1.1.1. Спектроскопия ЯМР высокого разрешения	19
1.1.2. Рентгеноструктурный анализ	38
1.1.3. Криогенная просвечивающая электронная микроскопия	59
1.2. Рибосомы и биосинтез белка	69
1.3. Механизмы устойчивости к антибиотикам золотистого стафилококка	83
Глава 2. Краткая характеристика объектов и методов исследования.	115
2.1. Спектроскопия ЯМР	116
2.2. Рентгеноструктурный анализ	120
2.3. Криогенная просвечивающая электронная микроскопия	121
2.4. Спектроскопия ЭПР	123
2.5. Реактивы и препараты.	123
2.6. Общие методы работы с нуклеиновыми кислотами и белками	126
Глава 3. Структурные исследования антимикробных пептидов протегринов	133
3.1. Определение пространственной структуры протегринов PG-2, PG-3, PG-4 и PG-5 методами спектроскопии ЯМР	134
3.2. Димеризация протегринов	141
Глава 4. Молекулярный механизм гибернации рибосом <i>S. aureus</i>	143

4.1. Структурные исследования белка SaHPF	144
4.2. Реконструкция <i>in vitro</i> 100S рибосом <i>S. aureus</i>	162
4.3. Структурные исследования 100S димеров рибосом <i>S. aureus</i> методом криоэлектронной микроскопии	165
4.4. Анализ влияния мутаций в интерфейсе димеризации белка С-концевого домена SaHPF на димеризацию рибосом	178
Глава 5. Структурно-функциональный анализ элонгационного фактора Р из <i>S. aureus</i>	182
5.1. Структурные исследования белка SaEF-P	183
5.2. Посттрансляционная модификация SaEF-P	194
Глава 6. Структурные исследования комплекса 70S рибосомы <i>S. aureus</i> с лигандами	197
6.1. Определение пространственной структуры комплекса 70S рибосомы <i>S. aureus</i> с мРНК и тРНК ^{фМет}	197
6.2. Посттранскрипционные модификации рРНК <i>S. aureus</i>	203
Заключение	214
Благодарности	216
Список цитируемой литературы	217
Список авторских публикаций по теме диссертации	257

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

CSI	Chemical shift index
CSI	Chemical shift index
CTF	contrast transfer function
DHPC	дигексаноилфосфатидилхолин
DMPC	димиристоилфосфатидилхолин
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	этилендиаминтетрауксусная кислота
HPF	Hibernation promoting factor
MRSA	Устойчивый к метициллину <i>S. aureus</i>
MTSL	S-(1-оксил-2,2,5,5-тетраметил-2,5-дигидро-1H-пиррол-3-ил)метил метантиосульфат
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PSF	Point Spread Function
RDC	Residual dipolar coupling
RMF	Ribosome modulation factor
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>T. thermophilus</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
a.o.	аминокислотный остаток
aa-тРНК	аминоацил-тРНК
АКФ	автокорреляционная функция
АМП	антимикробные пептиды
ГТФ	гуанозинтрифосфат
ДДВ	диполь-дипольное взаимодействие
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДСН	додецилсульфат натрия
ДСС	2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфонат натрия

ДФХ	додецилфосфохолин
ИХС	индекс химического сдвига
ККФ	кросс-корреляционная функция
Крио-ЭМ	криоэлектронная микроскопия
ЛПС	липополисахарид
мРНК	матричная рибонуклеиновая кислота
ОКФ	объёмная корреляция Фурье
ПААГ	полиакриламидный гель
ПТЦ	пептидил трансферазный центр
ПЭГ	полиэтиленгликоль
ПЭМ	просвечивающая электронная микроскопия
РНК	рибонуклеиновая кислота
рРНК	рибосомная рибонуклеиновая кислота
рРНК	рибосомная РНК
РСА	рентгеноструктурный анализ
тРНК	транспортная рибонуклеиновая кислота
тРНК ^{фМет}	формилметионин-тРНК
ФАР	функция атомного рассеяния
ФРТ	функция рассеяния точки
ЧКХ	частотно-контрастная характеристика
ЭПР	электронный парамагнитный резонанс
ЯМР	ядерный магнитный резонанс
ЯЭО	ядерный эффект Оверхаузера

ВВЕДЕНИЕ

Развитие современных биофизических методов исследования структуры, свойств и функций биологических макромолекул, произошедшее за последние десятилетия, совершило настоящую революцию в ряде областей знаний физики, химии и биологии. Разработка многомерных методов спектроскопии ЯМР высокого разрешения позволила впервые изучать структуру и динамику биомолекул в растворе – состоянии наиболее близком к нативным условиям. Определение методом рентгеноструктурного анализа (РСА) с атомарным разрешением структуры таких асимметричных макромолекулярных комплексов как рибосомы позволило установить специфику их функционирования. Создание нового поколения детекторов для криогенной просвечивающей электронной микроскопии (крио-ЭМ) привело к так называемой «революции в разрешении» (“resolution revolution” в англоязычной литературе), что открыло новые возможности в изучении структуры и функции биомолекул без кристаллизации, например мембранных белков и вирусов. Прогресс, достигнутый в увеличении расчетных мощностей современных суперкомпьютеров, позволяет на основе экспериментально определенных пространственных структур биомолекул проводить поиск потенциальных ингибиторов биохимических процессов биоинформатическими методами. Эти, вне всякого сомнения, выдающиеся успехи в приведенных выше областях знаний позволяют применять биофизические методы для решения наиболее актуальных задач медицины и фармакологии, таких как борьба с новыми штаммами патогенных бактерий, обладающих множественной устойчивостью к существующим антибиотикам. Одной из наиболее значимых проблем в современной медицине является отсутствие эффективных методов борьбы со штаммами золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*) с множественной устойчивостью к антибиотикам. Число инфекций, вызванных устойчивыми к метициллину штаммами золотистого стафилококка (MRSA), увеличивается примерно на 30% в течение каждого десятилетия. Недавно найденные на

территории Российской Федерации штаммы золотистого стафилококка с множественной устойчивостью к антибиотикам, подтверждают необходимость изменения подходов к диагностике, лечению и принятию срочных мер по сдерживанию распространения стафилококковых инфекций [1].

Большинство известных на сегодняшний день антибиотиков действуют на следующие основные мишени в бактериальных клетках: клеточную стенку и компоненты процесса синтеза клеточной стенки; аппараты синтеза белка и нуклеиновых кислот. В свою очередь, устойчивость к бактериям может быть опосредованно связана с рядом механизмов: от предотвращения проникновения антибиотика через барьер клеточной стенки до разрушения лекарственного средства внутри клетки.

Одним из активно развивающихся в настоящее время направлений поиска новых бактерицидных веществ является применение молекул пептидной природы, продуцируемых в клетках организма «хозяина». Данный класс пептидов называют «антимикробными пептидами» (АМП), «защитными пептидами», «катионными антимикробными пептидами» или «антибактериальными пептидами». Интерес к АМП обусловлен их широким спектром механизмов действия против патогенов, а также неспецифическим связыванием с молекулами патогена в отличие от обычных антибиотиков. К таким АМП относятся протегрины - богатые аргинином и цистеином катионные пептиды (16-18 аминокислотных остатков), выделенные из лейкоцитов свиней и обладающие антимикробной активностью в отношении широкого круга микроорганизмов, в том числе MRSA [2]. Предполагается, что антибактериальный механизм действия протегринов основан на связывании положительно заряженных остатков протегринов с отрицательно заряженной поверхностью мембраны. Накопление на поверхности бактериальной мембраны молекул протегринов приводит к их ассоциации в олигомерные образования и формированию трансмембранных пор, что ведет к нарушению клеточного гомеостаза и гибели клетки. Несмотря на

имеющуюся информацию об активности протегринов в отношении бактериальных клеток, детали механизма их взаимодействия с клеточной мембраной на структурном уровне с высоким разрешением остаются мало изученными.

Другое направление поиска новых антибактериальных препаратов основано на поиске веществ, способных останавливать биосинтез белка в клетке. Действие порядка 40% антибиотиков направлено на остановку работы рибосомы. Рибосома является наиболее значимым, самым сложным компонентом белок-синтезирующего аппарата клетки и представляет собой асимметричный макромолекулярный РНК-белковый комплекс, состоящий из двух субъединиц, каждая из которых имеет определенную структурную и функциональную организацию, выполняющих различные функции в процессе трансляции. Большинство антибиотиков, действующих на рибосому, обладают низкой селективностью в силу консервативности строения активных центров рибосом различных организмов. Таким образом, связывание антибиотика с консервативным участком рибосомы приводит к остановке трансляции как в прокариотических, так и в эукариотических клетках, что приводит к возникновению побочных эффектов при антибиотикотерапии. Одним из перспективных направлений поиска новых мишеней для разработки высокоселективных антибиотиков является регуляция процесса трансляции патогенов путем воздействия на специфические бактериальные белковые факторы, управляющие работой рибосомы.

Наряду со специализированными системами защиты от антибиотиков у бактерий имеются и неспецифичные физиологические механизмы. При недостатке питательных веществ или накоплении ингибиторов бактерии переходят в стационарную фазу роста, в которой у этих микроорганизмов наблюдаются физиологические изменения, повышающие их устойчивость к стрессам, в том числе, и к воздействию антибиотиков. Бактерии реагируют на неблагоприятные условия путем регуляции процессов модулирующих

экспрессию генов белков. Эта регуляция имеет важнейшее значение для преодоления стресса и адаптации к новым условиям. Регуляция стресс-ответа включает в себя несколько путей, контролирующих процессы транскрипции ДНК, синтеза белка, а также стабильности транскриптов мРНК и вновь синтезированной полипептидной цепи. В условиях стресса часть рибосом перестает участвовать в процессе трансляции за счет связывания с ними специальных белковых факторов (факторов гибернации) [3]. Это позволяет клетке сохранять функциональные рибосомы, которые после снятия стрессовых условий вновь способны начать участвовать в процессе трансляции. Кроме того, показано, что факторы гибернации также конкурируют с антибиотиками за места связывания на функциональных частях рибосомы. Вероятно, данные факторы могут способствовать выживанию бактерий при проведении курсов антибиотикотерапии, что может становиться причиной хронических инфекций.

Таким образом, **актуальность исследования** продиктована необходимостью понимания молекулярных механизмов, обеспечивающих устойчивость бактерии *S. aureus* к антибиотикам, и поиску новых подходов борьбы с данным патогеном.

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.

Задачи работы:

1. Определить механизм олигомеризации протегринов PG2, PG3, PG4, PG5 в мембраномоделирующем окружении на основе данных спектроскопии ЯМР высокого разрешения.
2. Исследовать структуру и динамику факторов регуляции трансляции HRF и EF-P из *S. aureus* по данным спектроскопии ЯМР высокого

разрешения, спектроскопии ЭПР, рентгеноструктурного анализа и просвечивающей криогенной электронной микроскопии.

3. Установить с атомарным разрешением детали взаимодействия факторов регуляции трансляции HPF и EF-P с рибосомой *S. aureus*.
4. Установить молекулярный механизм гибернации рибосом *S. aureus*.
5. Определить детали механизма взаимодействия мРНК и тРНК с рибосомой *S. aureus*.
6. Установить наличие и тип посттранскрипционных модификаций рРНК *S. aureus*.

Научная новизна работы:

- 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, что позволило на молекулярном уровне объяснить механизм формирования трансмембранных пор.
- Установлен молекулярный механизм формирования 100S димеров рибосом золотистого стафилококка за счет белок-белкового взаимодействия удлиненной формы белка HPF.
- Впервые определена структура и внутримолекулярная динамика белка EF-P из *S. aureus* и установлено наличие посттрансляционной модификации 5-аминопентанола в положении K32 в высококонсервативном мотиве PGKG домена I.
- Впервые методом криогенной просвечивающей электронной микроскопии с разрешением 3,2 Å установлена пространственная структура 70S рибосомы *S. aureus* с лигандами (мРНК и тРНК^{фМет}) и показаны детали молекулярного механизма их взаимодействия.

- Впервые установлено наличие 10 посттранскрипционных модификаций рРНК *S. aureus*.

Положения, выносимые на защиту

- 1) Протегрины в мембраномоделирующем окружении формируют антипараллельные димеры.
- 2) Гибернационные белки могут обеспечивать неспецифическую устойчивость к антибиотикам путем конкурентного связывания с активными сайтами рибосомы.
- 3) Структура 100S димера рибосом *S. aureus* стабилизируется за счет белок-белкового взаимодействия С-концевых доменов удлиненной формы белка НРФ.
- 4) Элонгационный фактор Р из *S. aureus* имеет посттрансляционную модификацию 5-аминопентанол в высоко консервативном остатке Lys32, обеспечивающую биосинтез белков с полипролиновыми участками.
- 5) В структуре рибосомы *S. aureus* имеется 10 посттранскрипционных модификаций нуклеотидов рРНК, располагающихся вблизи функциональных центров.

Теоретическая и практическая значимость работы:

- 1) Показано, что в основе механизма формирования трансмембранных пор антимикробными пептидами протегринами лежит процесс димеризации протегринов, что может быть использовано для разработки схожих по пространственному строению новых синтетических препаратов пептидной природы с широким спектром антимикробной активности.
- 2) Показано, что мутации аминокислотных остатков, участвующих в белок-белковом взаимодействии С-концевого домена белка SaНРФ, либо добавление в раствор димеров рибосом изолированного С-концевого домена SaНРФ нарушает процесс димеризации рибосом, что может использоваться для создания препаратов пептидной природы, ингибирующих процессы димеризации и гибернации рибосом *S. aureus*.

- 3) Показано наличие посттрансляционной модификации 5-аминопентанола в структуре белка EF-P из *S. aureus*, что открывает возможность поиска ингибиторов нарушающих работу ферментов, участвующих в посттрансляционной модификации, с целью снижения патогенных свойств золотистого стафилококка за счет остановки синтеза белков с полипролиновыми мотивами.
- 4) Показано наличие посттранскрипционных модификаций рРНК *S. aureus*, что может быть использовано для поиска ингибиторов нарушающих работу ферментов, участвующих в образовании посттранскрипционных модификаций рРНК, с целью нарушения строения активных сайтов рибосомы и остановки биосинтеза белка у золотистого стафилококка.

Инструментарий, методы и подходы исследования

В данной работе использовался комплексный подход на основе современных методов биофизики (спектроскопия ЯМР высокого разрешения, спектроскопия ЭПР, криогенная просвечивающая электронная микроскопия, макромолекулярная кристаллография, масс-спектрометрический анализ) и молекулярной биологии (экспрессия и очистка индивидуальных компонент клетки для структурных исследований). 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; методом спектроскопии ЭПР на спектрометре X-диапазона (9,6 ГГц) Elexsys 680 производства Bruker; методом макромолекулярной кристаллографии на монокристалльном дифрактометре Rigaku Synergy-S с микрофокусным источником рентгеновского излучения с медным анодом, оснащенный четырёхкружным каппа гониометром и двумерным высокоскоростным детектором на основе гибридных пикселей HyPix-6000HE, и на линиях Proxima1 синхротрона Soleil (г. Сент-Обен, Франция) и Gemini синхротрона ESRF (г. Гренобль, Франция); а также

методом криогенной просвечивающей электронной микроскопии на микроскопе Titan Krios (FEI, Нидерланды), оснащенного пушкой автоэлектронной эмиссии при энергии ускорения электронов 300 КэВ, в Институте генетики, молекулярной и клеточной биологии (I.G.V.M.C., г. Страсбург, Франция).

Объекты исследования:

- образцы пептидов протегринов PG2, PG3, PG4 PG5, полученных методом твердофазного синтеза;
- штаммы бактерий *E. coli* (DH5 α , BL21 (DE3)) и *S. aureus* (RN6390);
- генно- инженерные конструкции и вектора pET28a и pGS21a для экспрессии в *E. coli*;
- образцы рекомбинантных белков HPF, EF-P и их модификации с природным содержанием изотопов и обогащенных по изотопам $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$;
- образцы мРНК и тРНК^{фMet}
- образцы рибосом *S. aureus*.

Апробация результатов. Работа выполнялась в научной лаборатории ЯМР кафедры медицинской физики Института физики и в научно-исследовательской лаборатории Структурная биология Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета. Результаты исследований представлялись на международных и всероссийских научных конференциях, школах и семинарах, ежегодных итоговых конференциях КФУ, докладывались на заседаниях кафедр медицинской физики и кафедры физики молекулярных систем Института физики КФУ. Среди мероприятий, на которых были представлены результаты работы: 43-й конгресс федерации биохимических обществ Европы (FEBS) (Прага, Чехия, 2018); международные школы-конференции молодых ученых Spinus (Санкт-Петербург, 2016, 2020), «Материалы и технологии XXI века Казань» (Казань, 2016), "Actual problems of magnetic resonance and its application" (Казань, 2018), «Биология – наука

XXI века» (Пушино, 2019); международные конференции BIOMEMBRANES (Долгопрудный, 2016), «Трансляционная медицина: настоящее и будущее» (Казань, 2016), "31th Rhine-Knee Regional Meeting" по Структурной биологии (Мюнстер, Франция, 2017), ASCB-EMBO meeting 2018 (Сан-Диего, США, 2018), Постгеном-2018 (Казань, 2018), "Ribosome and translation" (Петергоф, 2018), "Инновационные технологии и передовые решения" (Бишкек, Киргизия, 2018), EPR-75 (Казань, 2019), Russian International Conference on Cryoelectron Microscopy 2019 (Москва, 2019); XXVIII Российская конференция по электронной микроскопии (Черноголовка, 2020), международный симпозиум «Магнитный резонанс: от фундаментальных исследований к практическим приложениям» (Казань, 2016); XI Всероссийская школа-конференция молодых ученых «Теоретическая и экспериментальная химия жидкофазных систем» (Иваново, 2017), X Всероссийский конгресс молодых ученых-биологов «Симбиоз – 2017» (Казань, 2017), Научная конференция грантодержателей РФ «Современные тенденции в химии, биологии, медицине. От молекулы к лекарству» (Казань, 2018), «Актуальные проблемы магнитного резонанса и его применение» (Казань, 2018), Итоговая научная конференция сотрудников Казанского университета (Казань, 2017, 2018, 2019), Международная научная конференция «Наука будущего – наука молодых» (Сочи, 2019) и др.

Список авторской литературы по теме диссертации включает 25 наименований. Из них 16 научных статей (в том числе 2 обзора) в международных рецензируемых журналах, индексируемых системами Web of Science и Scopus [A1-A16] и 9 публикаций в специальных выпусках журналов, опубликованных в рамках международных конференций [A17-A25]. Согласно базе данных научных публикаций Web of Science на 08.11.2020 г., из представленных работ 4 опубликованы в изданиях, входящих в первый квартиль (Q1) по различным научно-естественным направлениям, а общее число ссылок на научные статьи автора,

индексируемые этой базой и представленные в данной работе, составляет 105.

Полученные в работе 12 пространственных структур пептидов, белков, рибосом и их комплексов были депонированы в международный банк структур PDB (2MUN, 2MZ6, 6QKF, 2NC7, 6QBZ, 5NKO, 5OOX, 5ND8, 5ND9, 6RK3, 6RJI, 6YEF).

Достоверность полученных результатов обеспечена применением широко апробированных подходов на основе современных методов спектроскопии ЯМР высокого разрешения, спектроскопии ЭПР, криогенной просвечивающей электронной микроскопии, макромолекулярной кристаллографии, масс-спектрометрического анализа, воспроизведением ряда результатов в ведущих лабораториях мира.

Личное участие заключалось в выборе направления исследований и постановке задач. Проведенные исследования являлись междисциплинарными и частично выполнялись с участием коллег из НИЛ Структурная биология Института фундаментальной медицины и биологии КФУ (Валидовым Ш.З., Аюповым Р.Х., Фатхуллиным Б.Ф., Голубевым А.А. под руководством автора, а также аспирантом кафедры медицинской физики Института физики КФУ при научной консультации автора: Колосовой О.А.), что было отражено в публикациях, в которых автору принадлежит основная роль в формулировании направления исследований, постановке экспериментов и обработке полученных результатов. Ряд работ проводился в сотрудничестве с коллегами из Института генетики, молекулярной и клеточной биологии (I.G.V.M.C., г. Страсбург, Франция), что отражено в публикациях.

На разных этапах исследования финансировались из следующих источников: Министерство образования и науки РФ (государственное задание на 2012-2014 гг., руководитель Клочков В.В.), Министерство образования и науки РФ (Проектное финансирование 2014-2015 гг., руководитель Клочков В.В.). Программа повышения конкурентоспособности

(«5-100») Министерства науки и высшего образования для КФУ (2016-2020 гг., НИЛ «Структурная биология», руководитель К.С. Усачев); Российский научный фонд (грант РНФ 16-14-10014, руководитель М.М. Юсупов, грант РНФ 17-74-20009, руководитель К.С. Усачев); Российский фонд фундаментальных исследований (грант РФФИ 16-34-60001, руководитель К.С. Усачев); стипендия им. И.И. Мечникова посольства Франции в России (Усачев К.С.).

Структура и объем диссертации: Диссертация состоит из списка сокращений, введения, шести глав, заключения, благодарностей, списка цитируемой литературы (377 наименований), списка авторских трудов из 26 наименований, в том числе 16 статей (2 – обзорные), индексируемые базами Scopus, Web of Science. Общий объем диссертации составляет 260 страниц, включая 91 рисунок и 19 таблиц, 43 страницы цитируемой и авторской литературы.

Обзор литературы

В данной главе приводится обзор существующих методов структурных исследований биомолекул и макромолекулярных комплексов, таких как спектроскопия ЯМР высокого разрешения, рентгеноструктурный анализ и криогенная просвечивающая электронная микроскопия. Дается описание теоретических и практических аспектов применения данных методов. Также приводится описание основных этапов биосинтеза белка, описывается строение рибосом и различия в строении рибосом прокариот и эукариот. Рассматриваются механизмы действия антибиотиков, и формулируется проблема устойчивости к ним штаммов золотистого стафилококка. Дан обзор существующей информации об особенностях строения рибосом золотистого стафилококка. Приведен обзор литературных данных по применению молекул пептидной природы, продуцируемых в клетках организма «хозяина», которые способны препятствовать росту либо уничтожать патогенные организмы. Данный класс пептидов называют «антимикробными пептидами» (АМП). АМП представляют большой интерес в клинических исследованиях благодаря их широкому спектру активности, возможности комбинации нескольких механизмов действия и высокой активности, которая сводит к минимуму устойчивость к этим молекулам. Механизм действия АМП носит селективный характер, поскольку они ориентированы на ключевые структурные и физиологические особенности патогенных микроорганизмов, и, следовательно, наличие генетически приобретенной устойчивости к АМП у патогена менее вероятно. Далее в главе описываются механизмы гибернации рибосом, а также описываются механизмы действия ряда факторов трансляции и элонгации.

1.1. Структурные методы исследования биомолекул и макромолекулярных комплексов

К настоящему времени достигнут существенный прогресс в изучении структуры индивидуальных компонент живой клетки и молекулярных механизмов протекающих в ней. Информация, полученная методами структурной биологии, позволила подойти к моделированию в трехмерном пространстве биохимических реакций. Основными экспериментальными методами структурной биологии являются рентгеноструктурный анализ, спектроскопия ЯМР и криоэлектронная микроскопия (Рис. 1). Каждый из методов имеет свои достоинства и недостатки, поэтому их совместное использование позволяет дополнять картину изучаемых процессов. Далее приводится описание всех трех методов используемых в данной работе.

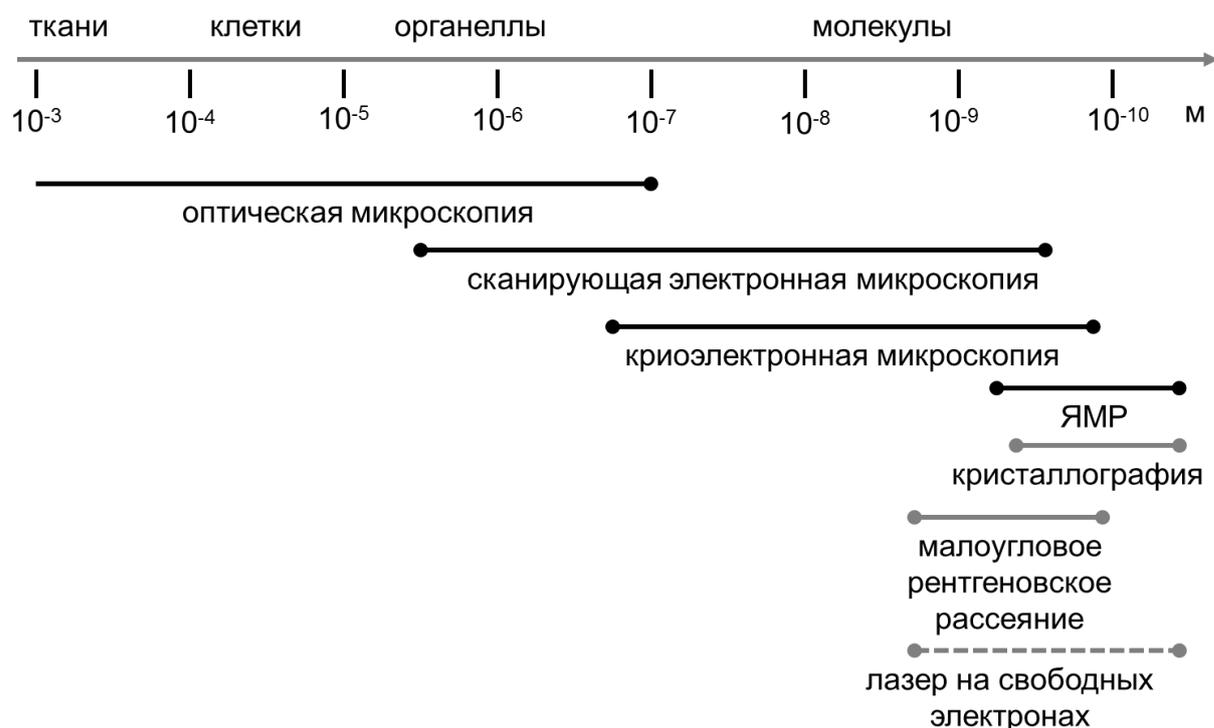


Рисунок 1. Диапазон разрешения различных физических методов для определения пространственной структуры биомолекул.

1.1.1. Спектроскопия ЯМР высокого разрешения

Для понимания функций биомолекул и механизмов их взаимодействий необходима информация об их трехмерной структуре. Так как размер этих молекул, порядка 10^{-9} метров, для них невозможно прямое наблюдение, например с помощью оптической микроскопии. Методами способными давать информацию о структуре с атомарным разрешением биомолекул являются спектроскопия ЯМР, РСА и крио-ЭМ.

В основе явления ЯМР лежит взаимодействие магнитных атомных ядер, находящихся в постоянном магнитном поле, с электромагнитным полем в радиочастотном диапазоне. Согласно правилам квантовой механики взаимодействие магнитного ядра с внешним магнитным полем B_0 приводит к образованию дискретных энергетических уровней, поскольку магнитная энергия ядра может принимать только дискретные значения (E_i), которые также называются собственными значениями. Этим собственным значениям энергии соответствуют собственные (или стационарные) состояния. Возбуждение системы радиочастотным полем приводит к переходам между собственными состояниями. Полученное поглощение энергии регистрируется приемной катушкой в виде линий спектра (резонансный сигнал). На основе анализа спектральной информации, возможно устанавливать химическое строение, пространственную структуру и динамику исследуемого соединения и его свойства.

Двумя решающими факторами, определяющими точность, с которой могут быть получены спектральные параметры, являются чувствительность и спектральное разрешение.

Основные параметры спектроскопии ядерного магнитного резонанса

Для ансамбля ядер со спинами $\frac{1}{2}$ помещённых в магнитное поле B_0 существует два различных по энергии собственных состояния (обозначим их

α и β), разница между которыми равна $\Delta E = E_\beta - E_\alpha$ и определяется величиной магнитного поля и гиромагнитным отношением ядер γ .

$$\Delta E = \hbar\gamma B_0 \text{ или } \Delta E = \hbar\omega_0, \quad (1)$$

где \hbar - постоянная Планка деленная на 2π и ω_0 - Ларморова частота прецессии ядра (в рад/с). Разность энергий приводит к неодинаковой заселенности собственных состояний, и заселенность уровней n_α и n_β определяются распределением Больцмана:

$$n_\alpha = \frac{1}{Z} N e^{(-E_\alpha/kT)} \text{ и } n_\beta = \frac{1}{Z} N e^{(-E_\beta/kT)}, \quad (2)$$

где N - общее число спинов, k - постоянная Больцмана, T - температура. Z обозначает статистическую сумму, и для спина $1/2$ определяется как $e^{(-E_\alpha/kT)} + e^{(-E_\beta/kT)}$. При температуре окружающей среды разность энергий ΔE очень мала по сравнению с kT , и можно упростить уравнение 2, используя приближение что $e^{(-x)} \approx 1 - x$ и $Z \approx 2$:

$$n_\alpha = \frac{1}{2} N (1 - E_\alpha/kT) \text{ и } n_\beta = \frac{1}{2} N (1 - E_\beta/kT). \quad (3)$$

Разница заселенности, также называемая спиновой поляризацией, очень мала при температуре окружающей среды даже при самых сильных доступных сегодня магнитных полях. Например, в ансамбле спинов ^1H разность населенностей при $B_0 = 1$ Тл порядка 10^{-4} .

Чувствительность метода ядерного магнитного резонанса

В качестве характеристики чувствительности метода в спектроскопии ЯМР, как и для других физических методов, определяется как отношение сигнала к шуму в единицу времени [4, 5]:

$$\text{Чувствительность} = \frac{\text{Сигнал}}{\text{Шум}} \cdot \frac{1}{\text{единица времени}} \text{ или } \left(\frac{S}{N} \right)_t. \quad (4)$$

На чувствительность влияет несколько факторов. Сигнал S пропорционален объемной намагниченности, которая является произведением гиромагнитного отношения γ и поляризации, как указано выше. Небольшая разность населенностей между собственными состояниями ядерного спина приводит к низкой чувствительности ЯМР-экспериментов.

Другие факторы, связанные с чувствительностью, можно представить следующим образом:

$$\left(\frac{S}{N}\right)_t \propto \frac{N_{\text{спинов}}}{V} \gamma_{\text{возб}} \gamma_{\text{рег}}^{3/2} B_0^{3/2} n_{\text{сканов}}^{1/2} \frac{1}{\sqrt{R_o(T_y T_o) + R_k(T_y T_k)}}, \quad (5)$$

где T это температура предусилителя (а), образца (о) и радиочастотной катушки (к), 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. Часто необходимо повторение эксперимента и регистрация сигнала с тем, чтобы просуммировав результат увеличить результирующее соотношение сигнал/шум. Увеличение числа сканов $n_{\text{сканов}}$ приводит к усилению сигнала в n раз, однако также накапливаются и шумы в $\sqrt{n_{\text{сканов}}}$ раз, что в итоге дает выигрыш в $\sqrt{n_{\text{сканов}}}$ раз для чувствительности. Существуют следующие методы увеличения чувствительности спектроскопии ЯМР:

- Увеличение количества спинов в единице объема ($N_{\text{спинов}}/V$), т.е. концентрации вещества в образце. Однако для биомолекул зачастую существуют ограничения для повышения концентрации, а максимально возможная концентрация образца зачастую не превышает нескольких ммоль/на литр.
- Чувствительность выше у ядер с большим гиромагнитным отношением. В большинстве ЯМР экспериментов белков и нуклеиновых кислот (в жидком состоянии) регистрацию сигналов проводят по спинам ядер ^1H (для которых наблюдается наибольшая чувствительность), а также сигналы по ядрам ^{13}C , ^{15}N и ^{31}P (см. Таблица 1.1).
- Увеличение силы магнитного поля. В современных коммерческих криомагнитах величина максимально достигнутого магнитного поля составляет 28,2 Тл.

- Снижение уровня тепловых шумов электроники за счет криогенного охлаждения предусилителя и приемной катушки, что дает увеличение чувствительности в 2-4 раза.
- Снижение времени на регистрацию и увеличение числа сканов за счет использования «быстрых методов» (разреженная выборка, реконструкция проекций, селективное возбуждение).

Спектроскопические характеристики ядер наиболее часто встречаемых в биологических структурах приведены в Таблице 1.1:

Таблица 1.1. Спектроскопические характеристики ядер наиболее часто встречаемых в биологических структурах.

Ядро	Спин	Частота резонанса МГц	Гиромагнитное отношение ($10^7 \text{ рад с}^{-1} \text{T}^{-1}$)	Относительная чувствительность	Природное содержание %	Абсолютная чувствительность
^1H	$\frac{1}{2}$	600	26,7522	100,00	99,98	100,0000
^{13}C	$\frac{1}{2}$	150	6,7283	1,59	1,11	0,0176
^{15}N	$\frac{1}{2}$	60	-2,7126	0,10	0,37	0,0004
^{17}O	$\frac{5}{2}$	81	-3,6280	2,91	0,04	0,0011
^{19}F	$\frac{1}{2}$	564	25,1815	83,00	100,00	83,0000
^{23}Na	$\frac{3}{2}$	159	7,0704	9,25	100,00	9,2500
^{31}P	$\frac{1}{2}$	243	10,8394	6,63	100,00	6,6300
^{77}Se	$\frac{1}{2}$	114	5,1214	0,69	7,58	0,0525

Химический сдвиг

Разрешающая способность ЯМР спектрометра определяется как наименьшее расстояние между двумя спектральными линиями, которые можно фиксировать отдельно. Разрешение спектра ЯМР определяется количеством резонансных линий, присутствующих в данном диапазоне частот и их ширины линий. Ларморовская частота ядра зависит от его гиромагнитного отношения и напряженности магнитного поля. Также химическое окружение ядра изменяет результирующую напряженность магнитного поля, что вызывает смещение сигнала. Это смещение называется *химическим сдвигом* и обозначается δ . Единицей измерения являются миллионные доли (м.д., в англоязычной литературе p.p.m.) и его величина

определяется как нормированная разность частот по отношению к эталонному соединению:

$$\delta = \frac{\omega - \omega_{\text{эталон}}}{\omega_{\text{эталон}}} \cdot 10^6 \quad (6)$$

резонансная частота зависит от δ , γ и B_0 как:

$$\omega = -\gamma \cdot (1 + \delta) \cdot B_0 \quad (7)$$

Другое понятие, связанное с разрешением применяемое в спектроскопии ЯМР, является цифровое разрешение, которое равно ширине спектра разделенное на число точек в спектре.

Скалярное и диполь-дипольное взаимодействие

Спины ядер внутри макромолекулярных структур могут взаимодействовать друг с другом. Взаимодействие ядер связанных друг с другом химической связью и обусловленное взаимодействием электронов называется скалярным взаимодействием (обозначается буквой J). Сила данного взаимодействия задается константой связи ${}^n J_{ab}$ для двух ядер a и b , разделенных n ковалентными связями.

Поскольку спины ведут себя как магнитные моменты, они могут взаимодействовать друг с другом через пространство. Поскольку такое скалярное взаимодействие зависит от ориентации, то в растворе из-за вращения молекулы оно усредняется и равно нулю. Однако оно все еще влияет на скорости релаксации спинов. Вклад магнитного диполь-дипольного взаимодействия в релаксацию ядер приводит к изменению интенсивностей сигналов, обусловленное ядерным эффектом Оверхаузера (ЯЭО или NOE в англоязычной литературе), который возникает при взаимодействии спинов разных ядер. Интенсивность ЯЭО связана с расстоянием между двумя взаимодействующими спинами. Намагниченность может передаваться не только непосредственно с одного спина на другой, но и за счет спиновой диффузии, то есть косвенно через другие спины окружения.

Для характеристики молекулярного движения используется параметр называемый временем корреляции молекулярного движения τ_c , который в простейшем случае определяется как среднее время между двумя соударениями молекулы с другими молекулами, а за вращательное время корреляции принимают время, за которое молекула поворачивается на 1 радиан. Для описания динамики белковой молекулы в растворе можно воспользоваться моделью вращательной диффузии, применимой при условии, что время угловой корреляции τ_c значительно превышает период свободного вращения молекулы $(kT/I)^{1/2}$, (k – постоянная Больцмана, T – температура, I – момент инерции молекулы) [3]. Это условие выполнимо для белковых молекул. Время корреляции молекулярного движения τ_c можно выразить через коэффициент вращательной диффузии D как:

$$\tau_c = 1/(6D). \quad (8)$$

Коэффициент вращательной диффузии можно оценить из модели Стокса-Эйнштейна, в которой предполагается, что молекулы являются твердыми сферами с радиусом r_h , и диффундируют в однородной среде:

$$D = kT/(8\pi r_h^3 \eta), \quad (9)$$

где η – вязкость среды. В случае если структура белка в растворе не упорядочена, его гидродинамический радиус r_h будет пропорционален квадратному корню от числа аминокислотных остатков ($N^{1/2}$). В случае формирования компактной белковой глобулы, зависимость будет пропорциональна кубическому корню от числа аминокислотных остатков ($N^{1/3}$). Таким образом, время корреляции молекулярного движения для большинства глобулярных белков в общем виде можно представить [6]:

$$\tau_c = (c_0/T)e^{(E_\eta/RT)N^\nu}, \quad (10)$$

где член E_η учитывает энергию активации вязкости среды. Величины констант c_0 и ν можно оценить на основе статистических экспериментальных данных определенных для разных белков. График зависимости времени корреляции молекулярного движения от количества аминокислотных остатков в полипептидной цепи представлен на рисунке 2.

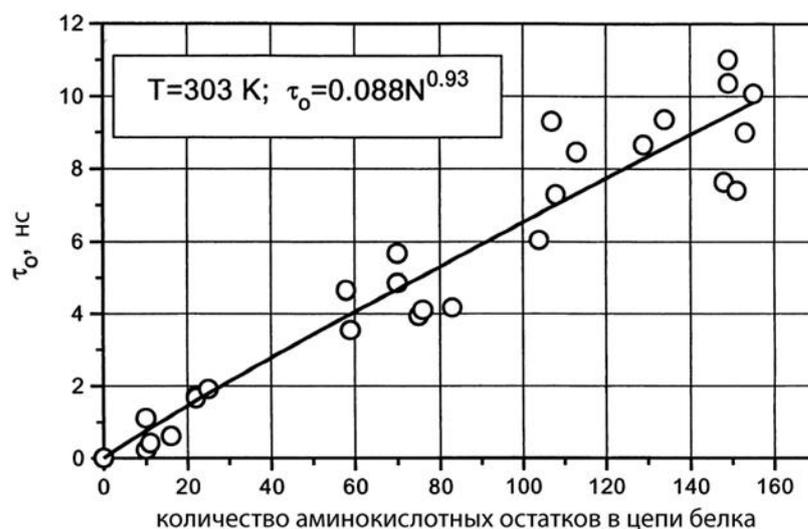


Рисунок 2. График зависимости времени корреляции молекулярного движения от числа аминокислотных остатков в полипептиде (при температуре 303 К, адаптировано из [6])

Многомерные методики спектроскопии ЯМР

В 1970-е годы Джинером и позже Эрнстом был предложен новый метод позволяющий увеличить разрешение в спектрах ЯМР, который произвел революцию практически во всех областях применения спектроскопии ЯМР: многомерное преобразование Фурье. Принцип многомерного преобразования Фурье схож с одномерным преобразованием, и заключается в регистрации сигнала, который является функцией n временных переменных $s(t_1, t_2, \dots, t_n)$ и с помощью преобразования Фурье реконструкции n -мерного спектра $I(\omega_1, \omega_2, \dots, \omega_n)$. Сигнал в двумерном спектре ЯМР можно представить в виде:

$$I(\omega_1, \omega_2) = \int_0^{t_1^{max}} \int_0^{t_2^{max}} s(t_1, t_2) e^{-i\omega_1 t_1} e^{-i\omega_2 t_2} dt_1 dt_2. \quad (11)$$

Таким образом, получение сигнала $s(t_1, t_2)$ получается повторением эксперимента несколько раз, регистрируя сигнал по всей временной области в одном измерении и увеличивая при каждом повторении эксперимента параметр задержки в последовательности импульсов. Схему двумерного эксперимента можно представить следующим образом:

$$\text{подготовка} - \text{эволюция по } t_1 \text{ (с инкрементом)} - \text{смешивание} - \text{регистрация } t_2. \quad (12)$$

В данной схеме на этапе подготовки возбуждается исходная спиновая система, на резонансной частоте Ω_1 и эволюционирует во время задержки t_1 . В конце этой задержки в период смешивания происходит перенос намагниченности на другие спиновые системы, при условии, что между ними существует механизм взаимодействия, позволяющий эту передачу. Затем сигнал регистрируется на резонансной частоте Ω_2 , на которую была перенесена намагниченность в период смешивания. Таким образом, конечный сигнал является функцией двух временных переменных, и после двумерного преобразования Фурье дает двумерный спектр (уравнение 11). Наличие сигнала на частотах Ω_1 и Ω_2 в двумерном спектре означает, что между данными спинами существует взаимодействие.

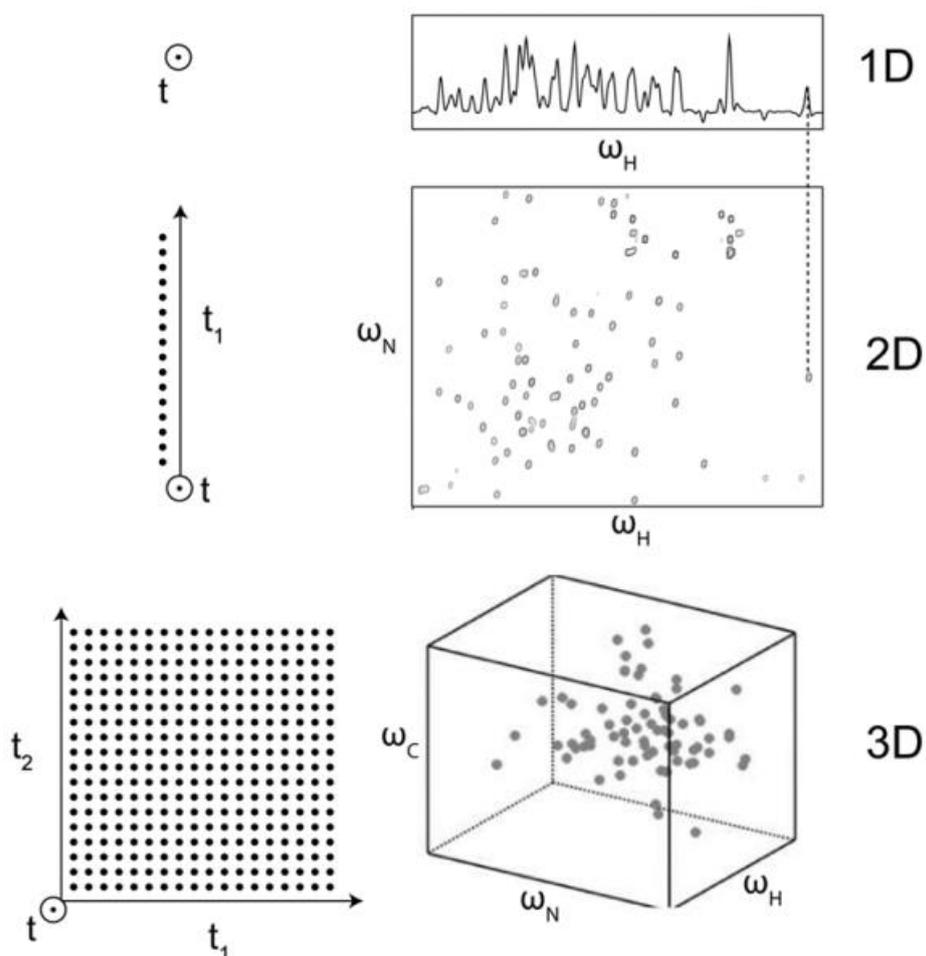


Рисунок 3. Схематическое представление одномерного, двумерного и трехмерного спектров ЯМР белка.

Расширение данной схемы эксперимента до более высоких размерностей осуществляется добавлением дополнительных шагов смешивания и эволюции для каждого дополнительного спектрального измерения, и получение всех точек в косвенных измерениях должно быть независимым.

На рисунке 3 представлены примеры применения многомерных методов ЯМР для увеличения разрешения и спектральной информации.

В основе трехмерных экспериментов разработанных для белков лежит перенос намагниченности за счет спин-спинового взаимодействия ядер белковой цепи (Рис. 4).

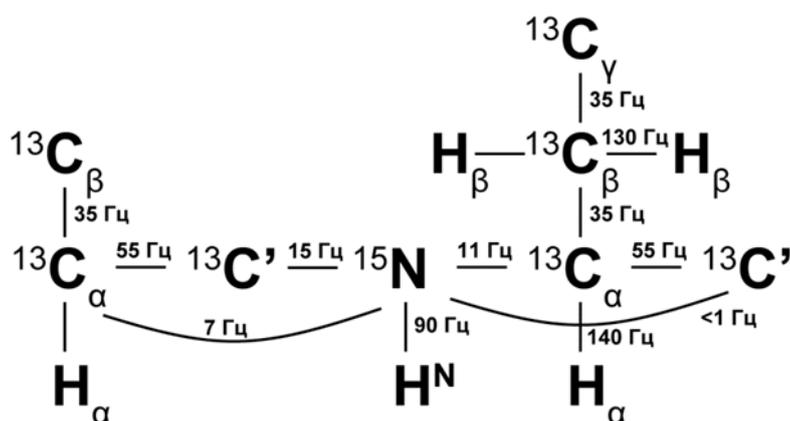


Рисунок 4. Значения констант спин-спинового взаимодействия между атомами основной и боковой цепи белка.

Спектроскопия ЯМР в исследовании структуры и динамики биологических макромолекул

Создание многомерных методов спектроскопии ЯМР высокого разрешения позволило изучать структуру и динамику таких биологических молекул как белки и нуклеиновые кислоты в растворе. Основная цепь белка, образуемая в результате формирования пептидной связи между аминокислотами, представляет собой упорядоченную определенным образом структуру. Среди многообразия аминокислот у большинства организмов только 20 участвует во внутриклеточном синтезе белков (Рис. 5):

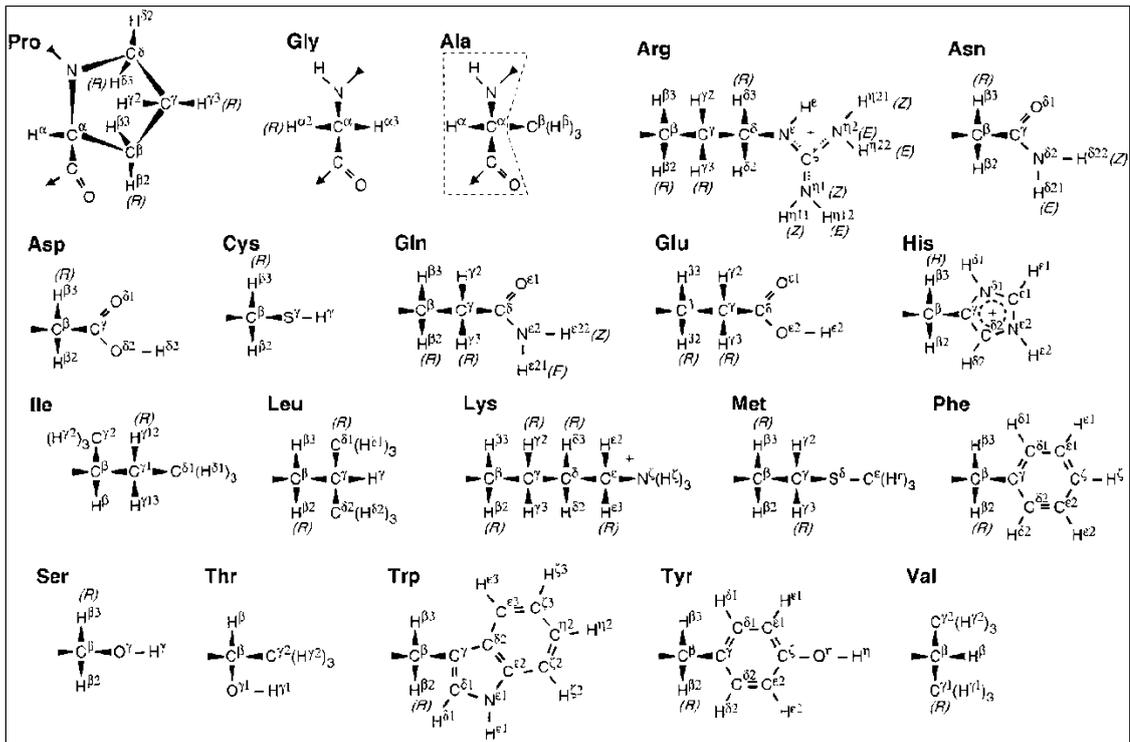


Рисунок 5. Химическое строение аминокислот.

Пептидная связь формируется посредством присоединения α -карбоксовой группы первого остатка к α -аминогруппе второго остатка (Рис. 6).

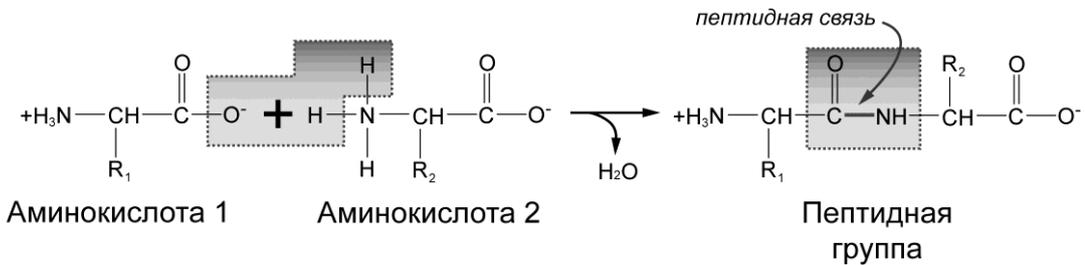


Рисунок 6. Формирование полипептидной связи.

Процесс определения структуры белков с помощью спектроскопии ЯМР состоит из нескольких этапов: регистрации и обработки спектров, отнесения сигналов в спектрах к соответствующим ядрам, получение структурных ограничений (межъядерные расстояния и двугранные углы атомов основной и боковых цепей). Далее информация используется в качестве входных данных для расчетов методом молекулярной динамики. Общая схема определения структуры белка показана на рисунке 7.

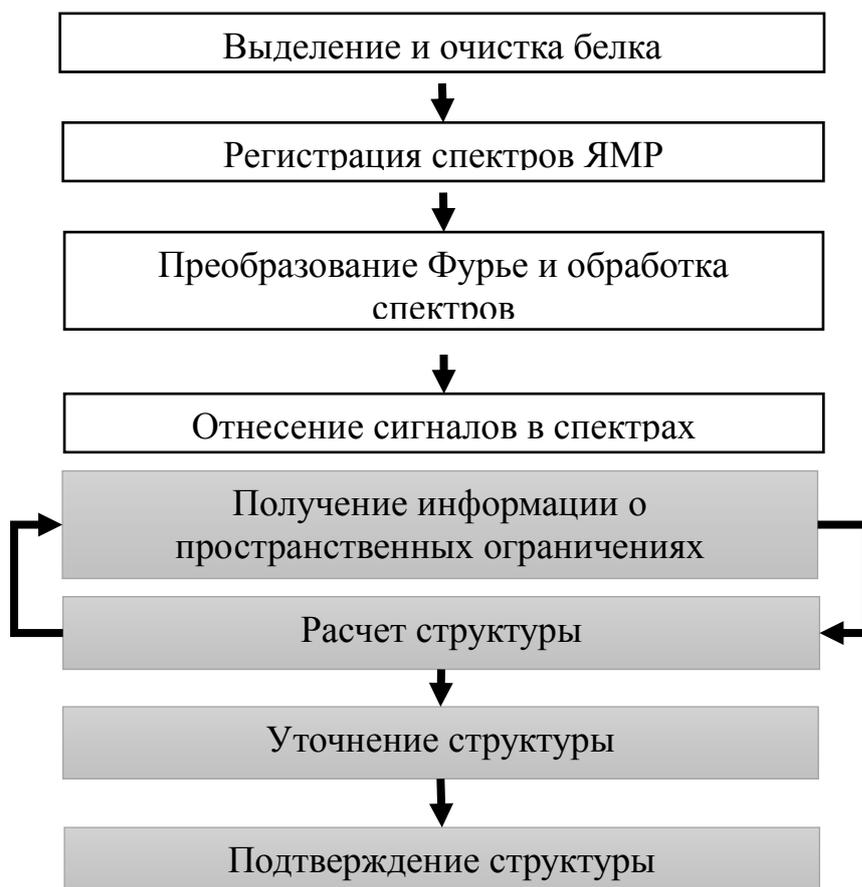


Рисунок 7. Протокол установления структуры белков по данным спектроскопии ЯМР высокого разрешения.

Ядерный эффект Оверхаузера

Для регистрации ЯЭО Джинером был разработан двумерный эксперимент NOESY [7] для молекул находящихся в растворе, который на основе эффекта ЯЭО дает информацию о взаимодействующих через пространство ядрах на расстоянии до 5 Å.

В первом приближении зависимость величины ЯЭО (V) от межъядерного расстояния (r) можно представить в виде:

$$V = \langle r^{-6} \rangle f(\tau_c). \quad (13)$$

Зависимость процесса переноса намагниченности от молекулярного движения выражается как функция от времени корреляции молекулярного движения (τ_c), которая включает в себя как движения молекулы в целом, так и подвижность отдельных ее частей. Величину расстояния между взаимодействующими ядрами можно определить путем измерения

интенсивностей недиагональных пиков в спектре NOESY и использовать их для последующего расчета структуры молекулы в качестве набора ограничений на расстояния между взаимодействующими ядрами [8-10].

Приближение, которое было использовано для пары двух изолированных спинов справедливо только для очень коротких времен смешивания в эксперименте NOESY. При увеличении времени смешивания в оценке расстояния следует учитывать явление спиновой диффузии. Полуклассическое описание двух взаимодействующих спинов выражает уравнение Соломона. Предсказанная из данного уравнения величина кросс-релаксации R_{ij} является функцией расстояния r_{ij} и времени корреляции τ_c :

$$R_{ij} = \frac{1}{10} \gamma^4 \hbar \frac{1}{r_{ij}^6} \left(-\tau_c + \frac{6\tau_c}{1+(2\omega_0\tau_c)^2} \right). \quad (14)$$

В матричной форме интенсивность ЯЭО A_{ij} в двумерном спектре, записанном при времени смешивания $\tau_{смеш}$, определяются как:

$$\mathbf{A} = e^{-\mathbf{R}\tau_{смеш}}, \quad (15)$$

где \mathbf{R} матрица всех R_{ij} .

Спин-спиновое взаимодействие

Помимо межъядерных расстояний, определяемых на основе ЯЭО, для получения информации о структуре молекул из спектров ЯМР используются величины двугранных углов между атомами в полипептидной цепи (Рис. 8).

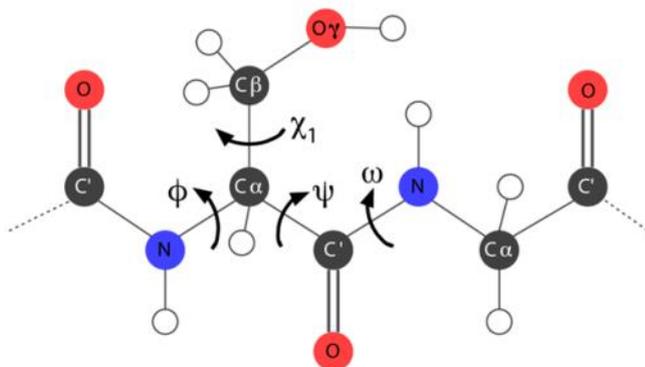


Рисунок 8. Двугранные углы в полипептидной цепи.

Расположение атомов основной цепи белка, задающие значения двугранных углов определяет константы скалярного взаимодействия:

$${}^3J(\theta) = A \cos^2(\theta) + B \cos(\theta) + C. \quad (16)$$

Величины констант A , B и C были определены для большинства двугранных углов $\theta(\varphi, \psi$ или $\chi)$. Если величина ЯЭО дает информацию о коротких и дальних взаимодействиях между ядрами, то константы скалярного взаимодействия дают представление о локальной конформации полипептидной цепи. Поэтому эти ограничения важны для точного определения локальной конформации белка.

Индекс химического сдвига

Как было ранее сказано в главе 1.1., величина химического сдвига зависит от химического окружения ядра, поэтому химические сдвиги ядер основной цепи белка несут в себе информацию о положении вторичных элементов, таких как альфа-спираль и бета-складки (Рис. 9) [11, 12].

Для определения элементов вторичной структуры белков на основе значений химических сдвигов ядер основной цепи было введено понятие индекса химического сдвига (ИХС или Chemical shift index, CSI в англоязычной литературе). Он определяется как разность наблюдаемых и средних значений химических сдвигов ядер основной цепи (H_α и C_α). Значение индекса принимается равным -1 или $+1$, если данное отклонение превышает $0,1$ м.д., и 0 – если менее. В случае если подряд встречаются четыре и более остатка с ИХС равным -1 , это является свидетельством наличия альфа спирали на данном участке. Для участка с тремя и более подряд ИХС равными $+1$, соответствует расположение β -нити [13]. Полученная таким образом информация может быть использована при расчете структур, как в виде значений торсионных углов, так и в виде водородных связей. Существующие программные пакеты, такие как TALOS или DANGLE, позволяют получать ограничения для расчетов структур автоматически на основе анализа базы данных со значениями химических сдвигов для участков разбитых на трипептиды для существующих определенных структур с высоким разрешением [14-18].

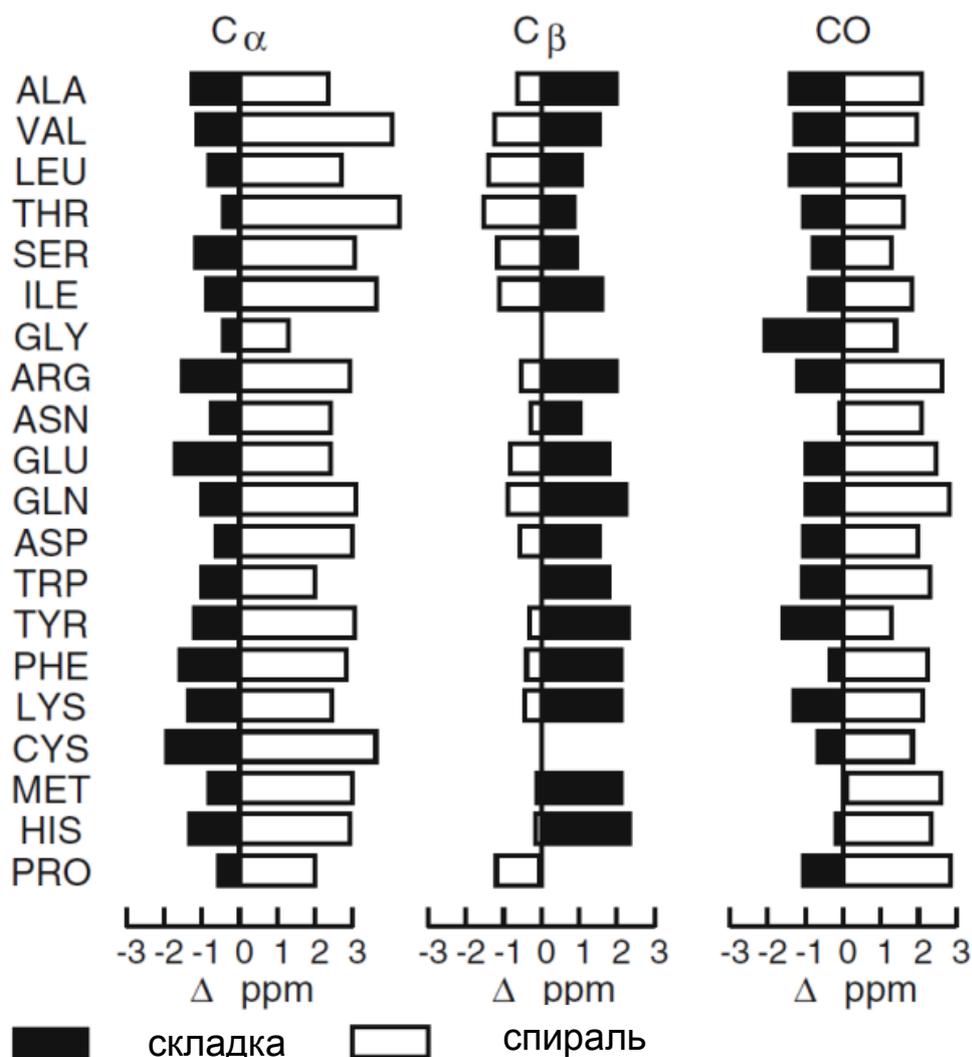


Рисунок 9. Эффект влияния вторичной структуры белка на химический сдвиг ядер углерода.

В последнее время было показано, что структурная информация, содержащаяся в химических сдвигах, может быть достаточной для определения структуры белков *de novo* только из значений химических сдвигов. Так, например два схожих подхода используются в программах CHESHIRE [19] и CS-ROBETTA [20], которые основаны сравнении экспериментальных данных с полученными данными для молекулярных фрагментов, соответствующих по аминокислотной последовательности и значениям химических сдвигов из базы данных структур определенных с высоким разрешением и последующей симуляцией методом Монте-Карло.

Константы остаточного диполь-дипольного взаимодействия

Как отмечалось в главе 1.1. в растворе вследствие вращения происходит полное усреднение диполь-дипольного взаимодействия между магнитными ядрами, принадлежащими одной молекуле. Тем не менее, существует возможность частично восстановить данное взаимодействие, если в раствор с исследуемой молекулой добавить ориентированные среды с тем, чтобы возникла анизотропия во вращении молекулы [21]. На основе измеренных значений констант остаточного диполь-дипольного взаимодействия (ДДВ или в англоязычной литературе RDC) возможно рассчитать ориентацию векторов химических связей относительно направления внешнего магнитного поля B_0 . Для модели жесткой молекулы константу остаточного ДДВ между двумя спинами можно выразить как:

$$D_{ij}(\theta, \varphi) = D_a^{ij} \left\{ (3 \cos^2 \theta - 1) + \frac{3}{2} R \sin^2 \theta \cos 2\varphi \right\}, \quad (17)$$

где параметр $D_a^{ij} = -(\mu_0 h / 16\pi^3) S \gamma_i \gamma_j \{r_{ij,eff}^{-3}\} A_a$ зависит от расстояния между ядрами i и j . Здесь $A_a = A_{zz} - (A_{xx} + A_{yy}) / 2$ - аксиальная компонента тензора \mathbf{A} , описывающего преимущественное расположение молекулы в пространстве по отношению к внешнему магнитному полю; $R = (A_{xx} - A_{yy}) / A_{zz}$ ромбическая компонента; θ и φ - полярные координаты, связывающие главные оси молекулярного тензора и направление внешнего магнитного поля; S - параметр порядка, описывающий внутреннюю динамическую подвижность межъядерного вектора; γ - гиромагнитное отношение; $r_{ij,eff}$ - межъядерное расстояние. На рисунке 10 показан пример ориентации двух векторов связанных ДДВ в молекуле белка.

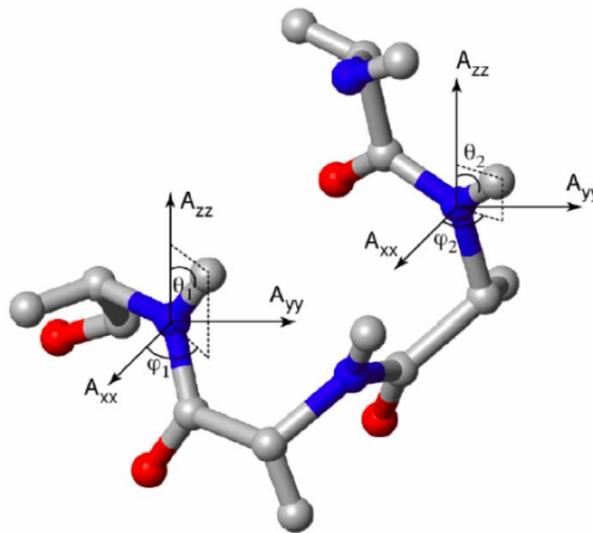


Рисунок 10. Ориентация двух векторов диполь-дипольного взаимодействия в структуре основной цепи белка.

Исследование динамических процессов

Кроме информации о структуре молекул, метод спектроскопии ЯМР также позволяет получить информацию о внутримолекулярной динамике в широком временном диапазоне от пикосекунд для процессов медленного обмена до секунд, и даже более. Одним из наиболее информативных методов исследования динамических процессов макромолекул является анализ релаксации по ядрам ^{15}N , который позволяет получать информацию о движении молекул в диапазоне от пико- до микросекунд [22-27]. В рамках данного метода измеряются три основных параметра: время продольной релаксации T_1 , время поперечной релаксации T_2 и гетероядерный ЯЭО ^1H - ^{15}N . Данные параметры дают информацию о локальных движениях частей молекулы, ее жесткости и процессах химического обмена.

На процессы релаксации влияют колебания локальных магнитных полей из-за стохастических вращательных движений макромолекулы и постоянные магнитные поля, что в итоге способствует расфазированию когерентности (T_2 релаксация). Распределение частот создаваемых переменными магнитными полями зависит от стохастических движений молекулы и описывается функцией спектральной плотности $J(\omega)$. Данная функция представляет собой

результат Фурье преобразования автокорреляционной функции стохастического движения. Если предположить, что автокорреляционная функция представлена затухающей экспонентой $C = \exp(-t/\tau_c)$, то функция спектральной плотности будет равна:

$$J(\omega) = \frac{2\tau_c}{1+\tau_c^2\omega^2}. \quad (18)$$

Для ядер со спином $I = 1/2$ наибольший вклад в релаксацию дают анизотропия химического сдвига и дипольные взаимодействия. Релаксация двух спинов связанных скалярным взаимодействием ($^1\text{H}-^{15}\text{N}$) описывается функцией спектральной плотности с пятью частотами: $J(0)$ – описывает постоянные магнитные поля, $J(\omega_H)$, $J(\omega_N)$, $J(\omega_H + \omega_N)$ и $J(\omega_H - \omega_N)$ соответствующих частотам перехода скалярной связанной двух спиновой системы. Наиболее часто используются следующие три релаксационных параметра:

$$NOE = 1 + \frac{d^2 \gamma_H}{20 \gamma_N} [6J(\omega_H + \omega_N) - J(\omega_H - \omega_N)] T_1 \quad (19)$$

$$\frac{1}{T_1} = \frac{d^2}{20} [J(\omega_H - \omega_N) + 3J(\omega_N) + 6J(\omega_H + \omega_N)] + \frac{c^2}{15} J(\omega_N) \quad (20)$$

$$\frac{1}{T_2} = \frac{d^2}{40} [4J(0) + J(\omega_H - \omega_N)] + 3J(\omega_N) + 6J(\omega_H) + 6J(\omega_H + \omega_N) + \frac{c^2}{90} [4J(0) + 3J(\omega_N)] + R_{ex}, \quad (21)$$

где d дипольный коэффициент $d = (\mu_0/4\pi)\gamma_H\gamma_N(h/2\pi)r_{NH}^{-3}$ и $c = \omega_N(\sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp})$ – анизотропия химического сдвига ^{15}N .

Для анализа релаксационных данных глобулярных белков используется формализм, в котором движение молекулы белка рассматривается отдельно от внутренних движений частей белковой цепи. Расчет значения времени корреляции молекулярного движения τ_c на основе соотношения T_1/T_2 позволяет получить информацию о локальной подвижности участков белковой цепи [28].

Расчет структур белков методом молекулярной динамики и симулированного отжига по данным спектроскопии ЯМР

Расчет структур белков, на основе ограничений полученных из данных спектроскопии ЯМР обычно выполняется с использованием метода молекулярной динамики и симулированного отжига для минимизации энергии. Симулированный отжиг - метод нелинейной оптимизации, позволяющий преодолевать локальные энергетические барьеры за счет кинетической энергии системы (Рис. 11). Данный метод был разработан по аналогии с отжигом в металлургии, когда для увеличения качества кристаллической структуры материала производят нагрев и контролируемое охлаждение. Метод симулированного отжига используется для поиска глобального минимума некоторой функции N переменных, каждую из которых можно расценить как степень свободы, приписать ей "вес" и использовать Монте-Карло моделирование для поиска глобального минимума.

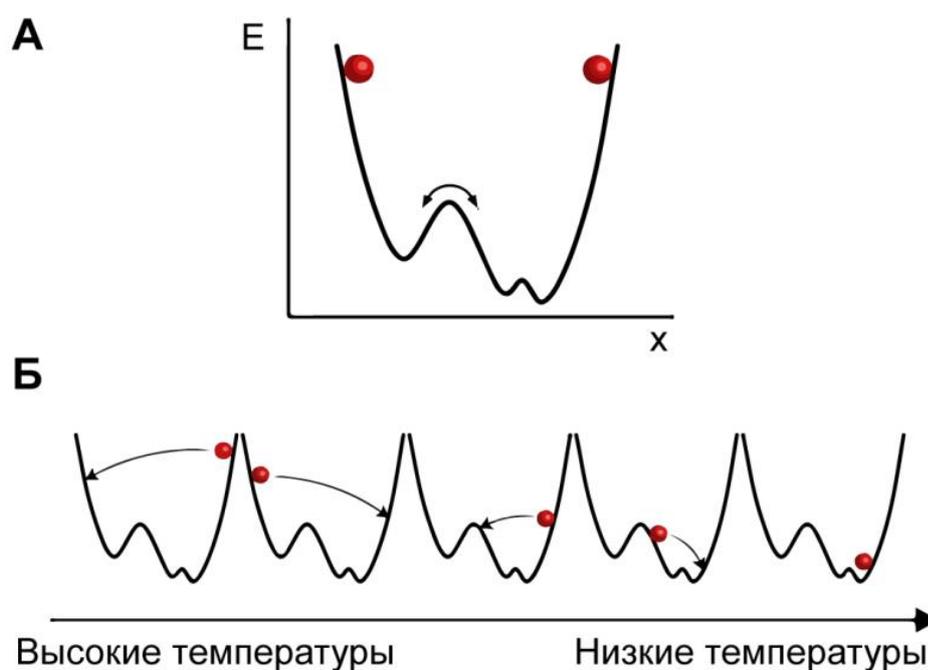


Рисунок 11. Схема минимизации энергии молекулы методом молекулярной динамики (а) и симулированного отжига.

Таким образом, метод симулированного отжига состоит в численном решении уравнения движения Ньютона в декартовых координатах на основе молекулярной динамики:

$$\frac{d^2\vec{r}_i}{dt^2} = -\frac{1}{m_i} \frac{\partial E}{\partial \vec{r}_i}, \quad (22)$$

где m_i и \vec{r}_i – масса и координата частицы i .

Цель метода найти глобальный энергетический минимум потенциальной энергии E молекулы. Данная энергетическая функция содержит члены, характеризующие химическую структуру системы, а также члены содержащей экспериментальные данные ЯМР:

$$E = E_{\text{хим}} + E_{\text{эксп}} = \sum_i \omega_i E_i = \omega_{\text{связи}} E_{\text{связи}} + \omega_{\text{двуг.уг.}} E_{\text{двуг.уг.}} + \omega_{\text{яэо}} E_{\text{яэо}} + \omega_{\text{ддв}} E_{\text{ддв}} + \dots \quad (23)$$

Компонента $E_{\text{хим}}$ включает геометрические свойства (такие как длина связи, углы, двугранные углы), а также электростатические и Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия. После высокотемпературного этапа отжига температура системы постепенно уменьшается с тем, чтобы найти глобальный минимум энергии E . Температура контролируется путем добавления внешнего термостата с известной температурой [29]. Термостат действует как источник тепловой энергии, при необходимости подавая или удаляя тепло из системы и позволяя температуре системы колебаться относительно заданного значения. В большинстве случаев, при расчете структур, установленных методом ЯМР, в эмпирической функции энергии вместо потенциала Леннарда-Джонса и замены кулоновских взаимодействий используется простой потенциал отталкивания [30]. Такой подход существенно ускоряет расчеты конформационных изменений молекулы, которые необходимы для сворачивания белка.

1.1.2. Рентгеноструктурный анализ

Кристаллографические методы на основе рентгеноструктурного анализа (РСА) позволяют определять трехмерную структуру биомолекул (белков, РНК, ДНК и их макромолекулярных комплексов) с атомарным разрешением. Помимо информации о третичной структуре молекулы и положении элементов вторичной структуры, на основе кристаллографических данных, можно получать информацию о функции белков, например о каталитических механизмах ферментов, или о специфическом взаимодействии факторов транскрипции с ДНК [31-35].

В принципе, биологические макромолекулы любого типа и размера могут быть исследованы методом РСА, если их кристаллы диффрагируют в рентгеновском излучении. В определении структуры молекулы с помощью рентгеновской кристаллографии можно выделить несколько основных этапов: получение белковых кристаллов (кристаллизация); анализ дифракции рентгеновских лучей; расчет параметров элементарной ячейки кристалла и оценка разрешения карт электронной плотности; анализ изоморфно-замещенных кристаллов, включающий в себя получение кристаллов и анализ интенсивности рефлексов; получение полной информации, содержащейся в рефлексах: нахождение структурных факторов; расчет распределения электронной плотности в элементарных ячейках; определение координат атомов.

Кристаллизация

Для проведения экспериментов по дифракции рентгеновских лучей необходимо получить отдельные кристаллы макромолекул. Получению отдельных кристаллов препятствует срастание нескольких кристаллов вместе, что приводит к перекрыванию решеток и двойникованию, что зачастую не позволяет использовать их для определения структуры методом РСА.

Прогресс технических методов регистрации дифракционных данных и увеличение вычислительных мощностей, позволили существенно снизить трудоемкость таких операций как сбор дифракционных данных, их обработку и уточнение структурной модели, однако поиск условий кристаллизации биологических макромолекул все еще остается основанным на методе проб и ошибок. Тем не менее, благодаря развитию современных методов выделения и очистки рекомбинантных белков, в настоящее время возможно получение большого количества очищенного белка, что в сочетании с автоматизацией процесса кристаллизации позволяет в короткие сроки тестировать тысячи различных условий кристаллизации для различных конструкций интересующего белка.

Для того чтобы приступить к поиску условий кристаллизации исследуемого белка необходимо получение как можно более гомогенного образца не содержащего примесей. Чистоту и однородность образца обычно сначала определяют с помощью электрофоретического разделения белков в полиакриламидном геле (ПААГ), а затем более сложными методами, такими как эксклюзионная хроматография и динамическое светорассеяние. Также для определения стабильности белка в определенном буферном растворе используется так называемый «анализ теплового сдвига» (в англоязычной литературе “thermal shift assay”), который основан на анализе скорости разворачивания третичной структуры белка от температуры.

Процесс перехода макромолекул в кристаллическое состояние осуществляется за счет создания таких условий, в которых белковый раствор становится перенасыщенным, что приводит к белок-белковой агрегации. В этом случае возникают процессы нуклеации и кристаллизации. В зависимости от условий, достигнутых путем добавления, так называемого осадителя (вещества, уменьшающего растворимость), один из этих двух процессов может доминировать и приводить к образованию монокристаллов различных форм, размеров и количества. Во время самого процесса кристаллизации макромолекулы переходят из пересыщенного раствора в

твердое состояние. Обычно это достигается добавлением осадителя, вытесняющего макромолекулы из раствора. Таким образом, концентрация осадителя должна постепенно увеличиваться либо путем диффузии воды из раствора белка в маточном растворе, либо путем диффузии осадителя в раствор белка (Рис. 12).



Рисунок 12. Диаграмма фазовых переходов молекул белка.

Наиболее широко используемыми экспериментальными методами осаждения белков являются так называемая «висячая капля» и «сидячая капля», в основе которых лежит создание пересыщенного раствора в капле с образцом путем увеличения концентрации макромолекулы и осадителя за счет диффузии паров летучих веществ. Для кристаллизации методом висячей капли на покровное стекло наносится небольшой объем (1-2 мкл) высококонцентрированного белкового раствора (5-40 мг/мл) и в тот же объем добавляется маточный раствор (смесь осадителя и буфера). После смешивания капля должна оставаться чистой. В случае помутнения раствора при смешивании следует повторить разведение с меньшей концентрацией

белка или осадителя. Затем на дно резервуара наносится 0,5-1,0 мл неразбавленного маточного раствора, края лунки в планшете покрывают тонким слоем силиконового масла или жира для герметизации системы и устанавливают сверху покровное стекло с нанесенной каплей образца (Рис. 13). Поскольку концентрация осадителя в висячей капле составляет лишь половину от концентрации в резервуаре, диффузия паров летучих веществ вызывает уменьшение объема капли, что приводит к медленному увеличению концентрации белка и осадителя в капле до тех пор, пока не наступит перенасыщение и может произойти кристаллизация.

В отличие от «висячей капли», в методе «сидячей капли» раствор с белком наносится не на покровное стекло, а на специальный пьедестал, возвышающийся над резервуаром с осадителем (Рис. 13). Существуют и другие, методы кристаллизации биологических макромолекул.

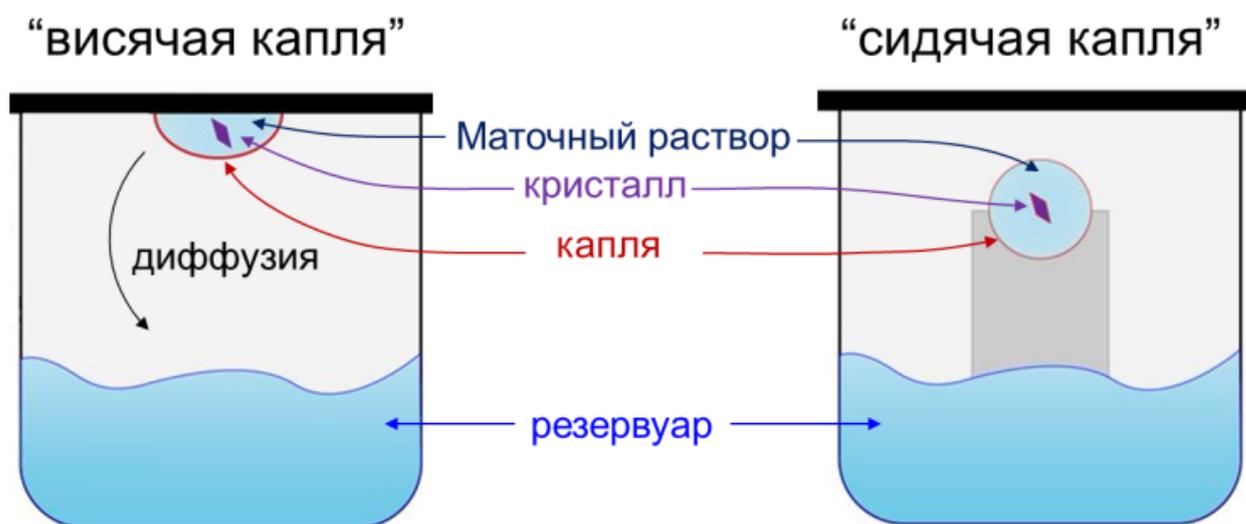


Рисунок 13. Методы кристаллизации белков. В обоих методах осадитель помещают на дно резервуара, каплю концентрированного раствора белка с осадителем наносят на покровное стекло в методе «висячей капли», или на пьедестал, возвышающийся над резервуаром с осадителем в методе «сидячей капли».

В качестве осадителя наиболее часто используются соли (такие как $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, K_3PO_4), органические соединения (полиэтиленгликоль 100-20000 Да) или спирты (метилпентандиол, этанол, изопропанол). В настоящее время для поиска условий кристаллизации на

рынке существуют специальные наборы с различными вариантами осадителей. Также на процесс кристаллизации влияет рН раствора, он обычно варьируется в небольших интервалах в пределах от 4 до 10. Другим важным условием кристаллизации является температура. Зачастую одинаковые условия кристаллизации тестируются при различных температурах инкубации (например, 4, 16 или 22 °С). Для ускорения процесса поиска оптимальных условий кристаллизации были созданы специализированные автоматизированные системы кристаллизации, оснащенные роботизированной системой пипетирования (позволяющей создавать различные условия кристаллизации из исходных растворов в 96-луночных планшетах), системой хранения планшетов, автоматизированной системой фотографирования капель регистрирующей данные с заданным интервалом времени, что позволяет отслеживать процессы, протекающие в каплях с течением времени.

Дифракция рентгеновских лучей на кристаллической структуре

Кристаллы белков могут отличаться по размеру и форме, но обычно для рентгеноструктурного анализа подходят кристаллы с длиной ребра 0,02-0,3 мм. Размеры элементарных ячеек кристаллов белков могут составлять от 20 до 2000 Å. Все типы кристаллов можно описать с помощью 14 типов кристаллических решеток (решеток Браве), которые представляют собой математическую модель: геометрическое место точек, получающихся из исходной \vec{r}_0 последовательным применением операций трансляции $\vec{r} = \vec{r}_0 + n\vec{a} + m\vec{b} + p\vec{c}$, где n, m, p – целые числа. Генерируемые этими трансляциями точки называются узлами кристаллической решётки. В свою очередь решетки Браве можно сгруппировать в семь сингоний – систем, различающихся по виду элементарной ячейки – пространственного параллелепипеда, периодическое повторение которого образует данную кристаллическую структуру. Существует моноклинная, триклинная, тригональная, ромбическая, тетрагональная, гексагональная и кубическая

сингонии. Понятие решетки Браве связано с основными трансляционными векторами, которые задают минимальный в данном направлении вектор перехода из данной точки в ближайшую эквивалентную: $\vec{a} = n_1\vec{a}_1 + n_2\vec{a}_2 + n_3\vec{a}_3$, где n_1, n_2, n_3 - произвольные целые числа. Виды возможных элементарных ячеек представлены на рисунке 14.

За исключением триклинной системы, во всех других кристаллических системах элементарные ячейки содержат, как минимум, две асимметричные единицы, связанные операциями симметрии. Для кристаллов белка этими элементами симметрии являются ось симметрии и ось вращения, которые сочетают вращение с перемещением вдоль оси. Комбинация 14 типов решетки Браве с 32 точечными группами симметрии приводит к различным пространственным группам. Теоретически существует 230 различных пространственных групп, но в кристаллографии белков встречается только 65 пространственных групп из-за наличия хиральных центров в аминокислотах белков.

После этапа кристаллизации, кристалл белка извлекают из раствора с помощью петли или капилляра, и помещают в сфокусированный рентгеновский луч. На основе метода РСА определяется предел разрешения карт электронной плотности, пространственная группа симметрии кристалла и размеры элементарной ячейки. Следует отметить, что в кристаллах белка часто имеются широкие каналы между молекулами белка заполненные буферным раствором (обычно они достигают 50-60% объема кристаллов). Это становится причиной того, что кристаллы белка становятся достаточно хрупкими к механическим нагрузкам и не устойчивым к изменениям влажности. Поэтому кристаллы белка должны быть постоянно окружены раствором, в большинстве случаев резервуарным раствором соответствующего эксперимента по кристаллизации.

Тип решетки

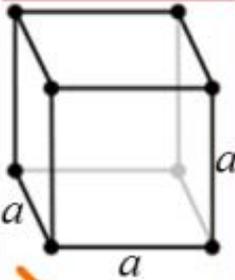
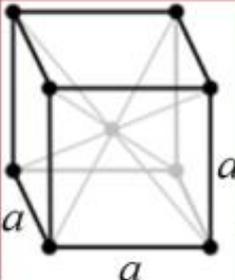
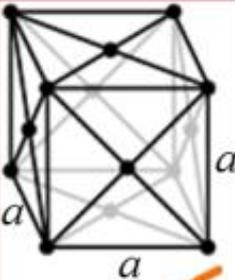
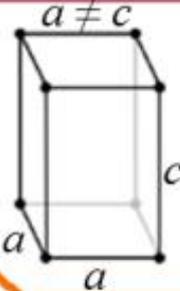
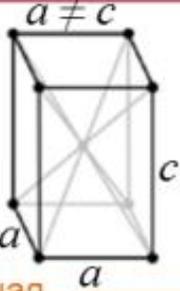
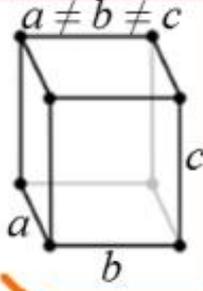
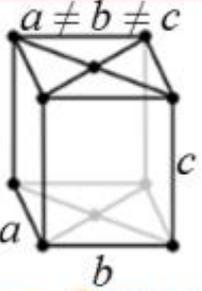
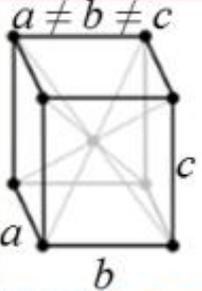
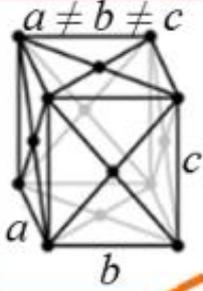
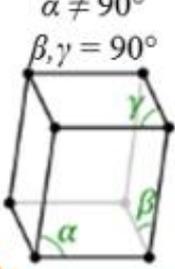
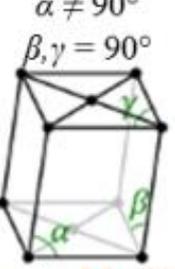
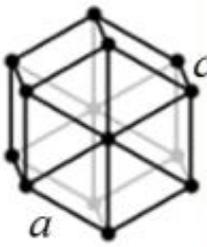
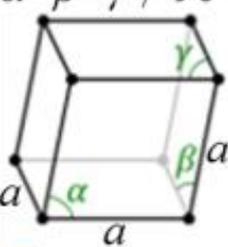
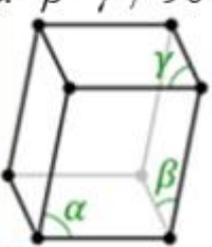
	Примитивный	Базоцентриро- ванный	Объемноцен- трированный	Гранецентри- рованный
СИНГОНИИ				
	Кубическая			
				
	Тетрагональная			
				
	Орторомбическая			
				
Моноклиная				
				
Гексагональная	Тригональная	Триклинная		

Рисунок 14. Решетки Браве.

Для того чтобы поместить кристалл под рентгеновский пучок, его либо переносят в небольшой стеклянный капилляр диаметром 0,3-1,0 мм (окружающий раствор аккуратно удаляется, а концы покрываются воском), либо вылавливают небольшой нейлоновой петлей (в этом случае кристалл удерживается за счет сил поверхностного натяжения в тонкой пленке жидкости) и мгновенно охлаждают в жидком азоте. В последнем случае кристалл затем поддерживают при постоянной температуре около 100 К, что помогает минимизировать вызванное рентгеновским излучением повреждение кристалла и тепловое движение макромолекул.

Экспериментальная установка регистрации дифракции рентгеновских лучей требует источника рентгеновского излучения, вспомогательной системы для фокусировки луча и системы детектирования дифрагированных рентгеновских лучей. В лабораторных установках рентгеновский луч обычно создается генератором, содержащим вращающийся анод или отпаянную трубку (Рис. 15 а). Длина волны рентгеновских лучей зависит от металла анода, например, длина волны медного источника составляет $1,5418 \text{ \AA}$ (Cu- K_{α}). Самыми мощными устройствами, создающими рентгеновское излучение, являются синхротроны, представляющие собой установку с кольцевой вакуумной камерой, в которой заряженные частицы движутся по замкнутой круговой траектории. Заряженные частицы, двигаясь по круговой орбите под действием постоянного магнитного поля, испускают электромагнитное излучение, которое также называют синхротронным излучением. Спектр данного излучения простирается от радиоволн до рентгеновского диапазона.

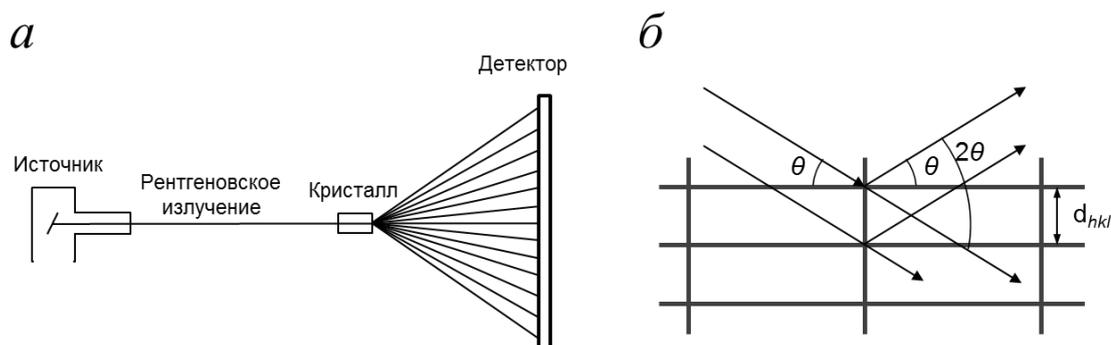


Рисунок 15. Схема устройства дифрактометра (а) и представление дифракции рассеянных рентгеновских лучей как отражение лучей от параллельных плоскостей (б).

Преимуществом синхротронного излучения заключается в высокой интенсивности пучка, что позволяет использовать для определения структуры более мелкие кристаллы. В отличие от генераторов излучения лабораторных дифрактометров, на синхротроне можно регулировать длину волны в диапазоне от 0,8 до 4,0 Å, что позволяет измерять наборы данных на нескольких длинах волн, например для экспериментов с аномальной дисперсией.

Выделяют два основных механизма взаимодействия рентгеновского излучения с веществом: упругое (когерентное) и неупругое (некогерентное или комптоновское) рассеяние. При упругом рассеянии электроны возбуждаются под действием рентгеновских лучей, и испускается вторичное излучение, которое имеет ту же частоту, что и падающее излучение, но отличается по фазе. В случае неупругого рассеяния энергия рентгеновского излучения частично поглощается веществом, что приводит к уменьшению частоты рассеянного излучения. В результате может наблюдаться интерференция волн рассеянных когерентно, а для некогерентно рассеянных волн интерференция не наблюдается, поскольку в последнем случае их частоты отличаются от частот первичных и рассеянных когерентно. В основе метода РСА лежит анализ интерференционной картины когерентно рассеянного излучения. Поскольку величина длины волны рентгеновского излучения сопоставима с периодом кристаллической решетки, то при

прохождении через кристалл будет наблюдаться дифракция рентгеновского излучения. Дифракция рентгеновских лучей на кристалле описывается как отражение на множестве параллельных плоскостей по закону Брэгга:

$$2d_{hkl} \sin\theta_{hkl} = n\lambda, \quad (24)$$

где λ – длина волны падающего излучения; n – порядок отражения; θ_{hkl} – угол между падающим пучком рентгеновских лучей и отражающей плоскостью (Рис. 15 б). Таким образом, условие возникновения и направление дифракционного луча определяется длиной волны падающего излучения и межплоскостным расстоянием.

Поскольку расположение макромолекул в кристалле не является идеальным, что обуславливает не идеальность кристаллической решетки, то рентгеновские лучи дифрагируют только до определенного максимального угла $\theta_{\text{макс}}$. Согласно закону Брэгга угол $\theta_{\text{макс}}$ связан с наименьшим детектируемым расстоянием между двумя плоскостями, которое определяется как разрешение кристаллической структуры:

$$d_{\text{мин}} = \frac{\lambda}{2 \sin \theta_{\text{макс}}} \quad (25)$$

Таким образом, каждое отдельное пятно на детекторе, называемое рефлексом, соответствует рентгеновской дифракции на определенной серии плоскостей. Положение и ориентация серии плоскостей в решетке описываются миллеровскими индексами отражающей плоскости h , k и l . Из-за сложности работы с отражениями разных порядков от одной и той же серии плоскостей hkl были введены дифракционные индексы отражений $h'k'l'$, которые можно выразить через миллеровские индексы как: $h'=nh$, $k'=nk$, $l'=nl$.

Определение симметрии кристаллического вещества из дифракционной картины

Из формулы Вульфа-Брэгга следует, что если длина волны падающего излучения постоянна, то синус угла дифракции будет обратно

пропорционален расстоянию между плоскостями, тогда плоскостям с малым межплоскостным расстоянием будут соответствовать большие углы θ . Для описания данной закономерности между синусом угла отражения и межплоскостным расстоянием вводится понятие обратной решетки, узлами которой $(h'k'l')$ являются концы векторов длиной $1/d_{hkl}, 2/d_{hkl}, \dots, n/d_{hkl}$ (где n – порядок отражения) отложенных от начала координат перпендикулярно плоскостям h, k и l , где $h'=nh, k'=nk, l'=nl$. Параметры элементарной ячейки обратной решетки обозначаются как: $a^*, b^*, c^*, \alpha^*, \beta^*, \gamma^*$. Можно выразить вектора прямой решетки $(\vec{a}, \vec{b}, \vec{c})$ через вектора обратной решетки $(\vec{a}^*, \vec{b}^*, \vec{c}^*)$ как векторное произведение: $\vec{a}^* = [\vec{b} \times \vec{c}]; \vec{b}^* = [\vec{a} \times \vec{c}]; \vec{c}^* = [\vec{a} \times \vec{b}]$.

На основе формулы Вульфа-Брэгга можно записать условия возникновения дифракции используя представление об обратной решетке. Пусть начало координат O располагается в одном из узлов обратной решетки. Тогда из точки A можно провести окружность радиусом $1/\lambda$ таким образом, чтобы начало координат находилось на этой окружности (Рис. 16) [36].

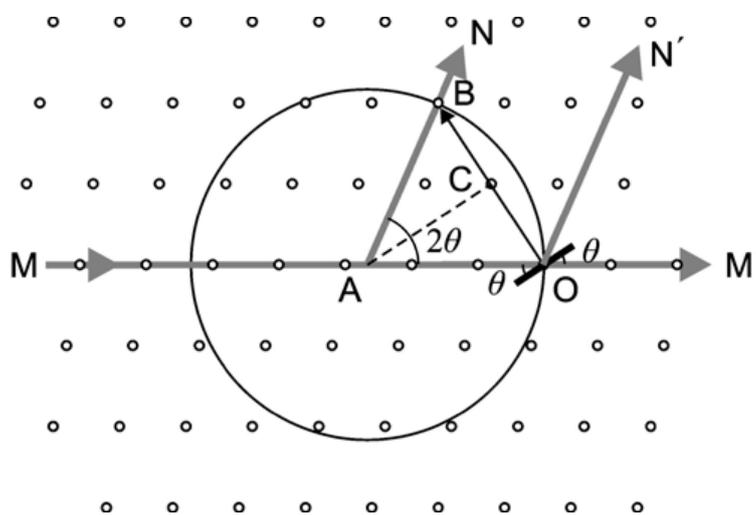


Рисунок 16. К выводу уравнения Вульфа-Брэгга для обратной решетки [36].

Поместим в начало координат кристалл, тогда через точки A и O можно провести луч рентгеновского излучения MM' , а отраженный луч пройдет в направлениях AN и ON' под углом 2θ . Если на рассматриваемой окружности

окажется узел обратной решетки **В**, тогда перпендикулярно направлению **ОВ** будет расположена кристаллографическая плоскость, которая в обратной решетке представлена точкой **В**.

Согласно определению обратной решетки расстояние **ОВ** будет равно n/d_{hkl} , а угол **ОАВ** равен 2θ . Тогда для треугольника **ОАС** справедливо: $\sin \theta = \frac{[ОВ/2]}{ОА} = \frac{[n/2d_{hkl}]}{[1/\lambda]}$. Упростив данное выражение, получим формулу Вульфа-Брэгга: $2d_{hkl} \sin \theta = n\lambda$. Таким образом, справедливо утверждение, что если на окружность радиусом $1/\lambda$, на которой находится начало координат **О**, попадает узел обратной решетки, то из центра окружности **А** в этот узел будет идти дифрагированный луч **АН** [36]. Данное рассуждение справедливо и для трехмерной кристаллической решетки. В этом случае дифракция будет наблюдаться, если на сферу радиуса $1/\lambda$ будет попадать узел обратной решетки, эту сферу называют сферой Эвальда. При вращении обратной решетки относительно этой сферы в отражающее положение будет попадать большее количество узлов обратной решетки (Рис. 17). Таким образом, для получения полной дифракционной картины в эксперименте необходимо осуществлять вращение кристалла белка.

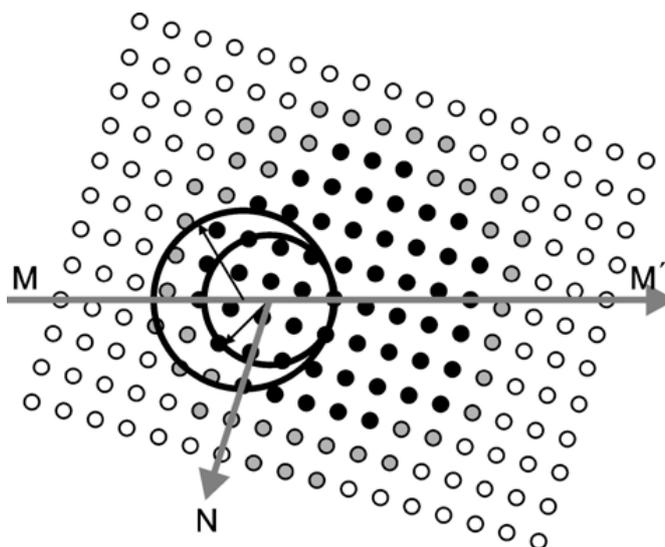


Рисунок 17. Узлы обратной решетки, попадающие в отражающее положение. [36].

По симметрии дифракционной картины возможно определение сингонии решетки, поскольку сингонии элементарной ячейки кристалла и обратной решетки совпадают. Наблюдаемая дифракционная картина всегда centrosymmetric, поскольку лучи hkl и $\bar{h}\bar{k}\bar{l}$ являются отражениями от одной и той же серии плоскостей, и интенсивности отражений I_{hkl} и $I_{\bar{h}\bar{k}\bar{l}}$ совпадают по закону Фриделя. Это означает, что группу симметрии можно установить только с точностью до центра инверсии и наблюдаемая дифракционная картина будет принадлежать к одной из одиннадцати centrosymmetric кристаллографических точечных групп [36].

Для того чтобы определить группу симметрии кристалла применяют правила погасания, которые можно сформулировать следующим образом: если имеется центрированные решетки и (или) открытые элементы симметрии, тогда часть отражений с определенными индексами будут отсутствовать в дифракционной картине. В центрированных решетках будут наблюдаться отражения с произвольными индексами hkl :

A-решетка: при $k + l = 2n$,

B-решетка: при $h + l = 2n$,

C-решетка: при $h + k = 2n$,

I-решетка: при $h + k + l = 2n$,

F-решетка: при $h + k = 2n, k + l = 2n, h + l = 2n$,

R-решетка: при $-h + k + l = 3n$

В результате с помощью этих правил можно определять наличие открытых элементов симметрии и центрировки решетки. Тем не менее, остается неопределенность в определении пространственной группы симметрии, поскольку остается неясным вопрос, есть ли в пространственной группе симметрии зеркальные плоскости и поворотные оси симметрии [36].

Рассеяние рентгеновских лучей. Структурная амплитуда и проблема фаз

Сферическую модель атома, когда любой его элементарный объем рассеивает рентгеновские лучи независимо, можно использовать для описания рассеяния рентгеновского излучения. Согласно этой модели в результате рассеяния амплитуду с учетом разности фаз можно вычислить интегрированием волн, рассеянных от разных точек внутри атома. Зависимость, которая характеризует во сколько раз амплитуда рассеянной атомом волны, больше амплитуды волны рассеянной в том же направлении одним электроном, называется функцией атомного рассеяния (ФАР) [36]. Рассеяние от атома определяется количеством электронов и строением электронных оболочек (чем больше у атома электронов, тем интенсивнее будет его рассеяние). В случае флуоресценции при определенных длинах волн будет происходить поглощение излучения и последующее испускание атомом излучения с большей или с той же длиной волны, но с разницей в фазе. Также при отставании по фазе может наблюдаться интерференция с упруго рассеянным излучением, тогда необходимо учитывать возникающую разность фаз. Аномальным рассеянием называют изменение вида функции атомного рассеивания вблизи области поглощения атома [36].

Волна, рассеянная от элементарной ячейки кристалла будет представлять собой результат сложения волн рентгеновского излучения, рассеянных от каждого атома внутри элементарной ячейки. Наличие в составе элементарной ячейки различных атомов приводит к возникновению разницы фаз рассеянными ими волн. Тогда при расчете суммарной амплитуды рентгеновского луча, рассеянного элементарной ячейкой необходимо учитывать разные рассеивающие способности атомов и различие в фазах [36]. Амплитуда рассеянных волн будет определяться функциями атомного рассеяния с заданными значениями $\sin\theta/\lambda$. Расположение атома в элементарной ячейке и направления, вдоль которого происходит

суммирование волн, будет определять значения начальных фаз, рассеянных атомами. Также от рассеивающей способности атома и его положения в элементарной ячейки будет зависеть вклад в результирующую амплитуду волны, рассеянной элементарной ячейкой. Для того чтобы описать рассеяние от элементарной ячейки в направлении плоскости hkl применяют понятие структурной амплитуды (F_{hkl}), которая в случае приближения точечных атомов, распределенных с координатами x, y, z выглядит как

$$F_{hkl} = \sum f_j e^{i2\pi(hx_j + ky_j + kz_j)}, \quad (26)$$

где h, k, l – дифракционные индексы плоскости; f_j – ФАР j -го атома для заданного угла дифракции, соответствующего отражению hkl . Или в комплексном виде: $F_{hkl} = |F_{hkl}| e^{i\varphi_{hkl}}$, где $|F_{hkl}|$ – модуль структурной амплитуды, а φ_{hkl} – фаза. Если от амплитуды волны нужно перейти к интенсивности, производят умножение амплитуды на комплексно-сопряженную величину, что дает так называемый структурный фактор $|F_{hkl}|^2$. Этот фактор показывает во сколько раз интенсивность рассеяния от элементарной ячейки в направлении плоскости (hkl) больше рассеяния от одного электрона. При переходе к непрерывному распределению электронной плотности используется интегральный вид:

$$F_{hkl} = \int_{V_0} \rho(x, y, z) e^{i2\pi(hx + ky + lz)} dV, \quad (27)$$

где ρ – электронная плотность, V_0 – объем ячейки [36].

Применяя обратное преобразование Фурье, можно представить электронную плотность в любой точке элементарной ячейки с помощью определенных в эксперименте структурных амплитуд и по расположению максимумов электронной плотности вычислить координаты атомов элементарной ячейки:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} |F_{hkl}| e^{i\varphi_{hkl}} e^{-i2\pi(hx + ky + lz)} \quad (28)$$

Однако из экспериментальных данных возможно только измерение интенсивностей ($I_{hkl} \sim |F_{hkl}|^2$), что приводит к получению информации только

о модулях структурных амплитуд, но не о разности фаз. Без значений фаз φ_{hkl} расчет электронной плотности и определение положений атомов в элементарной ячейке невозможно. Это так называемая фазовая проблема. Были разработаны различные методы для решения фазовой проблемы, которые позволяют либо оценить значения фаз, либо даже рассчитать структуру без них.

Методы решения фазовой проблемы

Метод проб и ошибок

В приближении точечных атомов, если известна структура элементарной ячейки, для любого отражения можно рассчитать структурную амплитуду F_{hkl} и, таким образом, предсказать положение пиков на дифракционной картине, так как в структурной амплитуде присутствует информация о вкладе в отражение hkl (в том числе и фазы) от каждого атома элементарной ячейки. На основе экспериментально установленных значений интенсивностей пиков дифракционной картины I_{hkl} можно получить информацию о модулях структурных амплитуд F_{hkl} . То есть с помощью данного метода можно проводить сравнение экспериментальных данных ($|F_{hkl}|_{\text{эксп}}$) с рассчитанным для пробной модели ($|F_{hkl}|_{\text{выч}}$).

Для построения пробной модели применяются данные известных кристаллографических и физико-химических параметров вещества, что позволяет в результате определять предполагаемое расположение атомов внутри ячейки. Затем экспериментальные данные сопоставляют с рассчитанной моделью, и используют так называемый фактор расходимости R для анализа качества предложенной модели:

$$R = \frac{\sum |F_{hkl}|_{\text{эксп}} - |F_{hkl}|_{\text{выч}}}{\sum |F_{hkl}|_{\text{эксп}}} \quad (29)$$

При $R \leq 0,05$ структуру считают надежно установленной.

Предложенный подход применим для определения структуры веществ с элементарными ячейками, в состав которых входит небольшое количество

атомов. В настоящее время метод проб и ошибок практически не используется [36].

Метод изоморфного замещения

Благодаря методу изоморфного замещения достигнут настоящий прорыв в решении фазовой проблемы в РСА белка, и он до сих пор остается важным методом определения структур *de novo*. В данном методе кристаллы белка вымачивают в солевых растворах или других соединениях, содержащих атом или молекулу с высокой электронной плотностью. Эти ионы или молекулы, содержащие тяжелый атом, диффундируют в кристаллическую решетку, взаимодействуют с поверхностью белка и, в зависимости от химических свойств, образуют ковалентные связи с белком. Например, ионы Hg^{2+} взаимодействуют с сульфгидрильной группой цистеинов или $[\text{PtCl}_4]^{2-}$ связываются с боковыми цепями гистидинов. За счет наличия большого числа электронов тяжелые атомы значительно сильнее рассеивают рентгеновские лучи по сравнению с атомами аминокислот. Для того чтобы данный метод можно было применять для решения фазовой проблемы необходимо, чтобы тяжелый атом не влиял на структуру белка и упаковку белковых молекул в кристалле, что означает, что модифицированные тяжелым атомом кристаллические производные должны быть изоморфны нативному кристаллу без тяжелого атома. Таким образом, в дифракционных изображениях будет наблюдаться лишь отличия в относительных интенсивностях для нативного кристалла и его изоморфной производной.

Различия в интенсивности соответствующих рефлексов между нативным кристаллом и кристаллом изоморфной производной позволяют рассчитать положение тяжелых атомов в элементарной ячейке кристалла. Для описания дифракционных данных применяют функцию свертки:

$$P(\vec{u}) = \int_V \rho(\vec{r})\rho(\vec{r} + \vec{u})dV, \text{ или} \quad (30)$$

$$P(u, v, w) = \int_V \rho(x, y, z)\rho(x + u, y + v, z + w)dV.$$

Интегрирование производится по всему объему ячейки.

Под знаком интеграла находится произведение электронной плотности в двух точках элементарной ячейки, которые разделены межатомным вектором \vec{u} ; u, v, w – координаты межатомного вектора \vec{u} ; \vec{r} – вектор, описывающий положение атома, x, y, z – фракционные координаты атома в элементарной ячейке. В случае когда концы вектора \vec{u} соединяют два атома структуры функция Паттерсона не равна нулю, поэтому ее также называют межатомной функцией [36].

Если электронную плотность записать в виде ряда Фурье, в котором коэффициентами будут являться экспериментально определяемые квадраты структурных амплитуд, то функция Паттерсона будет принимать вид:

$$P(u, v, w) = \frac{1}{V} \sum |F_{hkl}|^2 e^{-i2\pi(hu+kv+lw)} \quad (31)$$

Для centrosymmetric дифракционной картины (за исключением случаев аномального рассеяния $|F_{hkl}|^2 = |F_{\bar{h}\bar{k}\bar{l}}|^2$), справедливо выражение:

$$P(u, v, w) = \frac{1}{V} \sum |F_{hkl}|^2 \cos 2\pi(hu + kv + lw), \quad (32)$$

тогда, функция $P(u, v, w)$ будет определяться квадратами модулей структурных амплитуд независимо от фаз, то есть ее можно определить экспериментально [36].

Чтобы записать функцию Паттерсона для структуры из N атомов, задают положение начала координат, в которое поочередно помещают атомы ячейки и проводят из начала координат вектора до всех атомов структуры. Таким образом, получают набор из N^2 векторов, описываемых функцией Паттерсона (Рис. 18). Вектора с более высокими максимумами межатомной функции будут соответствовать более тяжелым атомам. В случае кратного расположения атомов интенсивность пика будет возрастать прямо пропорционально, то есть если масса одного из атомов в независимой части ячейки будет превышать массу остальные атомы, то вектор, связывающий два таких атома, будет отвечать самому высокому максимуму на карте функции Паттерсона. Тогда координаты расположения самого тяжелого

атома в элементарной ячейке можно определить по положению наиболее интенсивного пика на карте функции Паттерсона. Затем, на основе анализа модулей структурных амплитуд и фаз полученных из эксперимента для тяжелого атома возможно рассчитать карту электронной плотности [36].

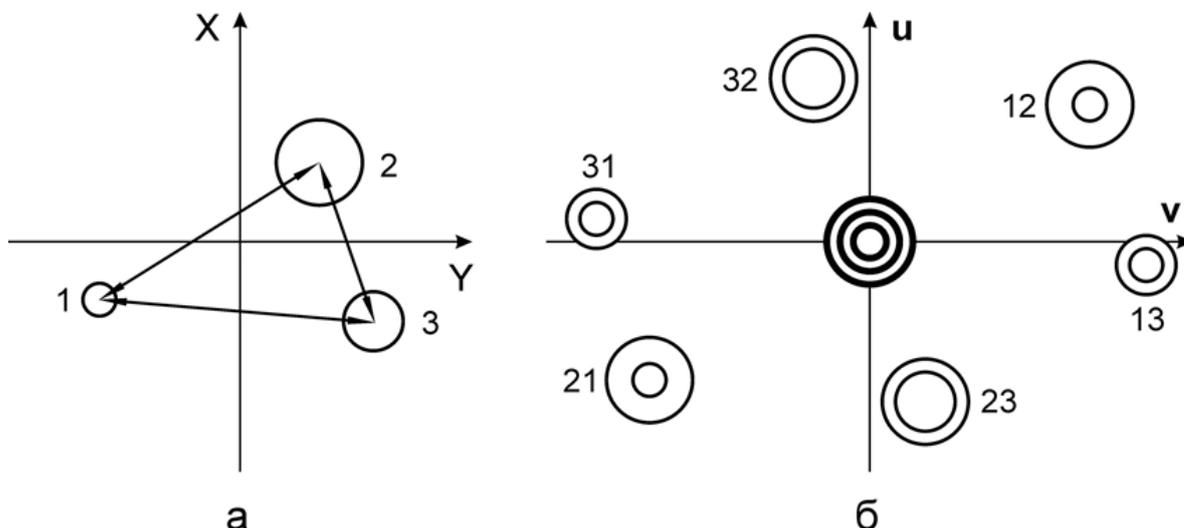


Рисунок 18. Графическое представление функции Паттерсона для трех атомов: а) расположение атомов; б) карта функции Паттерсона [36].

Для кристаллов белков с большим количеством атомов в элементарной ячейке функция Паттерсона может быть применена не ко всем атомам, а к уменьшенному набору атомов (тяжелых атомов). В результате, определяется положение отдельных областей и информация о расстояниях и относительной ориентации между тяжелыми атомами, и в первом приближении определяется положение тяжелых атомов внутри элементарной ячейки. Информация о фазе, полученная из положений тяжелых атомов, позволяет оценить значения фаз для атомов белка и впоследствии используется для расчета карты электронной плотности. Тем не менее, величина ошибки в фазах может быть весьма существенной, в случае если используется только одна производная тяжелого атома. Полученные ошибки в значениях электронной плотности приводят к неверной или неполной картине распределения атомов в элементарной ячейке. Для того чтобы обойти эту проблему с помощью изоморфного замещения вводят тяжелоатомные производные в структуру ячейки. Благодаря тому, что

наличие информации для каждого независимого изоморфного производного уменьшает ошибку в оценке фазы, достигаются более качественные карты электронной плотности структуры белков.

Метод молекулярного замещения

В данном методе для анализа карт электронной плотности используются результаты ранее определенных белков гомологичных по структуре. В этом случае для получения в начальном приближении значений неизвестных фаз исследуемого объекта используются фазы структурных факторов, рассчитанные по известной атомной модели гомологичного белка. Комбинируя эти данные с экспериментальными модулями структурных факторов для исследуемого объекта можно получить хорошее приближение к искомому распределению электронной плотности. Для анализа качества полученных карт электронных плотностей сравниваются рассчитанные по модели модули структурных факторов с величинами, полученными в эксперименте.

Прямые методы

Термин «прямые» методы подразумевает, что для получения информации о структуре исследуемого соединения используется только набор интенсивностей рефлексов, полученный в рентгеновском эксперименте. В основе данных подходов лежит статистический метод, который предполагает, что функциями координат атомов в элементарной ячейке являются все структурные амплитуды и их значения не являются произвольными. Считая, что величины электронной плотности в кристалле не может принимать отрицательных значений, для части сильных отражений получают величины структурных амплитуд. Далее выбирают набор значений фаз, соответствующий предполагаемому строению элементарной ячейки для построения карт электронной плотности $\rho(x,y,z)$ [36].

Использование эффекта аномального рассеяния

Данный метод получил интенсивное развитие благодаря использованию синхротронного излучения в РСА и возможности проведения эксперимента на определенных длинах волн. Метод основан на анализе результатов экспериментов на двух длинах волн, одна из которых соответствует краю полосы поглощения определенного типа атомов в исследуемой структуре. Положение атомов в ячейке определяют на основе анализа картины аномального рассеяния отдельных атомов. Для белковых молекул введение тяжелых атомов позволяет определить фазы отражений непосредственно из эксперимента [36].

Интерпретация карт распределения электронной плотности

На основе разработанных методов решения проблемы фаз возможно определение координат некоторых атомов или начальных фаз некоторых отражений. Как правило, это удается сделать для наиболее тяжелых атомов, поскольку их вклад в значения структурных амплитуд наибольший. В этом случае можно оценить значения структурных амплитуд как:

$$F_{hkl} = |F_{hkl}| e^{i\varphi_{hkl}} \approx \sum_{j=1}^m f_j e^{i2\pi(hx_j + ky_j + lz_j)}. \quad (33)$$

Полученная таким образом карта электронной плотности будет приближенной, то есть в ней будут максимумы соответствующие атомам, принятым за основу расчета, но также будут присутствовать и другие максимумы, соответствующие оставшимся атомам. Далее в расчете структурных амплитуд используют координаты появившихся максимумов, что позволяет уточнить значения начальных фаз и построить более точное распределение электронной плотности. Затем эту операцию повторяют до тех пор, пока в распределении электронной плотности не будет определено расположение всех атомов. В качестве оценки верности интерпретации электронной плотности применяют характер распределения $\rho(x, y, z)$, в котором выявляется разумное размещение атомов, и исчезают ложные

максимумы. На каждом этапе вычисляется значение R-фактора, которое должно уменьшаться по мере выявления атомов [36].

1.1.3. Криогенная просвечивающая электронная микроскопия

Криоэлектронная микроскопия (крио-ЭМ) - это метод определения трехмерных структур методом электронной микроскопии на основе анализа проекционных изображений молекулярных комплексов, замороженных в «нативном», некристаллическом состоянии ультратонких электроннопрозрачных образцов. Толщина образца при этом составляет порядка 0,1 мкм. Основным ограничением метода электронной микроскопии для исследования структур биологических объектов была необходимость окрашивания образцов и их обезвоживание (дегидратация) для обеспечения контрастности изображений и сохранения образца в вакууме внутри колонки электронного микроскопа. Данное ограничение было преодолено группой Дюбуше и его коллег, которые разработали метод быстрого замораживания исследуемого вещества в жидком этане для получения стекловидных образцов, в которых тонкий слой водного раствора также затвердевает при охлаждении [37]. Полученные таким образом стекловидные образцы устойчивы в вакууме внутри микроскопа, а низкая температура замедляет скорость радиационного повреждения образца, что также является принципиальным для исследований биологических комплексов.

Общие принципы работы просвечивающего электронного микроскопа

В просвечивающей или трансмиссионной электронной микроскопии (ПЭМ, в англоязычной литературе TEM) электронный луч, прошедший через образец, увеличивается магнитными линзами (объектив) и регистрируется экране или цифровом детекторе с ПЗС матрицей. Разница в напряжении между катодом и анодом составляет порядка 10^5 В. Так как при взаимодействии с образцом (а также с молекулами воздуха) возникает рассеяние электронов, внутри колонны ПЭМ необходимо создание

постоянной вакуумной среды. Это в свою очередь накладывает требования на приготовление образцов, таких как фиксация, дегидратация и заморозка исследуемого объекта.

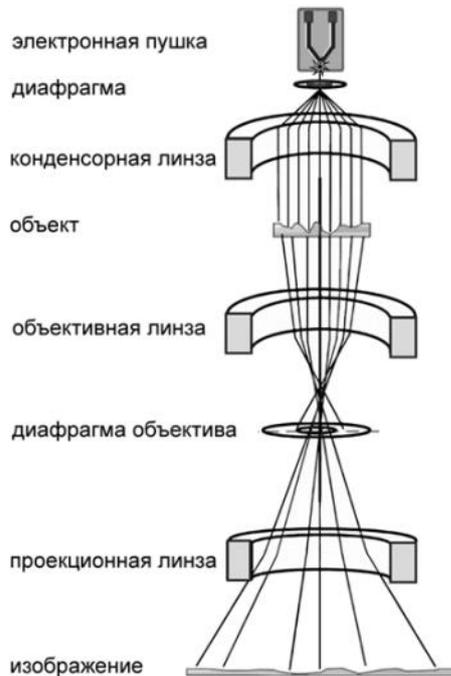


Рисунок 19. Блок-схема колонны ПЭМ (адаптировано из работы [38])

Конструкция электронного и оптического микроскопа схожа с тем отличием, что вместо оптических линз в ПЭМ используются электромагнитные линзы (Рис. 19). Положение электромагнитных линз фиксировано, а фокусное расстояние изменяется путем вариации в них электрического тока. Для электромагнитных линз также характерен астигматизм, искривление поля, сферические и хроматические aberrации. Для фокусирования пучка используют изменения тока в обмотке линзы. С помощью системы, состоящей из объектива-линзы, нескольких промежуточных и проекционной линз формируется увеличенное изображение объекта (Рис. 19). В результате взаимодействия пучка электронов с образцом происходит их рассеивание, и часть из них может взаимодействовать с магнитным полем объективной линзы. Электроны, которые прошли через образец формируют увеличенное изображение объекта, которое регистрируется на экране или детекторе.

Приготовление образцов для ПЭМ

С развитием технологий в области созданий новых микроскопов (стабильных, низкотемпературных держателей образцов; более когерентных источников электронов; создание новых типов детекторов и возможность получения изображений применяя более низкие дозы излучения), методов томографии и обработки изображений за последнее десятилетие произошел резкий прорыв в применении данного метода для получения структур биомолекул и их комплексов практически с атомарным разрешением ($< 4 \text{ \AA}$) [39-42]. ЭМ позволяет осуществлять непосредственную визуализацию и 3D-реконструкцию индивидуальных частиц или комплексов с молекулярной массой более 100 кДа; участков тканей; органелл или даже целых клеток при условии, что они достаточно тонкие ($< 1 \text{ мкм}$) Для того чтобы сквозь них мог проходить электронный луч. Высокая чувствительность биологических молекул к повреждению электронным лучом приводит к тому, что интенсивность рассеяния электронов достаточно мала, что приводит к получению изображений с низкой контрастностью.

Для получения изображений структуры исследуемой биологической молекулы в гидратированном состоянии раствор с образцом наносят на тонкий диск-сетку (из меди, золота или никеля) диаметром около 3 мм с размерами ячейки 30-100 мкм. Сетка в свою очередь покрыта тонкой пористой углеродной пленкой толщиной 5-10 нм и размером пор 0,5-2 мкм в диаметре. Таким образом, получается тонкий слой жидкости, удерживающийся в данных порах за счет поверхностного натяжения (Рис. 20). После нанесения образца на углеродную сетку остаток жидкости удаляют с помощью фильтровальной бумаги и производят мгновенную заморозку путем погружения сетки в жидкий этан (около $-180 \text{ }^\circ \text{C}$), так что молекулы получают замороженными в стекловидном слое воды.

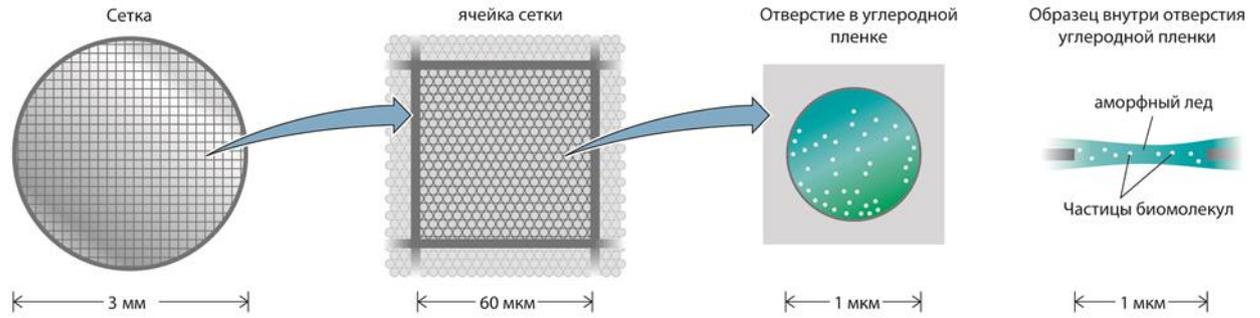


Рисунок 20. Сетки для криоэлектронной микроскопии при различном увеличении (адаптировано из работы [43]).

Для исследования структуры биологических объектов методом крио-ЭМ необходимо повышения контраста изображения молекулы. Для этого применяется так называемый метод негативного контрастирования, в котором контраст повышается путем введения солей тяжелых металлов с высокой отклоняющей способностью ядер атомов контрастера. С помощью данного подхода можно проводить быстрый предварительный анализ исследуемого образца, однако данный метод позволяет изучать только внешнюю поверхность молекулы.

Принцип получения изображений в крио-ЭМ методом отдельных частиц

При прохождении пучка электронов через образец, часть из них проходит сквозь него, не взаимодействуя и не претерпевая никаких изменений, в то время как другая часть электронов изменяет направление движения за счет электростатического взаимодействия с ядрами атомов объекта. При этом взаимодействующие с образцом электроны могут терять часть своей энергии и передавать её образцу (неупругое рассеяние), или могут отразиться без потери энергии (упругое рассеяние). Степень рассеяния в какой-либо области зависит от толщины образца в этой области, его плотности и его средней атомной массы. Большое отклонение будет наблюдаться, если отрицательно заряженные электроны проходят вблизи положительно заряженных ядер (элементы с большим атомным номером, ядра атомов солей тяжелых металлов контрастера) и если скорость

электронов в пучке низкая (зависит от ускоряющего потенциала). Регистрируемое изображение формируется упруго рассеянными электронами и электронами, прошедшими сквозь образец без потери энергии. Считается, что при упругом рассеивании и малых углах отклонения энергия электронного пучка не изменяется. В среднем величина угла рассеивания составляет 0,1 радиан. Электроны, отклоняющиеся на большие углы, отсекаются с помощью диафрагмы. Для уменьшения телесного угла в ЭМ используются апертуры (конденсорная, объектная и селекторная), что способствует увеличению разрешения, глубины поля и глубины фокуса, контраста изображения и углового разрешения. С помощью линзы-объектива происходит преобразование рассеянных волн в изображение, которое увеличивается и проецируется на экране или детекторе системой проекционных линз.

В большинстве случаев ЭМ изображения представляют собой разницу в интенсивностях пропускной способности отдельных участков сетки с нанесенным на нее образцом. Поскольку биологические объекты состоят в основном из легких атомов таких как H, O, N и C, наблюдается небольшое смещение электронного пучка, что на фоне общего количества электронов в пучке приводит к изображению с низким амплитудным контрастом. Поэтому основной вклад в контраст изображения формируется так называемым фазовым контрастом. Он обусловлен наличием прямой (нерассеянной) и рассеянной волновых составляющих электронной волновой функции. Обе составляющие имеют одинаковую длину волны, но их фазы различаются. Разность в фазах будет определяться углом рассеивания. Для волновых составляющих будет наблюдаться интерференционная картина в плоскости изображения в зависимости от разности фаз. Амплитуда результирующей волны будет складываться из амплитуд волновых составляющих и разности фаз между ними. Для получения фазового контраста производят дефокусировку микроскопа, что приводит к появлению низкочастотной контрастности за счет снижения контрастности на более высоких частотах.

Для описания смещения сигнала от образца до плоскости изображения в электронном микроскопе вводится функция переноса контраста или частотно-контрастная характеристика (ЧКХ, в англоязычной литературе STF или contrast transfer function). Данная осциллирующая функция в пространственно-частотной области описывает, как aberrации влияют на изображение образца:

$$\begin{aligned} \text{ЧКХ}(f) = & A(\sin(\pi\lambda f^2(\Delta z - 0,5\lambda^2 f^2 c_s))) \\ & + B \cos(\pi\lambda f^2(\Delta z - 0,5\lambda^2 f^2 c_s)) \end{aligned} \quad (34)$$

где f – частота, Δz – расстояние до фокальной плоскости, c_s – коэффициент сферической aberrации, λ – длина волны, A – огибающая функция, зависящая от дефокусировки, которая соответствует затуханию сигнала для заданной угловой апертуры, B – доля амплитудного значения контраста [44].

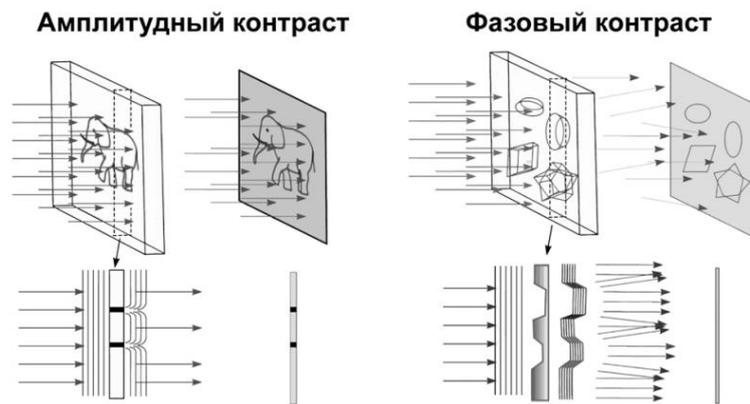


Рисунок 21. Амплитудный и фазовый контраст в ЭМ (адаптировано из работы [38])

Таким образом, максимальный контраст изображения достигается при наибольшем значении модуля ЧКХ для заданного значения частоты (Рис. 21).

Для биологических объектов контраст изображения может быть улучшен путем комбинированного воздействия сферической aberrации и изменения расстояния до фокальной плоскости (дефокусировки). Контрастность изображения повышается за счет возникновения фазового сдвига между рассеянными и нерассеянными электронами из-за сферической aberrации и дефокусировки. Поэтому для увеличения контраста используют дефокусировку в пределах 0,5-3,5 мкм (Рис. 22).

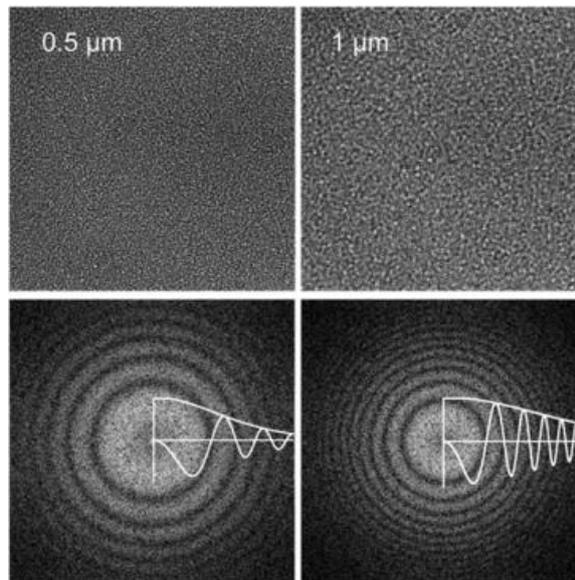


Рисунок 22. Зависимость ЧХК от размера дефокуса (адаптировано из работы [38]).

Применение дефокусировки увеличивает контраст изображения, но в тоже время усложняет его интерпретацию, так как некоторые детали изображения могут иметь обратный контраст. Кроме того происходит размывание мелких деталей изображения, поскольку с увеличением пространственной частоты происходит затухание осцилляций за счет влияния окружения и не когерентности пучка. Для того чтобы описать как исходная точка связана с ее изображением используется функция рассеяния точки (ФРТ, в англоязычной литературе: point spread function, PSF). Эта функция описывает несовершенства системы формирования изображения в реальном пространстве. Таким образом, происходит искажение изображения объекта, так как его идеальное изображение претерпевает свертку с ФРТ и непосредственно не связано с распределением плотности в исходном объекте:

$$\psi_{\text{набл}}(\vec{r}) = \psi_{\text{образца}}(\vec{r}) * \text{ФРТ}(\vec{r}) \quad (35)$$

где $\psi_{\text{набл}}(\vec{r})$ - наблюдаемое изображение, $\psi_{\text{образца}}(\vec{r})$ - изображение идеальной проекции образца, \vec{r} - волновой вектор изображения в реальном пространстве.

Для восстановления информации, изображение должно быть избавлено от эффекта ЧКХ, которая связана преобразованием Фурье с функцией рассеяния точки:

$$F\{\psi_{\text{набл}}(\vec{r})\} = F\{\psi_{\text{образца}}(\vec{r})\} * \text{ЧКХ}(\vec{R}) * E(\vec{R}) \quad (36)$$

где $E(\vec{R})$ - огибающая функция, которая описывает влияние различных нестабильностей и разрушение образца под действием излучения пучка.

Для того чтобы получить полное восстановление данных изображения у слабых фазовых объектов, наблюдаемое изображение делят на частотно-контрастную характеристику и производят обратное преобразование из пространства Фурье. Данная операция называется коррекцией частотно-контрастной характеристики. Существует трудность в проведении данной операции связанная с тем, что в выражение для ЧКХ входят нули, и спектр невозможно восстановить из снимков, сделанных с одним дефокусом. Поэтому используют изображения, снятые при различных значениях дефокусировки для полного восстановления информации, так что нули каждой отдельной частотно-контрастной характеристики будут заполнены значениями других изображений с различными значениями дефокусировки.

После коррекции ЧКХ, изображение объекта можно представить в виде набора двумерных проекций трехмерной структуры исследуемого объекта в различных ориентациях.

До начала регистрации изображений выбирается размер квадратной ячейки, в центре которой расположена исследуемая молекула. Размер выбранной ячейки играет важную роль для процесса выравнивания на последующем этапе, поэтому ячейку выбирают таким образом, чтобы объект целиком помещался в ней и занимал $\sim 85\%$ площади. Для реконструкции трехмерного изображения необходимо выполнение процедуры нормализации, которая приводит среднее значение электронной плотности всех изображений частиц к одному значению. В полученном наборе двумерных проекций исследуемого объекта для каждого изображения соотношение сигнал/шум будет низким. Далее для его увеличения

необходимо совместить одинаковые проекции и определить относительное положение и ориентацию изображений частиц. Для этого в качестве эталонного изображения выбирается усредненное изображение всех частиц в наборе данных и относительно него путем определения сдвигов и углов производится поворот всего набора изображений. Данный процесс выравнивания повторяют несколько раз, получая все более и более четкие изображения, усреднение которых дает новую эталонную структуру для повторного проведения процедуры уточнения. Для того чтобы иметь возможность оценивать степень сходства между различными изображениями используют кросс-корреляционную функцию (ККФ, в англоязычной литературе cross-correlation function, CCF):

$$\text{ККФ}(\vec{s}) = \frac{\int g_1(\vec{r}+\vec{s})g_2(\vec{r})d\vec{r}}{\sqrt{\int g_1(\vec{r})g_1(\vec{r})d\vec{r} \times \int g_2(\vec{r})g_2(\vec{r})d\vec{r}}}, \quad (37)$$

где \vec{r} - это вектор в пространстве, а \vec{s} является сдвигом между двумя изображениями. Если произвести кросс-корреляцию изображения самого на себя, то такую функцию называют автокорреляционной (АКФ). В пространстве Фурье ККФ можно записать как:

$$\text{ККФ}(\vec{s}) = F^{-1} \left\{ \frac{G_1^*(\vec{R})G_2(\vec{R})}{\sqrt{\int |G_1(\vec{R})|^2 d\vec{R} \times \int |G_2(\vec{R})|^2 d\vec{R}}} \right\}, \quad (38)$$

где \vec{R} – вектор в пространстве Фурье, а G_1 и G_2 - Фурье-трансформанты функций g_1, g_2 .

В процессе классификации все изображения попарно сравниваются друг с другом, и вычисляется ККФ. После чего похожие изображения объединяют вместе в один класс и производят суммирование изображений уже внутри этого класса, что дает проекции объекта с большим контрастом. Затем изображения частиц сравнивается с каждым классом, после чего изображение сдвигают на определенный вектор или вращают под определенным углом, чтобы изображения максимально совпадали (Рис. 23). Этапы выравнивания и классификации повторяют несколько раз до тех пор, пока классы не перестают улучшаться.

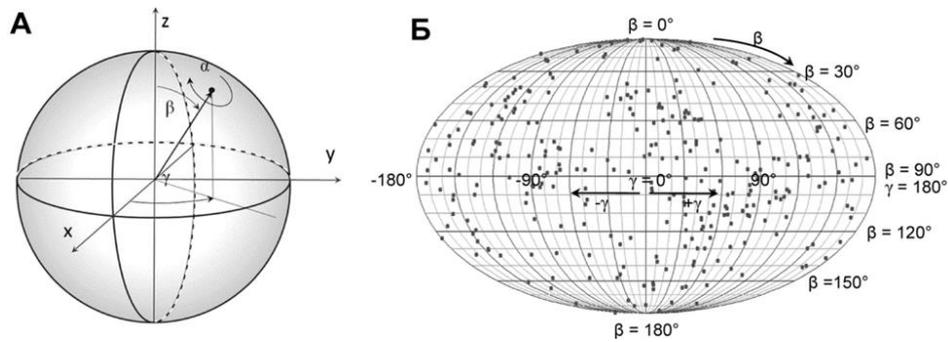


Рисунок 23. Сфера Эйлера (А) и пример углового распределения классов объекта (Б) (адаптировано из работы [38]).

Для получения реконструкции трехмерного изображения объекта на основе его двумерных проекций определяют ориентацию проекций на основе значений координат и углов. С этой целью разработаны несколько различающихся подходов, объединенных в рамках двух методов. Метод, в котором реконструкция выполняется в реальном пространстве, и метод, в котором реконструкция осуществляется в пространстве Фурье [45]. Отметим, что в основе идеи реконструкции 3D структуры объекта по его 2D проекциям лежит предположение, что существует бесконечное число проекций, которые равномерно распределены на сфере Эйлера с началом координат в центре масс объекта (Рис. 24).

Общая схема процедура получения данных о трехмерной структуре исследуемого объекта методом крио-ЭМ показана на рисунке 24:

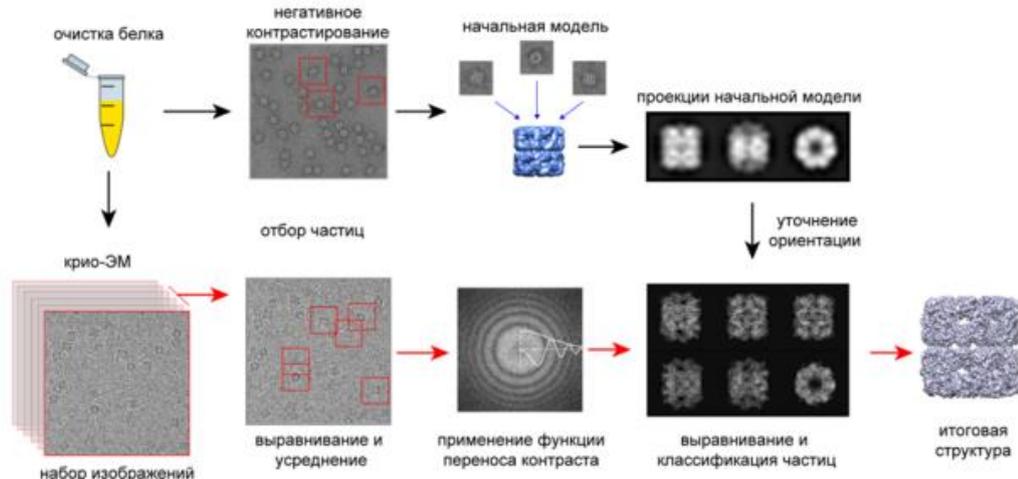


Рисунок 24. Схема обработки данных эксперимента по крио-ЭМ (адаптировано из работы [46]).

1.2. Рибосомы и биосинтез белка

Биосинтез белка – многостадийный процесс синтеза белковых молекул, протекающий во всех живых организмах и являющийся одним из наиболее консервативных биологических процессов. Центральная догма молекулярной биологии гласит, что генетическая информация, хранящаяся в ДНК, переводится в РНК и согласно коду матричной РНК (мРНК), рибосома синтезирует полипептидную цепь. В течение цикла трансляции (инициация, элонгация, терминация) происходит связывание с рибосомой различных белковых факторов. Рибосома является основным связующим звеном между генами и белками и состоит из нуклеиновых кислот (рибосомной РНК или рРНК) и рибосомных белков (р-белков).

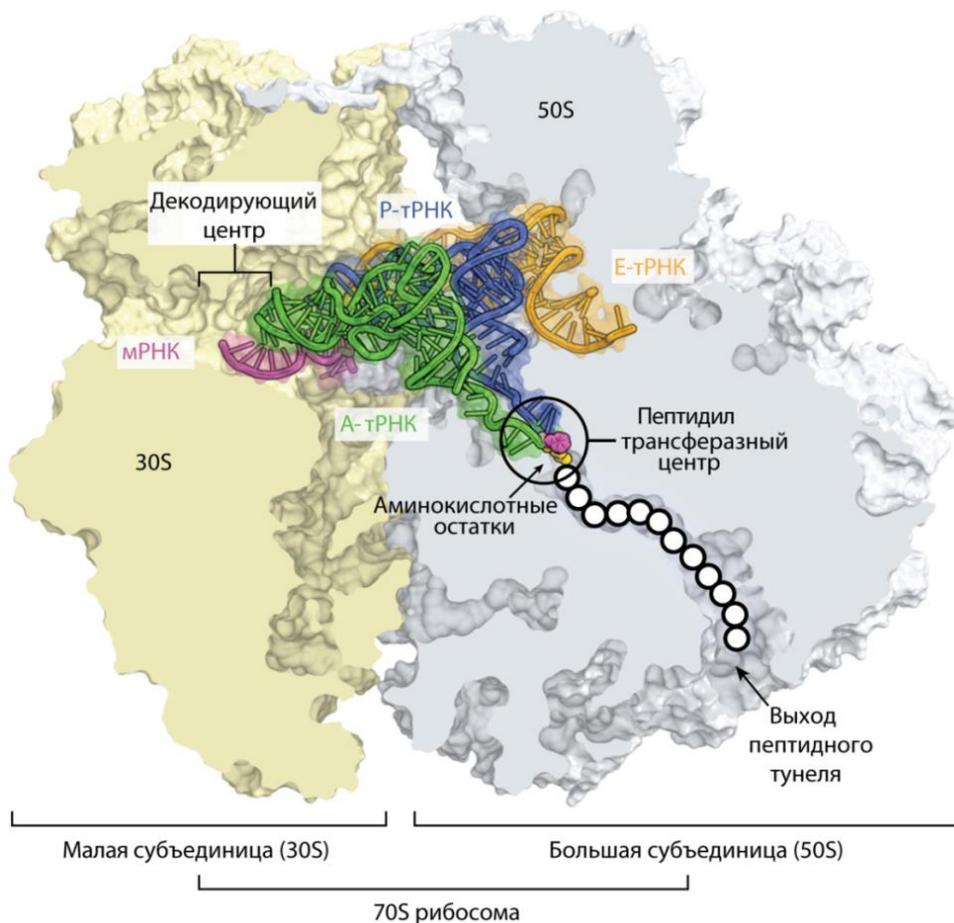


Рисунок 25. Структура рибосомы и ее функциональные сайты. Отмечены основные функциональные сайты, мРНК и тРНК (адаптировано из работы [47]).

Рибосомы всех живых клеток состоят из двух субъединиц, называемых большой и малой субъединицей. Рибосомные субъединицы состоят из рРНК и р-белков с соотношением около 2:1 (РНК:белок) у бактерий и около 1:1 у эукариот. Рибосомы митохондрий и хлоропластов имеют соотношение РНК:белок 1:2 и 3:2 соответственно [48]. Рибосома является асимметричным макромолекулярным комплексом, и каждая ее субъединица имеет определенную структурную и функциональную организацию, выполняющих различные функции в процессе трансляции (Рис. 25).

Главные функциональные сайты рибосомы находятся на интерфейсе рибосомы, состоящем в основном из рРНК. На малой рибосомной субъединице находятся участки связывания мРНК и трех тРНК (А, Р и Е). В А-сайте происходит связывание аминоацил-тРНК (aa-тРНК) согласно последовательности нуклеотидов мРНК (декодирование). В Р-сайте удерживается тРНК несущая растущую полипептидную цепь (пептидил-тРНК). В Е-сайте находится деацелированная тРНК перед выходом из рибосомы. Во время трансляции тРНК перемещается из А-сайта в Р-сайт и затем из Р-сайта в Е-сайт вместе с мРНК (транслокация). Большая субъединица и ее пептидилтрансферазный центр (ПТЦ) обеспечивает формирование пептидной связи. Основные функциональные области большой субъединицы это сайты связывания тРНК (А, Р и Е) и ПТЦ, который находится в начале пептидного туннеля, проходящего через «тело» большой субъединицы. После образования пептидной связи в ПТЦ, растущая полипептидная цепь перемещается с пептидил-тРНК, в Р-сайте, на aa-тРНК в А-сайте. В результате растущая цепь белка увеличивается на один аминокислотный остаток.

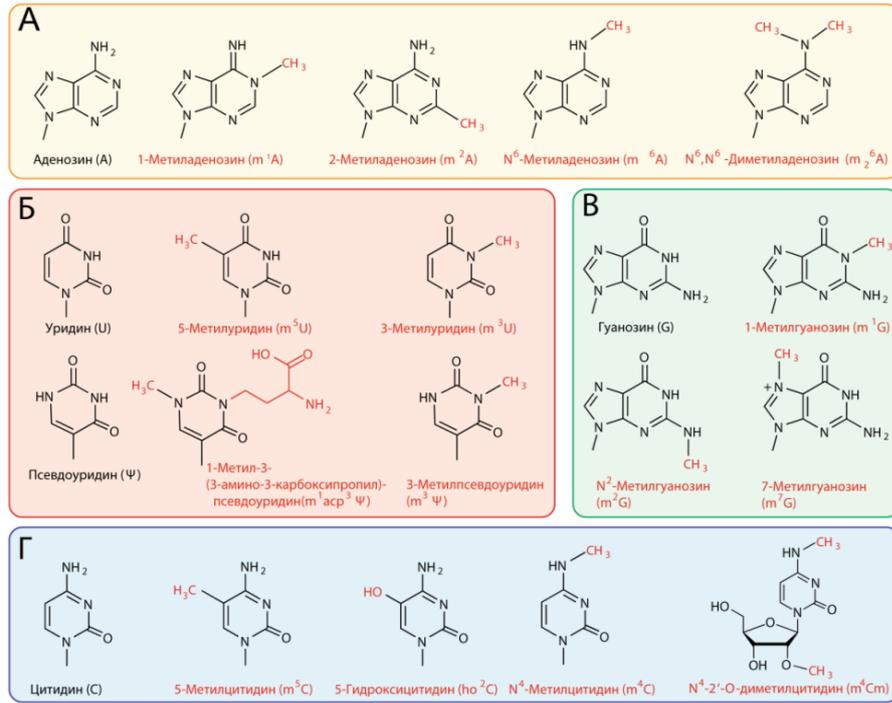


Рисунок 26. Химическая структура нуклеотидов рРНК и их модификаций. Не модифицированные аденозин, уридин и псевдоуридин (Б), гуанозин (В) и цитидин (Г) показаны черным цветом слева на каждой панели. Их природные производные, обнаруженные в рРНК различных видов, показаны справа. Рибозные фрагменты не показаны. Химические группы, которые ферментативно добавляются к нуклеозидам, выделены красным (адаптировано из работы [47]).

Помимо стандартных нуклеотидов (аденин, гуанин, урацил и цитозин) в состав рРНК также входят модифицированные нуклеотиды (Рис. 26). Нуклеотидные модификации встречаются во всех 3 царствах жизни. У бактерий существует три основных типа модификаций нуклеотидов рРНК: метилирование оснований, метилирование рибозы и псевдоуридилрование. Модификации рРНК расширяют топологические свойства нуклеотидов. Считается, что функции модифицированных нуклеотидов зависят не столько от их химической структуры, сколько от их влияния на пространственную структуру окружения. Появление модификации вносит ряд изменений в строении рибосомы: увеличивает жесткость структуры; влияет на связывание отдельных частей друг с другом; усиливает локальное взаимодействие пар оснований. Все это, в конечном итоге, приводит к изменениям в структуре рибосом даже за пределами сайта модификации [49]. Модификации

нуклеотидов рРНК встречаются не случайным образом, а кластеризуются в непосредственной близости к функциональным центрам рибосомы: сайтах связывания А, Р и Е тРНК, межсубъединичных мостиках и ПТЦ [47, 50-54]. Несмотря на то, что роль каждой модификации еще не раскрыта, общее мнение состоит в том, что модификации участвуют в правильном построении функциональных центров, и, таким образом, обеспечивают правильное функционирование рибосом [47]. Наличие химических модификаций рРНК делают ее вторичную и третичную структуру более стабильной, и, по-видимому, они не вовлечены напрямую непосредственно в процесс трансляции [55]. Модификации нуклеотидов, вероятно, стабилизируют менее выгодные конформации РНК за счет внесения изменений в зарядовые взаимодействия, либо влияя на способность образования водородных связей [56]. За некоторыми исключениями, у бактерий модификация рРНК осуществляется сайт-специфическими ферментами [47]. Исследования ферментов метилирования показали, что удаление одной модификации редко сопровождается заметными изменениями в выживаемости бактерий [57]. Однако потеря некоторых модификаций рРНК может привести к различным негативным эффектам: серьезной задержке роста [58], замедлению скорости и точности трансляции [59], изменениям в структуре активных сайтов рибосомы [60]. Несмотря на имеющиеся структурные данные о расположении и химическом составе модификаций нуклеотидов в рибосоме, все еще не хватает биохимических данных о каждой известной модификации рРНК, особенно у разных видов. Известно, что помимо влияния на точность трансляции, модификации рРНК могут участвовать и в процессах сборки рибосомы [50], а также выступать в качестве маркеров для контроля качества конечной структуры рибосомы [61]. Модификации рРНК тесно связаны с устойчивостью и чувствительностью к антибиотикам [62]. Поскольку большинство модификаций рРНК находятся вблизи функциональных центров, которые являются мишенями для связывания антибиотиков, то метилирование рРНК в некоторых случаях позволяет бактериям развивать

устойчивость к антибиотикам. Одной из причин возникновения приобретенной устойчивости бактерий является горизонтальный перенос генов метилтрансфераз. Существует и обратная ситуация, когда потеря гена метилтрансферазы приводит к возникновению устойчивости к антибиотику, если его мишенью был сайт с модифицированными нуклеотидами [50]. Несмотря на приобретенную устойчивость, потеря этих модификаций может привести к задержке роста и некоторым функциональным нарушениям, например, к снижению точности инициации трансляции [63].

Таким образом, структурные исследования модификаций рРНК у патогенных бактерий таких как *S. aureus* представляет большой интерес для понимания особенностей функционирования рибосом, действия антибиотиков и адаптации к ним.

Структурные отличия бактериальных и эукариотических рибосом

Сравнение структуры рибосом прокариот и эукариот показало наличие консервативного ядра, состоящего практически полностью из структуры бактериальной рибосомной РНК и 34 консервативных рибосомных белков (Рис. 27). Несмотря на наличие общей для всех живых клеток консервативной части рибосом, существуют отличия в ее структуре между различными доменами, таксономическими подгруппами, органеллами и в меньшей степени, даже внутри одного вида. В структуре рибосом могут присутствовать набор специфических фрагментов: специфические белки, вставки и расширения консервативных белков и сегментов экспансии рРНК.

Наиболее сильно различия в составе рибосом наблюдаются между доменами жизни. Анализ существующих структур бактериальных рибосом (*Escherichia coli* (*E. coli*) или *Thermus thermophilus* (*T. thermophilus*)) показывает, что в структуре бактериальной рибосомы помимо консервативного ядра, присутствуют 21 специфических для бактерий р-белков, несколько дополнительных участков в структуре консервативных р-белков и рРНК. Эукариотическая рибосома (*Saccharomyces cerevisiae*, *S.*

cerevisiae) содержит 46 специфических для эукариот р-белков (800 кДа), а также расширения и вставки в большинстве р-белков консервативного ядра (200 кДа), и в структуре рРНК. Кроме того, существуют несколько расширений в консервативной части цепей рРНК (около 800 нуклеотидов с общей массой 350 кДа) [64]. Для характеристики и обозначения изолированных или связанных субъединиц рибосом используют значения коэффициента седиментации, который является показателем скорости осаждения микрочастиц в гравитационном поле, создаваемым с помощью центрифугирования (единица измерения: Сведберг, $1S = 10^{13}$ с). Таким образом, ассоциация малой субъединицы (30S у бактерий, 40S у эукариот) с большой субъединицей (50S у бактерий и 60S у эукариот) приводит к образованию полной рибосомы с коэффициентом седиментации 70S у бактерий и 80S у эукариот (Рис. 27).

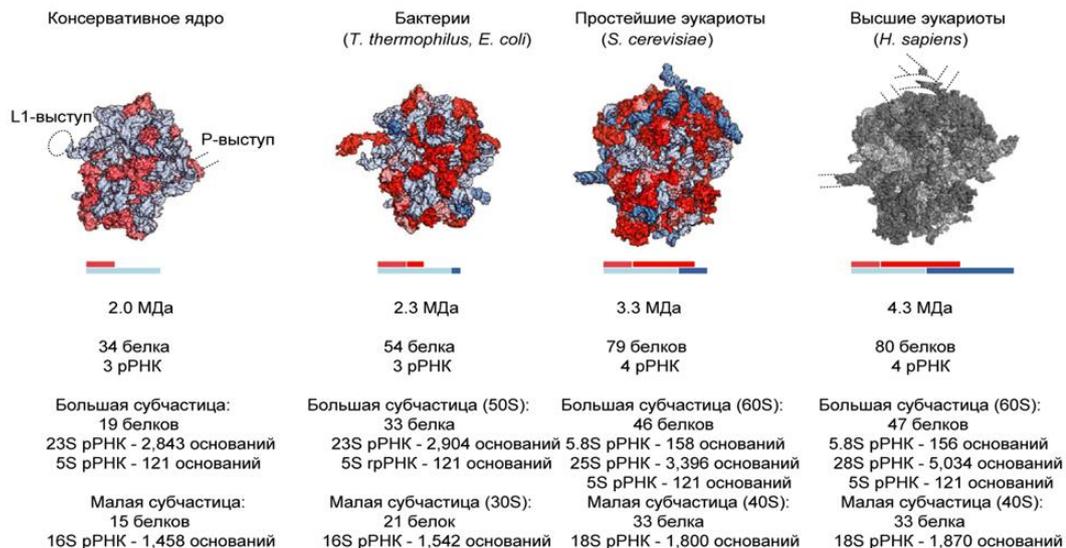


Рисунок 27. Состав бактериальной и эукариотической рибосомы, и консервативного ядра по данным структур определенных методом РСА. Бактериальная и эукариотическая рибосома содержат консервативное ядро, состоящее из РНК (показано голубым) и белков (показано розовым). Кроме консервативного ядра рибосомы каждого домена жизни имеют свои собственные белки, расширения и вставки в консервативных белках (красный) и сегменты экспансии РНК (синий). 5,8S и 25S рРНК гомологичны 23S рРНК у бактерий. Пунктирными линиями возле консервативного ядра отмечены положения подвижных выступов в структуре рибосомы, которые обычно не упорядочены в структурах, определенных методом РСА [65-68]. Для упрощения рисунка данные линии не показаны в остальных структурах (адаптировано из работы [66]).

Биосинтез белка

Процесс синтеза белка можно разделить на следующие основные этапы: инициация, элонгация полипептидной цепи и терминация (Рис. 28). На каждом из этих этапов происходит участие различных белков, которые называются факторами и обозначаются по названию этапа: факторы инициации, факторы элонгации, факторы терминации или высвобождения.

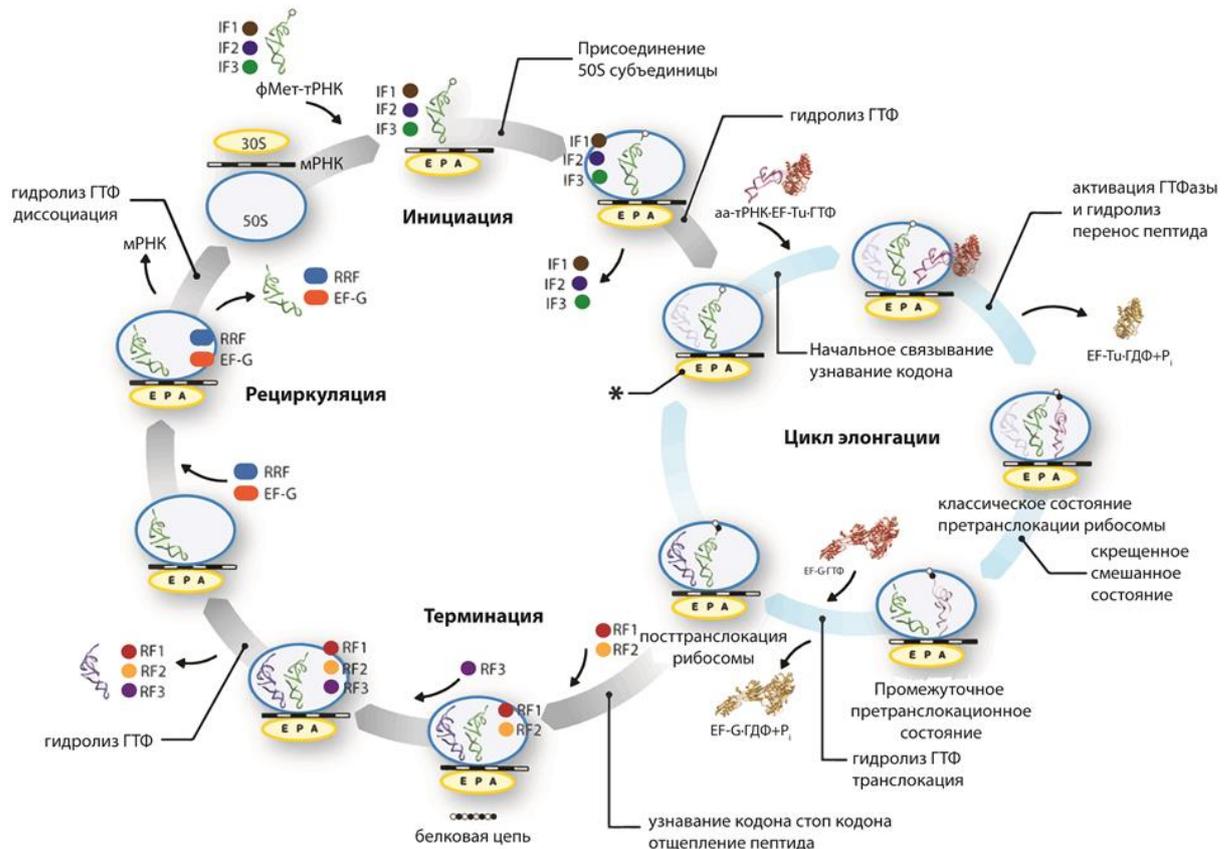


Рисунок 28. Схема синтеза белка у бактерий. Показаны основные этапы трансляции. Для упрощения рисунка некоторые промежуточные этапы были опущены. На рисунке молекула мРНК представлена горизонтальной линией вдоль малой (30S) субъединицы состоящей из черных и белых прямоугольников (каждый соответствует одному кодону). Показано положение тРНК в А-, Р-, и Е-сайте. Растущий полипептид показан в виде черно-белых кругов (адаптировано из работы [69]).

На этапе инициации на малой (30S) субъединице рибосомы происходит распознавание стартового кодона мРНК вместе с формилметионин-тРНК (тРНК^{фМет}) в Р-сайте, после чего происходит ассоциация с большой (50S) субъединицей рибосомы, приводящая таким образом, к формированию

полной 70S рибосомы. Данный процесс обеспечивается тремя специальными факторами инициации трансляции: IF1, IF2 и IF3.

В составе элонгационного цикла выделяют четыре основных этапа. Сначала в А-сайт рибосомы элонгационным фактором Tu (EF-Tu) в комплексе с ГТФ доставляется aa-тРНК. Во время этапа декодирования рибосома контролирует процесс взаимодействия между кодоном мРНК и антикодоном тРНК таким образом, что происходит связывание только тРНК несущей правильную аминокислоту. Образование пептидной связи происходит между аминокислотами, присоединенными к двум тРНК находящимся в А- и Р-сайтах, в результате чего происходит перенос аминокислотного остатка с тРНК в Р-сайте на aa-тРНК в А-сайте. Далее для обеспечения возможности связывания следующей aa-тРНК с рибосомой, происходит перенос двух тРНК из А- и Р-сайтов в Р- и Е-сайты. Данный процесс называется транслокацией и происходит в присутствии фактора EF-G. Удлиняющаяся полипептидная цепь проходит через туннель в 50S субъединице и затем выходит в цитоплазму, где происходит правильное сворачивание белковой молекулы. Элонгационный цикл продолжается пока не будет распознан стоп кодон. При прочтении стоп кодона (UAG, UGA или UAA) вместо тРНК происходит связывание фактора терминации, который высвобождает синтезированный пептид. В заключение происходит диссоциация субъединиц, которые могут вновь участвовать в следующем цикле трансляции.

Данный механизм синтеза белка сохраняется у всех видов, однако существуют различия в регуляции и в некоторых этапах, таких как инициация, у более сложных организмов.

Структурные исследования рибосом

В настоящее время методы структурной биологии находятся на переднем крае науки, позволяя изучать молекулярные механизмы синтеза белка. Достигнут существенный прогресс в изучении структуры и механизма

белкового синтеза в клетке. Методом РСА была с атомарным разрешением определена структура рибосомы и нескольких рибосомных функциональных комплексов, моделирующих различные стадии белкового синтеза.

Первые работы по изучению структур биомолекул (отдельных белков и нуклеиновых кислот) были сделаны в середине XX века с использованием метода РСА: установлены структуры витамина В12 [70], инсулина [71], пенициллина [72]; двойной спирали ДНК Р. Франклином, Дж. Уотсоном, Ф. Криком и М. Уилкинсоном [73]; структура белка гемоглобина [74]; и многие другие. Позднее в 1984 в лаборатории К. Вутрихта была определена первая структура белка методом спектроскопии ЯМР, и параллельно с группой В. Быстрова [75] разработаны принципы многомерной спектроскопии ЯМР [76]. В том же году впервые с помощью крио-ЭМ получены первые изображения биомолекул - аденовирус в стекловидном слое воды [77]. Данные открытия оказали колоссальное влияние на развитие современных представлений в медицине, биологии, химии и физике живых систем.

Несмотря на открывшиеся возможности для определения структур белков и нуклеиновых кислот, структурные исследования больших макромолекулярных комплексов, таких как рибосома, все еще были недоступны для биофизических методов. Рибосома - массивный, асимметричный, обладающий высокой подвижностью макромолекулярный комплекс, состоящий из двух типов молекул (РНК и белков) долгое время оставался одним из наиболее сложных объектов для структурного анализа.

Применение метода спектроскопии ЯМР для структурных исследований ограничено размерами исследуемой молекулы и обычно используется для исследования структуры молекул с молекулярной массой 25 - 100 кДа. Но доступны для структурных исследований методом ЯМР спектроскопии высокого разрешения и большие симметричные биомacroмолекулярные системы массой до 900 кДа [78]. Метод электронной микроскопии напротив хорошо подходит для исследования структур больших объектов, и его применение ограничено для малых молекул. Тем не менее, первые

трехмерные структуры рибосом были получены в результате реконструкции изображений электронной микроскопии. В 1983 г А.С. Спирин с коллегами смоделировал структуру 70S рибосомы *E. coli* и показал основные структурные особенности обеих субъединиц [79-82]. В течение следующих десятилетий Дж. Франк с коллегами работали над установлением структуры рибосомы методом криоэлектронной микроскопии. Ими был достигнут существенный прогресс в этой области и в 2000 г. получена структура 70S рибосомы с разрешением 11,5 Å, а также разработаны основы метода криоэлектронной микроскопии [83-85].

В середине 1980х годов появились работы по установлению структуры рибосом методом РСА, который давал наиболее точную структурную информацию. Однако применение данного метода затрудняется необходимостью получения высокоупорядоченных устойчивых к излучению кристаллов, что требует большого количества стабильного однородного исходного материала и подбора условий кристаллизации. Рибосома из-за ее размера, состава из РНК и белков, асимметрии и высокой подвижности является одним из наиболее трудных объектов для кристаллизации. Тем не менее, благодаря развитию методом молекулярной биологии и биофизики, исследователям удалось достичь этой цели.

Исследования рибосом методом РСА

В настоящее время рентгеновская кристаллография является единственной методикой, которая позволяет наиболее точно решать структуру рибосом с высоким разрешением.

Первые кристаллы большой субъединицы были получены для рибосом термофильных бактерий *Bacillus stearotherophilus* и экстремальных галофильных археон *Haloarcula marismortui* в институте Макса Планка (Берлин) Г. Уитманном и А. Йонат в 1982. В их основополагающих работах были получены кристаллы большой 50S субъединицы бактерий и архей дифрагирующих с разрешением 18 Å [86-88].

В период 1983-1990 гг. группой М.М. Юсупова в Институте белка РАН (г. Пущино) были получены первые кристаллы рибосом и малой рибосомной субчастицы из экстремальной термофильной бактерии *T. thermophilus* [89, 90]. В 1998-2000 годах Т. Штайц (Йельский университет, США) с коллегами предложили определение структуры 50S субъединицы рибосомы *H. marismortui* с разрешением сначала 9 Å, а затем последовательно 5,5 Å и 2,4 Å разрешения [91]. В 2000 г. группами В. Рамакришнан из Кембриджского университета (Великобритания) и А. Йонат были опубликованы структуры 30S субъединицы из *T. thermophilus* с атомарным разрешением [92, 93].

Первая кристаллическая структура полной 70S рибосомы из *T. thermophilus* содержащей связанные с ней функциональные лиганды, такие как мРНК и три тРНК, была определена с разрешением 7,8 Å в 1999 г. М. Юсуповым, Г. Юсуповой и Х. Ноллером (Калифорнийский университет, г. Санта Круз) [94]. В 2001 году разрешение данных кристаллов было улучшено до 5,5 Å, что позволило впервые детально наблюдать взаимодействия между мРНК и тРНК в А-, Р- и Е-сайтах [95, 96]. В течение следующих нескольких лет разрешение на похожих кристаллах было улучшено до 3,7 Å [97]. Группой ученых под руководством Джимми Кейта (J. Cate) из Калифорнийского университета (г. Беркли, США) был разработан экспериментальный протокол кристаллизации 70S рибосомы *E. coli* и получена структура с разрешением 3,5 Å [98, 99]. Вскоре предел разрешения был снова увеличен до 2,8 Å с получением новых форм кристаллов рибосом *T. thermophilus* [100]. С развитием методов очистки и кристаллизации рибосом открылась возможность для изучения большого числа функциональных комплексов, что дало новые знания о процессе синтеза белка у бактерий. В 2009 В. Рамакришнан, Т. Штайц и А. Йонат были награждены Нобелевской премией по химии «за изучение структуры и функций рибосомы».

Тем не менее, все еще остается много нерешенных вопросов в области биосинтеза белка. Геномный анализ, биофизические и биохимические

данные, результаты электронной микроскопии эукариотических рибосом показывают, на наличие различий трансляции белка у эукариот и бактерий, однако данных об атомарной структуре эукариотической рибосомы все еще не было получено. В 2010 г. в лаборатории М. Юсупова (IGBMC, г. Страсбург, Франция) была установлена структура полной эукариотической рибосомы из *S. cerevisiae* с разрешением 4,2 Å [101]. В 2011 г. той же группой ученых была получена кристаллическая структура с разрешением 3,0 Å 80S рибосомы *S. cerevisiae*, которая позволяла визуализировать практически все структуры рРНК оснований и боковых цепей белков, а также дополнительных белков таких как Stm1 [66]. В этом же году группой Н. Бана (N. Ban) (ETH, г. Цюрих, Швейцария) с коллегами были определены структуры большой 60S и малой 40S субъединицы рибосомы *Tetrahymena thermophila* с разрешением 3,5 Å и 3,9 Å соответственно [102, 103]. Единственной на данный момент определенной структурой рибосомы для млекопитающих является 43S инициаторный комплекс кролика с разрешением 11 Å полученный в лаборатории Т. Штайца [104]. Значительные успехи в детальной расшифровке механизмов синтеза белка с использованием РСА были сделаны в лабораториях Х. Ноллера, М. Юсупова, Дж. Кейта, Т. Штайца и В. Рамакришнана, которые провели множество уникальных исследований по изучению кристаллических структур разных промежуточных состояний транслирующей или остановленной рибосомы [105-125].

Несмотря на то, что метод кристаллографии дает очень детальную информацию о структуре, его недостатком является статичность исследуемых молекул. Однако в процессе трансляции, который является многостадийным и циклическим, рибосома принимает разные конформации и динамические состояния. Поэтому с помощью метода кристаллографии возможно изучение только тех состояний, которые минимально изменяют структуру рибосомы и не препятствуют кристаллической упаковке. Для

преодоления данного ограничения используется метод криоэлектронной микроскопии.

Исследования рибосом методом криоэлектронной микроскопии

Криоэлектронная микроскопия - относительно молодой, но очень динамично развивающийся метод, который привлекает большое число исследователей в области структурной биологии. Некоторые исследователи даже заявляют о наступлении «новой эры крио-ЭМ» благодаря открывшимся возможностям изучения данным методом структур биомолекул с атомарным разрешением, что ранее было прерогативой методов кристаллографии и спектроскопии ЯМР [126, 127]. Действительно, криоэлектронная микроскопия достигла огромного прогресса за последние несколько лет и, благодаря разработке технологических и вычислительных методов, способна достигать почти атомного и даже атомного разрешения [128-130]. Примечательно, что именно структурные исследования рибосом сыграли важную роль в развитии данного метода. Существует несколько основных причин, по которым рибосомы являются удобными объектами для крио-ЭМ:

- Размер (2,5 – 4,3 МДа): большой размер частиц глобулярной формы делает данный объект хорошо видимым на крио-ЭМ микрофотографиях;
- Стабильность: благодаря высокому содержанию РНК она более стабильна при воздействии электронов;
- Наличие установленных кристаллических структур: метод молекулярного замещения уже известных кристаллических структур в карты электронной плотности полученные методом крио-ЭМ позволяет получать структурную информацию об объекте.

Криоэлектронная микроскопия обеспечивает ряд сильных методологических преимуществ в области структурного исследования макромолекул. Во-первых, возможно изучение молекул непосредственно в растворе, тем самым возможно исключить сложный этап кристаллизации.

Другим преимуществом является то, что количество вещества и концентрация, необходимые для крио-ЭМ, значительно ниже, чем требуется для кристаллографии. В-третьих, существует возможность одновременно анализировать молекулы в различных состояниях (даже незначительно отличающихся) одного и того же образца, что позволяет наблюдать промежуточные состояния динамических биологических процессов.

Благодаря указанным преимуществам с помощью метода крио-ЭМ были преодолены проблемы, наблюдающиеся в РСА ряда рибосом. Это позволило получить структуры с высоким разрешением рибосом *Trypanosoma brucei* [131], *Plasmodium falciparum* [132], человека [129, 133] с высоким разрешением. Кроме того, с помощью крио-ЭМ были определены структуры митохондриальных рибосомных субъединиц и полной митохондриальной рибосомы [134-139], рибосомы хлоропластов [140], рибосомы *Bacillus subtilis* [141], мембранных рибосом млекопитающих [142] и многих других функциональных комплексов, которые не могли быть определены методом кристаллографии [131, 132, 137-139, 143-161].

Тем не менее, существуют и недостатки метода крио-ЭМ. Во-первых, подвижность частиц на сетке крио-ЭМ намного выше, чем подвижность частиц внутри кристалла. Например, отличительной особенностью человеческой рибосомы является наличие специфических для человека длинных сегментов экспансии рРНК, которые составляют до 25% от молекулярной массы рибосомы. Несмотря на установление структур рибосомы человека с разрешением 5,0 и 3,6 Å структура этих сегментов экспансии с молекулярной массой 1 МДа остается неизвестной. Еще одним слабым местом метода является проблема разрешения. Исследователи используют разные методы для оценки разрешения их структур из-за отсутствия единого подхода к его вычислению. Более того, разрешение структуры неоднородно для разных частей молекулы. Из-за движений образца при экспонировании потока электронов разрешение на периферии может быть значительно ниже, чем в центре частицы. И, наконец, в области

крио-ЭМ все еще не хватает единых инструментов для валидации структур. Это может привести к неверным истолкованиям и ошибкам в окончательной модели.

Таким образом, каждый из методов определения структур имеет свои плюсы и минусы, и их применение в изучении больших асимметричных молекулярных комплексов, таких как рибосома, требует осторожности в интерпретации полученных данных, так как разрешение полученных структур все еще далеко от реального атомарного разрешения в 1,5 Å и выше [162].

1.3. Механизмы устойчивости к антибиотикам золотистого стафилококка

Полученные методом кристаллографии и электронной микроскопии с высоким разрешением структуры рибосом и рибосомных субъединиц сделали революцию в области изучения трансляции белка. Информация о точном положении остатков рибосомы в различных состояниях позволила подойти к более глубокому пониманию сложного механизма белкового синтеза. Кристаллические структуры комплексов рибосом с антибиотиками и противогрибковыми препаратами позволили понять механизмы действия ингибиторов, а также предложить пути по дизайну более эффективных соединений [163, 164]. Оказалось, что большинство ингибиторов трансляции связывается с консервативными регионами рибосом (ПТЦ, сайты связывания тРНК, пептидный туннель, и т.д.). Однако, воздействие одного и того же соединения на различные организмы может быть различным. Примером этого являются штаммы бактерий с множественной устойчивостью к большинству известных антибиотиков. К таким бактериям относится золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*), который обладает высокой устойчивостью и вызывает множество тяжелых заболеваний человека, поэтому для лечения инфекции вызванной этим патогеном необходима разработка высокоселективных лекарственных препаратов.

Получение структурной информации с атомарным разрешением о синтезе белка данного патогена является первым шагом для понимания механизмов его устойчивости к антибиотикам.

Золотистый стафилококк относится к роду стафилококков и семейству микрококков. Этот род состоит из грамположительных аэробных бактерий. Большинство представителей вида являются условно-патогенными возбудителями, однако также встречаются и патогенные виды, такие как *S. aureus*, который был впервые выделен из гноя, полученного с перевязочных материалов, шотландским хирургом Александром Огстоном в 1880 г. Позднее в 1882 г. он пронаблюдал данные бактерии в микроскоп и дал им название «кластеризованные микрококки» (*Staphylococci*) [165]. *S. aureus* является одним из наиболее часто встречаемых патогенов человека. Идентифицируют *S. aureus* по золотистому цвету колоний при выращивании на твердых средах, а также способности синтеза фермента коагулазы, который приводит к образованию сгустков крови [166]. *S. aureus* является возбудителем множества опасных для жизни внебольничных и внутрибольничных инфекций. Проявлениями данных инфекций могут быть поражения кожных покровов, вызванные стафилококковыми эксфолиативными токсинами, нарушения в контроле температуры тела, потеря жидкости и вторичные инфекции [167, 168]. Некоторые штаммы *S. aureus* продуцируют суперантиген TSST-1, вызывающий синдром токсического шока [169]. Более глубокое проникновение стафилококковой инфекции в организм вызывает серьезные осложнения в виде воспаления легких, головного мозга и спинного мозга, инфекций костей и органов [168]. Такое разнообразие инфекций указывает на то, что возбудитель хорошо адаптируется к различным условиям окружающей среды. Более того, существуют штаммы *S. aureus* с множественной устойчивостью к различным антибиотикам, которые стремительно меняются за последние десятилетия по причине нерационального использования антибиотиков [170-174].

S. aureus, за счет способности образования биопленок, способен

выживать в неблагоприятных условиях окружающей среды, таких как действие моющих средств, а также при стерилизации, что приводит к развитию внутрибольничных инфекций. Число внутрибольничных инфекций вызванных штаммами золотистого стафилококка устойчивыми к метициллину (MRSA) увеличивается примерно на 30% в течение каждого десятилетия [175]. Недавно найденные на территории Российской Федерации штаммы золотистого стафилококка с множественной устойчивостью к антибиотикам [1], подтверждают необходимость изменения подходов к диагностике, лечению и принятию срочных мер по сдерживанию распространения стафилококковых инфекций.

Золотистый стафилококк обладает рядом регуляторных механизмов контроля синтеза его многочисленных факторов вирулентности в ответ на внешние факторы, стресс и изменения окружающей среды [176-179]. Данные факторы вирулентности включают в себя поверхностные белки, экзо-белки, токсины и белки клеточной адгезии. Эти факторы не только обеспечивают борьбу с иммунной системой, но также и участвуют в процессах колонизации и питания [179]. Синтез большинства поверхностных белков стафилококка происходит во время начальной фазы роста, тогда как экзо белки синтезируются позже в течение экспоненциальной фазы [180, 181]. Данный двух стадийный процесс хорошо объясняет способность стафилококка связываться в месте заражения за счет синтеза различных адгезионных белков во время начальной фазы роста. На следующем этапе после заражения происходит обеспечение питания, колонизация и борьба с иммунными клетками организма хозяина за счет синтеза экзотоксинов. После чего, клетки стафилококка могут проникать глубоко в ткани и рассеиваться через кровь в другие органы.

По оценкам, около 20% людей являются постоянными носителями стафилококковой инфекции (часто колонизируется одним штаммом *S. aureus* на протяжении длительного периода времени), около 60% являются временными носителями (могут переносить различные штаммы с течением

времени) [182, 183]. Такое широкое распространение обеспечивается способностью стафилококка подавлять иммунную систему организма хозяина, включая иммуноглобулины, лактоферрин, лизоцим и антимикробные пептиды [184]. Стафилококк обладает разнообразными механизмами защиты, такими как стафилокок киназа [185], модификации мембранных пептидов при воздействии на клетки катионных антимикробных пептидов [186]; выработка белка А, который связывается в области железо связывающего центра иммуноглобулинов, приводя тем самым к их инактивации. Кроме того, все штаммы *S. aureus* устойчивы к лизоциму, благодаря наличию пептидогликанспецифической О-ацетилтрансферазы [187]. Также помимо способности к защите от дефензинов млекопитающих *S. aureus* демонстрирует чрезвычайно высокий уровень устойчивости к антибиотикам и антимикробным соединениям в целом. С широким распространением антибиотиков произошло развитие устойчивости *S. aureus* к большинству из них, что привело к серьезным трудностям в лечении инфекций, вызванных данным патогеном [188].

Согласно отчету ВОЗ за 2014 год, предсказание развития антимикробной устойчивости бактерий (включая устойчивость к антибиотикам) в будущем является невозможным, так как данный процесс происходит стремительно во всех регионах мира и может наблюдаться у людей любого возраста в любой стране. Устойчивость к антибиотикам в настоящее время является серьезной угрозой для здоровья населения. Согласно отчету, до 60% инфекций, вызванных золотистым стафилококком, являются устойчивыми к метициллину (MRSA) в Европе. В Америке данный показатель достигал 80%, в Африке 80%, в регионе Восточного Средиземноморья более 50%, в некоторых частях региона Юго-Восточной Азии 25%. Несмотря на недавний прогресс в борьбе с бактериями, обладающими множественной устойчивостью, их резистентность к противомикробным препаратам по-прежнему остается одной из самых актуальных тем на Ассамблее здравоохранения 2019 года.

Развитие антибиотиков значительно увеличило выживание при инфекционных заболеваниях, однако наблюдающийся рост противомикробной устойчивости различных штаммов представляет серьезную проблему для здравоохранения в будущем. По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), антибиотики увеличили средний срок продолжительности жизни человека в среднем на 20 лет. Но в течение почти 90 лет с момента открытия пенициллина многие патогенные виды развили устойчивость к большинству часто используемых противомикробных препаратов. Среди них *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*. Примечательно, что в 1928 году Александр Флеминг наблюдал первую антимикробную активность гриба пеницилла в культуре *S. aureus* [189], а через несколько лет, в начале 1940-х годов, массовое производство пенициллина с использованием метода, разработанного Говардом Флори, значительно улучшило выживаемость пациентов со стафилококковой инфекцией. Однако, уже в 1942 году устойчивые к пенициллину стафилококки были обнаружены сначала в клинике, а затем в обществе [190]. К концу 1960-х годов более 80% как внутри- так и внебольничных инфекций стафилококка были устойчивы к пенициллину. На сегодняшний день эта цифра составляет до 98% в некоторых регионах мира. Устойчивость обуславливалась активностью фермента бета-лактамазы и пенициллиназы. Модификации структуры молекулы пенициллина должны были преодолеть данную бактериальную устойчивость. Первым разработанным полусинтетическим бета-лактамым антибиотиком, пенициллинового ряда стал метициллин, который не используется в медицине в настоящее время. Открытый в 1961 году, он стал известен как антистафилококковый пенициллин, однако вскоре появились сообщения о изолятах, устойчивых к метициллину [191]. На сегодняшний день MRSA штаммы являются одной из наиболее частых причин инфекций с множественной устойчивостью к антибиотикам.

Механизмы действия антибиотиков и бактериальная устойчивость

Для преодоления проблемы устойчивости бактерий к антимикробным препаратам необходимо понимание механизма действия лекарственного средства на молекулярном уровне. Большинство известных на сегодняшний день антибиотиков действуют на следующие основные мишени в бактериальных клетках: клеточную стенку и компоненты процесса синтеза клеточной стенки; аппараты синтеза белка и нуклеиновых кислот. В свою очередь, устойчивость к бактериям может быть опосредовано связана с рядом механизмов: от предотвращения проникновения антибиотика через барьер клеточной стенки до разрушения лекарственного средства внутри клетки (Рис.29).

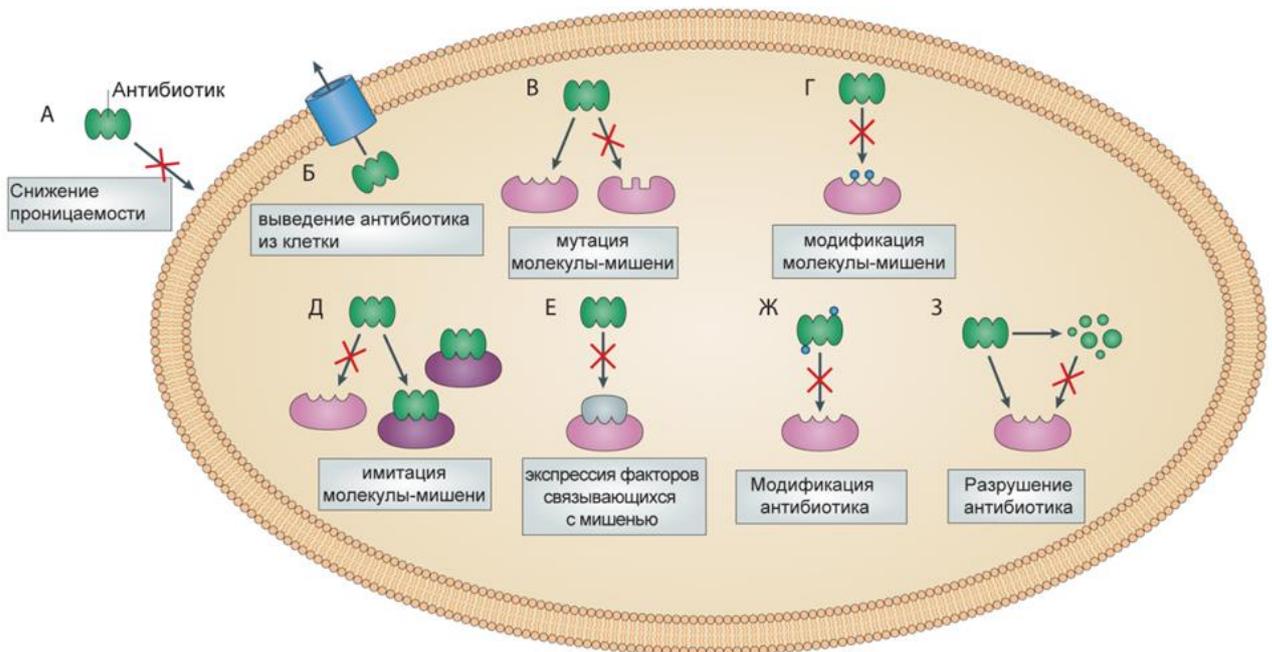


Рисунок 29. Механизмы устойчивости к антибиотикам у бактерий (адаптировано из статьи [164]): изменение проницаемости внешней мембраны клетки (а); выведение антибиотика из клетки (б); мутация или модификация молекулы-мишени действия антибиотика (в, г); синтез молекул имитирующих мишень действия антибиотика (д); экспрессия факторов связывающихся с молекулой-мишенью действия антибиотика (е); модификация антибиотика (ж); энзиматическая инактивация антибиотика.

Антибиотики, препятствующие синтезу клеточной стенки

Исторически первыми антибиотиками получившие широкое применение для борьбы с бактериальными инфекциями были вещества ингибирующие синтез клеточной стенки бактерий. В данный класс соединений входят лактамы, такие как пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы и монобактамы, а также гликопептиды, включая ванкомицин и тейкопланин [192, 193]. β -лактамные агенты ингибируют синтез стенки бактериальной клетки, мешая ферментам, необходимым для синтеза слоя пептидогликана. Из-за способности связывать пенициллин эти ферменты назывались пенициллинсвязывающими белками. Преимущественно, устойчивость к этим антибиотикам обусловлена активностью ферментов β -лактамазы, которые расщепляют лактамное кольцо молекулы лекарственного средства, что делает его неэффективным [194]. Модификация существующих лекарств и разработка антибиотиков β -лактамного нового поколения привели к эволюции нового поколения β -лактамаз.

Механизм устойчивости бактерий к β -лактамам второго поколения (метициллин, карбапенемы и т. д.) обусловлен изменениями пенициллинсвязывающих белков. Изменения, полученные в результате мутаций в исходных ферментах или появление новых, привели к неспособности антибиотика связываться со своей мишенью и ингибировать синтез клеточной стенки.

Устойчивость к гликопептидным антибиотикам (ванкомицин, тейкопланин), как и в случае с метилциллином обусловлена, в основном, экспрессией генов, кодирующих белки, что приводит к изменениям в биосинтезе клеточной стенки и, таким образом, ингибируется действие антибиотика [195].

Антибиотики, препятствующие синтезу нуклеиновых кислот

Антибиотики, препятствующие синтезу нуклеиновых кислот, являются наиболее часто назначаемыми антибактериальными препаратами в мире. Однако устойчивость к этим антибиотикам может расти чрезвычайно быстро [196]. Основными представителями данного класса антибиотиков являются хинолоны и фторхинолоны. Было разработано несколько модификаций данных антибиотиков составляющих четыре поколения с различным спектром антимикробной активности. Хинолоны препятствуют процессу репликации бактериальной ДНК путем превращения их мишеней, гиразы и топоизомеразы IV в токсичные ферменты, которые фрагментируют бактериальную хромосому [197]. Другим важным представителем этого класса является рифампицин (или рифампин), антибиотик, связывающийся с бактериальной РНК-полимеразой и ингибирующий ее активность [198-200].

У бактерий существует несколько механизмов устойчивости к активности хинолонов:

- 1) протонные насосы [201];
- 2) выработка гиразосвязывающих белков, которые либо уменьшают сродство фермента к ДНК, либо конкурируют за сайт связывания с антибиотиком [202, 203];
- 3) мутации в аминокислотных остатках ферментов, критически важных для связывания антибиотиков [204]. Устойчивость к рифампицину в основном обусловлена мутацией сайта связывания антибиотика на РНК-полимеразе [205].

Антибиотики, ингибирующие синтез белка

Данный класс антибиотиков, воздействующих на рибосомы, на сегодняшний день наиболее широко используется в клинике. Антибиотики, связывающиеся с рибосомой, отличаются от соединений, используемых во многих других терапевтических областях, поскольку в их механизме

действия преобладают взаимодействия с РНК, а не с белками-мишенями (Рис. 30).

Бактериальная рибосома является мишенью для действия широкого класса химически модифицированных естественных вторичных метаболитов, которые связываются со специфичными сайтами рибосомы, где они препятствуют синтезу белка и в конечном итоге ингибируют рост микроорганизмов (Рис. 31).

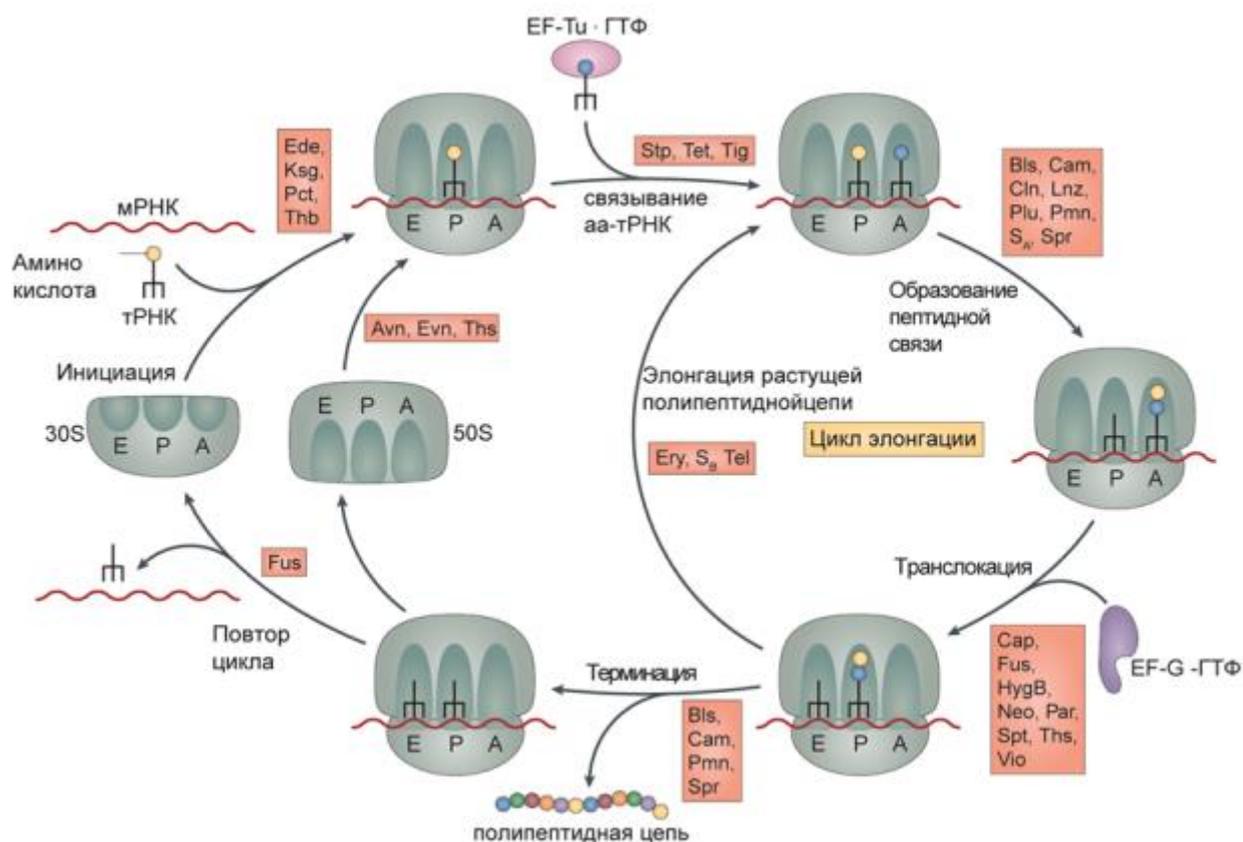


Рисунок 30. Ингибирование работы рибосомы антибиотиками (адаптировано из статьи [164]). Обозначение антибиотиков: Avn – авиламицин, Bls – бластицидин, Cap – капреомицин, Cam – хлорамфеникол, Cln – клиндамицин, Ede – эдеин, Ery – эритромицин, Evn – эвернимидин, Fus – фузидиевая кислота, HygB – гигромицин В, Lnz – линезолид, Ksg – касугомицин, Neo – неомицин, Pct – пактамицин, Par – паромидин, Plu – плевромутилины, Pmn – пуромицин, Spr – спарсомидин, Spt – спектиномицин, S_A – стрептограмин А, S_B – стрептограмин В, Stp – стрептомицин, Tel – телитромицин, Tet – тетрациклины, Tig – тигециклин, Thb – терморубин, Ths – тиострептон, Vio – виомицин.

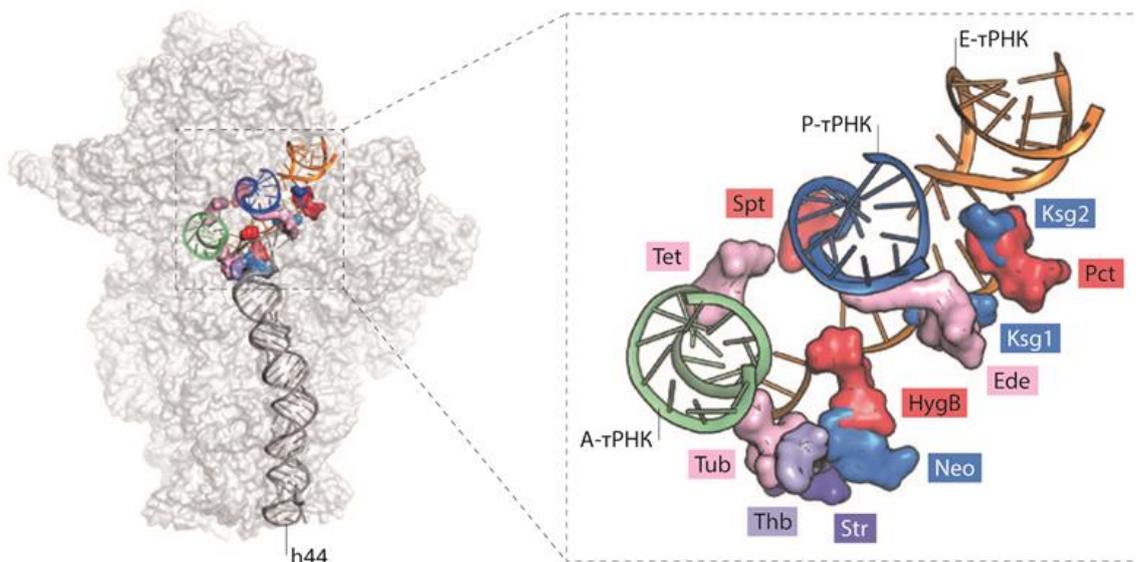
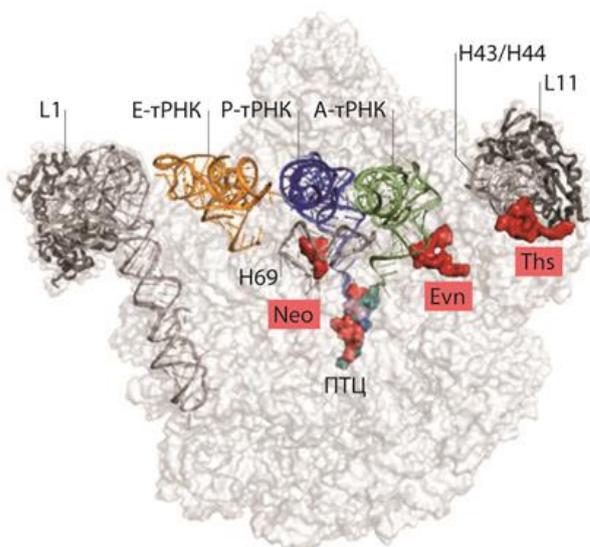
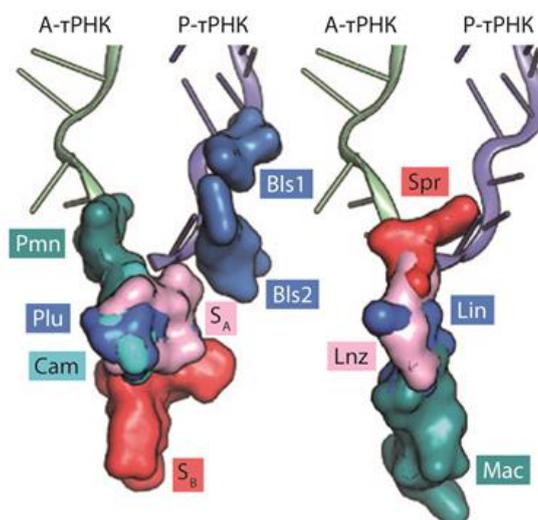
А Антибиотики связывающиеся с 30S субъединицей**Б** Антибиотики связывающиеся с 50S субъединицей**В** Антибиотики связывающиеся с ПТЦ

Рисунок 31. Сайты связывания антибиотиков с 70S рибосомой (адаптировано из статьи [164]). А: показаны места связывания на 30S субъединице, Б: показаны места связывания на 50S субъединице, В: показаны места связывания в области ПТЦ. Антибиотики: Lin – линкомицин, Mac – макролиды, Tub – туберактиномицины.

Интерес к рибосоме как к цели для поиска новых антибактериальных средств существенно возрос в последние несколько лет благодаря определению с атомарным разрешением структуры бактериальных рибосом, их субъединиц, доменов и их комплексов с антибиотиками [206, 207]. Трехмерные структуры комплексов рибосом с антибиотиками подтвердили

полученные ранее биохимическим путем данные, и показали, что природные соединения взаимодействуют преимущественно с компонентами РНК в функциональных сайтах рибосомы, такими как сайты связывания тРНК, ПТЦ, декодирующий центр, пептидный туннель [208-210]. В таблице 1.2 представлен обзор антибиотиков, нацеленных на рибосому, места их связывания и механизм устойчивости бактерий.

Таблица 1.2. Механизмы действия и пути резистентности ряда антибиотиков действующих против рибосомы (адаптировано из статьи [164]. Используются следующие сокращения: М – модификация/деградация антибиотика, П – проницаемость мембраны / протонный насос, EF – фактор элонгации, З – защита фактора, НО – не определено, ПТЦ – пептидил трансферазный центр, S_A – стрептограмин А, S_B – стрептограмин Б, Ц – изменение цели за счет модификации (или ее отсутствие), МЦ – мутация цели

Антибиотик	Мишень	Механизм ингибирования	Механизм устойчивости
Эдеин	30S	Инициация	М, МЦ
Касугамицин	30S	Инициация	М, Ц, МЦ
Паромомицин, неомомицин	30S	Транслокация, доставка тРНК	М, П, Ц, МЦ
Спектиномицин	30S	Транслокация, доставка тРНК	М, П, Ц, МЦ
Стрептомицин	30S	Транслокация, доставка тРНК	М, П, Ц, МЦ
Диоксициклин, тетрациклин	30S	Доставка тРНК	М, П, З, МЦ
Хлорамфеникол	50S	ПТЦ	М, П, Ц, МЦ
Клиндамицин, линкомицин	50S	ПТЦ	М, П, Ц, МЦ
Стрептограмин А, Б	50S	ПТЦ	П, Ц, МЦ
Линезоид	50S	ПТЦ	П, Ц, МЦ
Пуромицин	50S	ПТЦ	М
Спарсомицин	50S	ПТЦ	П, МЦ
Тиамулин	50S	ПТЦ	П, Ц, МЦ
Бластицидин S	50S	ПТЦ, терминация	М, МЦ
Эвернимидин, авиламицин	50S	Инициация	Ц, МЦ
Эритромицин, телитромицин	50S	Элонгация полипептидной цепи растущей	М, П, Ц, МЦ
Тиострептон	50S	Связывание фактора	Ц, МЦ
Терморубин	70S	Инициация	НО
Виомицин, капреомицин	70S	Транслокация	М, Ц, МЦ
Кирромицин	EF-Tu	Элонгация	МЦ
Фузидиевая кислота	EF-G	Элонгация, рециркуляция	П, З, МЦ

Антимикробные пептиды

Активно развивающимся в настоящее время направлением поиска новых бактерицидных веществ является применение молекул пептидной природы, продуцируемых в клетках организма «хозяина», которые способны препятствовать росту либо уничтожать патогенные организмы. Данный класс пептидов называют «антимикробными пептидами» (АМП) [211], «защитными пептидами» [212, 213], «катионными антимикробными пептидами» [214] или «антибактериальными пептидами» [215]. Интерес к АМП обусловлен их широким спектром механизмов действия против патогенов, а также неспецифическим связыванием с молекулами патогена в отличие от обычных антибиотиков [216, 217]. Многие природные АМП использовались в качестве моделей для создания синтетических АМП. АМП представляют большой интерес в клинических исследованиях благодаря их широкому спектру активности, возможности комбинации нескольких механизмов действия и высокой активности, которая сводит к минимуму устойчивость к этим молекулам [218-221]. Механизм действия АМП носит селективный характер, поскольку они ориентированы на ключевые структурные и физиологические особенности патогенных микроорганизмов, и, следовательно, наличие генетически приобретенной устойчивости к АМП у патогена [222, 223]. АМП млекопитающих, как правило, активны в отношении большинства патогенов, включая грамположительные и грамотрицательные бактерии и вирусы [224]. Другим несомненным преимуществом АМП является то, что они продуцируются клетками организма хозяина и, обеспечивают очень быструю реакцию против действия вторгшегося возбудителя [225]. По сути АМП являются первым шагом реакции организма хозяина на патоген, действующим еще до активации адаптивного иммунного ответа [217, 225, 226]. По этой причине особенно важными являются исследования, направленные на изучение деталей

механизмов действия АМП, так как в конечном итоге это позволит создать синтетические пептиды с широким спектром антимикробной активности.

С медицинской точки зрения для успешного терапевтического применения, идеальный антимикробный пептид должен быть активным в отношении широкого спектра патогенных микробов, и в то же время обладать минимальным либо полностью отсутствующим цитотоксичным эффектом на пациента. Это может быть достигнуто либо путем обнаружения новых и эффективных АМП из различных организмов (бактерий, грибов, растений, насекомых и млекопитающих), или путем модификации структуры известных в настоящее время АМП, повышая их эффективность и снижая токсичность. Для этого необходимо знать точный механизм их действия. В настоящее время наиболее признанным механизмом действия АМП является их взаимодействие с патогенными мембранами. Также многие исследования показали, что после взаимодействия с мембраной патогена АМП могут нести дополнительные функции, например, действуя в качестве общих иммуномодулирующих агентов для усиления иммунного ответа хозяина после патогенной атаки [227-229].

На основе особенностей первичной и вторичной структуры используется следующая классификация АМП: *анионные антимикробные пептиды* богатые по содержанию глутаминовой и аспарагиновой кислотами и обладающие активностью в присутствии ионов цинка (Zn^{2+}) (максимин Н5 земноводных, дермицидин человека); *линейные катионные пептиды, формирующие α -спираль* в составе которых отсутствуют остатки цистеина (цекропины, андропин, морицин, мелиттин, магаинины, дермасептины, бомбинины). Данные пептиды имеют неупорядоченную структуру в растворе, но образуют α -спираль при взаимодействии с фосфолипидными везикулами и липосомами. Следующая группа - *пептиды, образующие β -складчатую структуру*, за счет входящих в их состав остатков цистеина, стабилизирующих структуру пептида дисульфидными связями (дефензины, бревинины, протегрины, тачиплезины). *Пептиды, обогащенные*

определенными аминокислотами (пролин, аргинин, фенилаланин, глицин, триптофан), образуют следующую группу (бактеницин, профенин, индолицидин, тритрптицин, гистатин). Данные пептиды не содержат в своем составе остатков цистеина и являются линейными.

Независимо от дальнейшего механизма действия АМП против патогена, на самом первом этапе всегда происходит его связывание с клеточной мембраной патогенного микроорганизма. Только после этого АМП может проникнуть через внешний барьер клеточной мембраны и достигнуть клеточных мишеней патогена [230]. Поэтому огромный интерес для исследований представляют собой детали взаимодействия АМП с клеточной мембраной [231-233]. Особенности селективной токсичности АМП против мембраны патогена зависят от многих факторов, некоторые из которых относятся к свойствам мембраны или микробной клеточной стенки, другие зависят от свойств самого пептида [234]. Среди свойств мембраны, которые оказывают влияние на взаимодействие АМП являются заряд, электроотрицательность, состав липид-содержащей поверхности [234]. Состав мембраны является наиболее важным критерием, который определяет остальную часть ее свойств. Все биологические мембраны состоят из фосфолипидного бислоя, содержащего как гидрофильные, так и гидрофобные домены. Тем не менее, существуют различия между мембранами прокариот и эукариот. Эукариотические мембраны в основном состоят из нейтральных липидов (фосфохолин, фосфатидилэтаноламин и сфингомиелин) и стерина (холестерин и эргостерол) [234]. Согласно работам [235-237] присутствие холестерина делает структуру мембраны более жесткой и, таким образом, обеспечивает защиту от действия АМП. Эта селективность фактически является одной из основ противоопухолевой активности ряда АМП действующих против мембран некоторых раковых клеток, богатых анионными компонентами [238]. Обобщая вышеизложенное можно заключить, что особенности структуры мембран эукариотических клеток сводят к минимуму возможность их взаимодействия с АМП. В

экспериментах с везикулами, имитирующими мембраны бактериальных клеток, к которым были добавлены компоненты клеток эукариот в виде холестерина показали, что наличие заряженных липидов снижает цитотоксический эффект АМП против данных везикул [236]. То есть можно утверждать, что АМП, как правило, нацелены против мембран, лишенных компонент эукариотических клеток.

Мембраны бактерий значительно отличаются от своих эукариотических аналогов по своей структуре и составу. Эти различия обуславливают сродство бактериальных мембран к АМП [239]. Бактериальные мембраны более электроотрицательны благодаря наличию липидов с отрицательным зарядом (фосфатидилглицерина, кардиолипина, фосфосерин и т.д.), и в их составе полностью отсутствует холестерин [234]. Клетки грамотрицательных бактерий имеют две мембраны, внешняя мембрана состоит из уникального компонента под названием липополисахарид (ЛПС), по которой, как предполагается, происходит первое распознавание иммунной системой клеток-мишеней молекулы «чужого» организма [217]. Таким образом, ЛПС, действуют как барьер проницаемости для антибактериальных препаратов [240-242] и гидрофобных молекул [243]. Влияние состава грамотрицательных бактерий мембраны на активность АМП была изучена с использованием искусственных везикул, имитирующих бактериальные мембраны [239]. Таким образом, есть четкие доказательства, что состав мембраны играет ключевую роль в активности АМП [236, 244]. Детально процесс взаимодействия АМП и ЛПС был рассмотрен в работах [244-246] с ЛПС мицеллами, в которых было показано, что различные АМП могут принимать различные конформации в зависимости от взаимодействия с ЛПС.

Внутренняя мембрана грамотрицательных бактерий, как и мембраны грамположительных бактерий, в основном состоит из заряженных анионных липидов. Взаимодействию АМП с этим слоем были посвящены работы с использованием метода ЯМР как в растворе, так и в твердом теле с использованием мицелл на основе додецилсульфата натрия (ДСН) и

додецилфосфохолина (ДФХ) в качестве мембранных миметиков [9, 239, 247-254]. Ключевую роль в активности АМП против клеточных мембран играет их компонентный состав и структура. Структура и активность АМП отличаются при их взаимодействии с внешней мембраной (ЛПС) и внутренней мембраной (анионные липиды) грамотрицательных организмов.

Предполагается, что первоначальное взаимодействие между АМП и мембраной имеет электростатическую природу, вследствие их взаимно противоположных зарядов, что приводит к их притяжению. Исследования показали, что АМП могут даже заменить молекулы ЛПС на бактериальной поверхности [255]. Конечно, взаимодействию АМП с мембраной также способствует сильный электрохимический градиент через биологические мембраны, который может изменяться от -90 до -110 мВ у эукариот, и от -130 до -150 мВ у прокариот [234]. Несмотря на то, что наиболее распространенная точка зрения о виде взаимодействия АМП с мембранами заключается в их неспецифическом и не рецепторном взаимодействии [256, 257], существуют ряд работ, подвергающих сомнению данное утверждение. Например, для таких АМП как низин [258], тачиплезин I [259] и PR-39 [260] было показано, что они связываются с внешней мембраной бактерий и образуют внутри нее домены либо становятся ее компонентами. Таким образом, появляется все больше доказательств, взаимодействие АМП с бактериальной мембраной намного более сложный процесс чем просто электростатическое притяжение. Поэтому для дальнейшего более полного понимания этого механизма необходимы структурные исследования с высоким разрешением.

После первоначального взаимодействия АМП с мембранами и достижения их пороговой концентрации, происходят конформационные изменения АМП: самоассоциация, олигомеризация и образование пептид-пептидных и/или пептид-липидных связей с образованием структур, которые в конечном итоге приводят к разрушению клеточной стенки. Наиболее широко известными такими механизмами являются так называемая модель

«ковра» и образование «бочкообразных» или тороидальных пор [261]. Примером модели бочкообразной поры является аламетицин, от 3 до 11 молекул которого образуют пору в мембране клетки путем формирования узелков с люменом таким образом, что с гидрофобными липидами бислоя гидрофобная взаимодействует поверхность АМП, а гидрофильная поверхность формирует внутреннюю часть поры [262, 263]. Примерами модели тороидальных пор являются маганины, пептиды, спиральные участки которых, встраиваясь в мембрану, вызывают искривление липидного слоя, образуя пору, состоящую из полярных групп пептида и полярных частей липидов [264, 265]. Третий вариант можно рассмотреть на примере цекропина, в котором в модели «ковра» пептиды начинают накапливаться на поверхности липидного бислоя за счет электростатических взаимодействий с отрицательно заряженной поверхностью мембраны и, при определенной концентрации разрушают мембрану за счет нарушения кривизны бислоя [266, 267]. Особый интерес представляют собой АМП, которые способны образовывать ионные каналы или поры при взаимодействии с мембранами клеток мишеней. Образование ионных каналов в клетке может приводить к изменению многих физиологических процессов, которые зависят от баланса ионов внутри клетки [268].

Большинство АМП обладают как катионными, так и амфипатическими свойствами, предположительно, потому что это увеличивает их сродство к анионным компонентам микробных мембран. АМП сильно различаются по структуре. Некоторые из них образуют амфипатические α -спирали в растворе или могут принимать эту структуру, когда они взаимодействуют с микробными мембранами или другими липидными средами. Протегрины и дефензины, напротив состоят в основном из элементов β -листа, которые стабилизируются внутримолекулярными дисульфидными связями. Другие АМП имеют повторяющиеся мотивы, которые могут содержать преимущественно пролины и аргинины [269].

Протегрины [270] - богатые аргинином и цистеином катионные пептиды длиной 16-18 аминокислотных остатков выделенные из лейкоцитов свиней и обладающие антимикробной активностью в отношении широкого круга микроорганизмов, в том числе MRSA штаммов и *Pseudomonas aeruginosa*. Тесты на лабораторных животных показали, что однократная инъекция протегрина PG-1 приводила к снижению смертности до 0 до 27% у иммунокомпетентных мышей, инокулированных внутрибрюшинно *P. aeruginosa* или *S. aureus*, по сравнению с контрольной группой (от 93 до 100%) [2]. Предполагается, что антибактериальный механизм действия протегринов основан на способности связываться положительно заряженных остатков протегринов с отрицательно заряженной поверхностью мембраны. Накопление молекул протегринов на поверхности бактериальной мембраны приводит к их ассоциации в олигомерные образования и формированию трансмембранных пор, что ведет к нарушению клеточного гомеостаза и гибели клетки. Также было показано, что протегрины ингибируют образование биопленок бактерий [271].

Вторичная структура протегринов представлена в виде β -шпильки [272, 273], которая стабилизируется двумя дисульфидными мостиками. Аминокислотные последовательности пяти природных протегринов приведены в таблице 1.3.

Таблица 1.3. Аминокислотные последовательности протегринов

Протегрин	Последовательность
PG-1	RGGRL-CYCRR-RFCVC-VGR-NH ₂
PG-2	RGGRL-CYCRR-RFCIC-V-NH ₂
PG-3	RGGGL-CYCRR-RFCVC-VGR-NH ₂
PG-4	RGGRL-CYCRG-WICFC-VGR-NH ₂
PG-5	RGGRL-CYCRP-RFCVC-VGR-NH ₂

До начала нашего исследования большинство опубликованных работ были посвящены изучению протегрина PG-1, а природные протегрины PG2-PG5 оставались мало изученными. Несмотря на имеющуюся информацию об активности протегринов в отношении бактериальных клеток, детали

механизма их взаимодействия с клеточной мембраной на структурном уровне с высоким разрешением оставались мало изученными. Для решения данного вопроса может быть использована спектроскопия ЯМР высокого разрешения протегинов в растворе с модельными системами, имитирующими поверхность мембран (мембранными миметиками), такими как детергенты на основе додецилфосфохолина (ДФХ) или плоских амфифилов CHAPS (3 - [(3-холамидопропил) диметиламмоний] -1-пропансульфонат).

Рибосомы S. aureus – мишень для новых антибиотиков

Повышение устойчивости *S. aureus* к антибиотикам вынудило исследователей модифицировать существующие или искать и синтезировать новые препараты для преодоления устойчивости. Одной из наиболее привлекательных для этого целей является рибосома. Знание структуры рибосомы, как мишени антибиотиков является критическим условием для детального понимания механизма их специфического действия, а также служит фундаментом для создания новых высокоэффективных лекарственных препаратов антимикробного действия. К примеру, детальный механизм действия таких широко распространенных антибиотиков как тетрациклин, стрептамицин, канамицин, хлорамфеникол был расшифрован с помощью рентгеноструктурного анализа комплексов рибосома-антибиотик. Полученные данные, в свою очередь, легли в основу разработок полусинтетических и синтетических антибиотиков нового поколения с улучшенными свойствами (дигидрострептомицин – производная стрептамицина с повышенной антитуберкулезной активностью; тигециклин – аналог тетрациклина усиленного действия; линезолид – полностью синтетический антибиотик широкого спектра, эффективный против множества бактерий устойчивых к антибиотикам). Примечательно, что многие антибиотики действуют на бактерии, но не на человека. Благодаря определению структуры эукариотической рибосомы дрожжей, а в

дальнейшем и человека, была выяснена причина такой избирательности – специфические структурные элементы рибосом эукариот препятствуют связыванию с ними антибиотиков. Аналогично, специфические элементы структуры, а также ряд уникальных модификаций рРНК, обуславливают и устойчивость *S. aureus* к целому ряду антибиотиков. Таким образом, определение детальной структуры рибосомы *S. aureus* открывает большие возможности для поиска принципиально новых и высокоспецифичных лекарственных препаратов для борьбы с инфекциями. Структура 70S рибосомы *S. aureus* была определена с разрешением 3,8 Å методом крио-ЭМ в 2016 году нашей группой [274]. Сравнительный анализ с уже известными структурами Грам (+) и Грам (-) бактерий – *B. subtilis*, *T. thermophilus*, *E. coli* выявил ряд участков, специфичных для рибосомы золотистого стафилококка. Одним из ярких примеров специфичности на белковом уровне является белок bL31, который участвует в управлении движениями малой субъединицы относительно большой субъединицы рибосомы в процессе трансляции. У *S. aureus* наблюдалось наличие специфичного для В-типа паралога дополнительного структурного элемента, состоящего из 15 аминокислотных остатков, который, как предполагается, влияет на функцию белка bL31 (Рис. 32). Ранее было показано, что у *B. subtilis* В-тип паралога bL31 имеет большее сродство с рибосомой, чем А-тип, в структуре которого имеется Zn^{2+} -связывающий мотив. Таким образом, В-тип bL31, вероятно, более подвижен на рибосоме в отличие от А-типа. При этом, В-тип bL31 *B. subtilis* связывается с рибосомой лишь при специфических условиях, например, таких как низкая внутриклеточная концентрация ионов Zn^{2+} . Кроме того, возможно, что данный дополнительный структурный элемент также играет другую функцию, например, связывается с регуляторными факторами. Интересным является тот факт, что для золотистого стафилококка и многих других грамположительных патогенных микроорганизмов А-тип белка bL31 отсутствует, что возможно связано с приобретением альтернативных механизмов детоксификации Zn^{2+} .

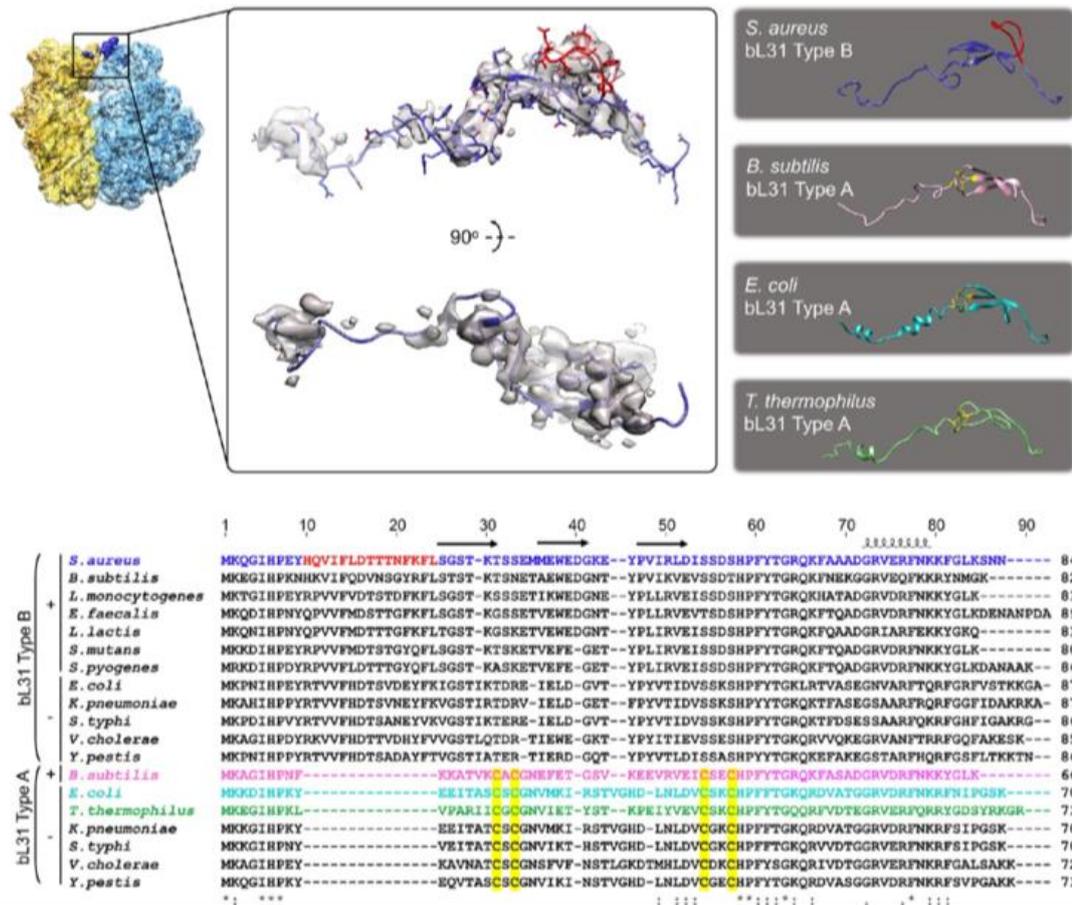


Рисунок 32. Структурные гомологи белка bL31 В-типа в отсутствии Zn-связывающего домена образующего белковый мостик между «головой» 30S субчастицы с центральным протуберанцем 50S субчастицы. Красным цветом выделен дополнительный специфичный для *S. aureus* участок (адаптировано из статьи [274]).

Интересно, что стафилококк кодирует лишь один белок – bL31 тип В, который всегда связан с рибосомой. В то же время в геномах сравниваемых бактерий присутствуют два паралога – bL31 тип А и bL31 тип В. Белок bL31 тип В связывается с рибосомой лишь в случае недостатка цинка. В белке bL31 тип В из *S. aureus* была найдена специфическая петля, расположенная на поверхности рибосомы, в то время как в структурах сравниваемых рибосом присутствовал белок bL31 тип А, который был лишен данной петли, но характеризовался наличием цинк-связывающего домена. Таким образом, замена жесткой цинк-связывающей структуры на гибкую петлю в белке bL31 тип В подразумевает не только наличие альтернативных механизмов детоксификации Zn^{2+} в клетках золотистого стафилококка, но также придают белку дополнительную подвижность и возможность взаимодействия с

лигандами в процессе трансляции. А отсутствие гибких механизмов замены одного паралога белка на другой в условиях стресса, характеризует как перспективную мишень для ингибиторов трансляции. Также были установлены различия на уровне рРНК: 7 спиралей у малой субъединицы и 16 у большой имели различную длину или ориентацию при сравнении структуры 70S рибосомы *S. aureus* с рибосомами бактерий *E. coli*, *T. Thermophilus* и *B. subtilis*. Большинство из них, например, h9, h26, h44 у малой субъединицы и H9, H10, H25, H54, H63, H79, H98 у большой расположены на периферии рибосомы. Среди этих примеров выделяется спираль h26 малой субъединицы – наиболее удлиненная в рибосоме стафилококка (Рис. 33).

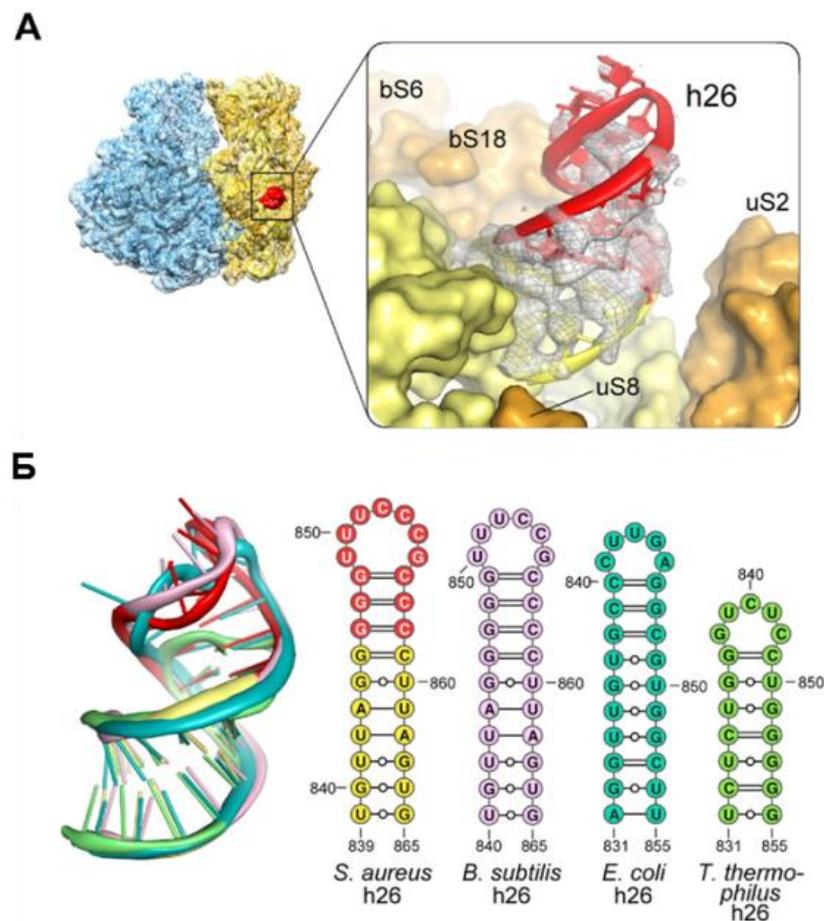


Рисунок 33. Спираль h26 малой субъединицы, которая возможно участвует в качестве регулятора процесса трансляции (А). Нуклеотидные последовательности и сравнение нескольких структур спиралей h26 из четырех бактерий (розовый, *B. subtilis*, PDB ID 3J9W; темно-зеленый, *E. coli*, PDB ID 4YBB; светло-зеленый, *T. thermophilus*, PDB ID 4V4J) (Б) (адаптировано из статьи [274]).

Положение спирали h26 соответствует положению сегмента экспансии 7 у эукариот – одного из крупнейших в малой субъединице, обеспечивающего связывание факторов инициации трансляции. Вероятно, у бактерий роль h26 также заключается в инициации трансляции и размещении мРНК посредством модулирующих взаимодействий между участками 16S рРНК (в частности, на h23, h45) и белками, (bS1, bS2, bS6, bS18, bS2). Также возможно, что петля h26 с большим количеством нуклеотидов U/C у золотистого стафилококка будет непосредственно связываться с последовательностями содержащими большое число G оснований, обнаруженных во многих 5'-нетранслируемых областях золотистого стафилококка, в том числе мРНК из области последовательности Шайна-Дальгарно. Полученные данные предполагают, что h26 играет роль в специфическом для золотистого стафилококка механизме регуляции инициации трансляции.

Гибернация рибосом

Помимо специфических структурных элементов, в ходе эволюции в бактериях есть и иные механизмы защиты своих рибосом от антибиотиков. Один из таких механизмов активируется в условиях стресса, и сопровождается образованием неактивных димеров рибосом [3]. Это обеспечивает бактериям переход в режим энергосбережения за счет замедления белкового синтеза. В результате обеспечивается выживаемость бактериальных клеток в неблагоприятных условиях путем сохранения части рибосом, так как их активные сайты закрыты для связывания антибиотиков. Когда стрессовые условия для клетки проходят, то в достаточно короткие сроки (1-2 минуты) клетки бактерий вновь могут переходить в активную фазу и возобновить биосинтез белков [275, 276]. Процесс гибернации рибосом инициируется связыванием с 70S рибосомами малых стресс-индуцированных белков, что часто приводит к образованию димеров

рибосом с коэффициентом седиментации 100S («диссом» см. обзор [3]). Данные стресс-индуцированные белки различаются у различных видов или штаммов бактерий [277]. Например, у бактерии *E. coli* существуют два белка: hibernation-promoting factor (*Ec*HPF, 10 кДа) и ribosome modulation factor (*Ec*RMF, 6,5 кДа), которые действуют совместно [278, 279], в то время как у бактерии *S. aureus* гибернация рибосом вызывается одним, но более длинным белком HPF (*Sa*HPF, 22 кДа; [277, 280, 281]). Гомология аминокислотной последовательности С-концевого домена *Sa*HPF (CTD) довольно низкая с белком RMF из *E. coli* [280], однако данный домен сохраняется у многих бактерий (Рис. 34).

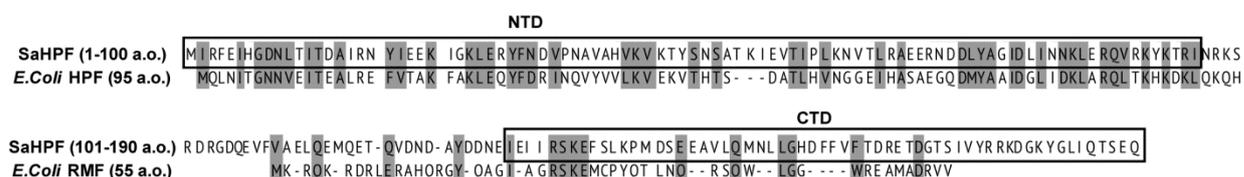


Рисунок 34. Аминокислотные последовательности белков гибернации из *E. Coli* и *S. aureus*. Серым отмечены гомологичные аминокислотные остатки.

Экспрессия факторов гибернации также различается у бактерий, например *Ec*HPF и *Ec*RMF экспрессируются во время перехода из логарифмической фазы роста к стационарной, в то время как *Sa*HPF присутствует в течение обеих фаз [280]. Эти видоспецифические особенности объясняют различия в реакциях на стрессовые условия у разных бактерий. Например, димеризация рибосом увеличивает жизнеспособность и переносимость стресса в течение стационарной фазы в *E. coli* [3], а в *B. subtilis* - способствует быстрому восстановлению клеток при снятии стресса [282]. В *S. aureus* белок *Sa*HPF предотвращает деградацию рибосом и препятствует процессу инициации трансляции [283]. В противоположность другим бактериям (*Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella* и др.), неактивные димеры рибосом *S. aureus* присутствуют не только в стрессовых условиях, но и во время активного роста клеток (Рис. 35). Такая стратегия, возможно,

позволяет клеткам стафилококка быть готовым к стрессовым условиям еще до их наступления, что, безусловно, увеличивает их потенциал к выживанию.

Наличие вариаций в структуре факторов, картине экспрессии и функциональной роли предполагают, что существуют различные механизмы гибернации рибосом (Рис. 36). В *E. coli* димеризация рибосом происходит в два этапа: сначала происходит образование 90S димеров за счет присоединения *EcRMF* в области последовательности анти-Шайна-Дальгарно мРНК-свободной рибосомы, а затем образуется 100S димер за счет присоединения белка *EcHPF* в сайте связывания тРНК [117, 278, 279]. У *S. aureus* димеризация рибосом происходит в присутствии белка *SaHPF* без фазы образования 90S рибосом [280]. Кроме того, увеличение длины белковой цепи HPF приводит к увеличению стабильности 100S димеров [277], что еще раз подчеркивает важность сравнительного анализа процесса димеризации рибосом у различных бактерий [284].

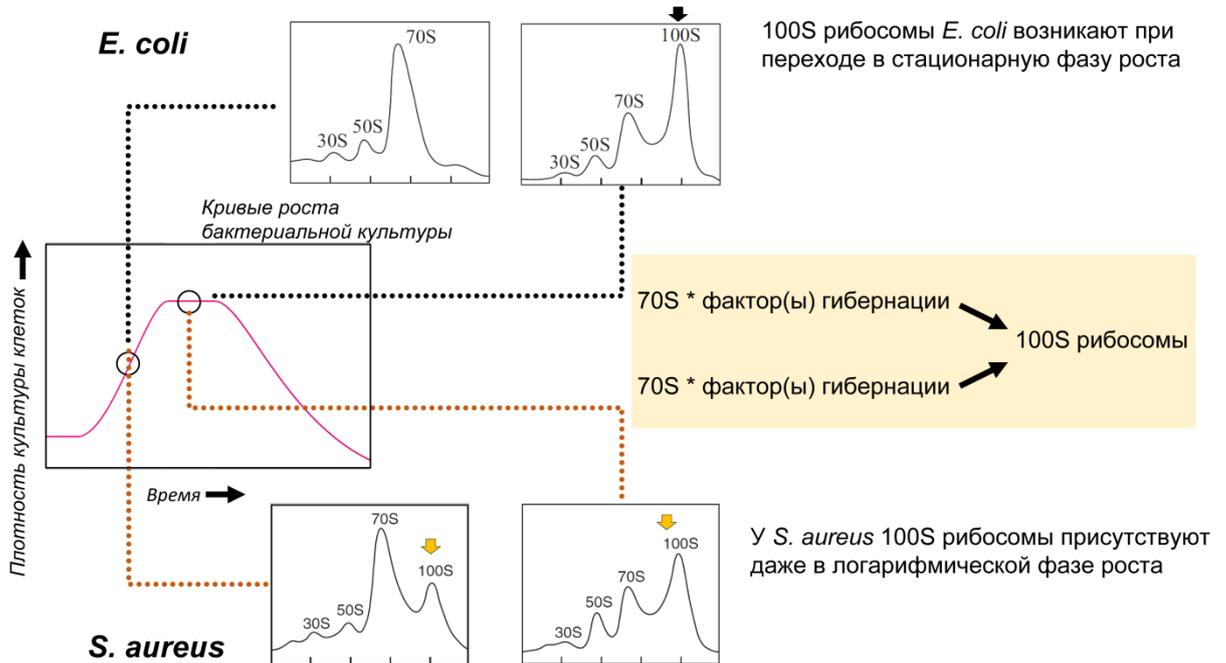


Рисунок 35. Кривые роста и коэффициенты седиментации рибосом *E. coli* и *S. aureus*.

гибернации, но и защищает их от связывания ряда антибиотиков, таких как тетрациклин, эдеин, касугамицин и др., чьи сайты связывания также перекрываются с данным регионом. Для С-концевого домена в базе данных банка белковых структур Protein Data Bank (PDB ID 3KA5) была одна структура гомолога указанная как рибосом-связывающийся белок Y (Ribosome-associated protein Y) из *Clostridium acetobutylicum*. Таким образом, получение структурной информации с высоким разрешением о механизме димеризации *S. aureus* в присутствии белка SaHPF позволит понять данный процесс на молекулярном уровне. Также ввиду отсутствия гибкой регуляции у *S. aureus*, белок SaHPF является перспективной мишенью для разработки антистафилококковых препаратов.

Факторы трансляции и элонгации

Как было отмечено ранее (см. главу 1.2.) одной из наиболее широко встречаемых мишеней для действия природных антибиотиков является ПТЦ и элонгационный цикл. Цикл элонгации является самым консервативным этапом синтеза белка у всех живых организмов. Данный этап является самым энергоемким шагом, так как для присоединения одной аминокислоты необходим гидролиз четырех высокоэнергетических связей. Факторы трансляции и элонгации очень гомологичны у про- и эукариот. Факторы элонгации также являются мишенями для ингибиторов процесса синтеза белка. Более того, факторы трансляции и элонгации обладают уникальными модификациями, которые прямым или косвенным образом могут влиять на синтез белка.

Во время каждого цикла элонгации “правильная” aa-тРНК доставляется в А-сайт рибосомы фактором EF-Tu (eEF1A у эукариот) в комплексе с ГТФ. В процессе гидролиза ГТФ фактор EF-Tu·ГДФ покидает рибосому и с помощью фактора обмена нуклеотидов EF-Ts трансформируется в ГТФ форму и вновь готов доставить новую aa-тРНК при освобождении А-сайта. Образование пептидной связи происходит между пептидил-тРНК в Р-сайте

рибосомы и aa-тРНК в А-сайте. Предполагается, что у бактерий белок EF-P способствует образованию пептидной связи, особенно у «трудных» для синтеза участков, таких как пролин-пролин (PPP, PPG, APP, PPD, и др.). Синтез таких мотивов на рибосоме затруднен из-за того, что пролин содержит пирролидиновое кольцо, которое снижает гибкость пептида из-за вращения вокруг углов ϕ и ψ [289, 290], поэтому конформации для растущего пептида ограничены, и синтез пептидной связи происходит медленно. Белок EF-P стабилизирует Р-тРНК и увеличивает энтропию заторможенного комплекса рибосом, чтобы компенсировать жесткую природу пролина [291]. На сегодняшний день структурные механизмы данного эффекта остаются до сих пор плохо изученными.

Известно, что в составе белков секреторных систем (например AmiB, CadC, FlhC, TonB, и другие) присутствует большое количество полипролиновых участков. Данные белки в свою очередь необходимы для выделения факторов патогенности, поэтому нарушения в работе фактора EF-P должны влиять на патогенные свойства. Было показано, что у *Salmonella* отсутствие посттрансляционной модификации белка EF-P приводило к снижению вирулентности. Для освобождения А-сайта для следующей aa-тРНК, тРНК из А-сайта и Р-сайта переносятся в Р- и Е-сайты соответственно, и происходит сдвиг мРНК на один кодон. Эта реакция называется транслокацией и обеспечивается фактором EF-G (eEF2) в ГТФ-зависимом режиме. Было показано, что транслокация может быть обратимой - специфический для бактерий фактор EF4 [292] может подтолкнуть тРНК и мРНК обратно к Р- и А-сайтам.

Элонгационный фактор Р (EF-P; eIF5A)

Фактор элонгации Р (EF-P: 20,5 кДа) описан как классический трансляционный фактор и обнаруживается у всех эубактерий. Аналог этого фактора обнаружен у эукариотических организмов и известен как eIF5A, у архебактерий аналогичный белок обозначен как aIF5A. Факторы eIF5A у

эукариот и EF-P у бактерий гомологичны и обладают уникальными посттрансляционными модификациями. У эукариот показана только одна посттрансляционная модификация – введение гидроксигипузина у консервативного остатка лизина Lys51, которая для высших организмов является абсолютно необходимой для функционирования eIF5A [293], в то время как у некоторых бактерий существует необычное лизинилирование остатка Lys34 фактора EF-P [294, 295] (Рис. 37).

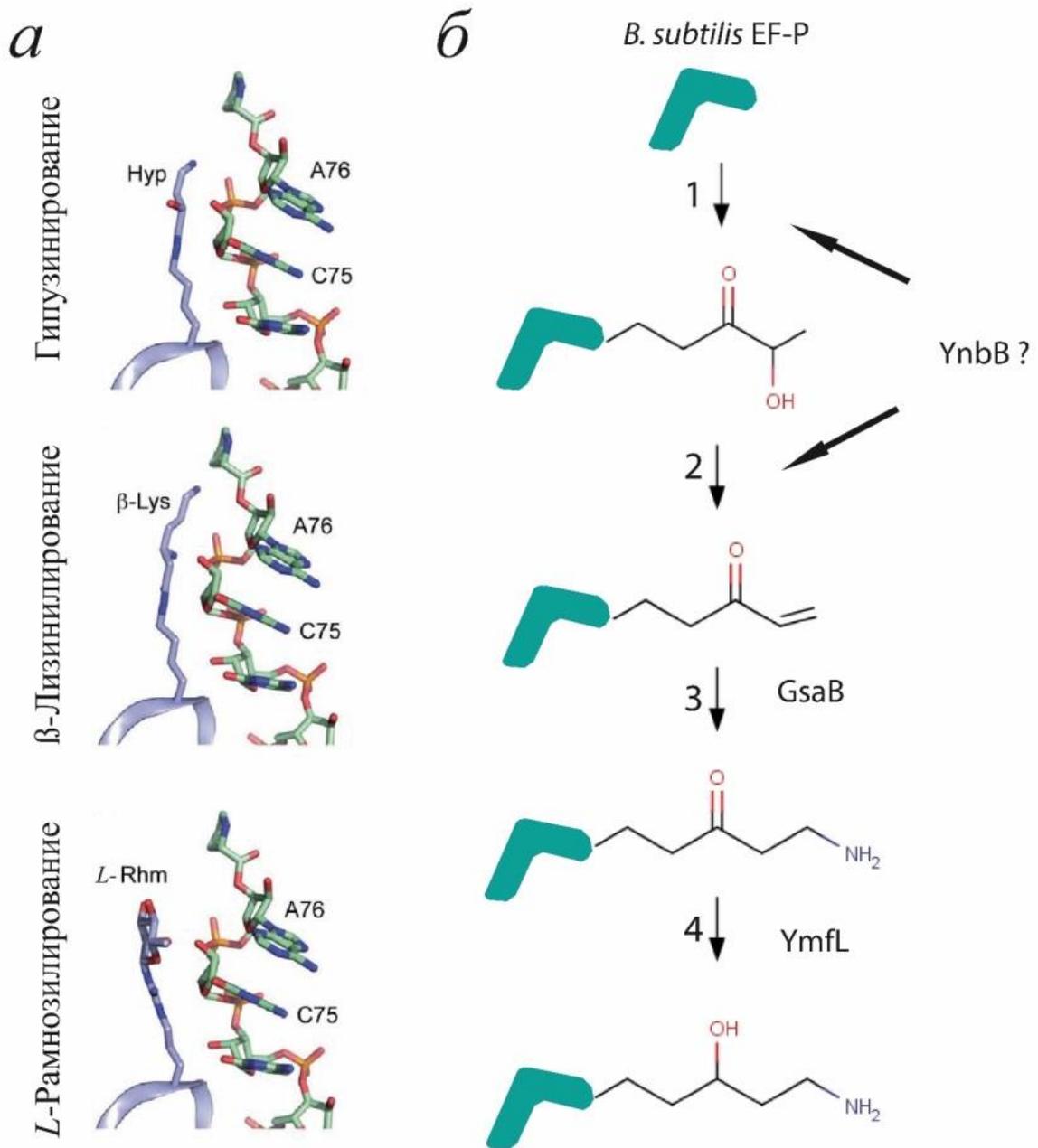


Рисунок 37. Типы модификаций EF-P и IF5A: гипузинирование, β -лизинилирование, L-рамнозилрование (а), и предполагаемая схема 5-аминопентанилирования EF-P (б).

У архей модификация, по-видимому, также необходима, но не происходит гидроксирование гипузина [296]. Характерно, что петля, внутри которой происходит модификация у архейных aIF5A и эукариотических eIF5A, демонстрирует консервативный мотив, что указывает на модификацию одним и тем же веществом – гипузином. У эубактерий петля, подвергающаяся модификации, показывает значительную вариабельность: у видов лизинилирующих EF-P и имеющих аналоги белков-модификаторов YjeA и YjeK мотив консервативен и состоит из следующих аминокислотных остатков: пролин-глицин-лизин-глицин (PGKG), для видов у которых эти гены не обнаруживаются, соответствующий мотив может значительно отличаться от консенсусной последовательности [297]. Соответственно для модификации EF-P у разных эубактерий используются разные вещества: если у *E. coli* и близких видов происходит присоединение и модификация лизина [298], то у *P. aeruginosa* в качестве модификации используется остаток рамнозы [299]. Вполне вероятно, что у других эубактерий, например у грамположительных бактерий, для модификации EF-P могут использоваться какие-либо другие соединения, поскольку в их геномах не обнаруживаются гомологи генов, отвечающих за присоединение лизина или рамнозы.

Предполагается, что модификация белка EF-P с удлинённым остатком лизина помогает образованию пептидной связи [300], особенно для полипролиновых участков [301, 302]. Анализ структур полученных методом кристаллографии факторов eIF5A и EF-P у различных эукариот, архей и бактерий показывает высокую схожесть в их структуре [303, 304] (PDB: ZERO). Фактор EF-P связывается с рибосомой между Р- и Е-сайтами и в его структура состоит из трех доменов [105] (Рис. 38).

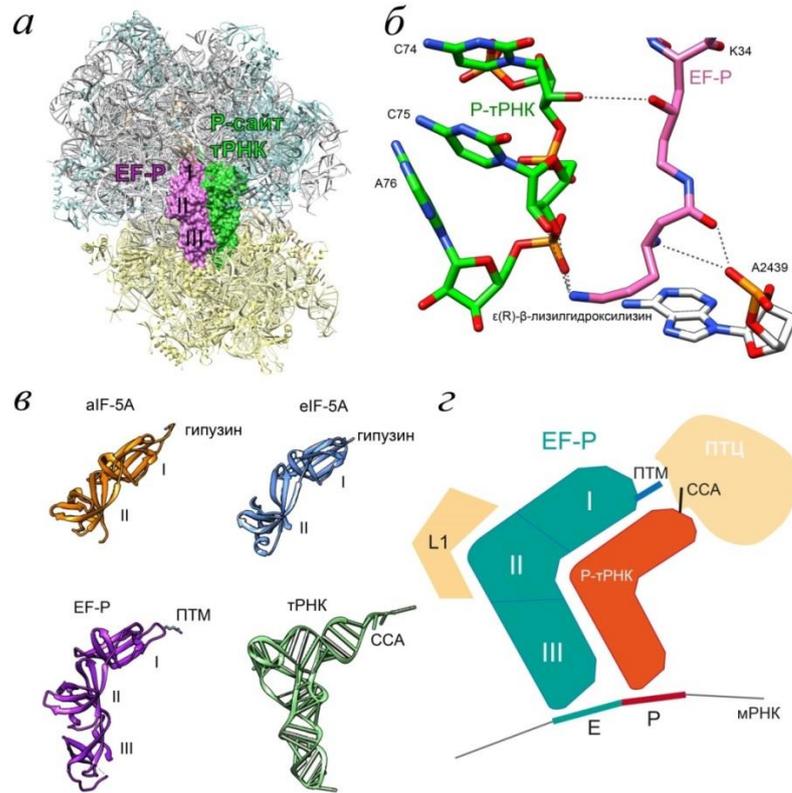


Рисунок 38. Механизм связывания EF-P с рибосомой (Адаптировано из работы [105]) (А). Б: Взаимодействие участков EF-P с ССА-концом Р-тРНК [305]. Предполагаемые водородные связи между ϵ (R)- β -лизилгидроксильной модификацией Lys34 EF-P с ССА-концом Р-тРНК и A2439 показаны пунктирной линией. В: Сравнение структуры бактериального EF-P с архейным (aIF5A) и эукариотическим (eIF5A) аналогом. Наибольшая структурная гомология наблюдается для доменов I и II сравниваемых структур. Посттрансляционная модификация располагается в верхнем правом углу домена I. Г: Схематическое представление расположения EF-P, белка L1, мРНК и Р-тРНК в рибосоме.

Наиболее полно описана функция домена I, который участвует в образовании пептидных связей каталитического EF-P в полипролиновых мотивах. Роль домена III, который расположен вблизи кодона мРНК в Е-сайте, мало изучена и его структура в комплексах с рибосомой имеет низкое разрешение из-за высокой подвижности. Данный домен частично располагается в Е-сайте рибосомы около антикодоновой петли aa-тРНК. Предполагается, что он может участвовать в предотвращении преждевременного сдвига тРНК в Е-сайт [306, 307]. Интересным является тот факт, что у белка eEF5 отсутствует третий домен и, предположительно,

стабильность рамки считывания достигается за счет иных механизмов: структурных особенностей рибосом, или другими механизмами контроля и регуляции синтеза белка у эукариот.

Структурные исследования фактора eIF5A связанного с 80S рибосомой показали значимость модификации гипузина при удлинении растущей пептидной цепи [64]. В структуре бактериальной рибосомы с инициаторной тРНК и белком EF-P не наблюдалось модификации лизинилирования, однако возможно ее наличие может способствовать образованию пептидной связи в прокариотах [105].

Фактор элонгации EF-P также отвечает за инициацию трансляции, поскольку входит в комплекс (30S, мРНК, EF-P и тРНК^{фМет}) [297]. Потеря белка EF-P не является летальной для бактериальной клетки, однако мутанты, у которых отсутствует белок EF-P, практически не секретируют белки и уступают дикому типу в скорости роста и в некоторых случаях проявляют большую чувствительность к антибиотикам [299]. Отсутствие секреции объясняется тем, что большинство белков, секреторного аппарата, имеют полипролиновые участки, следовательно, отсутствие EF-P значительно затрудняет их синтез. Многие факторы патогенности являются секретруемыми белками, их отсутствие значительно снижает вирулентность бактерий [308].

Исследования структуры и динамики фактора EF-P и структуры комплекса EF-P с 70S рибосомой патогенной бактерии *S. aureus* биофизическими методами (спектроскопия ЯМР, рентгеноструктурный анализ и криоэлектронная микроскопия), создадут фундамент для скрининга высокоселективных ингибиторов трансляции, которые будут не только угнетать клетки золотистого стафилококка, но и будут препятствовать выделению факторов патогенности.

Краткая характеристика объектов и методов исследования.

Крупные ассиметричные макромолекулярные многокомпонентные системы, такие как компоненты клеточных мембран или рибосомы и их комплексы с различными лигандами, являются одними из наиболее трудных для структурных исследований объектов. Из-за больших молекулярных масс, многокомпонентного состава, наличия участков с внутримолекулярной подвижностью, возможной диссоциации отдельных компонент в данных комплексах зачастую становится невозможным применять методы спектроскопии ЯМР высокого разрешения или получать кристаллы для проведения экспериментов по РСА. Метод криогенной просвечивающей электронной микроскопии позволяет решить ряд указанных выше проблем, однако, так как изображения в крио-ЭМ получаются путем большого количества усреднений, наличие внутримолекулярной подвижности отдельных частей макромолекулярного комплекса приводит к снижению разрешения карт данных крио-ЭМ для данных участков. Это приводит к тому, что при возможном достаточно высоком среднем разрешении для конечной структуры комплекса, детали структурной организации подвижных частей могут быть не различимы. Недостающая информация о структуре подвижных частей макромолекулярных комплексов может быть получена методами РСА и спектроскопии ЯМР при решении структуры отдельных компонент комплекса, которая затем может быть использована при интерпретации данных крио-ЭМ. Для подтверждения корректности интерпретации данных можно применять методы генетики и молекулярной биологии и осуществлять точечные замены аминокислотных остатков или нуклеотидов в интерфейсе взаимодействия белков или нуклеиновых кислот, и анализировать влияние данных замен на функционирование макромолекулярного комплекса. В данной главе описываются используемые в работе методы и подходы изучения структурной организации

макромолекулярных ансамблей, таких как комплексы пептидов с мембраноподобными средами и комплексы рибосом с различными лигандами методами спектроскопии ЯМР, ЭПР, РСА, крио-ЭМ, масс-спектрометрии и молекулярной биологии.

2.1. Спектроскопия ЯМР

Одномерные ^1H , двумерные ^1H - ^{13}C , ^1H - ^{15}N и трехмерные (^1H - ^{13}C - ^{15}N , ^1H - ^1H - ^{13}C , ^1H - ^1H - ^{15}N) ЯМР-спектры получали при 10–40 °С на спектрометре AVANCE-III HDTM фирмы Bruker с частотой 700 МГц по протонам, оборудованным криодатчиком QCI CryoProbe. Химические сдвиги ядер ^1H определяли относительно сигнала протонов воды (4,75 м.д. при 30 °С), либо относительно внутреннего стандарта ДСС (2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфонат натрия). Химические сдвиги ядер ^{15}N и ^{13}C были вычислены с использованием соответствующих гиромагнитных соотношений.

Регистрация спектров ЯМР и отнесение сигналов

ЯМР-эксперименты и параметры их измерения представлены в таблице 2.1. Спектры записывались с применением фазочувствительной методики (2048 точек по F3, 48 точек по F2, 128 по F1). Для подавления остаточных сигналов растворителя использовали методы WATERGATE [309] и EXCITATION SCULPTING [310]. В экспериментах с гетероядрами (^{13}C , ^{15}N) с регистрацией сигнала по ядрам ^1H подавление остаточных сигналов растворителя проводилось с помощью градиентного эха для выбора путей передачи намагниченности [311]. На основе определенных из эксперимента значений химических сдвигов ядер $^1\text{H}^\alpha$, $^{13}\text{C}^\alpha$, $^{13}\text{C}^\beta$, $^{13}\text{C}'$ рассчитывались ИХС и проводился анализ вторичной структуры белков по методике, изложенной в разделе 1.1. и работе [312]. Отнесение сигналов атомов основной цепи белков проводили в программе CcpNmr Analysis (<https://www.ccpn.ac.uk/v2-software/software/analysis>) на основе анализа сигналов в трехмерных спектрах тройного резонанса: HNCO/HNcaCO, HNCA/HNcoCA и HNCACB/CBCACONH. Также использовали данные о последовательных

ЯЭО контактах определенных из трехмерных спектров экспериментов ЯМР ^{15}N - ^1H HSQC-NOESY и ^{13}C - ^1H HSQC-NOESY. Для боковых цепей отнесение сигналов осуществляли на основе анализа трехмерных спектров экспериментов ЯМР HCCH-TOCSY, HNHB, ^{13}C - ^1H HSQC-NOESY, ^{15}N - ^1H HSQC-NOESY и двумерных спектров DQF-COSY.

Таблица 2.1. Образцы белков, использованные в работе, и параметры измерения ЯМР-экспериментов.

¹ «-», «N», «CN», – обозначает немеченый, ^{15}N -меченый, ^{13}C , ^{15}N -меченый образцы.

² Для образцов в 5 мм ЯМР ампулах объем оставлял 500 мкл, в Shigemi ампулах – 350 мкл, в 3 мм ЯМР ампулах – 160 мкл.

³ Для спектров NOESY в скобках указано время смешивания в мкс, которое использовалось для анализа пространственной структуры.

Белок	Метки ¹	Среда	Конц. (мМ); Объем (мкл) ² ; рН ³ ; Т (°С)	ЯМР-спектры ³
PG2, PG3, PG4, PG5	–	(90% H ₂ O, 10% D ₂ O), (100% D ₂ O)	1; 500; 7,6; 20	1D: ^1H , ^{13}C ; 2D: ^1H - ^{13}C -HSQC, ^1H - ^{15}N -HSQC, ^1H - ^1H -DQF-COSY, ^1H - ^1H -NOESY (120, 200);
SaHPF	–, N, CN	(90% H ₂ O, 10% D ₂ O), (100% D ₂ O)	2; 500,160; 7,6; 5-35	1D: ^1H , ^{13}C ; 2D: ^1H - ^{13}C -HSQC, ^1H - ^{15}N -HSQC, ^1H - ^1H -DQF-COSY, ^1H - ^1H -NOESY (120, 200); 3D: HNCA, HNCACB, C(CO)NH, CBCA(CO)NH HN(CA)CO, HNCO, HCCH-TOCSY, ^{15}N - ^1H HSQC-NOESY(150, 200), ^{13}C - ^1H HSQC-NOESY (150)
SaHPF-NTD	–, N, CN	(90% H ₂ O, 10% D ₂ O), (100% D ₂ O)	1,62; 160; 7,6; 35	1D: ^1H , ^{13}C ; 2D: ^1H - ^{13}C -HSQC, ^1H - ^{15}N -HSQC, ^1H - ^1H -DQF-COSY, ^1H - ^1H -NOESY (100); 3D: HNCA, HNCACB, C(CO)NH, CBCA(CO)NH HN(CA)CO, HNCO, HCCH-TOCSY, ^{15}N - ^1H HSQC-NOESY(100), ^{13}C - ^1H HSQC-NOESY (150), ^{15}N - ^1H HET-SOFAST HSQC
SaHPF-CTD	–, N, CN	(90% H ₂ O, 10% D ₂ O), (100% D ₂ O)	2; 350, 160; 7,6; 35	1D: ^1H , ^{13}C ; 2D: ^1H - ^{13}C -HSQC, ^1H - ^{15}N -HSQC, ^1H - ^1H -DQF-COSY, ^1H - ^1H -NOESY (120, 200); 3D: HNCA, HNCACB, C(CO)NH, CBCA(CO)NH HN(CA)CO, HNCO, HCCH-TOCSY, ^{15}N - ^1H HSQC-NOESY(150, 200), ^{13}C - ^1H HSQC-NOESY (150), $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ - $^{12}\text{C}/^{14}\text{N}$ NOESY-HSQC
SaEF-P	–, N, CN	(90% H ₂ O, 10% D ₂ O), (100% D ₂ O)	1,30; 160; 6,8; 35	1D: ^1H , ^{13}C ; 2D: ^1H - ^{13}C -HSQC, ^1H - ^{15}N -HSQC, ^1H - ^{15}N -IPAP-HSQC, ^1H - ^1H -DQF-COSY, ^1H - ^1H -NOESY (120, 200); 3D: HNCA, HNCACB, C(CO)NH, CBCA(CO)NH HN(CA)CO, HNCO, HCCH-TOCSY, ^{15}N - ^1H HSQC-NOESY(100), ^{13}C - ^1H HSQC-NOESY (100)

В образцах белков меченых по изотопу ^{15}N гетероядерные константы $^3J_{\text{NH}}^{\alpha}$ определяли по относительному сдвигу HN-H α кросс-пиков в спектрах NOESY, регистрируемых без развязки по ядрам ^{15}N [313]. Ограничения на двугранные углы основной цепи определяли из величин KCCB и ограничений на межпротонные расстояния рассчитанных на основе уравнений Карплюса в программе CcpNmr Analysis. Значения химических сдвигов депонировали в международную базу данных BMRB.

Значения констант остаточного ДДВ получали на основе данных эксперимента ^1H - ^{15}N -IPAP-HSQC для образцов белков, обогащенных по изотопам ^{15}N , в растворе липид-детергентных бицелл на основе цвиттер-ионных или анионных насыщенных липидов DMPC/DHPC (димиристоилфосфатидилхолин/дигексаноилфосфатидилхолин) (молярное соотношение 3:1).

Идентификация водородных связей

Определение доноров внутримолекулярных водородных связей осуществляли на основе значений констант скорости обмена амидных протонов с дейтерием в спектрах ^1H - ^{15}N HSQC для ^{15}N -меченых белков. Препараты белков предварительно лиофильно высушивали и растворяли в дейтерированном растворителе (D_2O). При анализе полученных данных использовали предположение о том, что амидные протоны, участвующие в формировании внутримолекулярных водородных связей будут медленно обмениваться с дейтерием молекул растворителя [314].

Идентификация контактов стабилизирующих димер белка SaHPF

Для определения контактов между аминокислотными остатками в димере С-концевого домена белка SaHPF был приготовлен образец белка, содержащий в равном молярном соотношении белок без изотопного замещения и белок, меченный по изотопам ^{13}C , ^{15}N . Смесь белков

инкубировалась при температуре 25 °С в течение 4 часов и регистрировались спектры $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ - $^{12}\text{C}/^{14}\text{N}$ NOESY-HSQC.

Расчет пространственной структуры белков

Расчет пространственной структуры белков методом молекулярной динамики и алгоритмом «симулированного отжига» на основе экспериментальных данных спектроскопии ЯМР проводили в программе CNS (Crystallography and NMR System) [315] с модулем ARIA (Ambiguous Restraints for Iterative Assignment) [316]. Структуры рассчитанные в вакууме с помощью стандартного протокола CNS оптимизировались с помощью расчета короткой траектории в водном окружении с использованием потенциала электростатических взаимодействий. В качестве входных данных для расчета структур белков использовались данные из экспериментов по спектроскопии ЯЭО, двугранные углы и водородные связи. Качество получаемых структур оценивалось исходя из анализа нарушений на ограничения и карты Рамачандрана (с помощью программы PROCHECK [317]). Визуализацию структур проводили с помощью программы UCSF Chimera [318]. Полученные структуры белков депонировали в международный банк структур PDB.

Идентификация остатков взаимодействующих с рибосомой

Для идентификации остатков N-концевого домена белка SaHPF, взаимодействующих с 70S рибосомой *S. aureus* регистрировались ^1H - ^{15}N HET-SOFAST спектры ЯМР для образца белка меченого по изотопам ^{15}N белка в буфере G (120 мкМ), затем в раствор добавляли 54 мкМ 70S рибосом и инкубировали смесь при 37°С в течение 30 минут и повторно регистрировали спектры ЯМР. Вследствие эффекта спиновой диффузии при радиочастотном облучении системы спинов на резонансной частоте иминопротонов РНК в спектрах ЯМР наблюдалось изменение интенсивностей взаимодействующих с рибосомой аминокислотных остатков.

2.2. Рентгеноструктурный анализ

Эксперименты по рентгеноструктурному анализу проводились как на монокристалльном дифрактометре Rigaku Synergy-S с микрофокусным источником рентгеновского излучения с медным анодом, оснащенный четырёхкружным каппа гониометром и двумерным высокоскоростным детектором на основе гибридных пикселей HyPix-6000HE, так и на линиях Proxima1 синхротрона Soleil (г. Сент-Обен, Франция) и Gemini синхротрона ESRF (г. Гренобль, Франция).

Кристаллизация и получение дифракционных данных

Образцы белков концентрировали до 10 мг/мл и подбирали условия кристаллизации методом диффузии водяных паров в модификации «висячая капля». Регистрация дифракционных данных производилась с помощью детектора PILATUS 6M при длине волны 1,0 Å. Расстояние от образца до детектора составляло 0,23670 м. Данные с высоким разрешением получали на линиях Proxima1 синхротрона Soleil (Сент-Обен, Франция) и Gemini синхротрона ESRF (Гренобль, Франция). Дифракционные изображения первоначально обрабатывали в программе XDS [319], осуществляли поиск дифракционных максимумов hkl , определяли сингонию и параметры элементарной ячейки кристаллов. На этапе интегрирования определяли интегральную интенсивность дифракционных максимумов на дифрактограммах. Модули структурных факторов $|F_{hkl}|$ определяли на этапе шкалирования и приводили интенсивности к абсолютной шкале.

Расчет фаз, построение и уточнение модели

Для определения положения молекулы исследуемого белка в элементарной ячейке кристалла применялся метод молекулярного замещения с использованием гомологичных белков в качестве начальной модели в программе Phaser [320] пакета Phenix [321]. Уточнение начальной модели

проводилось с помощью пакета phenix.refine [321]. Модели строились и корректировалась вручную в программе COOT [322]. Конечные структуры были депонированы в базу данных PDB. Для визуализации моделей использовали программу CHIMERA [318].

2.3. Криогенная просвечивающая электронная микроскопия

Эксперименты по крио-ЭМ на микроскопе Titan Krios проводились в Институте генетики, молекулярной и клеточной биологии (IGBMC, г. Страсбург, Франция).

Нанесение проб на сетки для крио-ЭМ

Образцы рибосом (концентрация ~ 0.075 мг/мл, 20 нМ) в объеме 4 мкл наносились на сетки Quantifoil 2/2 (Quantifoil Micro Tools, 400 ячеек на сетку, время тлеющего разряда 20 с), покрытые слоем аморфного углерода, с использованием аппарата Vitrobot Mark IV при постоянно поддерживаемых температуре и влажности. Сетки фиксировались в держателе, и излишки жидкости удалялись аппаратом с помощью бумажных фильтров в течение 1,5 с и опускались в жидкий этан. Сетки с нанесенными образцами хранились в жидком азоте, до проведения крио-ЭМ экспериментов.

Сбор данных крио-ЭМ

Регистрацию изображений проводили на микроскопе Titan Krios (FEI, Нидерланды), оснащенным пушкой автоэлектронной эмиссии, при энергии ускорения электронов 300 КэВ, увеличении в 50000 раз, и с дефокусировкой от 0,4 до 4,0 мкм. Регистрацию изображений осуществляли в автоматическом режиме с помощью камеры прямого детектирования электронов CMOS (Falcon II или Gatan K2) с размером матрицы 4096 x 4096 пикселей, и программного обеспечения EPU при следующих параметрах: размер пиксела 1,1 Å, суммарная доза облучения $60 \text{ e}^-/\text{Å}^2$ (что

соответствует $3,5 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$ на каждый кадр); 7 кадров из 17 возможных были сохранены и использованы для дальнейшей обработки.

Обработка данных крио-ЭМ

Обработка полученных изображений и 3D реконструкция структуры рибосом *S. aureus* производилась с использованием нескольких программных продуктов [323]. Сначала изображения индивидуальных частиц собирали и объединяли в стеки по 7 кадров в каждом с помощью алгоритма оптического потока в программе Xmipp3 [324]. Затем усредненное изображение стека использовалось для определения оптической передаточной функции в программе CTFFIND4 [325] и для выбора отдельных частиц в полуавтоматическом режиме в программе SCIPION [326]. Отбор частиц производился в программе Xmipp3. Сортировка полученных изображений сначала производилась с помощью 2D классификации, затем с помощью 3D классификации в программе RELION [327]. Для 100S рибосом было получено 2 класса частиц обозначенных нами как «жесткие» и «подвижные» димеры в ячейке размером $640 \times 640 \times 640 \text{ \AA}$; а также были выделены два класса рибосом с вращением и без вращения субъединиц друг относительно друга в составе 70S рибосомы в ячейке с размерами $340 \times 340 \times 340 \text{ \AA}$. Для определения состоит ли димер рибосом из двух не повернутых или двух повернутых рибосом или их комбинации, мы провели уточнение, сосредоточившись на одной рибосоме в димере, с последующей дополнительной 3D-классификацией. В результате наблюдалось равное количество рибосом с вращением и без вращения субъединиц в димерах. Уточнение структур для всех типов частиц производилось с использованием функции автоматического 3D уточнения в программе RELION [327]. Среднее значение разрешения для полученных структур составило $\sim 3,7 \text{ \AA}$ 70S рибосом с вращением и без вращения и $\sim 9\text{--}11 \text{ \AA}$ для «жестких» и «подвижных» димеров. Оценка разрешения полученных 3D структур производилась в программе ResMap [328].

2.4. Спектроскопия ЭПР

Спектры ЭПР регистрировались в рамках сотрудничества с группой М.Р. Гафурова из Казанского (Приволжского) университета на спектрометре X-диапазона (9,6 ГГц) Eleksys 680 фирмы Bruker, с применением стационарного режима при комнатной температуре. Параметры регистрации были выбраны равными 100 мкВт для мощности СВЧ и 0,2 Гс при модуляции 100 кГц, чтобы избежать эффектов насыщения и перемодуляции. Параметры ЭПР и времена вращательной корреляции были рассчитаны на основе аппроксимации спектров ЭПР в модуле Easyspin для Matlab [329].

2.5. Реактивы и препараты.

- CaCl₂, KH₂PO₄, KCl, KH₂PO₄, MnSO₄, MgSO₄, MgCl₂, Трис HCl, MgAc₂, NaCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, NaOH, NH₄Cl, HCl, H₃BO₃, ZnSO₄, FeCl₃, CuCl₂, CoCl₂, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), N- 2- гидроксипиперазин- N'- 2- этансульфоновая кислота (HEPES), сахараза, дрожжевой экстракт, бакто-агар компании Хеликон, Россия;
- Бакто-триптон, DTT (DL-Дитиотреитол) компании VWR Life Science, США;
- ДНКаза тип I из поджелудочной железы быка фирмы ООО «БиолоТ». Активность 1740 ЕД/мг;
- Полиэтиленгликоль 20000 (PEG 20000) фирмы Hampton Research, США;
- Полиэтиленгликоль 6000 (PEG 6000) фирмы Hampton Research, США;
- изопропил- 1- тио- β- D- галактопиранозид (IPTG), фирмы Thermo Scientific, США;
- аминокислоты: аргинин (R), глутаминовая кислота (E), дейтерированная вода фирмы Sigma, Германия;
- ампициллин, канамицин, хлорамфеникол фирмы Invitrogen, США;
- наборы ингибиторов протеаз Complete фирмы Roche, Германия;

- сверхчистая вода типа I (ГОСТ Р 52501- 2005) Milli-Q Advantage, Millipore, Франция;
- металл-хелатирующий сорбент с Ni²⁺-агарозой для аффинной хроматографии (Ni-NTA- агароза) фирмы Qiagen, Германия;
- центрифуги Amicon 10 и 100 000 фирмы Millipore, Германия;
- липидные бицеллы на основе димиристоилфосфатидилхолина (DMPC)/дигексаноилфосфатидилхолина DHPC, мицеллы на основе додецил-фосфохолина и плоские амифифилы CHAPS фирмы Avanti Polar Lipids, США;
- спиновая метка MTSL (S-(1-оксил-2,2,5,5-тетраметил-2,5-дигидро-1H-пиррол-3-ил)метил метантиосульфат) фирмы Toronto Research Chemicals, Канада.

Таблица 2.2. Растворы, буферы, гели, использовавшиеся в работе.

Название раствора, буфера, геля	Состав*
Фосфатный буфер	25 мМ NaH ₂ PO ₄ , 25 мМ Na ₂ HPO ₄ , 250 мМ NH ₄ Cl
Буфер CRB	20 мМ Tris-HCl (pH 7,6), 0,5 М NH ₄ Cl
Буфер Wash A	20 мМ Tris-HCl (pH 7,6), 1 М NH ₄ Cl
Буфер Wash B	20 мМ Tris-HCl (pH 7,6), 0,5 М NH ₄ Cl, 5 мМ имидазол. Итоговый раствор довели HCl до pH 7,6
Элюирующий буфер	20 мМ Tris-HCl (pH 7,8), 250 мМ NH ₄ Cl, 300 мМ имидазол. Итоговый раствор довели HCl до pH 7,6
Буфер А	20 мМ Hepes-KOH (pH = 7,5), 100 мМ NH ₄ Cl, 21 мМ MgOAc ₂ , 1 мМ DTT
Буфер В	10 мМ Hepes-KOH (pH = 7,5), 500 мМ NH ₄ Cl, 25 мМ MgOAc ₂ , 1,1 М сахарозы, 0,5 мМ EDTA, 1 мМ DTT
Буфер Е (5 кратный)	10 мМ Hepes-KOH (pH = 7,5), 100 мМ KCl, 10,5 мМ MgOAc ₂ , 0,5 мМ EDTA, 1 мМ DTT
Буфер G	5 мМ Hepes-KOH (pH = 7,5), 50 мМ KCl, 10 мМ NH ₄ Cl, 10 мМ MgOAc ₂ , 1 мМ DTT

Продолжение таблицы 2.2.

Название раствора, буфера, геля	Состав*
Лизис- буфер	ДНКаза тип I (0,1 мг/мл), 1 мМ DTT, 1,1 мМ лизостафин, ингибиторы протеиназ Complete
Название раствора, буфера, геля	Состав*
Среда LB	1% бакто-триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl
Среда LB (твердая)	1% бакто-триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl, 1,5% бакто-агар для твердой среды
среда M9	Na ₂ HPO ₄ 48 мМ, KH ₂ PO ₄ 22 мМ, NaCl 8.5 мМ, NH ₄ Cl 18.7 мМ, глюкоза 0.4%, MgSO ₄ 1 мМ, CaCl ₂ 0.1 мМ
среда 2YT	1,6% бакто-триптон, 1% дрожжевой экстракт, 0,5% NaCl
Разделяющий гель для электрофореза белков	1М Tris-HCl (pH 8,8) 375 мМ, 15% акриламид, 0,5% бисакриламид, 0,1% додецилсульфат (SDS), 0,1% персульфат аммония (PSA), 0,05% TEMED
Концентрирующий гель для электрофореза белков	1М Tris-HCl (pH 6,8) 125 мМ, 5% акриламид, 0,17% бисакриламид, 0,1% додецилсульфат (SDS), 0,1% персульфат аммония (PSA), 0,05% TEMED
1хбуфер для проведения ПААГ (TGB)	Tris-HCl 25мМ, Глицерин 250мМ, додецилсульфат (SDS) 0,1%
Буфер для окрашивания белков в геле	Сульфат аммония 8%, этанол (96%) 20%, фосфорная кислота (85%) 1,6% синий кумасси G-250 0,08%

*pH буферных растворов указан при 25°C

Таблица 2.3. Штаммы, использовавшиеся в работе.

Штамм	Описание штамма
<i>E. coli</i>	
DH5α	F ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20</i> φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺), λ ⁻
BL21 (DE3)	<i>E. coli str. B F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) λ(<i>DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]</i>) [<i>malB</i> ⁺] _{K-12} (λ ^S) <i>pLysS</i> [<i>T7p20 ori_{p15A}</i>](<i>Cm^R</i>)

Продолжение таблицы 2.3

Штамм	Описание штамма
<i>S. aureus</i>	
RN6390	Получен из штамма NCTC8325 и содержит мутацию в гене <i>rbsU</i> , активатора сигма В фактора. Таким образом, увеличен синтез РНК-полимеразы и снижена способность к формированию биопленок [330] (Все работы со штаммом проводились в специализированной лаборатории с уровнем биобезопасности 2 (по ВОЗ)).

Таблица 2.4. Генно- инженерные конструкции и вектора, использованные в работе.

Название	Применение	Ссылка, источник получения
pET28a	Для экспрессии в <i>E. coli</i>	Предоставлена с.н.с. Валидовым Ш.З., КФУ, Россия
pGS21a	Для экспрессии в <i>E. coli</i>	Предоставлена Поликановым Ю.С., университет Иллинойса в Чикаго США

2.6. Общие методы работы с нуклеиновыми кислотами и белками

Образцы протгеринов PG2, PG3, PG4 PG5 были получены методом твердофазного синтеза и предоставлены Филипповым А.В. (кафедра физики молекулярных систем Института физики КФУ; Технологический университете Лулео, Швеция).

Трансформация клеток E. coli

Плазмидная ДНК кодирующая последовательность белка SaNPF была предоставлена Поликановым Ю.С., университет Иллинойса в Чикаго, США.

Плазмидные ДНК кодирующие последовательности белков (*Sa*HPF, *Sa*HPF^{F160D}, *Sa*HPF^{V162D}, *Sa*HPF^{T171D}, *Sa*HPF^{I173D}, *Sa*HPF^{Y175D}, *Sa*HPF^{I185D}, *Sa*HPF^{T187D}, *Sa*HPF-NTD¹⁻¹¹⁰, *Sa*HPF-CTD¹³⁰⁻¹⁹⁰, *Sa*HPF-CTD¹⁴⁰⁻¹⁹⁰, *Sa*EF-P, *Sa*EF-P^{K32C}, лизостафин), компетентные клетки BL21 были предоставлены с.н.с. НИЛ Структурная биология Валидовым Ш.З., КФУ, Россия. Разморозку компетентных клеток, которые хранились при -80°C проводили в бане со льдом, после чего добавляли 5 мкл раствора плазмидной ДНК (концентрация 10 мкг/мкл) в деионнизированной воде (MilliQ), инкубировали 20 мин при температуре 0°C. Затем смесь прогревали в термостате при температуре 42°C в течение 60 с и охлаждали до 0°C, после чего добавляли 900 мкл среды 2YT (Табл. 2.2) для восстановления и инкубировали 1 ч при 37°C. Затем производили высев 100 мкл трансформационной смеси на твердую среду LB с соответствующими маркеру устойчивости антибиотиками (Табл. 2.2.). Чашки Петри инкубировали при 37 °C в течение 14 ч и переносили для хранения в термостат при 4°C.

Получение рекомбинантных белков

Одиночную колонию клеток *E. coli* штамма BL21, трансформированного плазмидой pGS21a-*Sa*HPF, либо pGS21a-*Sa*HPF^{F160D}, либо pGS21a-*Sa*HPF^{V162D}, либо pGS21a-*Sa*HPF^{T171D}, либо pGS21a-*Sa*HPF^{I173D}, либо pGS21a-*Sa*HPF^{Y175D}, либо pGS21a-*Sa*HPF^{I185D}, либо pGS21a-*Sa*HPF^{T187D}, либо pGS21a-*Sa*HPF-NTD¹⁻¹¹⁰, либо pGS21a-*Sa*HPF-CTD¹³⁰⁻¹⁹⁰, либо pGS21a-*Sa*HPF-CTD¹⁴⁰⁻¹⁹⁰, либо pET28a-*Sa*EF-P, либо pET28a-*Sa*EF-P^{K32C}, либо pET28a-лизостафин с чашки Петри высевали в 25 мл среды LB соответствующими маркеру устойчивости антибиотиками. Клеточную массу выращивали в течение 12 ч при интенсивном перемешивании 180 об./мин и 37°C. Далее 20 мл «ночной» культуры пересевали в 1 литр среды LB или M9 с добавлением D-глюкозы-¹³C6 (2 г/л) и сульфата аммония ¹⁵NH₄Cl (1 г/л) (Cambridge Isotope Laboratories), для получения ¹⁵N или ¹⁵N/¹³C меченого образца белка, и

растили клеточную массу до OD_{600} примерно 0,3-0,5 при 180 об./мин и 37°C. Экспрессию индуцировали добавлением 0,5 mM IPTG и растили при перемешивании в течение 4 ч при 180 об./мин и 37°C. Затем пробирку переносили в ледяную баню и проводили все операции на льду, либо при температуре 4 °C. Клеточную массу осаждали центрифугированием 15 мин при 5400 g (ротор JLA 9.1000, Beckman). Клеточную массу *E. coli*, содержащую рекомбинантный белок, ресуспендировали в 50 мл буфера CRB (Табл. 2.2.) и осаждали центрифугированием 15 мин при 3220 g, осадок взвешивали и хранили при температуре -20 °C.

Размораживали клетки *E. coli*, содержащие рекомбинантный белок, в бане со льдом и ресуспендировали в 5 мл холодного буфера CRB (Табл. 2.2.), в который добавлялась смесь ингибиторов протеиназ Complete (1 таблетка на 1 мл) и PMSF (0,5 mM). Клетки лизировали при помощи ультразвукового гомогенизатора (амплитуда 40%, 3 раза по 8 минут, чередовали 3 минуты ультразвук включен, 5 минут пауза). Лизат осветляли центрифугированием при 25000 g (ротор JA 25.50, Beckman) в течение 30 мин. Надосадочную жидкость переносили в пробирку от ротора 45 Ti Beckman и повторно очищали центрифугированием при 45000 g в течение 45 мин.

Получение белка EF-P из Staphylococcus aureus

Выделение белка EF-P из клеток *S. aureus* проводили на основе оптимизированного протокола для *E. coli*: индуцировали экспрессию добавлением окситетрацикина с концентрацией 200 нг/мл и инкубировали при перемешивании в течение 4 ч при 180 об./мин и 37°C. Клетки осаждали центрифугированием при 4000 g (ротор JLA 9.1000, Beckman) и проводили отмывку буфером CRB (Табл. 2.2.) и лизировали при помощи фермента - лизостафина с концентрацией 2 мг/мл. Лизат осветляли центрифугированием при 45000 g (ротор JA 25.50, Beckman) в течение 30 мин.

Металлохелатная аффинная хроматография на Ni- NTA-сорбенте

Для выделения рекомбинантных белков методом металлохелатной аффинной хроматографии в аминокислотные последовательности белков были добавлены 6 остатков His. В колонку, содержащую Ni-NTA-агарозу, вносили лизат клеток *E. coli*, содержащих рекомбинантный белок, и промывали 15 мл буфера А, затем 15 мл буфера В (Табл. 2.2.). Белок смывали с сорбента 5 мл элюирующего буфера (Табл. 2.2.). Итоговую концентрацию белковых препаратов определяли на спектрофотометре NanoDrop.

Эксклюзионная хроматография

Дополнительную очистку белков проводили с помощью эксклюзионной хроматографии на FPLC хроматографе NGC Discover (BioRad) и колонке Superdex 75 10/300 (производитель GE, Великобритания). Для этого использовали фракции, полученные на этапе металлохелатной аффинной хроматографии и концентрировали до 1 мл с помощью концентраторов Amicon-Ultra (Merck Millipore, Германия). Сконцентрированный образец вносили на колонку, которая предварительно уравнивали соответствующим буфером для гель-фильтрации. Эксклюзионную хроматографию проводили в потоке фосфатного буфера (Табл. 2.2.) при 4°C со скоростью нанесения 0,8 мл/мин, собирали фракции объемом 1 мл. За разделением белков следили по профилю поглощения A_{280} . Итоговую концентрацию белковых препаратов определяли на спектрофотометре NanoDrop.

Электрофоретическое разделение белков

Электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле (ПААГ-ДСН) проводили с помощью системы Mini-Protean производства Bio-Rad. Первоначально вносили 15% разделяющий гель, после полимеризации которого добавляли 5% концентрирующий гель. После полимеризации концентрирующего геля наносили прогретые при 100 °C в течение 10 минут аликвоты после аффинной и эксклюзионной хроматографии,

а так же супернатант, полученный после лизиса клеток и фракции полученные при промывке аффинной колонки отмывочными буферами wash A и wash B (Табл. 2.2.). Электрофорез проводился в буфере TGB (Табл. 2.2.) при напряжении 110-140 В до прохождения красителя (3',3'',5',5''-тетрабромфенолсульфонфталеин, Бромфеноловый синий) до конца геля. Для окрашивания гель помещали в буфер для окрашивания белков в геле и инкубировали при покачивании в течение 2 часов. Затем промывали гель дистиллированной водой до появления белковых зон. После производили анализ полученной на ПААГ картины.

Масс-спектрометрический анализ

Масс-спектрометрический анализ трипсинизированного образца белка проводили на приборе Orbitrap ELITE в Институте генетики, молекулярной и клеточной биологии (IGBMC, Страсбург, Франция). Разделение проводили на колонке C18 Accucore 50 см. Анализ масс-спектрометрических данных проводили в программном обеспечении Proteome Discoverer 2.1 (Sequest HT / Percolator).

*Выделение 70S рибосом *S. aureus**

Пробирку с клетками *S. aureus* RN6390 хранящуюся при -80 °С размораживали в бане со льдом, 5 мкл раствора клеток высевали методом истощающего посева на твердую среду LB без антибиотиков (Табл. 2.2.) в чашки Петри. Чашки Петри инкубировали при 37 °С в течение 20 ч и переносили для хранения в термостат при 4°С.

Одиночную колонию клеток *S. aureus* штамма RN6390 с чашки Петри высевали в 50 мл среды LB без антибиотиков (Табл. 2.2.). Клеточную массу выращивали в течение 17 ч при интенсивном перемешивании 180 об./мин и 37 °С до значения $OD_{600} = 5-5.5$. Далее 10 мл «ночной» культуры пересеивали в 1 литр среды LB без антибиотиков (Табл. 2.2.) и растили клеточную массу до $OD_{600} = 0,7-0,8$ при 180 об./мин и 37°С. Затем колбы с клеточной массой переносили на ледяную баню на 10 минут для остановки роста клеток. Все

дальнейшие манипуляции проводили на ледяной бане либо при температуре 4 °С. Клетки осаждали центрифугированием 10 мин при 4000 об./мин (ротор JLA 9.1000, Beckman). Клеточную массу *S. aureus* дважды ресуспендировали в 40 мл буфера А (Табл. 2.2.) и осаждали центрифугированием 10 мин при 4000 об./мин. Осадок взвешивали и хранили при температуре -80°С.

Размораживали клетки *S. aureus* в бане со льдом и ресуспендировали 5 мл холодного буфера А (Табл. 2.2.), в который добавляли EDTA и 10 мл лизирующего буфера (Табл. 2.2.) и инкубировали 45 мин на водяной бане при 37° аккуратно перемешивая каждые 5 минут. Лизат осветляли центрифугированием при 14 000 об./мин (ротор JA 25.50, Beckman) в течение 90 мин. Надосадочную жидкость (S30 фракция) переносили в пробирку от ротора JA 25.50 Beckman, разбавляли буфером А до $A^{260} = 60$ и добавляли PEG 20000 до 2.8%. Полученный раствор очищали центрифугированием при 15000 g в течение 5 мин. Надосадочную жидкость переносили в пробирку от ротора JA 25.50 Beckman и добавляли PEG20000 до 4.2%. Полученный раствор очищали центрифугированием при 15000 g в течение 10 мин. Осадок ресуспендировали 4 мл буфера А (Табл. 2.2.) на магнитной мешалке 1-2 часа и доводили итоговый объем буфером А (Табл. 2.2.) до 30 мл. В охлаждённую до 4 °С пробирку от ротора 45 Ti Beckman на дно наливали 25 мл буфера В (Табл. 2.2.) и сверху пипеткой вносили образец рибосом. Центрифугировали при 44 000 об./мин в течение 17 ч. Осадок ресуспендировали в 2 мл однократного буфера Е (Табл. 2.2.) на магнитной мешалке в холодной комнате в течение 4-6 часов. 0,5 мл полученного образца рибосом наслаивали на заранее приготовленные 7-30% сахарозные градиенты (по 3,65 мг рибосом на 1 градиент). Ультрацентрифугирование проводили при 17800 об./мин при 4°С в течение 15,5 ч в роторе SW32 (Beckman), фракционировали по 0,5 мл и анализировали на спектрофотометре NanoDrop. Фракции с максимальным поглощением на длине волны 260 нм соответствующие 70S рибосомам объединяли и доводили концентрацию до 1 мг/мл при помощи концентраторов согласно протоколу производителя (Amicon-Ultra, Merck

Millipore, Германия). В полученном растворе с 70S рибосомами довели концентрацию 1М MgOAc₂ до 25 мМ и для осаждения рибосом в полиэтиленгликоле добавляли PEG20000 до концентрации 4,5% (по объему). Осаждение рибосом проводили центрифугированием в роторе JA 25.50 Beckman при 20 000 g в течение 15 мин. Осадок ресуспендировали в 250 мкл буфера G (Табл. 2.2.) и очищали от нерастворимых фракций центрифугированием при 14500 об./мин в течение 10 мин. Полученный образец 70S рибосом замораживали и хранили для дальнейших экспериментов на - 80°C.

Реконструкция 100S рибосом S. aureus

Для реконструкции *in vitro* 100S рибосом *S. aureus* готовилась смесь, содержащая 1,3 нМ очищенных 70S рибосом с 13 нМ очищенного белка SaHPF и объем образца довели до 1 мл при тех же ионных условиях, что и в буфере G (Табл. 2.2.). Полученная смесь инкубировалась при 37°C в течение 30 минут и 35 мл образца наслаивали на 5–30% сахарозный градиент с теми же ионными условиями. Ультрацентрифугирование проводили при 17800 об./мин при 4°C в течение 15,5 ч в роторе SW32 (Beckman), фракционировали по 0,5 мл и анализировали на спектрофотометре NanoDrop. Фракции, содержащие пик 100S рибосом, диализировали против буфера G (Табл. 2.2.), объединяли и концентрировали при помощи концентраторов Amicon-Ultra 50000 MWCO (Merck Millipore, Германия). Далее полученный образец рибосом наслаивали на 11 мл 5–30% сахарозного градиента и центрифугировали в роторе SW41 Beckman при 27 783 g в течение 15 часов, фракционировали и анализировали на спектрофотометре NanoDrop. Фракции соответствующие 100S рибосомам отбирались в аликвоты, замораживались в жидком азоте и хранились при - 80 °C.

Структурные исследования антимикробных пептидов протегринов

Несмотря на имеющуюся информацию об активности протегринов в отношении бактериальных клеток, детали механизма их взаимодействия с клеточной мембраной на структурном уровне с высоким разрешением оставались мало изученными. Большинство работ были посвящены протегрину PG1, для которого было показано, что он может образовывать димеры в растворе с мицелламиДФХ [331], в то время как для остальных типов протегринов (PG-2, PG-3, PG-4, PG-5) практически отсутствовала информация об их пространственной структуре и биологических функциях. Было показано, что протегрины PG-2, PG-3 и PG-5 обладали такой же антимикробной активностью как и PG-1, и высказано предположение, что минимальной структурой для сохранения антибактериальной активности является PG2, состоящий из 12 остатков аминокислотных остатков, а для проявления противогрибковых свойств необходимы 4 дополнительных остатка [332].

В ряде работ методами молекулярной динамики и атомно-силовой микроскопии было показано, что протегрины способны к олигомеризации, образуя октамерные или декамерные поры, причем согласно расчетам, формирования в виде октамеров протегринов являлись более стабильными [333, 334]. Предполагается, что процесс формирования трансмембранной поры начинается с димеризации молекул протегринов по мере их накопления на поверхности клеточной мембраны, однако молекулярный механизм разрушения клеток не α -спиральными пептидами до сих пор остается мало изученным.

С помощью спектроскопии ЯМР для протегрина PG-1 было показано наличие двух различных моделей димеризации: формирование димера в виде параллельного β -листа (наблюдалось на поверхности холестеринсодержащих липидных бислоев методом твердотельной спектроскопии ЯМР) [331], либо

антипараллельного (наблюдалось в растворе на поверхности мицеллДФХ по данным спектроскопии ЯМР высокого разрешения) [335]. Возможно, данные различия обуславливались влиянием радиусов кривизны мицелл и липидных бислоев.

В данной главе приводится описание результатов установления ранее не изученных структур антимикробных пептидов протегринов PG-2, PG-3, PG-4 и PG-5 в растворе с мембраноподобными средами по данным спектроскопии ЯМР высокого разрешения, описывается механизм их олигомеризации и предлагается модель образования протегринами трансмембранных пор.

3.1. Определение пространственной структуры протегринов PG-2, PG-3, PG-4 и PG-5 методами спектроскопии ЯМР

Молекулярная масса протегринов составляет 1,96-2,16 кДа и для объектов таких размеров величина ЯЭО принимает значения близкие к нулю, что делает невозможным применение спектроскопии NOESY для установления их структуры в растворе методами спектроскопии ЯМР. Для решения данной проблемы возможно применение мембраноподобных сред на основе мицелл или плоских амфифилов. Мицеллы имеют относительно небольшое время вращательной корреляции ($\tau_c \sim 0,5$ нс), однако при взаимодействии пептидов с мицеллами, результирующая молекулярная масса такого комплекса становится больше, чем у несвязанного пептида, что позволяет перевести пептид из разряда малых молекул, подпадающих под условие быстрого обмена, в разряд молекул, подпадающих под условие медленного обмена. Кроме того, мицеллярные растворы увеличивают растворимость белков. В результате комплексообразования происходит увеличение интенсивностей в спектрах экспериментов NOESY и становится возможным изучение структуры данного класса объектов и деталей их взаимодействия с мембраноподобными средами.

В рамках данной работы протегрины PG-2, PG-3, PG-4 и PG-5 исследовались в мембраноподобных средах (МПС)ДФХ и CHAPS методом

спектроскопии ЯМР высокого разрешения. Подготовка образцов для записи спектров в деталях описаны в диссертационной работе Колосовой О.А [336]. Все спектры ЯМР регистрировались на ЯМР-спектрометрах производства Bruker Biospin, Германия: Avance II 500 МГц, Avance III 700 МГц.

Протегрин PG-2

Протегрин PG-2, состоящий из 16 а.о. (RGGRLCYCRRRFCICV), представляет собой минимальную структуру протегринов, проявляющую антибактериальную активность. Четыре аминокислотных остатка цистеина в составе протегринов обеспечивают формирование элемента вторичной структуры называемого бета-шпилькой. На основе данных 2D экспериментов ЯМР было проведено отнесение сигналов в спектрах PG-2 в растворе с мицелламиДФХ (Параметры экспериментов ЯМР приведены в Разделе 2.1). Данные о химических сдвигах были депонированы в международную базу данных BMRB с кодом 25212 (<http://www.bmrb.wisc.edu/>). На основе анализа спектров ^1H - ^1H NOESY для PG-2 в растворе с мицелламиДФХ наблюдалось 174 ЯЭО контакта, которые вместе с данными химических сдвигов и констант скорости обмена амидных протонов на дейтерий (Таблица 3.1) использовались для расчета пространственной структуры протегрина PG-2 методом молекулярной динамики. Было рассчитано 200 структур, из которых в дальнейшем были отобраны 20 с наименьшей энергией. Структура протегрина PG-2 в растворе с мицелламиДФХ приведена на рисунке 39. Данные депонированы в международную базу данных PDB с кодом 2MUN (<https://www.rcsb.org/>).

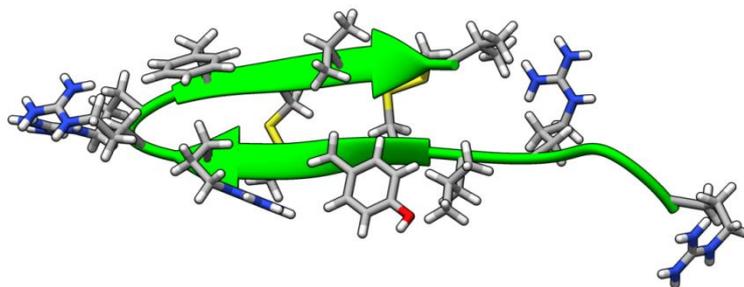


Рисунок 39. Структура протегрина PG-2 в растворе мицелламиДФХ, полученная методом спектроскопии ЯМР

Таблица 3.1. Набор пространственных ограничений, использовавшихся для расчёта структур протегрина PG-2 в растворе с мицелламиДФХ

	PG-2
Всего ЯЭО контактов	174
Дальнего диапазона ($ i-j > 4$)	11
Среднего диапазона ($ i-j = 2,3,4$)	8
Последовательные ($ i-j = 1$)	28
Внутриостаточные	127
Межмолекулярные	0
Водородные связи	6
Ограничений на двугранные углы φ, ψ	30
Статистика Рамачадрана	
Наиболее предпочтительная область (%)	78,6
Разрешенная область (%)	100,0
Среднеквадратичное отклонение атомов основной цепи в ансамбле из 10 структур (Å)	$0,64 \pm 0,1 \text{ \AA}$

В результате на основе данных спектроскопии ЯМР высокого разрешения установлено, что структура мономера протегрина PG-2 в растворе с мицелламиДФХ представлена в виде бета-шпильки, образованной а.о. 6-9 и 12-15.

Протегрин PG-3

Протегрин PG-3 представляет собой олигопептид, состоящий из 18 а.о. с последовательностью: RGGGLCYCRRRFCVVCVGR. Данный пептид был растворен в мицеллахДФХ и на основе данных 2D экспериментов ЯМР было проведено отнесение сигналов в спектрах (Параметры экспериментов ЯМР приведены в Разделе 2.1). Данные о химических сдвигах были депонированы в международную базу данных BMRB с кодом 25474 (<http://www.bmrw.wisc.edu/>). На основе анализа спектров ^1H - ^1H NOESY для PG-3 в растворе с мицелламиДФХ наблюдалось 155 ЯЭО контактов, которые вместе с данными химических сдвигов и констант скорости обмена амидных протонов на дейтерий (Таблица 3.2) использовались для расчета пространственной структуры протегрина PG-3 методом молекулярной

динамики. Было рассчитано 200 структур, из которых в дальнейшем были отобраны 20 с наименьшей энергией. Структура протегрина PG-3 в растворе с мицелламиДФХ приведена на рисунке 40. Данные депонированы в международную базу данных PDB с кодом 2MZ6 (<https://www.rcsb.org/>).

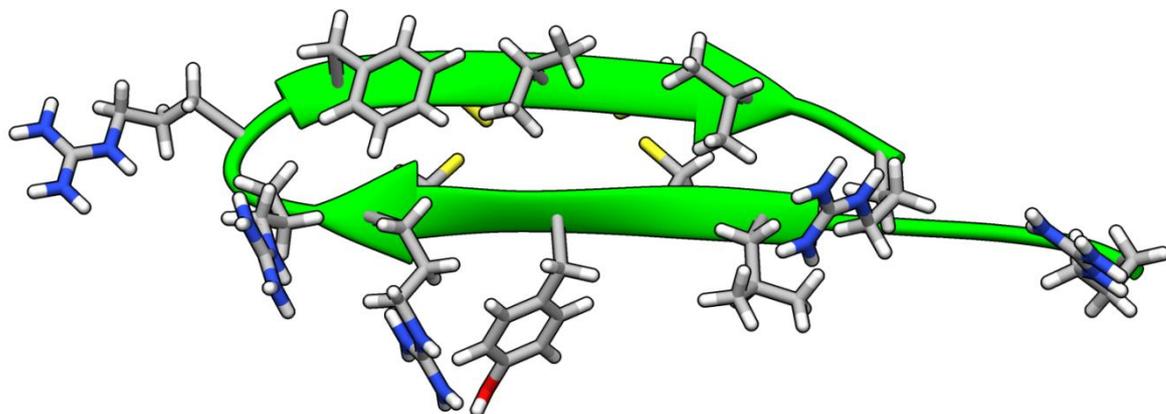


Рисунок 40. Структура протегрина PG-3 в растворе мицелламиДФХ, полученная методом спектроскопии ЯМР

Таблица 3.2. Набор пространственных ограничений, использовавшихся для расчёта структур протегрина PG-3 в растворе с мицелламиДФХ

	PG-3
Всего ЯЭО контактов	155
Дальнего диапазона ($ i-j > 4$)	0
Среднего диапазона ($ i-j = 2,3,4$)	11
Последовательные ($ i-j = 1$)	90
Внутриостаточные	54
Межмолекулярные	12
Водородные связи	6
Ограничений на двугранные углы ϕ, ψ	28
Статистика Рамачадрана	
Наиболее предпочтительная область (%)	77,8
Разрешенная область (%)	100,0
Среднеквадратичное отклонение атомов основной цепи в ансамбле из 10 структур (Å)	$0,41 \pm 0,1 \text{ \AA}$

Таким образом, по данным спектроскопии ЯМР высокого разрешения установлено, что структура мономера протегрина PG-3 в растворе с мицелламиДФХ представлена в виде бета-шпильки, образованной а.о. 4-9 и 12-17.

Протегрин PG-4

В отличие от других протегринов в состав PG-4, состоящего из 18 а.о. (RGGRLCYCRGWICFCVGR), входят неполярные остатки триптофан и изолейцин. Данный пептид был не растворим в мицеллахДФХ и для исследования его структуры применялась МПС на основе детергента CHAPS. Отнесение сигналов в спектрах ЯМР проводилось на основе данных 2D экспериментов ЯМР (Параметры экспериментов ЯМР приведены в Разделе 2.1). Данные о химических сдвигах были депонированы в международную базу данных BMRB с кодом 34357 (<http://www.bmrb.wisc.edu/>). На основе анализа ^1H - ^1H NOESY спектров ЯМР наблюдалось 145 ЯЭО контактов, которые вместе с данными химических сдвигов и констант скорости обмена амидных протонов на дейтерий (Таблица 3.3) использовались для расчета пространственной структуры протегрин PG-4 методом молекулярной динамики. Было рассчитано 200 структур, из которых в дальнейшем были отобраны 20 с наименьшей энергией. Структура протегрин PG-4 в растворе с CHAPS приведена на рисунке 41. Данные депонированы в международную базу данных PDB с кодом 6QKF (<https://www.rcsb.org/>).

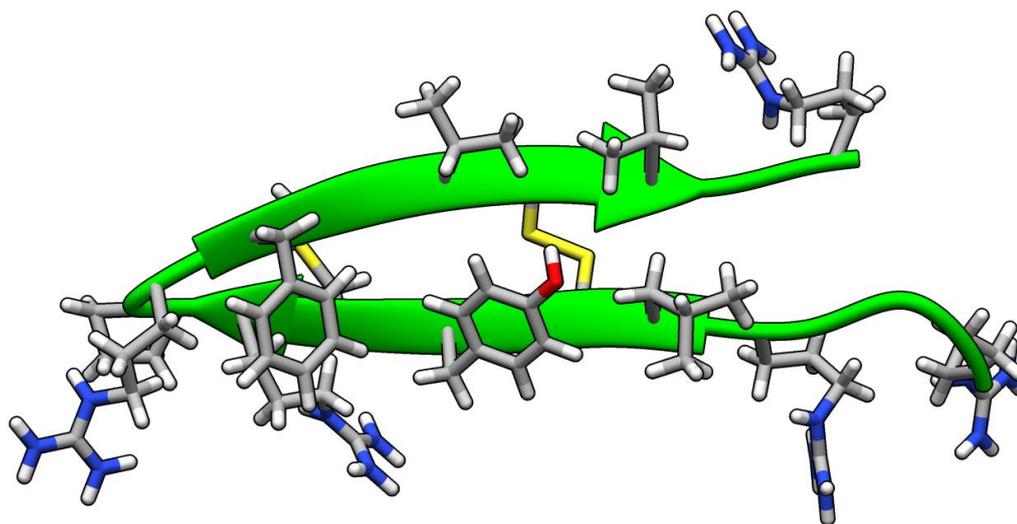


Рисунок 41. Структура протегрин PG-4 в растворе с детергентом CHAPS, полученная методом спектроскопии ЯМР

Таблица 3.3. Набор пространственных ограничений, использовавшихся для расчёта структур протегрина PG-4 в растворе с детергентом CHAPS

	PG-4
Всего ЯЭО контактов	145
Дальнего диапазона ($ i-j > 4$)	11
Среднего диапазона ($ i-j = 2,3,4$)	15
Последовательные ($ i-j = 1$)	51
Внутриостаточные	68
Межмолекулярные	15
Водородные связи	6
Ограничений на двугранные углы φ, ψ	25
Статистика Рамачадрана	
Наиболее предпочтительная область (%)	84,5
Разрешенная область (%)	99,7
Среднеквадратичное отклонение атомов основной цепи в ансамбле из 10 структур (Å)	$0,79 \pm 0,1 \text{ \AA}$

Таким образом, по данным спектроскопии ЯМР высокого разрешения установлено, что структура мономера протегрина PG-4 в МПС на основе детергента CHAPS представлена в виде бета-шпильки, образованной а.о. 4-8 и 13-17.

Протегрин PG-5

Протегрин PG-5 представляет собой олигопептид, состоящий из 18 а.о. с последовательностью: RGGRLCYCRPRFCVCGR. Данный пептид был растворен в мицеллахДФХ и на основе данных 2D экспериментов ЯМР было проведено отнесение сигналов в спектрах (Параметры экспериментов ЯМР приведены в Разделе 2.1). Данные о химических сдвигах были депонированы в международную базу данных BMRB с кодом 26009 (<http://www.bmrb.wisc.edu/>). В ^1H - ^1H NOESY спектрах ЯМР для PG-5 в растворе с мицелламиДФХ наблюдалось 164 ЯЭО контактов, которые вместе с данными химических сдвигов и констант скорости обмена амидных протонов на дейтерий (Таблица 3.4) использовались для расчета пространственной структуры протегрина PG-5 методом молекулярной динамики.

Таблица 3.4. Набор пространственных ограничений, использовавшихся для расчёта структур протегрина PG-5 в растворе с мицелламиДФХ

	PG-5
Всего ЯЭО контактов	164
Дальнего диапазона ($ i-j > 4$)	5
Среднего диапазона ($ i-j = 2,3,4$)	5
Последовательные ($ i-j = 1$)	65
Внутриостаточные	89
Межмолекулярные	6
Водородные связи	6
Ограничений на двугранные углы φ, ψ	25
Статистика Рамачадрана	
Наиболее предпочтительная область (%)	72,8
Разрешенная область (%)	100
Среднеквадратичное отклонение атомов основной цепи в ансамбле из 10 структур (Å)	$0,65 \pm 0,1 \text{ \AA}$

Было рассчитано 200 структур, из которых в дальнейшем были отобраны 20 с наименьшей энергией. Структура протегрина PG-5 в растворе с мицелламиДФХ приведена на рисунке 42. Данные депонированы в международную базу данных PDB с кодом 2NC7 (<https://www.rcsb.org/>).

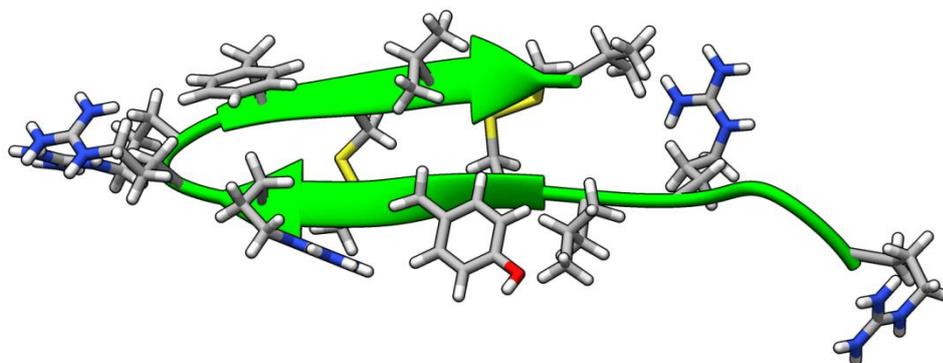


Рисунок 42. Структура протегрина PG-5 в растворе мицелламиДФХ, полученная методом спектроскопии ЯМР

В результате, по данным спектроскопии ЯМР высокого разрешения показано, что структура протегрина PG-5 в растворе с мицелламиДФХ представлена в виде бета-шпильки, образованной а.о. 5-9 и 12-16.

Полученные структуры мономеров протегринов PG-2, PG-3, PG-4 и PG-5 позволили перейти к следующему этапу исследований - изучению механизма димеризации протегринов.

3.2. Димеризация протегринов

Для протегрина PG-1 в спектрах ЯМР с мицелламиДФХ наблюдались ряд межмолекулярных ЯЭО контактов, например, между протонами СН α групп остатков V14 и V18 [335]. Однако близкие значения химических сдвигов данных остатков в спектрах ЯМР протегрина PG-2, которые составляли 4,38 и 4,32 м.д. соответственно, делают невозможным наблюдать недиагональные пики в спектрах NOESY. Поэтому на данном этапе невозможно определить происходит ли димеризация протегринов PG-2 в растворе с мицелламиДФХ, так как это было показано для PG-1. Для протегринов PG-3, PG-4 и PG-5 кроме внутримолекулярных ЯЭО контактов в спектрах NOESY также наблюдались контакты между протонами, расположенными на расстояниях, превышающих 5 Å в структуре мономера: между а.о. F12 и F16, V14 и C15, V14 и V16, C15 и V16 между а.о. протегрина PG-3; между а.о. W11 и C15 протегрина PG-4; между а.о. V14 и V16 протегрина PG-5. Это в совокупности с наблюдающимся медленным обменом амидных протонов, участвующих в образовании водородных связей, свидетельствует об формировании антипаралельной NCCN димерной структуры (Рис. 43).

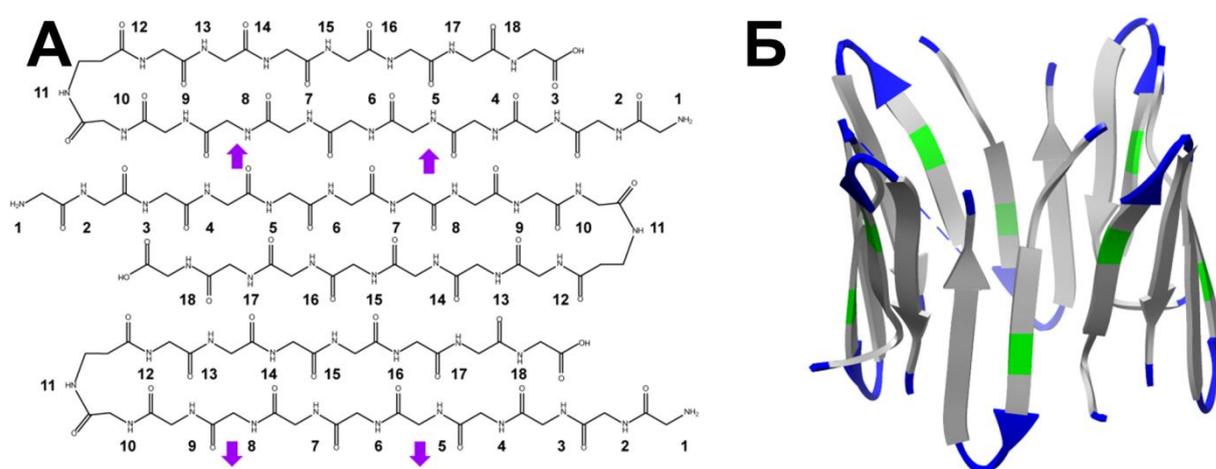


Рисунок 43. Межмономерные контакты ЯЭО участвующих в олигомеризации протегринов (А) и модель тороидальной поры (Б).

Помимо ЯЭО контактов участвующих в димеризации протегринов в спектрах NOESY наблюдались межмолекулярные контакты между а.о. L5 и C8 ($C_{\alpha}H$ Leu5 - $C_{\beta}H$ Cys8; $C_{\alpha}H$ Leu5 - HN Cys8; $C\delta H$ Leu5 - $C_{\beta}H$ Cys8), а также замедленный обмен амидных протонов а.о. C6 и C8 на дейтерий. Данные контакты свидетельствуют об образовании межмолекулярных водородных связей между димерами протегринов и формировании олигомерных структур в виде тороидальных пор.

Таким образом, на основе экспериментальных данных спектроскопии ЯМР высокого разрешения установлены структуры протегринов PG-2, PG-3, PG-4 и PG-5 в мембраноподобных средах показано, что молекулы протегринов в растворе с МПС формируют антипараллельные NCCN димеры, которые способны к дальнейшей олигомеризации в тороидальные поры, что соответствует данным атомно-силовой микроскопии и расчетов методом молекулярной динамики [337-339].

Молекулярный механизм гибернации рибосом *S. aureus*

В данной главе приводится описание результатов изучения механизма гибернации рибосом золотистого стафилококка на основе комплексного междисциплинарного подхода, включающего методы молекулярной биологии (генная инженерия, экспрессия белков и нуклеиновых кислот), биохимии (солюбилизация, очистка, фракционирование белков и нуклеиновых кислот) и физические методы исследования вещества (рентгеновская макромолекулярная кристаллография, спектроскопия ЯМР, криогенная просвечивающая электронная микроскопия).

Ранее было показано, что в стрессовых условиях в бактериальных клетках происходит снижение экспрессии белков и наблюдается формирование рибосомами 100S димеров, не участвующих в процессе биосинтеза белка [3]. В этой фазе бактериальные клетки устойчивы к внешним стресс условиям, что обеспечивает их устойчивость к антибиотикам. Данный процесс запускается за счет экспрессии белков стационарной фазы, таких как фактор гибернации рибосомы (hibernation promoting factor, HPF). Специфичный для стафилококка фактор гибернации рибосомы (SaHPF) был обнаружен в стационарной фазе, для которой было показано наличие процесса димеризации рибосом. Важно, что в противоположность другим бактериям (*Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella* и др.), неактивные димеры рибосом *S. aureus* присутствуют не только в стрессовых условиях, но и во время активного роста клеток. Такая стратегия, возможно, позволяет клеткам стафилококка быть готовым к стрессовым условиям еще до их наступления, что, безусловно, увеличивает их потенциал к выживанию. Первые структурные данные с высоким разрешением о механизме гибернации были получены методом кристаллографии для рибосом *T. thermophilus*, фактора гибернации рибосомы HPF и фактора модуляции рибосомы RMF из *E. coli*. Однако у грамположительных бактерий

(в том числе у *S. aureus*) в механизме димеризации рибосомы участвуют не два белка (HPF и RMF), а один белок HPF большего размера, который является комбинацией двух гомологов, обнаруженных в клетках *E. coli*. Таким образом, наличие одного белка, выполняющего функции двух значительно упрощает регуляцию образования димеров у *S. aureus*. С другой стороны, ввиду отсутствия гибкой регуляции, белок SaHPF является перспективной мишенью для разработки антистафилококковых препаратов.

4.1. Структурные исследования белка SaHPF

Для исследования биохимических свойств белка SaHPF *in vitro* необходимо было выделить данный белок. Для этого мы экспрессировали в клетках *E. coli* белок SaHPF с гистидиновым тагом (шесть а.о. His) на C-конце, очищали методом металлохелатной аффинной хроматографии и эксклюзионной хроматографии, и подбирали условия выделения. Белок экспрессировали в разных буферных условиях (трис-буфер; фосфатный буфер); при разных концентрациях соли NH₄Cl (150, 250, 500 мМ) и при разных уровнях pH (4,0, 7,6, 8,3). Электрофоретический анализ образца проводился в ПААГ в камере Mini-Protean Tetra (Рис. 44). Наиболее эффективное выделение оказалось для рекомбинантного белка в фосфатном буфере с добавлением 200 мМ NH₄Cl и pH=7,6. Для структурных исследований методом спектроскопии ЯМР белок SaHPF-6His экспрессировали в минимальной синтетической среде M9 на основе обогащенной по изотопам ¹³C глюкозы и обогащенного по изотопу ¹⁵N сульфата аммония. Протокол выделения белка SaHPF был разработан в нашей группе и более подробно описан в диссертации Аюпова Рустама Хасановича [340].

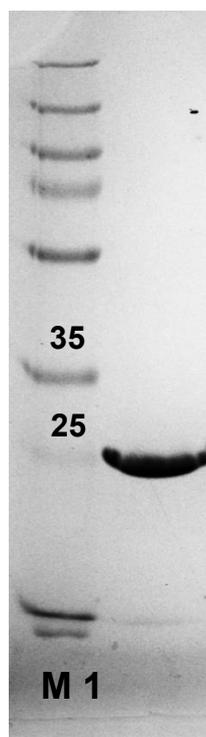


Рисунок 44. Электрофоретический анализ белка *SaHPF* в ПААГ после эксклюзионной хроматографии. Лунки: М – маркеры молекулярных масс белков (в кДа); 1- *SaHPF*-6His.

Подбор оптимальных условий для экспериментов по спектроскопии ЯМР меченого по изотопам ^{13}C и ^{15}N белка *SaHPF* проводили для образцов с различной концентрацией (от 0.05 до 0.3 мМ) в различных буферных условиях с вариацией концентрации соли NH_4Cl в диапазоне от 250 до 500 мМ. Параметры экспериментов ЯМР приведены в Разделе 2.1.

В спектрах ^1H - ^{15}N HSQC образца *SaHPF* в растворе фосфатного буфера с 250 мМ NH_4Cl при 298 К наблюдалось наличие двух групп сигналов с высокой и низкой интенсивностью, что соответствует наличию участков белка с разной конформационной подвижностью (рис. 45). Наблюдаемые в спектре ЯМР части сигналов с высокой дисперсией свидетельствуют о присутствии элементов вторичной структуры белка, а интенсивные сигналы с низкой дисперсией предположительно соответствуют подвижной неструктурированной петле соединяющей два домена белка.

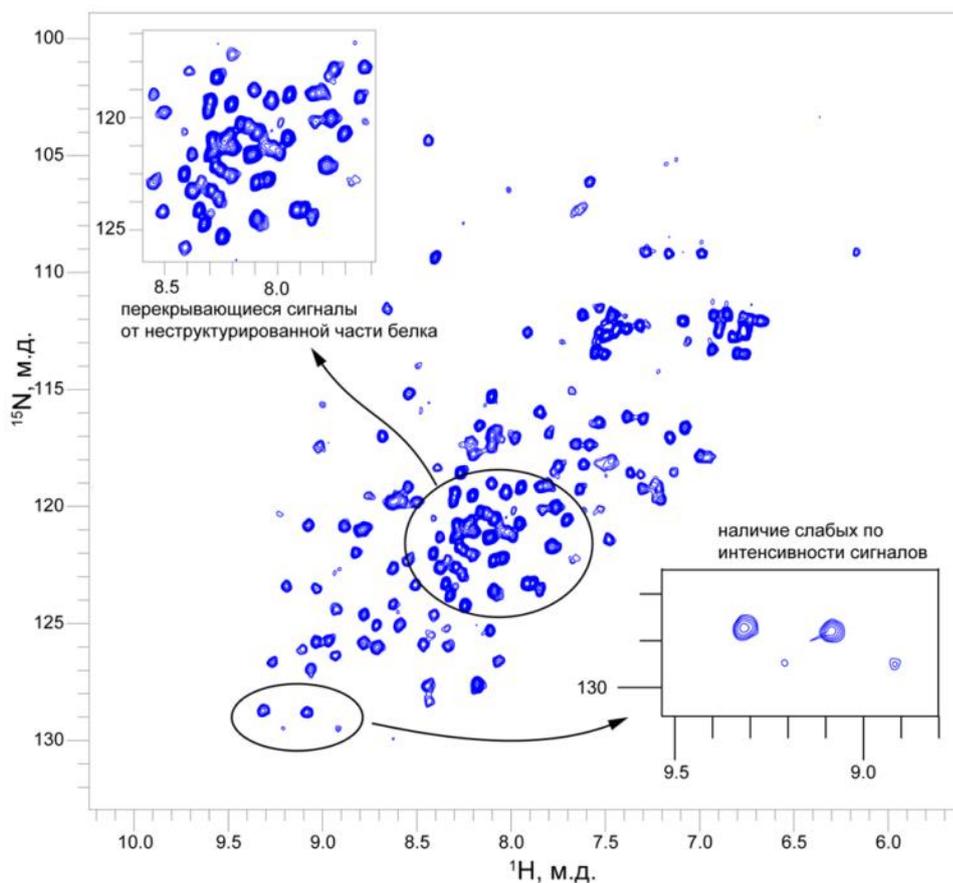


Рисунок 45. ^1H - ^{15}N HSQC-спектр ЯМР (700 МГц) белка *SaHPF*, меченого по изотопам $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$, (0,1 мМ) в фосфатном буфере с 250 мМ NH_4Cl , $T = 298$ К

Так как аминокислотная последовательность белка *SaHPF* состоит из 190 сигналов, то ожидалось такое же число кросс-пиков от амидных групп в спектре ^1H - ^{15}N HSQC, однако в эксперименте наблюдалось только около 130 сигналов. Полное отнесение сигналов в спектрах ЯМР на основе трехмерных экспериментов оказалось невозможным из-за отсутствия порядка 30% сигналов аминокислотных остатков и сильного перекрытия других сигналов. В результате были отнесены сигналы следующих аминокислотных остатков: 36–42, 49–54, 73–80, 107–114, 117–138, причем для остатков 107–114 и 117–138 наблюдались сигналы с высокой интенсивностью и меньшей дисперсией значений химических сдвигов по сравнению с остальными, что соответствует подвижной и неупорядоченной петле между доменами. Оказалось, что в спектрах ЯМР белка *SaHPF* не наблюдалось сигналов амидных протонов основной цепи для аминокислотных остатков С-концевого домена, который

имеет низкую гомологию с белком *EcRMF* из *E. coli* и отвечает за димеризацию рибосомы. Возможно данная часть белка у *S. aureus* менее конформационно подвижна и участвует в процессах комплексообразования или олигомеризации. Для поиска условий стабилизации подвижных участков структуры белка *SaHPF* были проанализированы спектры ЯМР в различных буферных условиях (трис-буфер; фосфатный буфер содержащий смесь аминокислот Arg и Glu (RE-буфер)) с варьированием концентрации соли NH_4Cl (150, 250, 500 мМ), рН (4,0, 7,6, 8,3) и температуры (от 15 °С до 35 °С) (Рис. 46).

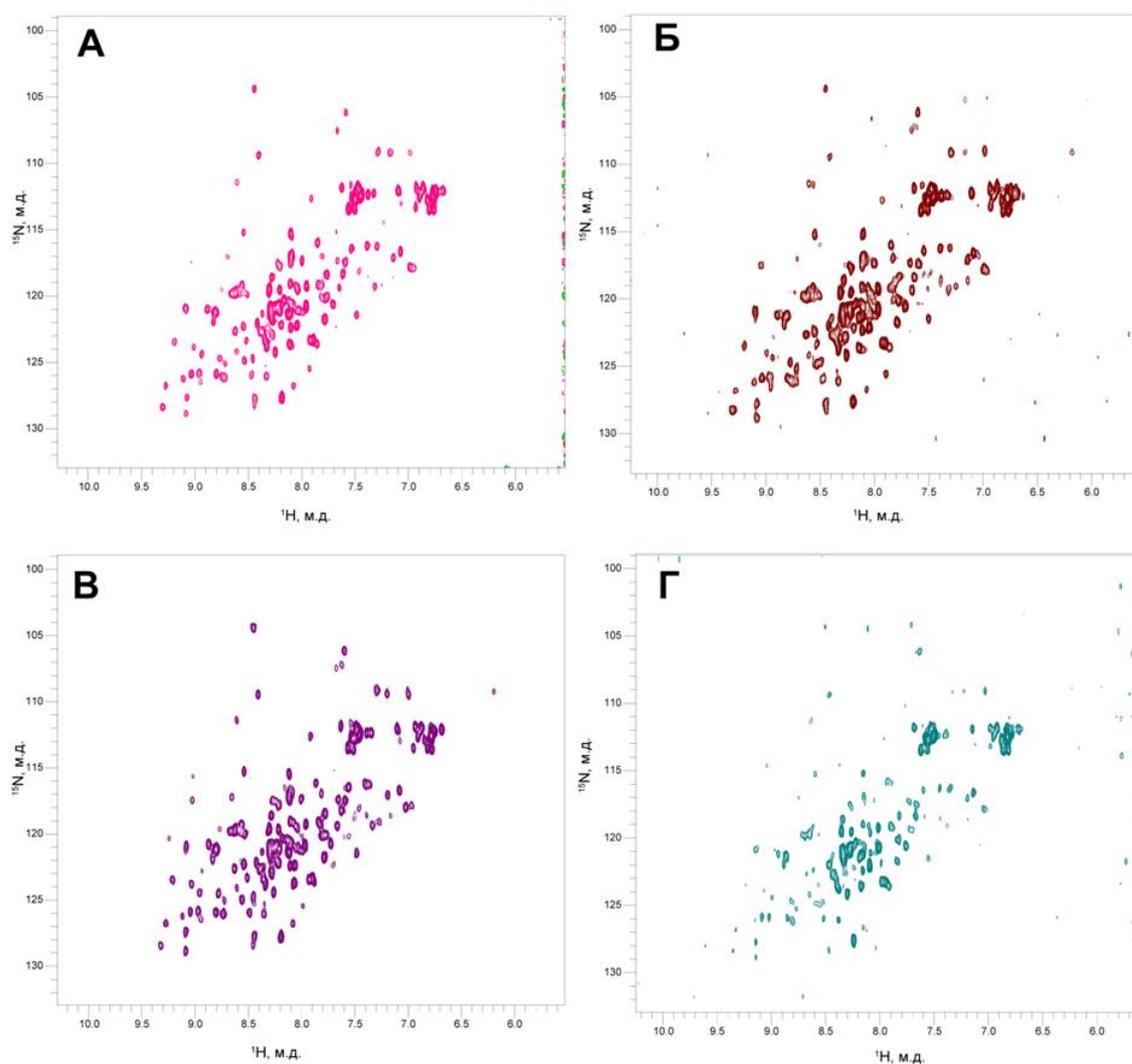


Рисунок 46. ^1H - ^{15}N HSQC-спектры ЯМР (700 МГц) белка *SaHPF*, меченого по изотопам $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$, (0.1 мМ) в трис-буфере с различной концентрацией соли NH_4Cl : а) 250 мМ; б) 150 мМ; в) 500 мМ; г) 250 мМ с 7 мМ детергента CHAPS, T = 298 К.

Для образца SaHPF в 50 мМ фосфатном буфере содержащем смесь аминокислот Arg и Glu (RE-буфер) при pH 7,6, 500 мМ NH₄Cl и 35 °C интенсивности сигналов амидных групп для различных участков белка отличались наименее сильно, тем не менее, сигналов от остатков C-концевого домена SaHPF по прежнему не наблюдалось. По этой причине нами было принято решение клонировать и выделять отдельные домены белка SaHPF для дальнейших структурных исследований методами спектроскопии ЯМР или РСА.

Структурные исследования N-концевого домена белка SaHPF методом спектроскопии ЯМР

Для получения информации о структуре N-концевого домена SaHPF методами спектроскопии ЯМР необходимо было получить данный белок с обогащением по изотопам ¹³C и ¹⁵N.

N-концевой домен белка SaHPF (SaHPF-NTD, а.о. 1-110) с гистидиновым тагом (шесть а.о. His) на C-конце экспрессировали в клетках *E. coli* в минимальной синтетической среде M9, содержащей обогащенные по изотопам ¹³C и ¹⁵N глюкозу и сульфат аммония. Полученный образец для исследований методом спектроскопии ЯМР содержал 1,62 мМ меченого по изотопам ¹³C и ¹⁵N белка в растворе фосфатного буфера (90% H₂O + 10% D₂O) с добавлением 200 мМ соли NH₄Cl, pH = 7,6 и температуре 308 К.

Параметры экспериментов ЯМР приведены в Разделе 2.1. Отнесение сигналов ядер ¹H, ¹³C, и ¹⁵N, для атомов основной и боковых цепей было получено для 108 из 110 аминокислотных остатков (98%) белка SaHPF-NTD. Данные о химических сдвигах ядер ¹H, ¹³C, ¹⁵N были депонированы в международную базу данных BMRB с кодом 27085 (<http://www.bmrb.wisc.edu/>). Спектр ЯМР ¹H-¹⁵N HSQC белка SaHPF-NTD приведен на рисунке 47. В дву- и трехмерных спектрах ЯМР не наблюдалось сигналов амидных протонов остатков Tyr47 и Ser48, что может объясняться наличием быстрого водородного обмена для данных остатков.

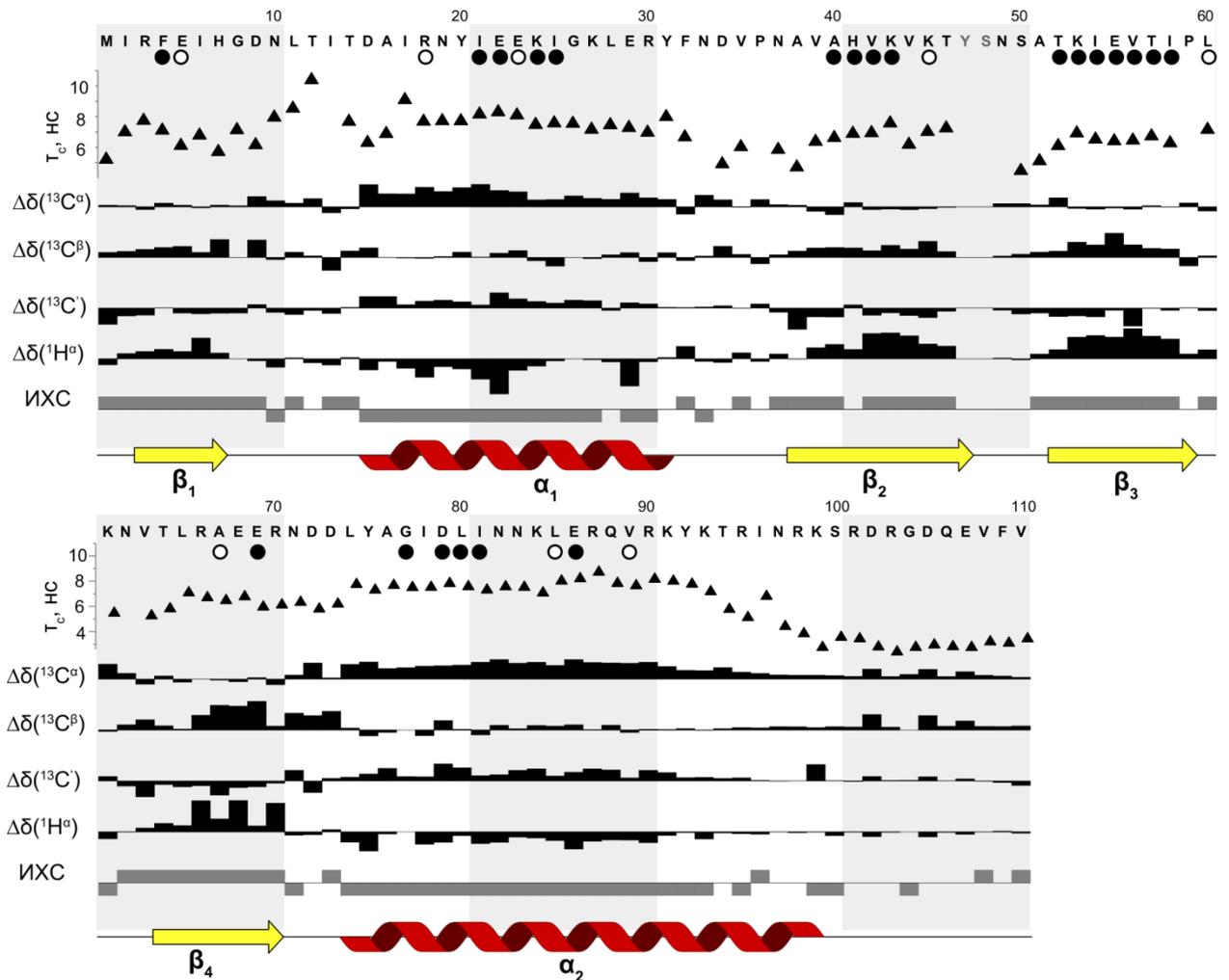


Рисунок 48. Индексы химического сдвига для аминокислотных остатков белка *SaHPF-NTD*. Величины времени корреляции молекулярного движения τ_c полученные по данным T_1/T_2 релаксации показаны треугольниками. Положение элементов вторичной структуры белка показаны спиралью для α -спирали и стрелками для бета-листов. Амидные протоны со средней и медленной скоростью обмена на дейтерий отмечены черными и белыми кругами соответственно.

Пространственная структура белка *SaHPF-NTD* была рассчитана методом симулированного отжига в программе ARIA [316] на основе экспериментально установленных значений химических сдвигов (двугранные углы), констант скорости обмена амидных протонов на дейтерий (водородные связи), и межъядерных ЯЭО контактов (рис. 49).



Рисунок 49. Межпротонные контакты ЯЭО и индексы химического сдвига для аминокислотных остатков белка *SaHPF-NTD*. Толщина линий ЯЭО контактов соответствует интенсивностям кросс-пигов в спектрах NOESY.

Информация о структурных ограничениях, полученных из анализа спектров ЯМР приведена в Таблице 3.2. Было рассчитано 500 структур белка, из которых в дальнейшем были отобраны 10 с наименьшей энергией. Структура N-концевого домена белка *SaHPF* приведена на Рисунке 50. Данные депонированы в международную базу данных PDB с кодом 6QBZ (<https://www.rcsb.org/>).

Таблица 3.2. Набор пространственных ограничений, использовавшихся для расчёта структуры белка *SaHPF-NTD*.

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)	$0,60 \pm 0,1 \text{ \AA}$

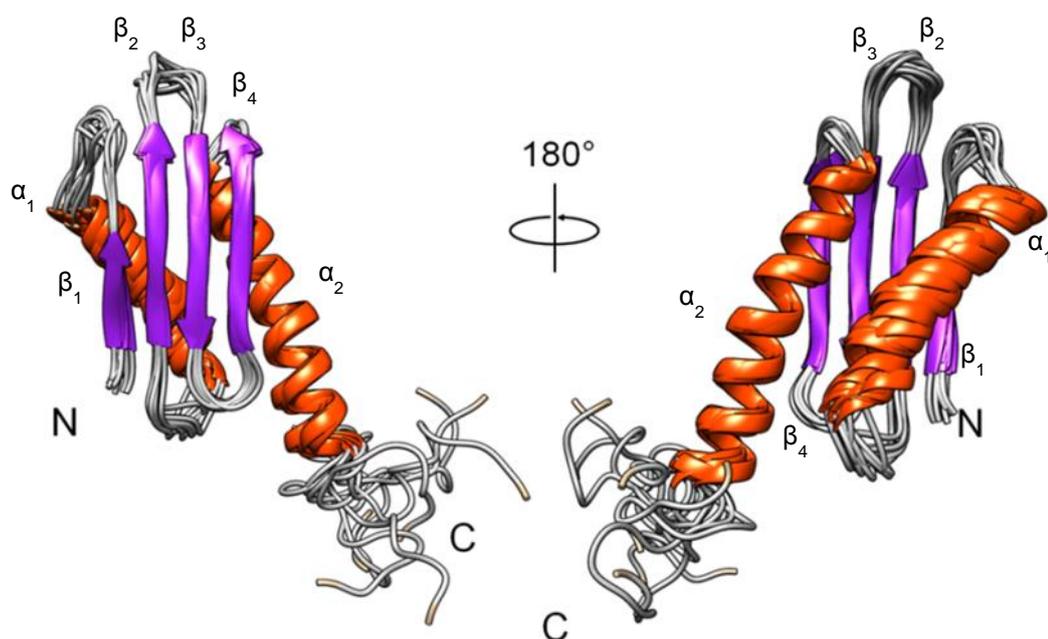


Рисунок 50. Структура SaHPF-NTD полученная методом спектроскопии ЯМР (PDB ID: 6QBZ). Представлен ансамбль из 10 структур.

Таким образом, методом спектроскопии ЯМР высокого разрешения было показано, что структура N-концевого домена белка SaHPF состоит из двух α -спиралей и четырех β -листов (топология β_1 - α_1 - β_2 - β_3 - β_4 - α_2). Полученные данные позволили в дальнейшем использовать структурную информацию для интерпретации карт электронной плотности в структуре комплекса рибосомы *S. aureus* с белком SaHPF полученных методом криоэлектронной микроскопии, а также идентифицировать аминокислотные остатки, взаимодействующие с рибосомой по данным спектроскопии ЯМР.

Структурные исследования С-концевого домена белка SaHPF методом спектроскопии ЯМР

Для получения информации о структуре С-концевого домена SaHPF методами спектроскопии ЯМР необходимо было получить данный белок с обогащением по изотопам ^{13}C и ^{15}N .

С-концевой домен белка SaHPF (SaHPF-CTD, а.о. 130-190) с гистидиновым тагом (шесть а.о. His) на С-конце экспрессировали в клетках *E. coli* в минимальной синтетической среде M9, содержащей обогащенные по изотопам ^{13}C и ^{15}N глюкозу и сульфат аммония. Образец для экспериментов

спирали и четырех β -тяжей (топология $\beta 1$ - $\alpha 1$ - $\beta 2$ - $\beta 3$ - $\beta 4$), таким образом, что спираль $\alpha 1$ состоит из остатков 146-156, бета-лист состоит из бета-тяжей (остатки 133-135), $\beta 2$ (остатки 160-164), $\beta 3$ (остатки 171-175), и $\beta 4$ (остатки 182-187) (Рис. 52). В дву- и трехмерных спектрах ЯМР не наблюдалось сигналов амидных протонов остатков Lys137 и Lys178, расположенных в петлях между $\beta 1$ -тяжем и альфа спиралью $\alpha 1$ и между бета-тяжами $\beta 3$ и $\beta 4$. Отсутствие данных сигналов в спектрах может объясняться наличием быстрого водородного обмена для данных остатков.

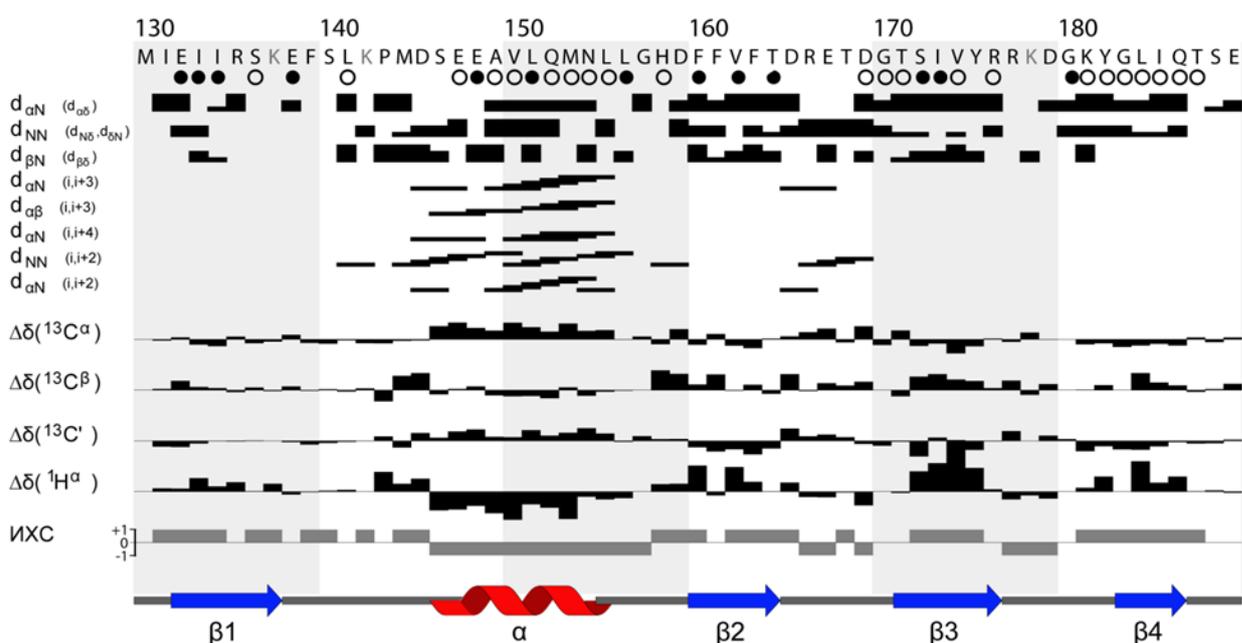


Рисунок 52. Межпротонные контакты ЯЭО и индексы химического сдвига для аминокислотных остатков белка *SaHPF-CTD*. Толщина линий ЯЭО контактов соответствует интенсивностям кросс-пиков в спектрах NOESY. Положение элементов вторичной структуры белка показаны спиралью для α -спирали и стрелками для бета-листов. Амидные протоны со средней и медленной скоростью обмена на дейтерий отмечены черными и белыми кругами соответственно.

Среднее значение времени вращательной корреляции τ_c для амидных групп основной цепи белка *SaHPF-CTD* составляло $8,20 \pm 0,7$ нс (Рис. 53), в то время как для белка длиной 60 а.о. при 35°C данный параметр составляет 3,8 нс, это позволяет предположить, что *SaHPF-CTD* присутствует в растворе в виде гомодимера [6].

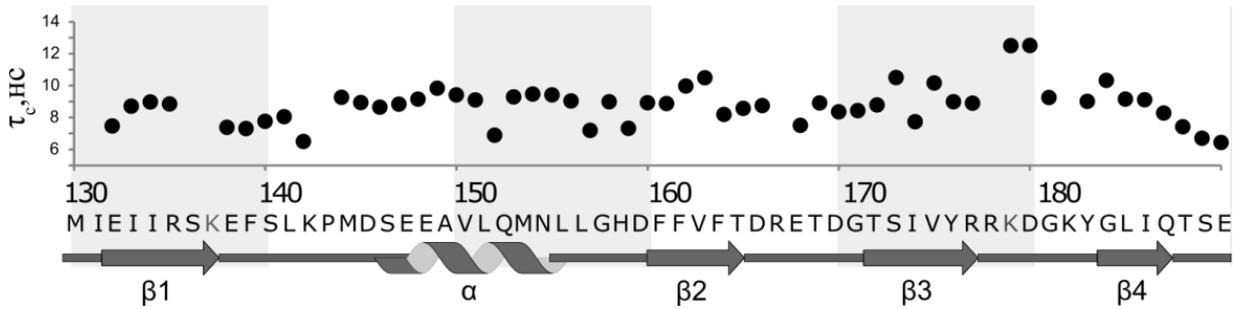


Рисунок 53. Величины времени корреляции молекулярного движения τ_c , полученные по данным T_1/T_2 релаксации. Снизу показано положение элементов вторичной структуры.

Для подтверждения данного предположения были использованы ЯМР эксперименты с изотопной фильтрацией (см. раздел 2.1.): $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ - $^{12}\text{C}/^{14}\text{N}$ NOESY-HSQC. В данных экспериментах за счет выбора пути переноса намагниченности в спектрах ЯМР наблюдаются межмолекулярные ЯЭО контакты между протонами связанными химическими связями с ядрами $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ одной молекулы и между протонами связанными химическими связями с ядрами $^{12}\text{C}/^{14}\text{N}$ другой молекулы. Для данного эксперимента белок *Sa*HPF-CTD, меченный по изотопам $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$, смешивался с эквимольным количеством белка *Sa*HPF-CTD с природным содержанием изотопов, и полученную смесь белков инкубировали при 37° в течение 2 часов. После чего производилась регистрация спектров NOESY. В полученных спектрах наблюдались ЯЭО контакты между протонами ароматических аминокислотных остатков (Phe160 и Tyr175) и гидрофобных аминокислотных остатков (Thr164, Thr171, Ile173), что позволило определить положение интерфейса димера между двумя β -складками. Были установлены следующие ЯЭО контакты стабилизирующие структуру димера: (1) между протонами γ -метильной группы и δ -метильной группы Ile173; (2) между протонами ароматического кольца Phe160 и протонами δ -метильной группы Ile173; (3) между протонами ароматического кольца Phe160 и протонами β -метильной группы Tyr175; и (4) между протонами ароматических колец остатков Phe160 из различных молекул в составе димера (π -стекинг взаимодействие) (Рис 54).

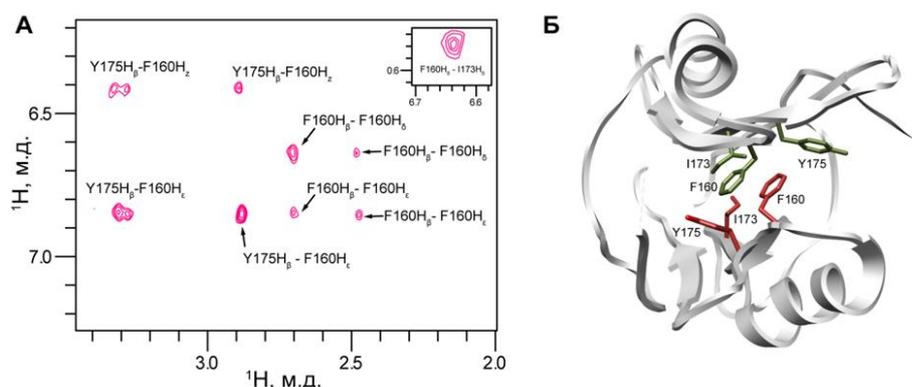


Рисунок 54. Спектр ЯМР $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ - $^{12}\text{C}/^{14}\text{N}$ NOESY-HSQC (А) и аминокислотные остатки, стабилизирующие димер белка *SaHPF*-CTD (Б).

Пространственная структура белка *SaHPF*-CTD была рассчитана методом симулированного отжига в программе ARIA [316] на основе экспериментально установленных значений химических сдвигов (двугранные углы), констант скорости обмена амидных протонов на дейтерий (водородные связи), и межъядерных ЯЭО контактов (Рис. 54).

Информация о структурных ограничениях, полученных из анализа спектров ЯМР, приведена в таблице 3.3. Было рассчитано 500 структур белка, из которых в дальнейшем были отобраны 10 с наименьшей энергией. Структура С-концевого домена белка *SaHPF* приведена на рисунке 55. Данные депонированы в международную базу данных PDB с кодом 5NKO (<https://www.rcsb.org/>).

Таблица 3.3. Набор пространственных ограничений, использовавшихся для расчёта структуры белка *SaHPF*-CTD.

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 ± 0.2 Å

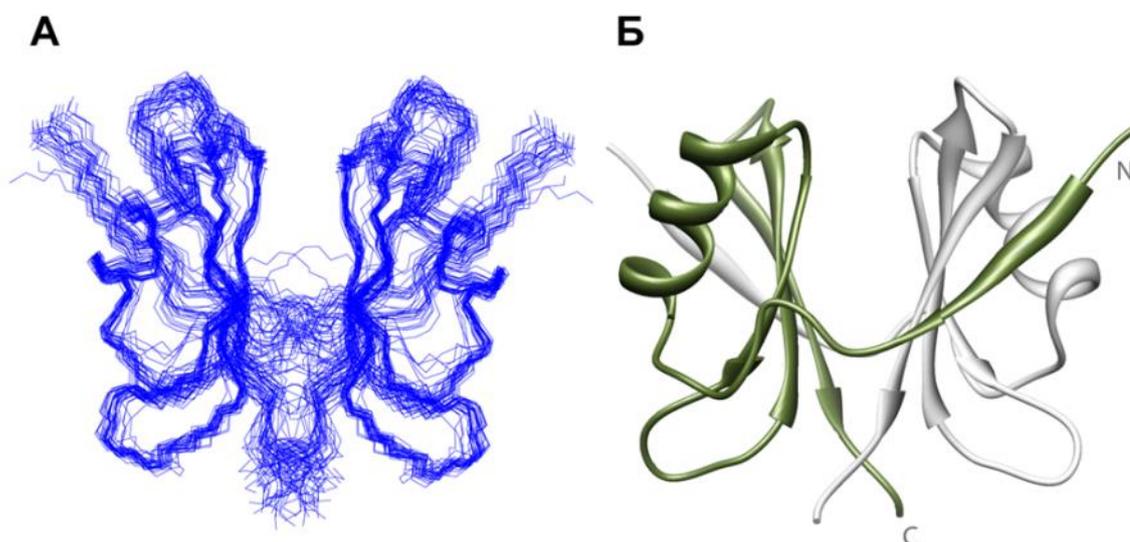


Рисунок 55. Структура SaHPF-CTD полученная методом спектроскопии ЯМР (PDB ID: 5NKO). Представлен ансамбль из 10 структур (А) и репрезентативная модель (Б).

Таким образом, методом спектроскопии ЯМР высокого разрешения было показано, что структура С-концевого домена белка SaHPF состоит из одной α -спирали и четырех β -листов (топология $\beta 1$ - $\alpha 1$ - $\beta 2$ - $\beta 3$ - $\beta 4$), а также, что С-концевой домен белка SaHPF присутствует в растворе в виде гомодимера. Взаимодействие молекул в димере белка идет за счет водородных связей в области бета-листа ($\beta 1$ -тяж из одной молекулы связывается с $\beta 2$ -тяжем второй молекулы), а также за счет парных взаимодействий остатков боковых групп Thr171-Thr187, Ile173-Val162 (гидрофобное взаимодействие), Phe160-Tyr175, Phe160-Phe160 (стекинг взаимодействие).

Наличие механизма димеризации С-концевого домена белка SaHPF объясняет неудачу с установлением структуры полного белка SaHPF методом спектроскопии ЯМР высокого разрешения, так как в структуре целевого белка присутствует фолдированная часть в виде димеров С-концевого домена и подвижная часть белка в виде линкера и N-концевого домена.

Структурные исследования С-концевого домена белка SaHPF методом кристаллографии

Для подтверждения данных спектроскопии ЯМР высокого разрешения и получения более детальной структурной информации о димеризации С-концевого домена белка SaHPF мы использовали метод рентгеноструктурного анализа. Белок SaHPF-CTD (10 мг/мл) был закристаллизован методом диффузии водяных паров. Монокристаллы SaHPF-CTD (Рис. 56), пригодные для рентгеноструктурного анализа, были получены в следующих условиях: 0,15 М лимонная кислота pH = 4,0, 24% полиэтиленгликоль (6000).

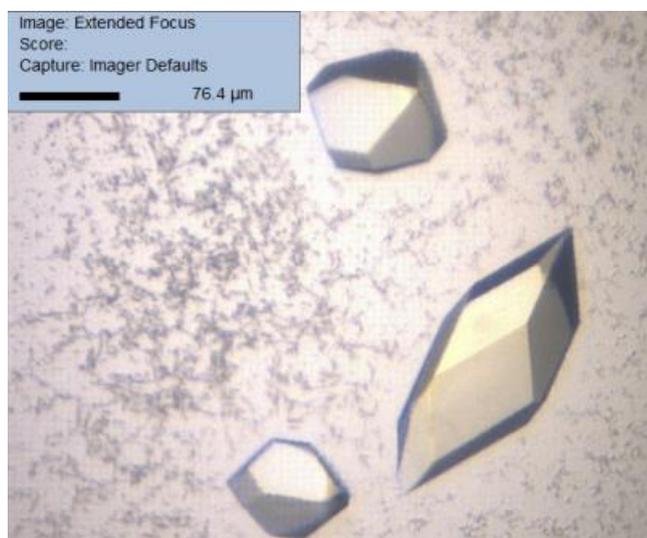


Рисунок 56. Кристаллы белка SaHPF-CTD.

Эксперименты по рентгеноструктурному анализу проводились на линии Proxima1 синхротрона Soleil (Франция). Регистрация дифракционных данных производилась с помощью детектора PILATUS 6M при длине волны 1.0 Å. Расстояние от образца до детектора составляло 0.2367 м. Дифракционные изображения первоначально обрабатывали в программе XDS, осуществляли поиск дифракционных максимумов hkl , определяли сингонию и параметры элементарной ячейки кристаллов. На этапе интегрирования определяли интегральную интенсивность дифракционных максимумов на дифрактограммах. Модули структурных факторов определяли на этапе шкалирования и приводили интенсивности к абсолютной шкале.

Определение фаз структурных факторов проводилось с помощью метода молекулярного замещения в программе Phaser [320]. В качестве начальной модели использовалась структура белка-гомолога Lmo2511 из *Listeria monocytogenes*, 2.4 Å (PDB ID: 3K2T) из базы данных PDB. Модель строилась и корректировалась вручную в программе COOT [322].

Полученная с разрешением 1,6 Å структура белка представляла собой димер состоящий из двух цепей С-концевого домена белка SaHPF длиной 59 а.о. каждая (Рис. 57). Данные депонированы в международную базу данных PDB с кодом 5OOX (<https://www.rcsb.org/>). Информация о кристаллографических данных приведена в таблице 3.4. Два аминокислотных остатка Glu¹⁸⁹ и Gln¹⁹⁰ не наблюдалось из-за их высокой подвижности.

Таблица 3.4. Кристаллографические данные, параметры съемки кристаллов SaHPF- STD (PDB ID: 5OOX). Сбор данных производился при 100 К.

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 не водородных 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

Также как и в структуре полученной методом спектроскопии ЯМР С-концевой домен белка *SaHPF* имел топологию β_1 - α - β_2 - β_3 - β_4 (тяж β_1 – а.о. 132–134; α -спираль – а.о. 146–156; тяж β_2 – а.о. 159–164; тяж β_3 – а.о. 169–176; тяж β_4 – а.о. 181–187). Среднеквадратичное отклонение между структурами определенными методом спектроскопии ЯМР и кристаллографии составляло $1,20 \pm 0,2$ Å. Структура димера стабилизируется за счет консервативного гидрофобного участка располагающегося между двумя β -складками (Рис. 57). Также тяж β_1 каждой из молекул мономера участвует в образовании β -складки в структуре другой молекулы димера. Следующие контакты между аминокислотными остатками стабилизируют структуру димера: Thr¹⁷¹-Thr¹⁸⁷ (2,7 Å) – водородная связь, Ile¹⁷³-Val¹⁶² (3,7 Å) – гидрофобное взаимодействие, Phe¹⁶⁰-Tyr¹⁷⁵ (3,5 Å между цепями А и В), Phe¹⁶⁰-Phe¹⁶⁰ – π -стекинг взаимодействие. (Рис. 58).

Основное различие между структурами определенными методом спектроскопии ЯМР и кристаллографии наблюдалось в области тяжа β_1 (Рис. 57). В структуре определенной методом ЯМР данный участок был более компактным, и повернут за счет образования водородных связей между Leu184 из тяжа β_4 и Ile134 из тяжа β_1 .

Полученные данные о структуре С-концевого домена белка *SaHPF* позволили нам перейти к реконструкции структуры 100S рибосомы *S. aureus* методом крио-ЭМ.

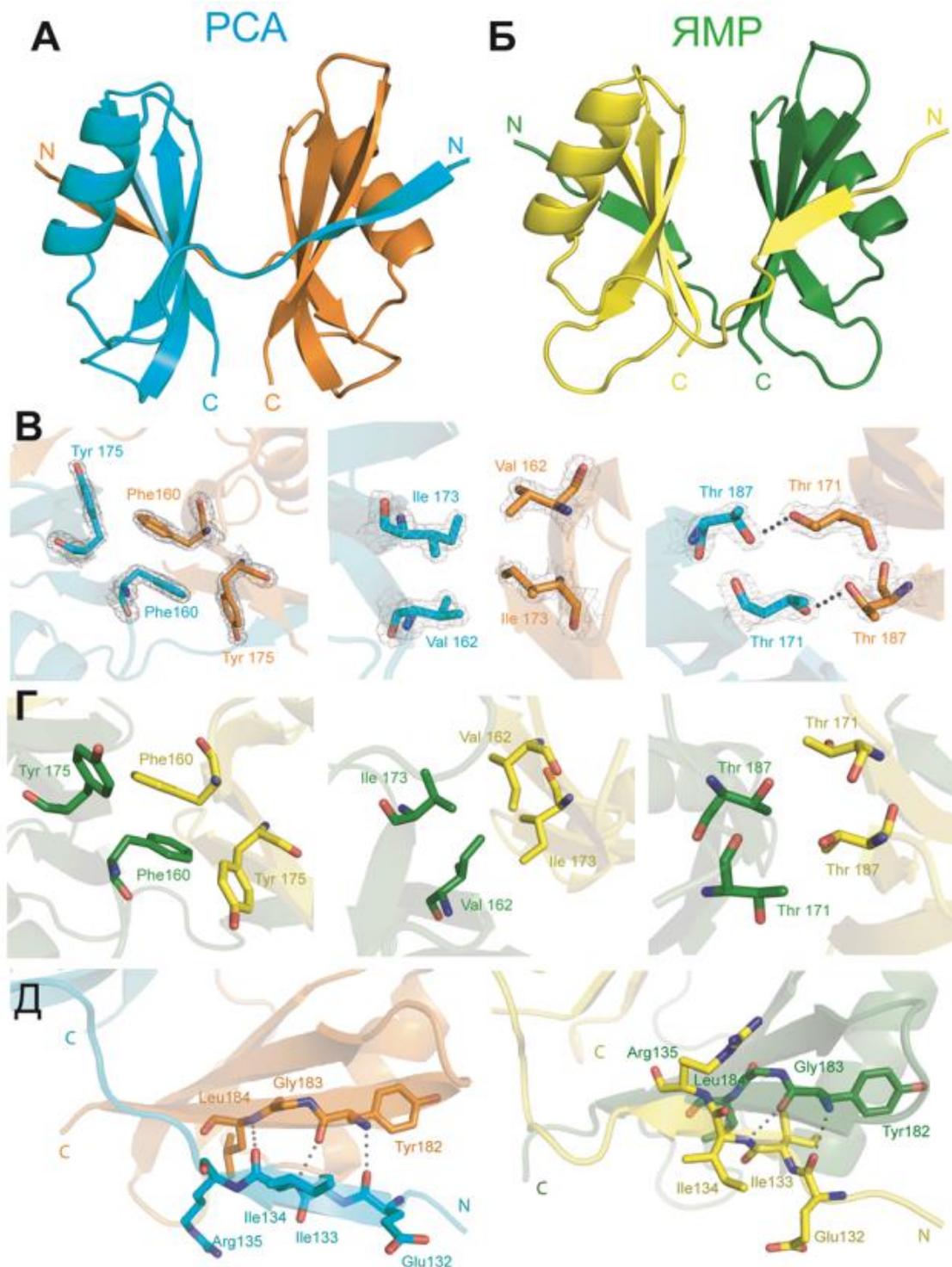


Рисунок 57. Сравнение структур С-концевого домена белка *SaHPF-CTD*, полученных методом кристаллографии (А) и спектроскопии ЯМР (Б). Боковые цепи аминокислотных остатков, стабилизирующие структуру димера белка показаны голубым (мономер 1) и оранжевым (мономер 2) для кристаллографической структуры (В) (PDB ID: 5O0X), зеленым (мономер 1) и желтым (мономер 2) в структуре определенной методом спектроскопии ЯМР (Г) (PDB ID: 5NKO). Пунктиром показаны межмолекулярные водородные связи. В структуре определенной методом ЯМР участок бета-тяжа $\beta 1$ был более компактным, и повернут за счет образования водородных связей между Leu184 из тяжа $\beta 4$ и Ile134 из тяжа $\beta 1$ (Д).

4.2. Реконструкция *in vitro* 100S рибосом *S. aureus*

70S рибосомы *S. aureus* получали из штамма *S. aureus* RN6390 и очищали методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы (Рис. 58а). Белок *Sa*HPF с гистидиновым тагом экспрессировали в клетках *E. coli* и очищали методом металлохелатной аффинной хроматографии на сорбенте с Ni^{2+} -агарозой и эксклюзионной хроматографии. Результаты выделения белков представлены на рисунке 58. На хроматограмме наблюдалось два пика, которые оба содержали *Sa*HPF в димерной форме, что подтверждалось методом электрофоретического разделения белков в ПААГ в нативных условиях (Рис. 58). Для второго пика с белком *Sa*HPF наблюдалось большее поглощение на длине волны 260 нм и данный белок обладал большей способностью к димеризации рибосом (Рис. 58 а-д). Наибольшую способность к образованию 100S рибосом обладали фракции белка *Sa*HPF с максимальным поглощением на длине волны 260 нм (соотношение A_{260}/A_{280} равнялось 2:1). Полученные таким образом 100S димеры рибосом очищали с помощью серии ультрацентрифугирований в градиенте плотности сахарозы (Рис. 59). С помощью диализа 100S димеров рибосом из раствора с 50 мМ KCl в раствор с 500 мМ KCl, диализом в обратном направлении в раствор с 60 мМ KCl, и последующей очисткой методом ультрацентрифугирования было показано, что процесс образования 100S димеров рибосом обратимый (Рис. 59 в). Стабильность полученных 100S димеров рибосом проверяли путем однократного замораживания и оттаивания образца (от -80°C до 4°C), и последующего аналитического ультрацентрифугирования. Протокол выделения 100S рибосом *S. aureus* был разработан в нашей группе и более подробно описан в диссертации Аюпова Рустама Хасановича [319]. В результате наблюдалось, что более 90% рибосом оставались в форме 100S димеров (Рис. 59 г). Таким образом, было показано, что комплекс 100S рибосом *S. aureus*, полученный путем реконструкции *in vitro* из индивидуальных 70S рибосом и белка *Sa*HPF, стабилен и пригоден для структурных исследований.

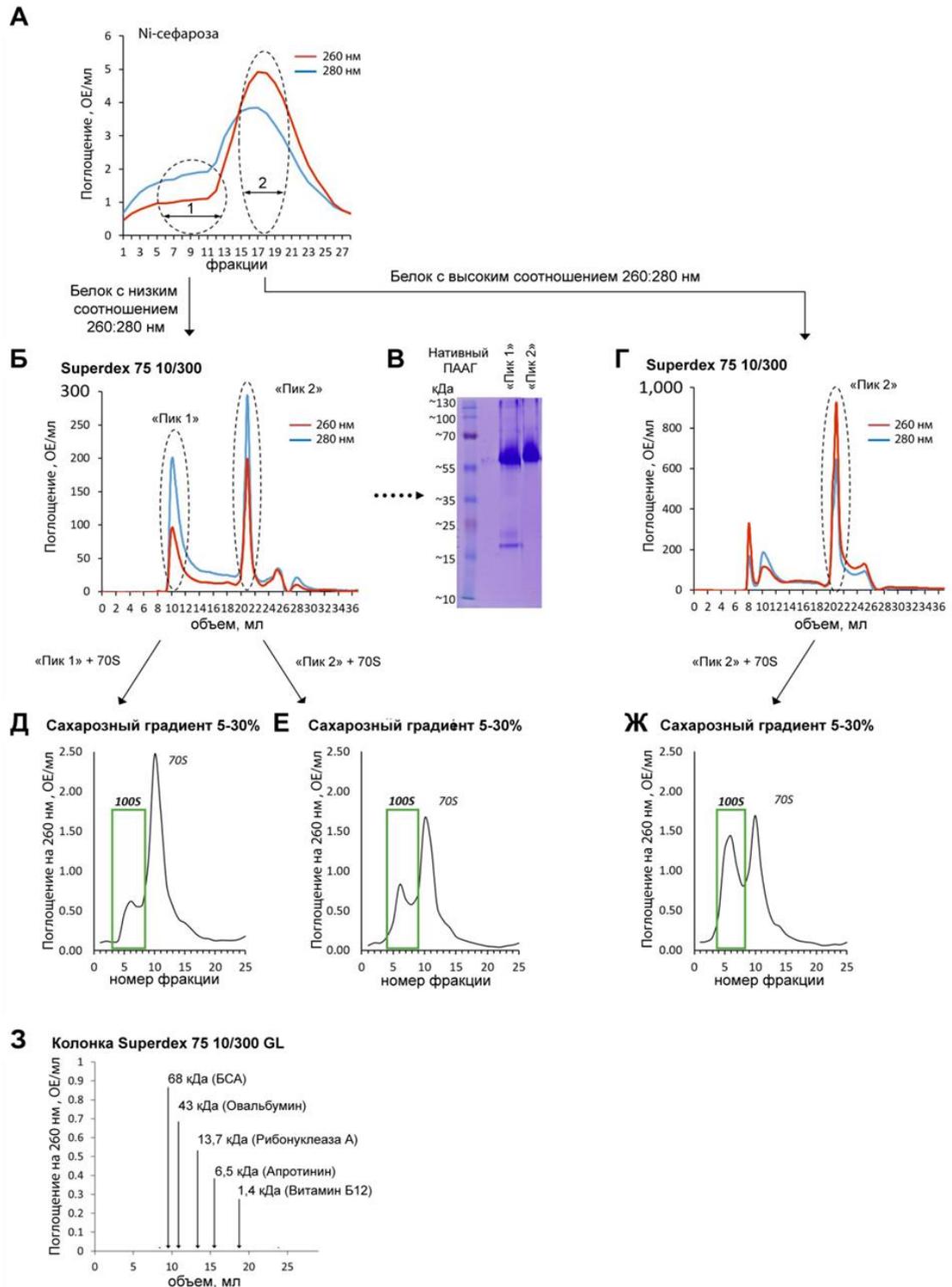


Рисунок 58. Этапы получения и очистки активного белка SaHPF. (А) Профиль элюирования SaHPF после металлохелатной аффинной хроматографии на Ni-NTA сефарозе. В результате отбирались 2 фракции: 1 - с большим поглощением на длине волны 280 нм, 2 - с большим поглощением на длине волны 260 нм. Каждая из фракций очищалась методом эксклюзионной хроматографии. **(Б)** В профиле эксклюзионной хроматографии фракции 1 наблюдалось два пика содержащих белок SaHPF: «Пик 1» принадлежит белку SaHPF в димерной форме; «Пик 2» соответствовал фракции с большим поглощением на 260 нм и элюировался

примерно после одного объема колонки (возможно вследствие взаимодействия с сорбентом). (В) Нативный ПААГ образцов соответствующих пикам 1 и 2 из фракции 1. Оба пика содержали SaHPF в димерной форме (~ 55 кДа). (Г, Д) Согласно данным ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы белок соответствующий «пику 2» обладал большей способностью к димеризации рибосом. (Е) В профиле эксклюзионной хроматографии фракции 2 «пик 1» был менее интенсивным и «пик 2» обладал большим поглощением на длине волны 260 нм. Пик 2 отбирался и использовался для формирования димеров рибосом. (Ж) Данные ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы образца соответствующего пику 2 из фракции 2. (З) Калибровочная кривая колонки Superdex 75 10/300 GL согласно данным производителя.

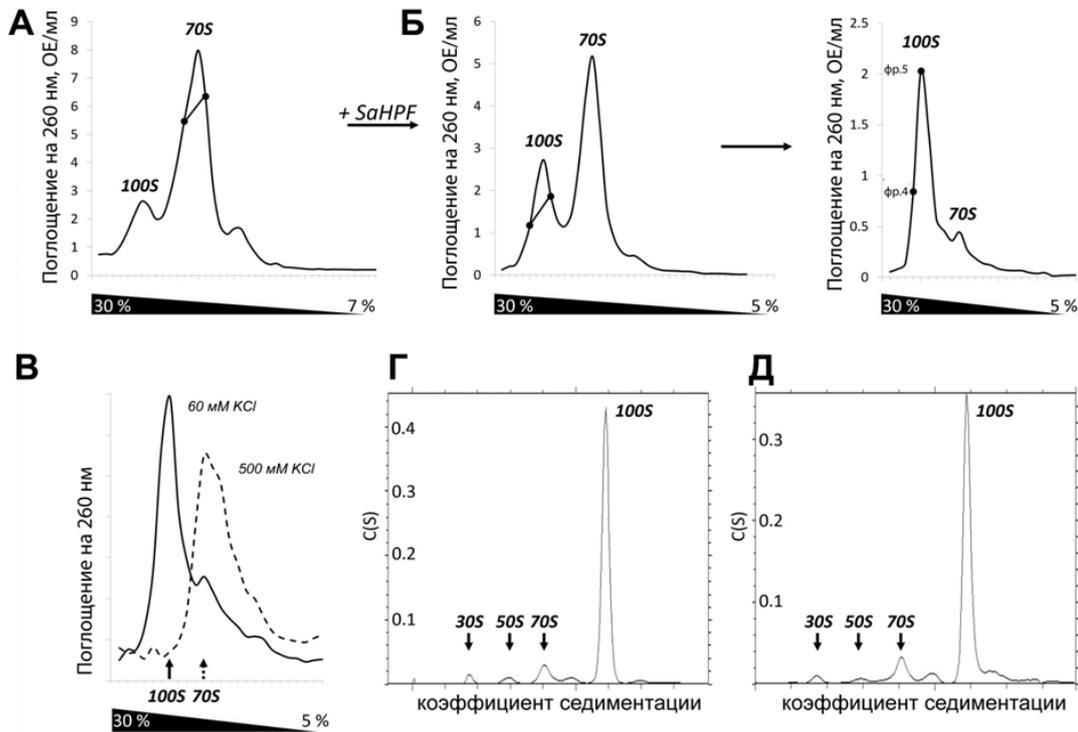


Рисунок 59. Выделение и очистка 100S рибосом *S. aureus*. (А) Данные ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы 70S и 100S рибосом. (Б) увеличение количества 100S рибосом образовавшихся в результате добавления SaHPF во фракции с 70S рибосомами. Затем отбирались фракции с 100S димерами и производили их повторную очистку методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы (правая панель). Фракции 4 и 5 использовались в дальнейшем для анализа методом крио-ЭМ. (В) Показана стабильность 100S димеров при низкой ионной силе раствора. Показаны данные ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы в тех же условиях, что и в (Б). (Г, Д) 100S димеры не разрушаются при замораживании. На рисунке (Г) показаны данные аналитического ультрацентрифугирования образца, который хранили при 4 °С, на рисунке (Д) – данные для образца подвергнутого циклу заморозки при -80 °С и разморозки при 4 °С.

4.3. Структурные исследования 100S димеров рибосом *S. aureus* методом криоэлектронной микроскопии

На фотографиях крио-ЭМ наблюдалось два типа частиц соответствующих мономерам и димерам рибосом. Первоначально для получения изображения 100S рибосом с субатомарным разрешением и для понимания устройства димера, мы обработали один и тот же набор крио-ЭМ изображений двумя различными способами. Первый – когда мы выбирали достаточно большой размер ячейки при обработке изображений, в которой производился поиск и классификация частиц. На этом этапе были получены двумерные проекции димеров рибосом, для которых одну половину димера удалось реконструировать с высоким разрешением и вторую с низким, вследствие наличия вращения частей молекулы друг относительно друга (Рис. 60).

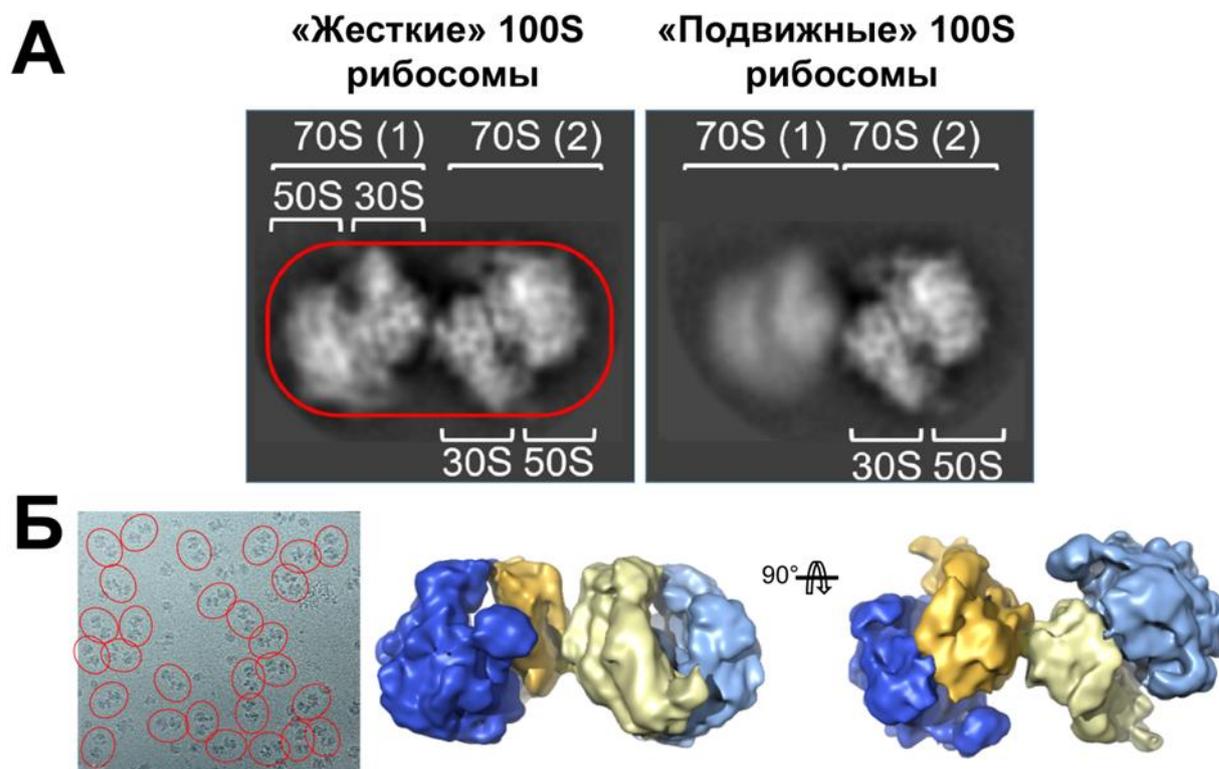


Рисунок 60. Структура 100S рибосом *S. aureus* с разрешением 9 Å определенная методом крио-ЭМ (А). На рисунке (Б) слева овалами выделены димерные частицы рибосом.

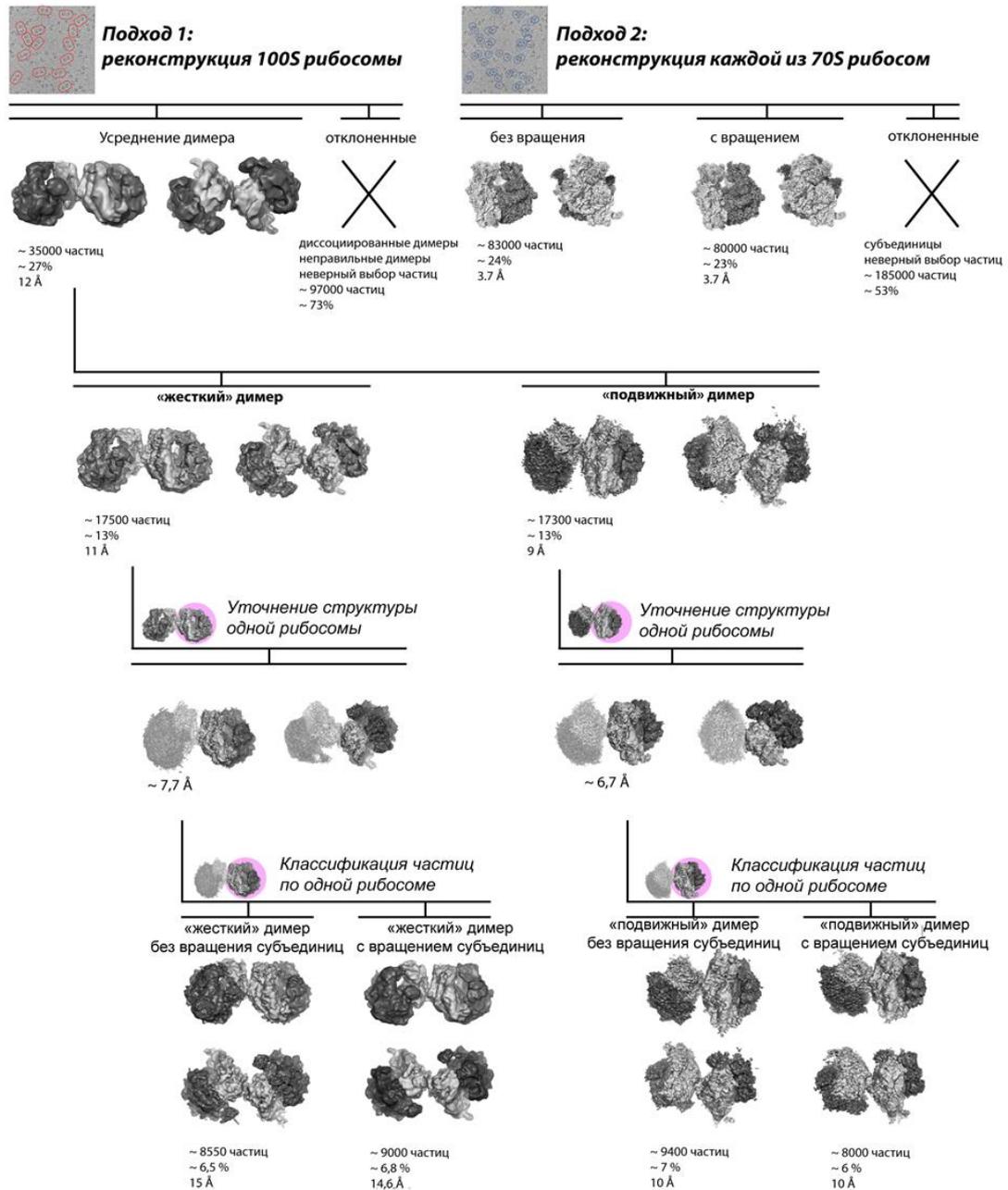


Рисунок 61. Классификация рибосомных частиц в димере. Подход 1: классификация частиц как димеров рибосом. Подход 2: классификация индивидуальных 70S рибосом в составе димера. Указано количество частиц используемых для усреднения, процент от общего количества частиц и разрешение полученных структур.

Обработанные изображения частиц разделяли на две категории «жесткие» и «подвижные» димеры рибосом (Рисунок 60). Для «жестких» димеров реконструкция структуры 70S рибосом давала более высокое разрешение, чем для «подвижных» димеров (Рисунок 61). Для обеих групп частиц («жестких» и «подвижных» димеров рибосом) наблюдалось три типа

димеров рибосом, которые включали либо только рибосомы в не повернутом друг относительно друга состоянии, либо только в повернутом состоянии, либо их комбинацию (Рисунки 60 и 61). После обработки крио-ЭМ изображений обеих групп частиц («жестких» и «подвижных» димеров рибосом) были получены карты электронной плотности с разрешением 11 Å и 9 Å соответственно при ОКФ = 0,143 (ОКФ - объемная корреляция Фурье, в англоязычной литературе *fourier shell correlation* или FSC)). В каждом димере область контакта наблюдалась как непрерывная электронная плотность, располагающаяся рядом с боковой лопастью («платформой») и «телом» 30S частицы. В структуре «подвижных» димеров рибосом наблюдался только один контакт между частицами, в то время как для «жестких» наблюдалось два контакта.

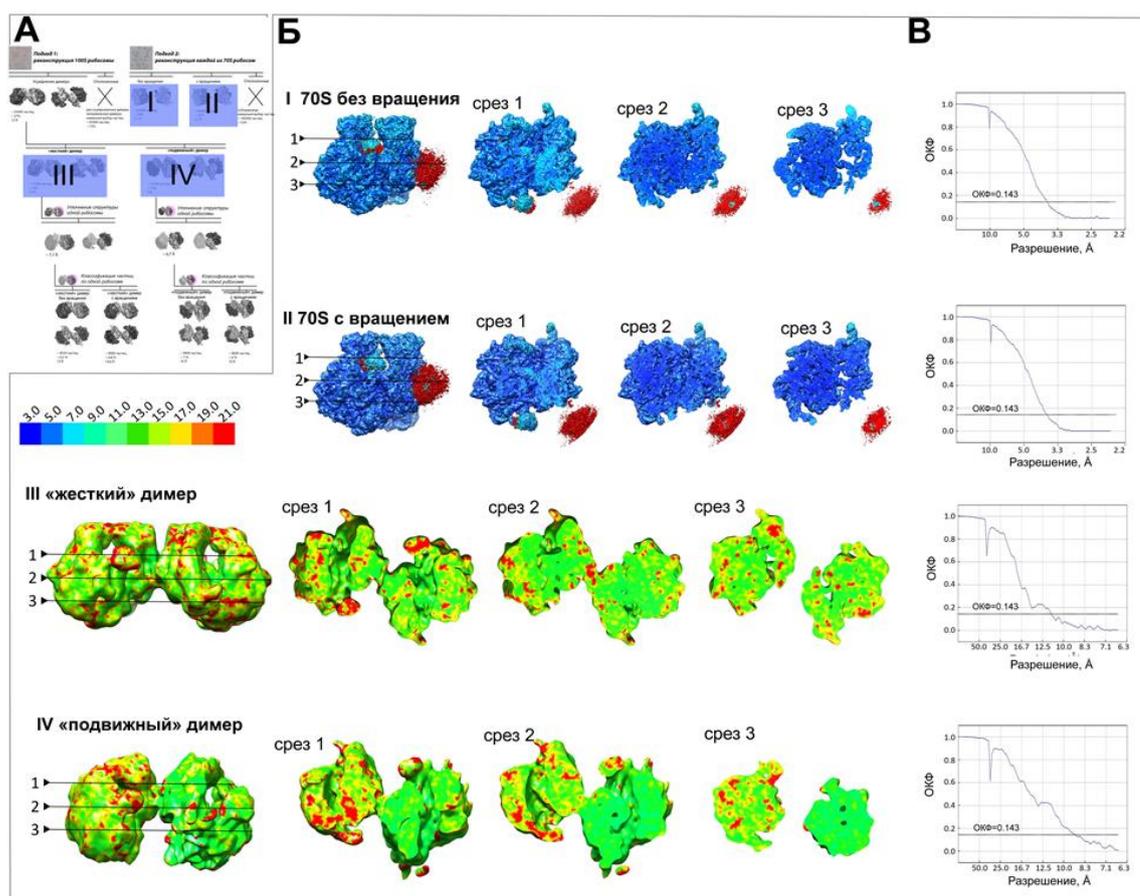


Рисунок 62. Оценка локального разрешения карт электронной плотности по данным крио-ЭМ. (А) Уменьшенное изображение схемы классификации частиц (рис. 61) с выделением этапов используемых для оценки локального разрешения (I-IV) (Б). (В) Зависимость ОКФ от разрешения.

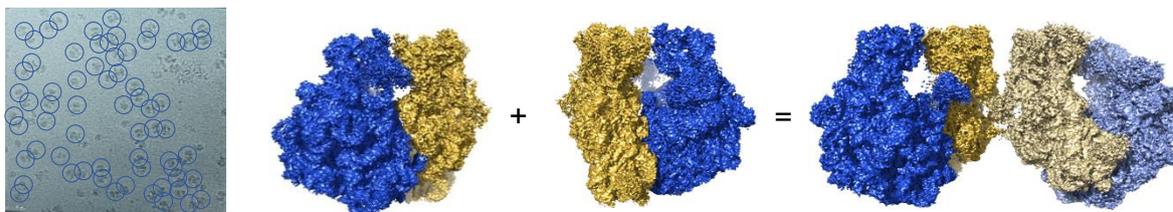


Рисунок 63. Структура 100S рибосом *S. aureus* с разрешением 3,7 Å определенная методом крио-ЭМ.

Второй подход, использованный нами для реконструкции крио-ЭМ изображений, заключался в реконструкции электронной плотности всех 70S рибосом по отдельности, не принимая во внимание, находятся ли они в свободном состоянии (70S) или в димерной форме (100S) (Рис. 63). В данном подходе мы также оставили большой размер ячейки с тем, чтобы при поиске и классификации частиц в область также попадали части соседних рибосом из димера, что позволяло идентифицировать области контакта внутри димеров рибосом. В результате классификации трехмерных изображений частиц получили равное распределение рибосом с вращением и без вращения субъединиц, которые были связаны с белком *SaHNF* (Рис. 63). Благодаря данному подходу удалось получить структуру 70S рибосом с высоким разрешением в составе 100S димера (3,7 Å при ОКФ = 0,143; Рис. 61 и 62, Таблица 3.5.). Кроме того, чтобы более детально интерпретировать структуру 100S рибосом, полученную с разрешением 11 Å, структуру с разрешением 3,7 Å 70S рибосомы вписывали в электронную плотность в структуре димера, используя в качестве эталона для выравнивания электронную плотность тела малой субъединицы и соседних 70S рибосом. Данная структура использовалась впоследствии для реконструкции структуры 100S рибосом с высоким разрешением. После интерпретации карт электронной плотности и определения положения рибосомных компонент в структуре 100S рибосом необходимо было интерпретировать дополнительную плотность белка *SaHNF*. Для этого нами были использованы полученные данные о структуре белка *SaHNF* методами спектроскопии ЯМР и РСА. Данные депонированы в международную базу данных PDB с кодами 5ND8, 5ND9 (<https://www.rcsb.org/>).

Таблица 3.5. Данные крио-ЭМ 100S рибосом *S. aureus*, параметры эксперимента и статистические характеристики уточнения структур.

Сбор данных	
Микроскоп	Titan Krios S-FEG
Камера	CMOS (Falcon II)
Напряжение (кВ)	300
Увеличение	59,000 X
Размер пикселя (Å/пиксель)	1,10
Диапазон дефокусировки (мкм)	(-4,5) – (-0,6)
Суммарная доза облучения ($\bar{\epsilon}/\text{Å}^2$)	60
Доза на кадр	~ 3,5
Уточнение структуры	
	«подвижный»; «жесткий» димер / мономер без вращения, с вращением субъединиц
Общее число частиц	132,000 / 348,000
Число частиц, используемое для 3D реконструкции	17,500; 17,300 / 83,000; 80,000
Разрешение (Å; ОКФ = 0.143)	11,0; 9,0 / 3,7; 3,7
Коэффициент корреляции	- ; - / 0,73; 0,74
	мономер без вращения; с вращением субъединиц
Количество не водородных атомов	141,613; 141,636
Количество а.о.	10090; 10093
Среднеквадратичные отклонения	
Длин связей (Å)	0,01; 0,01
Углов связей (°)	1,08; 1,2
Хиральности (°)	0,05; 0,08
Планарности (°)	0,005; 0,007
Подтверждение структуры	
Число стерических перекрытий атомов (> 0.4 Å на 1 000 атомов)	6,48; 7,82
<i>Белки</i>	
оценка MolProbity	2,06; 2,16
Наиболее предпочтительных ротамеров	4502 (96,22%); 4400 (94,00%)
Статистика Рамачадрана	
Наиболее предпочтительная область	4449 (82,28%); 4343 (80,28%)
Разрешенная область (%)	923 (17,26%); 1040 (19,22%)
Запрещенная область (%)	25 (0,46%); 25 (0,5%)
<i>РНК</i>	
Корректное положение изломов плоскости углеводного кольца	99,78%; 99,42%

Продолжение Таблицы 3.5.

Корректные конформации атомов основной цепи	79,23%; 75,41%
Число некорректных водородных связей	0/109772; 0/109772
Число некорректных двугранных углов	5/171185; 8/171185

Положение N-концевого домена SaHPF в структуре 100S димеров рибосом S. aureus

Как было сказано ранее, структура белка SaHPF состоит из N-концевого домена (NTD; а.о. 1–95) и C-концевого домена (CTD; а.о. 130-190), связанных друг с другом подвижным линкером из 35 аминокислотных остатков. Методом спектроскопии ЯМР было показано, что N-концевой домен имеет $\beta 1$ - $\alpha 1$ - $\beta 2$ - $\beta 3$ - $\beta 4$ - $\alpha 2$ топологию. Данный домен имеет высокую гомологию с белками HPF и YfiA из *E. coli*, для которых была показана способность связываться между «головой» и «телом» малой субъединицы рибосомы [117]. На основе этих данных структура N-концевого домена была вписана в электронную плотность 100S рибосом и было показано, что β складка SaHPF-NTD взаимодействует с 16S рРНК (стекинг взаимодействие между Glu5/His7 и A975, и между Arg66 и G976), в то время как консервативные положительно заряженные аминокислотные остатки в составе α спиралей (Lys27, Arg30, Lys84, Arg90, Arg95) взаимодействуют с 16S рРНК и стабилизируют ее в структуре димера рибосом (Рис. 64). Это объясняет полученные ранее биохимические данные о существенной роли этих аминокислотных остатков в связывании с рибосомой и способности к димеризации рибосом [283]. Следует отметить, что взаимодействия между SaHPF-NTD и «телом» рибосомы не наблюдаются для структур с повернутым положением субъединиц рибосом, что позволяет предположить, что наиболее стабильные контакты SaHPF-NTD с рибосомой - это те, которые обеспечивают взаимодействие с «головой» рибосомы (Рис. 64).

Также, при связывании с малой субъединицей рибосомы положение N-концевого домена SaHPF перекрывается с несколькими сайтами связывания антибиотиков в А-сайте (гигромицин В, тетрациклин), в Р-сайте (эдеин) и Е-сайте (пактамицин, касугамицин), что определяет устойчивость рибосомных димеров к данным антибиотикам (Рис. 65).

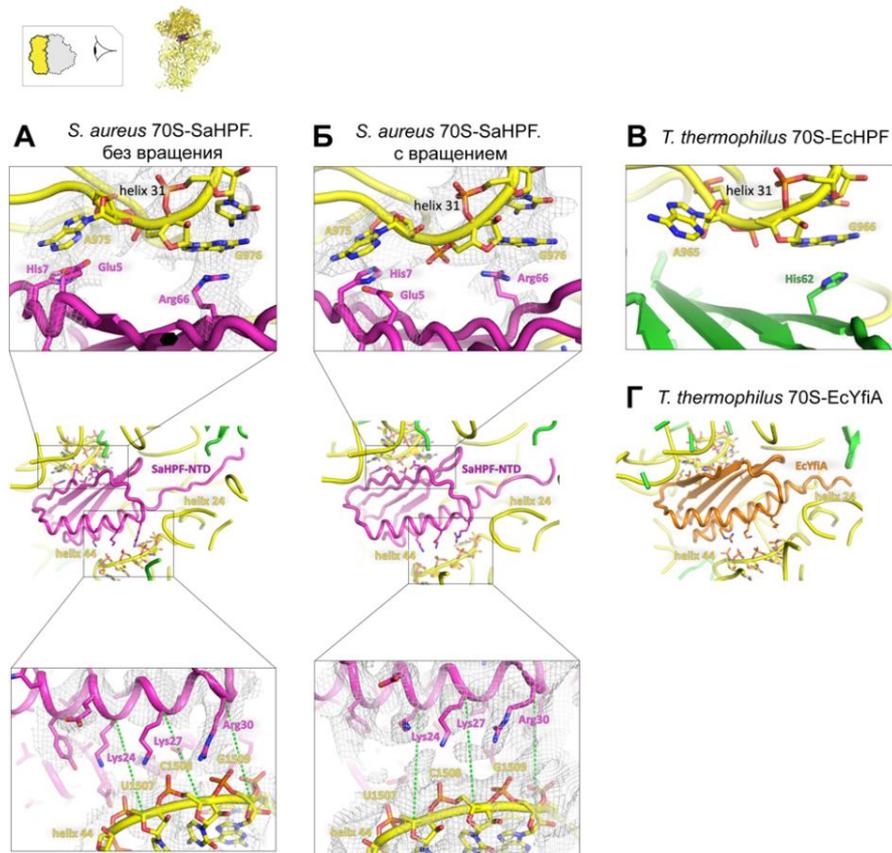


Рисунок 64. Контакты белка SaHPF-NTD с рибосомой для структур без вращения (А) и с вращением (Б) субъединиц рибосом. Для сравнения с имеющимися данными для рибосом *T. thermophilus* приведено положение белков EcHPF (PDB ID 4V8H; [117]) (В) и EcYfiA (PDB ID 4V8I; [117]) (Г) в той же ориентации. Отображение положения атомов боковых цепей показано для а.о. (HPF и YfiA) и нуклеотидов (в «голове» и «теле» 16S рРНК) находящихся на расстоянии менее 5 Å друг от друга.

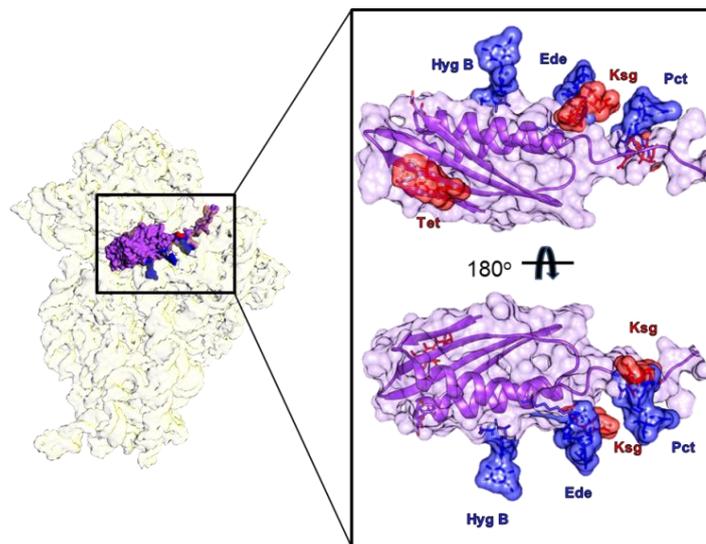


Рисунок 65. Положение N-концевого домена белка SaHPF и антибиотиков в активных сайтах рибосомы *S. aureus* (Hyg B- гигромицин В; Tet-тетрациклин; Ede – эдеин; Ksg – касугамицин; Pct - пактамицин).

Для более детального изучения взаимодействия N-концевого домена с рибосомой *S. aureus* регистрировались спектры ЯМР эксперимента ^1H - ^{15}N HET-SOFAST для меченого по изотопам ^{15}N белка *Sa*HPF-NTD (1-110 а.о.) в комплексе с 70S рибосомой *S. aureus*.

Эксперимент ЯМР HET-SOFAST является высокочувствительным методом для полуколичественного описания степени компактности и гетерогенности полипептидных цепей в растворе [342] на основе измерения соотношения скоростей спин-решеточной релаксации. Если производить селективное насыщение на частоте резонанса иминопротонов рибосомы (15 м.д.), то, за счет явления спиновой диффузии ^1H - ^1H и ЯЭО ($\lambda_{\text{ЯЭО}}$), в спектрах ЯМР будет наблюдаться изменение интенсивностей сигналов амидных групп тех аминокислотных остатков, которые связаны с рибосомой. Величину $\lambda_{\text{ЯЭО}}$ можно получить, рассчитав отношение интенсивностей сигналов $I_{\text{насыщ}}/I_{\text{эталон}}$ в 2D ^1H - ^{15}N спектрах, где $I_{\text{насыщ}}$ интенсивность сигнала при насыщении на частоте резонанса иминопротонов рибосомы (15 м.д.), а $I_{\text{эталон}}$ интенсивность сигнала при насыщении в области спектра, где заведомо отсутствуют сигналы от протонов рибосом и белка (-15 м.д.).

В раствор к меченому по изотопам ^{15}N белку *Sa*HPF-NTD добавляли 70S рибосомы *S. aureus* и анализировали изменение интенсивностей сигналов от амидных протонов белка в спектрах ЯМР при насыщении на частоте резонанса иминопротонов РНК. В случае наличия взаимодействия между белком и РНК вследствие эффекта спиновой диффузии в спектрах будет наблюдаться изменение интенсивностей сигналов. Для образца белка без добавления рибосом не наблюдалось изменение интенсивностей в спектрах (Рис. 66а), в то время как при добавлении в раствор к целевому белку 70S рибосом наблюдалось значительное изменение интенсивностей сигналов (до ~25%) в нескольких областях белка, что означает наличие обмена между протонами белка и рибосомы (Рис. 66 б-в).

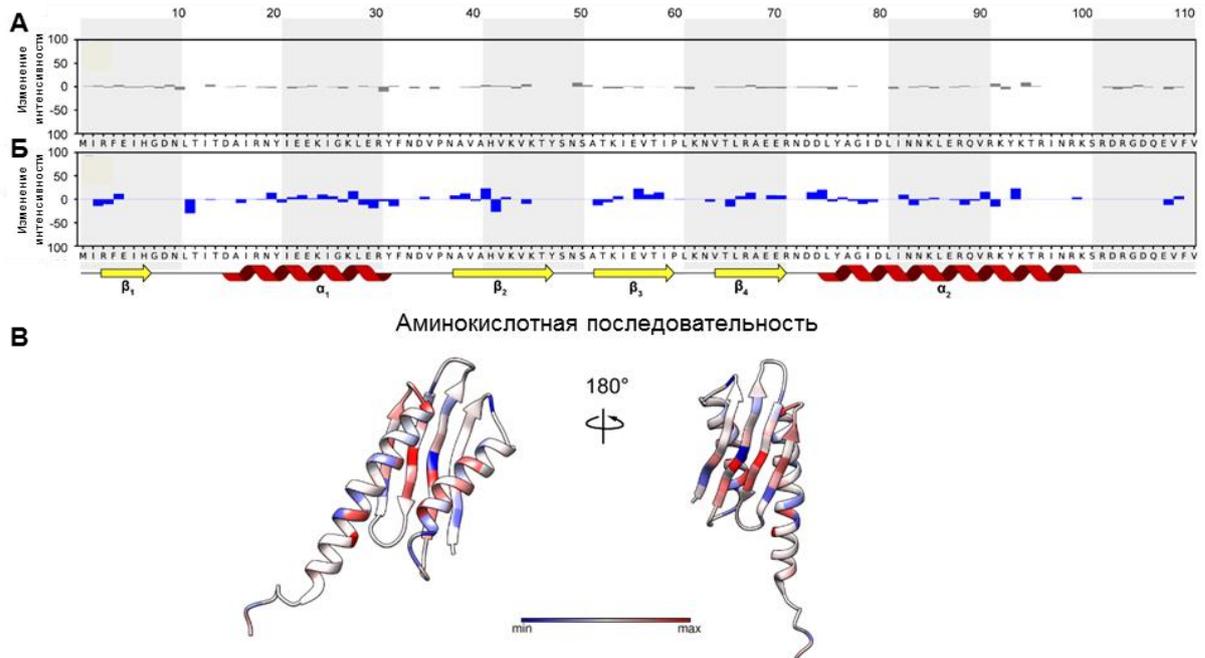


Рисунок 66. Результаты эксперимента ЯМР ^1H - ^{15}N HET-SOFAST HSQC. По вертикали отложено изменение интенсивностей сигналов амидных групп (λ_{noe}) белка SaHPF-NTD (120 мкМ) меченого по изотопам ^{15}N в растворе буфера G в отсутствии (а) и в присутствии (б) 70S рибосом *S. aureus* (54 мкМ). Структура белка SaHPF-NTD раскрашенная по величине λ_{noe} .

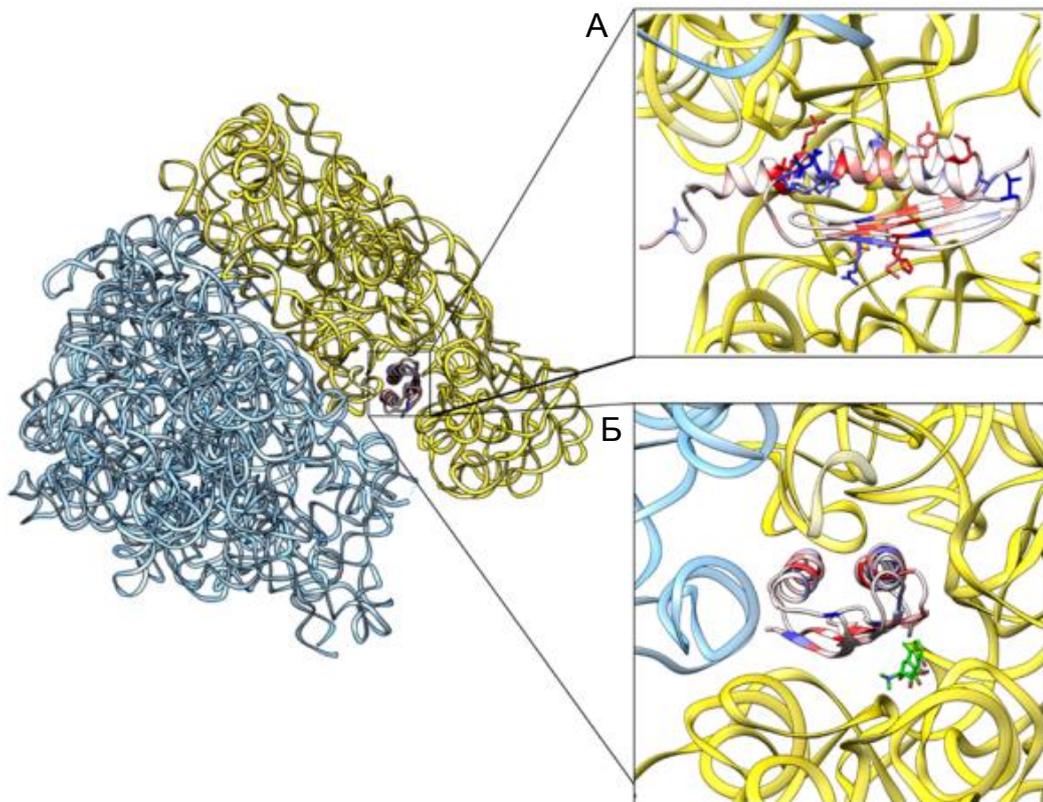


Рисунок 67. Положение N-концевого домена SaHPF в структуре 100S димеров рибосом *S. aureus* по данным спектроскопии ЯМР (А). На рисунке (Б) показано положение тигециклина (зеленым) в А-сайте.

На основе полученных данных из ЯМР экспериментов было установлено, что следующие аминокислотные остатки участвуют во взаимодействии с рРНК: Arg3, Glu5, His41, Val39, Thr57 взаимодействуют со спиралью 31; Tyr20, Leu28, Glu28, Arg30, Phe32, Asp73, Asn83, Gln88, Arg90, Lys91, Lys93 взаимодействуют со спиралью 44, что подтверждает полученные нами данные методом крио-ЭМ о положении N-концевого домена в 100S рибосоме *S. aureus* (Рис. 67).

Положение С-концевого домена SaHPF в структуре 100S димеров рибосом S. aureus

Как было сказано выше, в структуре 100S димера рибосом *S. aureus*, полученной методом крио-ЭМ в районе непосредственного контакта двух рибосом была обнаружена электронная плотность, не принадлежащая рибосомным компонентам. Так как карты электронной плотности для остальных компонент комплекса (рРНК, рибосомные белки и *SaHPF*-NTD) уже были интерпретированы, нами было предположено, что данная плотность принадлежит С-концевому участку белка *SaHPF*, чья роль в формировании 100S рибосом была неизвестна ранее. Структура данного домена была определена с высоким разрешением нами методами спектроскопии ЯМР и РСА, и полученные данные мы использовали для интерпретации дополнительной электронной плотности в области димерного контакта (Рис. 68).

В структуре 100S рибосомы С-концевой домен *SaHPF* не взаимодействует напрямую с рибосомой, так как располагается рядом с рибосомным белком uS2 и образует дополнительный контакт, стабилизирующий димер рибосомы за счет белок-белкового взаимодействия.

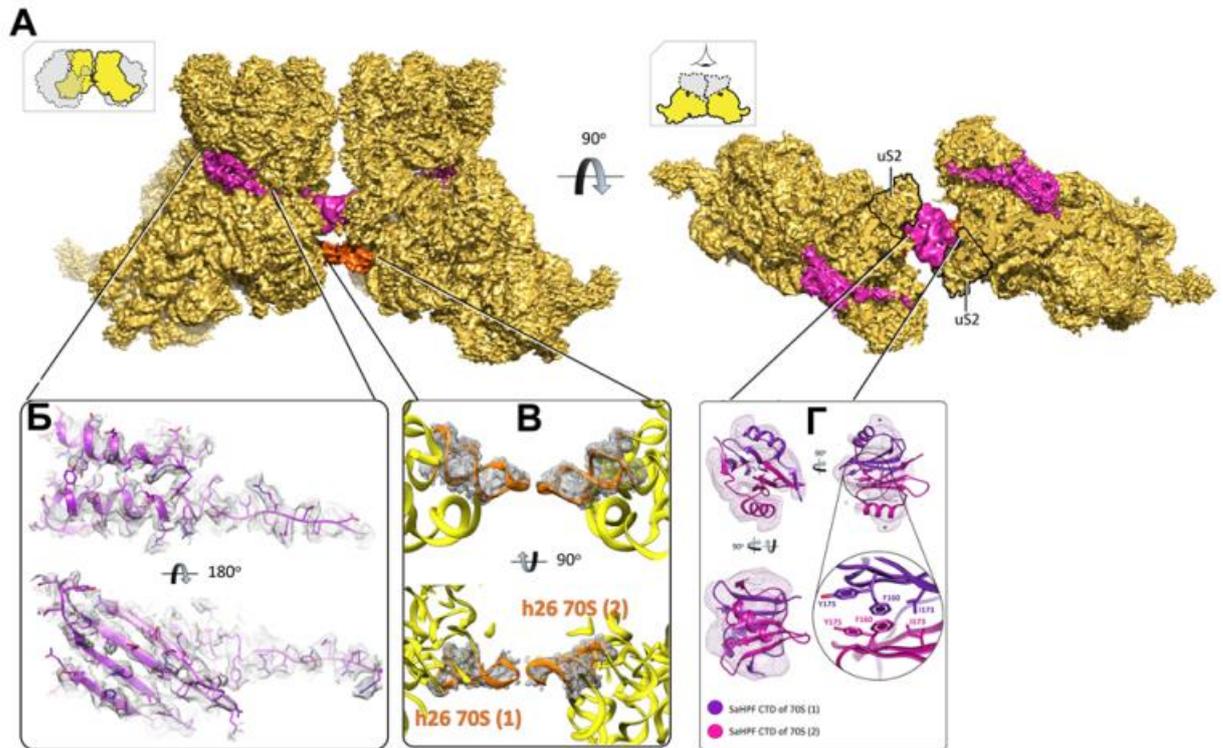


Рисунок 68. Положение С-концевого домена в структуре 100S димера рибосом. (А) Показана карта электронной плотности для димеров рибосом без вращения субъединиц в 70S рибосомах (фиолетовым показана плотность принадлежащая белку SaHNF; оранжевым – спирали h26). (Б) Положение боковых цепей SaHNF-NTD. (В) Димерный контакт между спиралями h26. (Г) Структура SaHNF-CTD.

Участок белка SaHNF из 35 аминокислотных остатков соединяющий N- и С-концевые домены в крио-ЭМ структуре не наблюдался, что свидетельствует о его высокой подвижности даже в связанном со 100S рибосомой состоянии.

Небелковые контакты, стабилизирующие структуру 100S димеров рибосом S. aureus

Примечательно, что димер рибосом стафилококка стабилизируется дополнительным контактом между двумя спиралями h26 малых субъединиц рибосом (той спирали, что длиннее в *S. aureus* в сравнении с остальными бактериями). Однако данный контакт наблюдался только в составе «жесткого» димера рибосом и не наблюдался в структуре «подвижных» 100S димеров, поэтому можно предположить, что данный контакт является вторичным для стабилизации димера (Рис. 69).

Сравнение структуры 70S рибосом с не повернутым положением большой субъединицы в наших экспериментах (в присутствии *Sa*HPF) со структурой вакантной 70S рибосомы, установленной ранее [274], показало, что связывание *Sa*HPF, в основном, вызывает конформационные изменения подвижных рибосомных элементов большой субъединицы, таких как стебель L1, стебель L7 / L12 и спираль h69 (Рис. 71)

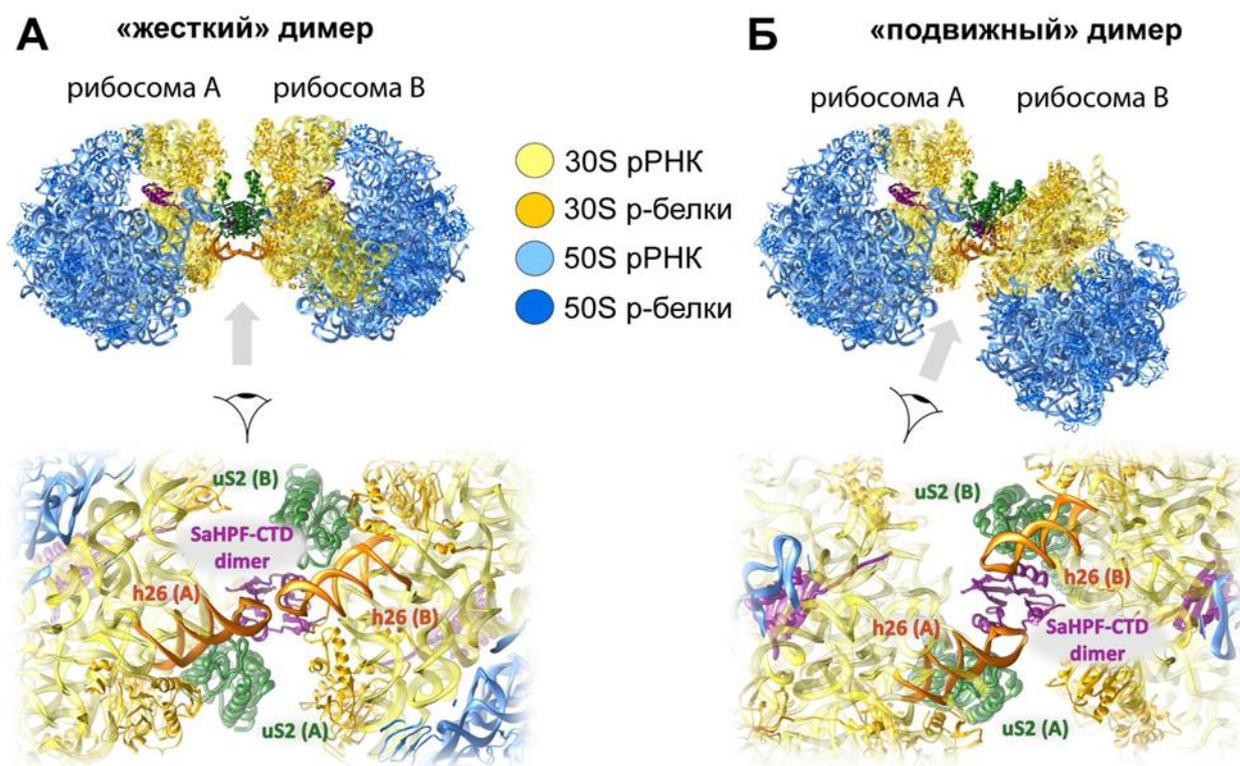


Рисунок 71. Различия в структуре «жесткого» (А) и «подвижного» (Б) димера рибосом.

Средняя амплитуда движений малой субъединицы во время поворота меньше ($\sim 10 \text{ \AA}$), причем самые большие изменения происходят в «голове» и спирали h44 в непосредственной близости от центра декодирования. Это смещение поддерживается подвижным белком bL31, в структуре которого отсутствует цинк-связывающий мотив (Рис. 72).

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что димеры формируются только из функционально пригодных рибосом, которые рано или поздно будут вовлечены в процесс синтеза белка, а, следовательно, являются крайне уязвимой мишенью в клетке во время стресса.

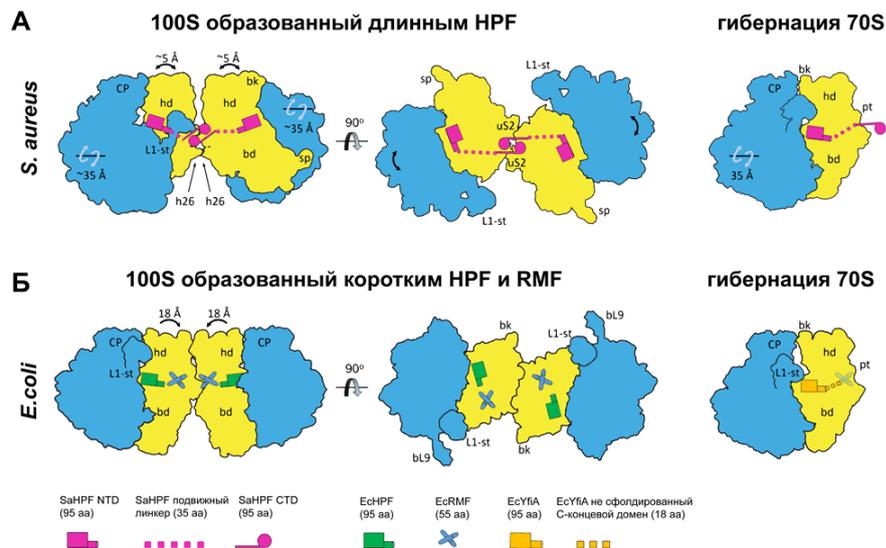


Рисунок 72. Схема гибернции рибосом для различных бактерий. (А) Гибернция рибосом *S. aureus* происходит за счет образования 100S димера путем связывания *SaHPF*-NTD с малой субъединицей, а *SaHPF*-CTD формирует дополнительный контакт за счет белок-белкового взаимодействия со второй молекулой белка *SaHPF* в димере. Также имеется вторичный контакт между спиралью h26 рРНК. Стрелками показано направление вращения субъединиц и «головы» рибосомы. (Б) В процессе гибернции рибосом *E. coli* участвуют три белка. Связывание *EcRMF* и *EcHPF* приводит к конформационному изменению «головы» малой субъединицы, что, в свою очередь, позволяет двум рибосомам взаимодействовать через контакты между рибосомными белками и рРНК [285, 286]. Гибернция также может происходить в результате связывания белка *YfiA*, положение С-концевого конца которого перекрывается с сайтом связывания *EcRMF*, препятствуя тем самым образованию димера [117].

4.4. Анализ влияния мутаций в интерфейсе димеризации белка С-концевого домена *SaHPF* на димеризацию рибосом

Полученные методом спектроскопии ЯМР высокого разрешения и РСА структуры С-концевого домена белка *SaHPF* позволили идентифицировать взаимодействия между аминокислотными остатками, стабилизирующими димер рибосомы: Thr¹⁷¹-Thr¹⁸⁷, Ile¹⁷³-Val¹⁶² – гидрофобное взаимодействие, Phe¹⁶⁰-Tyr¹⁷⁵, Phe¹⁶⁰-Phe¹⁶⁰ – стекнинг взаимодействие. С целью выявления ключевых взаимодействий, нарушение которых приводило бы к потере димеризации белка и нарушению димеризации 100S рибосом нами были клонированы и выделены мутантные белки с заменой данных аминокислотных остатков на отрицательно заряженную аспарагиновую

кислоту: $SaHPF^{F160D}$, $SaHPF^{V162D}$, $SaHPF^{T171D}$, $SaHPF^{I173D}$, $SaHPF^{Y175D}$, $SaHPF^{I185D}$, $SaHPF^{T187D}$. Данная замена приводит к электростатическому отталкиванию аминокислотных остатков за счет добавления отрицательного заряда в гидрофобную область в интерфейсе димера. Кроме того, было сделано предположение, что процесс димеризации рибосом можно предотвратить путем добавления избыточного количества индивидуальных доменов (N-концевого и C-концевого) белка *SaHPF*. Обладая теми же константами связывания с рибосомой (в случае N-концевого домена) и белком (в случае C-концевого домена), избыток изолированного *SaHPF*-NTD приведет к появлению комплексов 70S рибосом ассоциированных с ним (аналогично *EcYfiA*). Избыток *SaHPF*-CTD в растворе приведет к образованию комплексов *SaHPF*+*SaHPF*-CTD, что в конечном итоге даст уменьшение 100S фракции. Мутантные формы белка *SaHPF* экспрессировали в клетках *E. coli* с гистидиновым тагом (шесть а.о. His) на C-конце, очищали методом металлохелатной аффинной хроматографии и эксклюзионной хроматографии. Электрофоретический анализ образца проводился в ПААГ в камере Mini-Protean Tetra (Рис. 73).

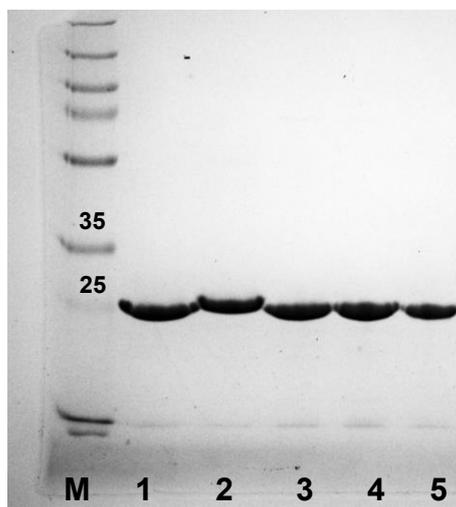


Рисунок 73. Электрофоретический анализ белка *SaHPF* и его мутантных форм в ПААГ после эксклюзионной хроматографии. Лунки: М – маркеры молекулярных масс белков; 1- *SaHPF*-6His (дикий тип, WT), 2 – $SaHPF^{F160D}$ -6His, 3 – $SaHPF^{I173D}$ -6His, 4 – $SaHPF^{Y175D}$ -6His, 5 – $SaHPF^{T187D}$ -6His. Небольшое отклонение в положении белка $SaHPF^{F160D}$ -6His объясняется изменением заряда белка вследствие замены аминокислотного остатка Phe на Asp.

Влияние аминокислотных замен на димеризацию рибосом оценивалось методом осаждения при ультрацентрифугировании в градиенте плотности сахарозы. Для этого экспрессированный белок SaHPF и его мутантные формы смешивали в эквимольном соотношении (64 пМ) с 70S рибосомами *S. aureus*, инкубировали при 37 °С в течение 30 минут и 6 мл образца наслаивали на 5–30% сахарозный градиент. Ультрацентрифугирование проводили при 15000 об./мин при 4°С в течение 15,5 ч в роторе SW41 (Beckman), фракционировали по 0,5 мл и анализировали на спектрофотометре NanoDrop. Результаты приведены на рисунке 74.

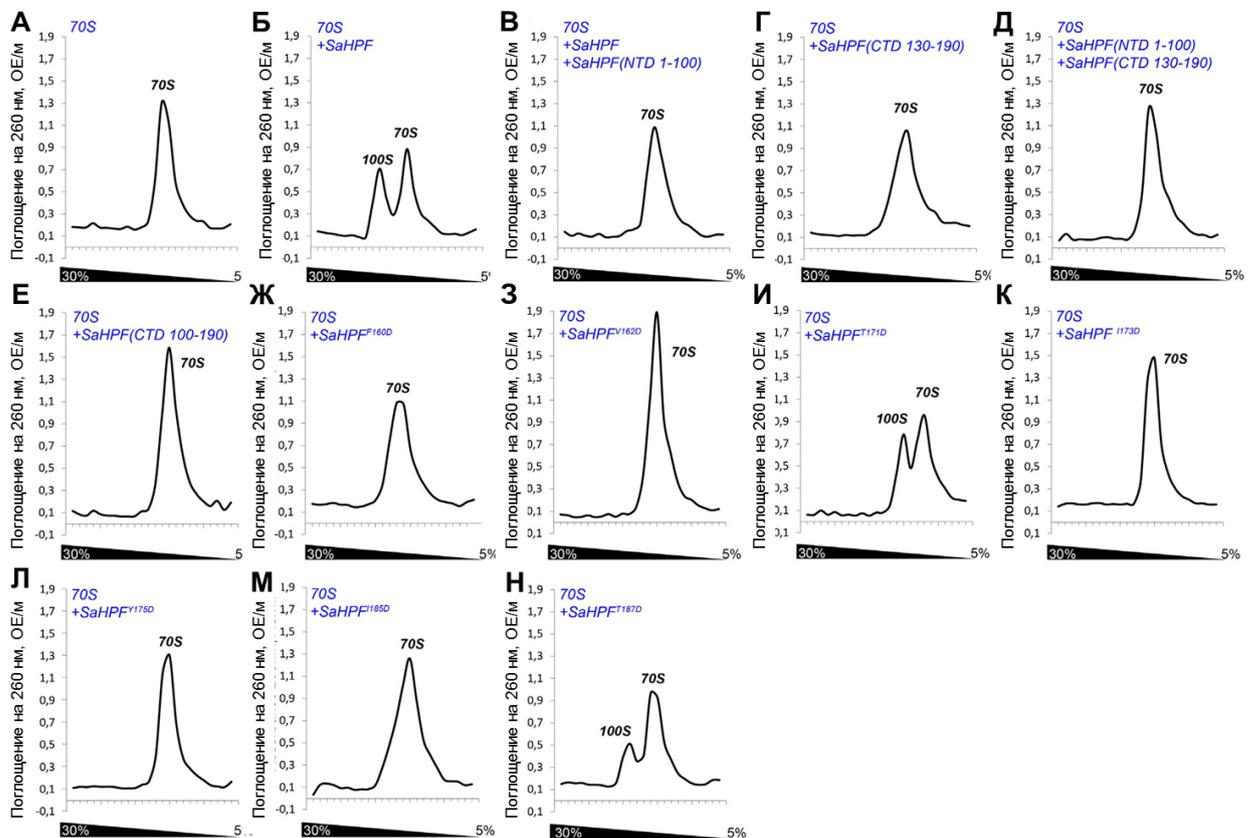


Рисунок 74. Влияние замен а.о. SaHPF на димеризацию рибосом. Данные ультрацентрифугирования комплексов рибосом *S. aureus* с SaHPF в градиенте плотности сахарозы: 70S рибосомы (А); 70S+SaHPF (Б); 70S+SaHPF+ SaHPF NTD(1–100) (В); 70S+SaHPF CTD(130–190) (Г); 70S+ SaHPF NTD(1–100)+ SaHPF CTD(130–190) (Д); 70S+SaHPF CTD(100–190) (Е); 70S+SaHPFV162D (Ж); 70S+SaHPFV162D (З); 70S+SaHPFT171D (И); 70S+SaHPFI173D (К); 70S+SaHPFY175D (Л); 70S+SaHPFI185D (М); 70S+SaHPFT187D (Н)

Анализ данных осаждения при ультрацентрифугировании в градиенте плотности сахарозы 70S рибосом *S. aureus* в присутствии различных модификаций белка *SaHPF* показал, что димеризация рибосом не происходит в следующих случаях (Рис. 74):

- при 10 кратном избытке *SaHPF*-CTD по сравнению с полноразмерным белком *SaHPF* (Рис. 74 в) за счет образования *SaHPF*+*SaHPF*-CTD пар;
- в отсутствие полноразмерного белка *SaHPF* и наличии *SaHPF*-CTD (Рис. 74 г), или *SaHPF*-NTD и *SaHPF*-CTD (Рис. 74 в) (т.е. изолированный С-концевой домен *SaHPF* не способен димеризовать рибосому аналогично *EcRMF*);
- при наличии мутаций белка *SaHPF* в положении остатков F160, V162, I173, Y175, I185.

Таким образом, на основе экспериментальных данных 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 ингибиторов механизма гибернации рибосом. Полученные результаты могут использоваться для установления роли механизма димеризации рибосом в процессе гибернации и анализа устойчивости к антибиотикам *S. aureus* при ингибировании данного механизма.

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

Данная глава посвящена результатам исследования структуры элонгационного фактора Р (EF-R) из *S. aureus* по данным методов молекулярной биологии (генная инженерия, экспрессия белков), биохимии (солюбилизация, очистка, фракционирование белков) и физических методов исследования вещества (РСА, спектроскопия ЯМР, спектроскопия ЭПР и масс-спектрометрический анализ).

EF-R – трехдоменный белок, который связывается с рибосомой между Р- и Е- сайтами и вплотную примыкает к тРНК в Р-сайте (Р-тРНК). Подавляющее большинство работ показывает, что EF-R помогает рибосоме синтезировать специализированные трудносинтезируемые аминокислотные последовательности, например полипролиновые мотивы, такие как RPP и APP. В составе белков секреторных систем встречается большое количество участков с повторяющимися остатками пролинов, которые обеспечивают секрецию факторов патогенности, поэтому нарушения в механизме работы EF-R могут приводить к снижению патогенных свойств микроорганизмов. Для максимально эффективного осуществления функции ускорения синтеза мотивов полипролинового типа EF-R нуждается в специальной посттрансляционной модификации в консервативном регионе петли домена I EF-R (Lys32 у *E. coli* и *S. aureus*; Arg34 у *P. aeruginosa*), наиболее сближенной с ПТЦ. Эксперименты по мутагенезу с нарушением синтеза и модификации EF-R позволят в дальнейшем определять роль данного фактора в работе систем, обеспечивающих патогенность *S. aureus*. Белок EF-R является как фактором инициации, так и трансляции, и входит в состав комплекса 70S рибосома, мРНК и тРНК^{фМет}. Структурные исследования данного белка и его функциональных комплексов с рибосомой позволят в дальнейшем провести скрининг новых ингибиторов трансляции *S. aureus*.

5.1. Структурные исследования белка *SaEF-P*

Для исследования биохимических свойств белка *SaEF-P in vitro* необходимо было выделить данный белок. Для этого мы экспрессировали в клетках *E. coli* белок *SaEF-P* с гистидиновым тагом (шесть а.о. His) на С-конце, очищали методом металлохелатной аффинной хроматографии и эксклюзионной хроматографии, и подбирали условия выделения. Белок экспрессировали в разных буферных условиях (трис-буфер; фосфатный буфер); при разных концентрациях соли NH_4Cl (150, 250, 500 мМ) и при разных уровнях рН (4,0; 6,8; 7,6; 8,3). Электрофоретический анализ образца проводился в ПААГ в камере Mini-Protean Tetra (Рис. 75). Наиболее оптимальными оказались следующие буферные условия: 50 мМ фосфатный буфер содержащий смесь 20 мМ аминокислот L-Arg и L-Glu при рН 6,8, концентрация соли NH_4Cl 250 мМ. Добавление смеси двух заряженных аминокислот (L-Arg и L-Glu) предотвращает агрегацию и осаждение белков [343]. Для структурных исследований методом спектроскопии ЯМР белок *SaEF-P-6His* экспрессировали в минимальной синтетической среде М9 на основе, обогащенной по изотопу ^{13}C глюкозы и обогащенного по изотопу ^{15}N сульфата аммония.

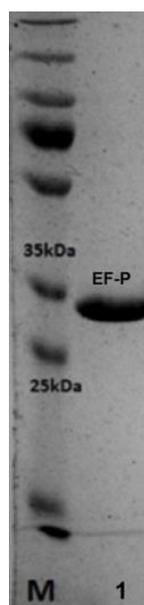


Рисунок 75. Электрофоретический анализ белка *SaEF-P* в ПААГ после эксклюзионной хроматографии. Лунки: М – маркеры молекулярных масс белков (в кДа); 1- *SaEF-P-6His*.

Структурные исследования SaEF-P методами спектроскопии ЯМР и ЭПР

Для получения информации о структуре белка SaEF-P методами спектроскопии ЯМР необходимо было получить данный белок с обогащением по изотопам ^{13}C и ^{15}N . Белок SaEF-P с гистидиновым тагом (шесть а.о. His) на С-конце экспрессировали в клетках *E. coli* в минимальной синтетической среде M9, содержащей обогащенные по изотопам ^{13}C и ^{15}N глюкозу и сульфат аммония. Полученный образец для исследований методом спектроскопии ЯМР содержал 1,30 мМ меченого по изотопам ^{13}C и ^{15}N белка в растворе фосфатного буфера (90% H_2O +10% D_2O) с добавлением 20 мМ смеси аминокислот L-Arg и L-Glu.

Параметры экспериментов ЯМР приведены в Разделе 2.1. Отнесение сигналов ядер ^1H , ^{13}C , и ^{15}N , для атомов основной и боковых цепей было получено для 163 из 185 аминокислотных остатков (88 %) белка SaEF-P. Данные о химических сдвигах ядер ^1H , ^{13}C , ^{15}N были депонированы в международную базу данных BMRB с кодом 27503 (<http://www.bmrb.wisc.edu/>). Спектр ЯМР ^1H - ^{15}N HSQC белка SaEF-P приведен на рисунке 76. В дву- и трехмерных спектрах ЯМР не наблюдалось сигналов амидных протонов остатков находящихся в петлях между β -тяжами $\beta 2$ и $\beta 3$ (остаток 33); между $\beta 4$ и $\beta 5$ (остатки 57–61), и в неструктурированной петле С-концевого домена (остатки 140–147), что может объясняться наличием быстрого водородного обмена для данных остатков.

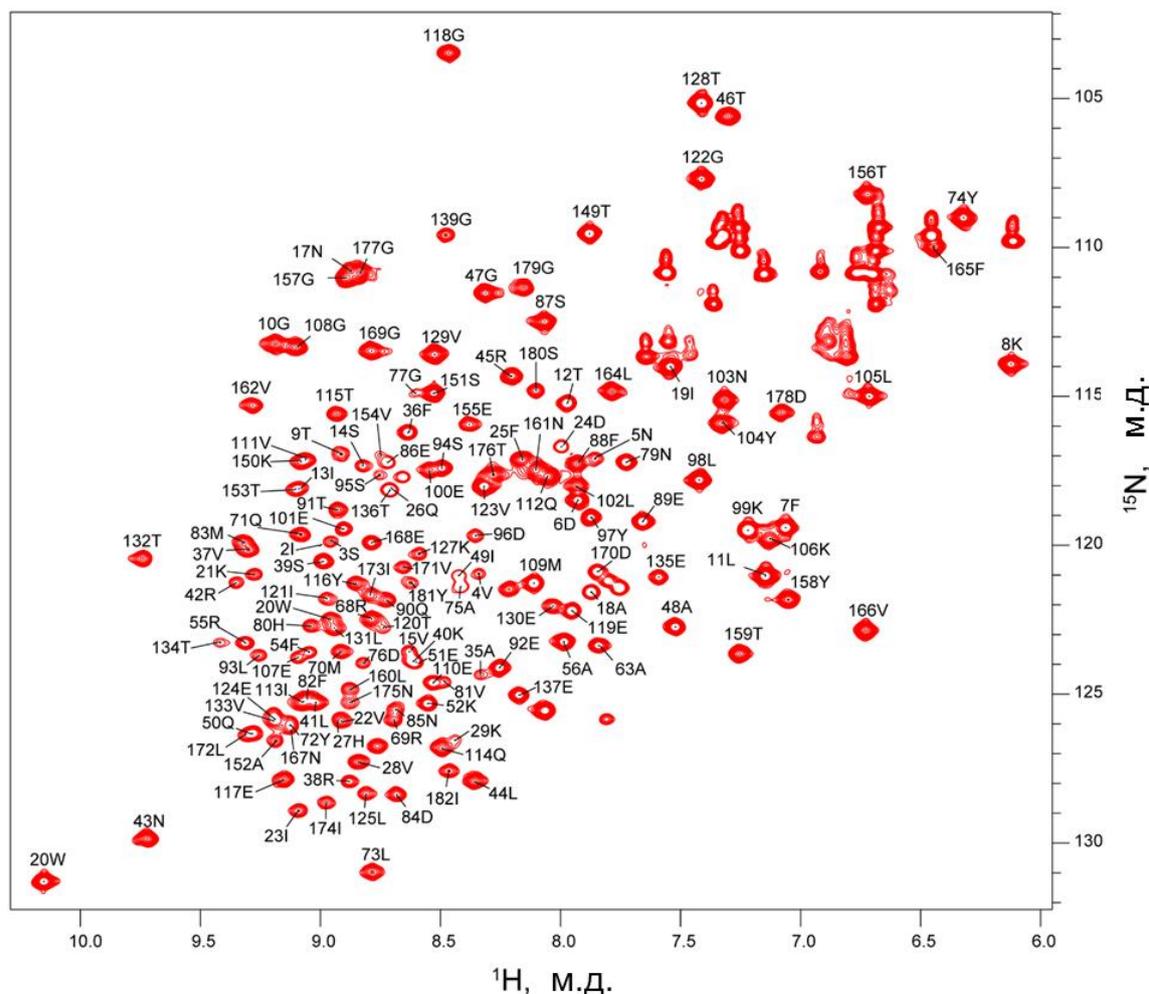


Рисунок 76. ^1H – ^{15}N HSQC-спектр ЯМР (700 МГц) белка *SaEF-P*, меченого по изотопам $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$, (1.30 мМ) в фосфатном буфере с 250 мМ NH_4Cl с добавлением 20мМ смеси аминокислот Arg и Glu, $T = 308$ К.

Анализ химических сдвигов сигналов ядер ^1H и ^{13}C основной цепи в программе TALOS+ [341] показал, что белок *SaEF-P* состоит из одной α -спирали и тринадцати β -тяжей (топология $\beta 1$ - $\beta 2$ - $\beta 3$ - $\beta 4$ - $\beta 5$ - $\beta 6$ - $\beta 7$ - $\alpha 1$ - $\beta 8$ - $\beta 9$ - $\beta 10$ - $\beta 11$ - $\beta 12$ - $\beta 13$), таким образом, что спираль $\alpha 1$ состоит из остатков 96-102, и бета-тяжи: $\beta 1$ (остатки 8-15), $\beta 2$ (18-28), $\beta 3$ (35-43), $\beta 4$ (48-55), $\beta 5$ (66-75), $\beta 6$ (79-84), $\beta 7$ (90-94), $\beta 8$ (110-117), $\beta 9$ (119-125), $\beta 10$ (128-137), $\beta 11$ (149-152), $\beta 12$ (157-161), $\beta 13$ (171-175) (Рис. 77). Среднее значение времени корреляции молекулярного движения τ_c для амидных групп основной цепи белка *SaEF-P* составляло $17,60 \pm 1,4$ нс, что соответствует величинам характерным для белков со 185 а.о. при 35 °С, т.е. *SaEF-P* присутствует в растворе как мономер [6].

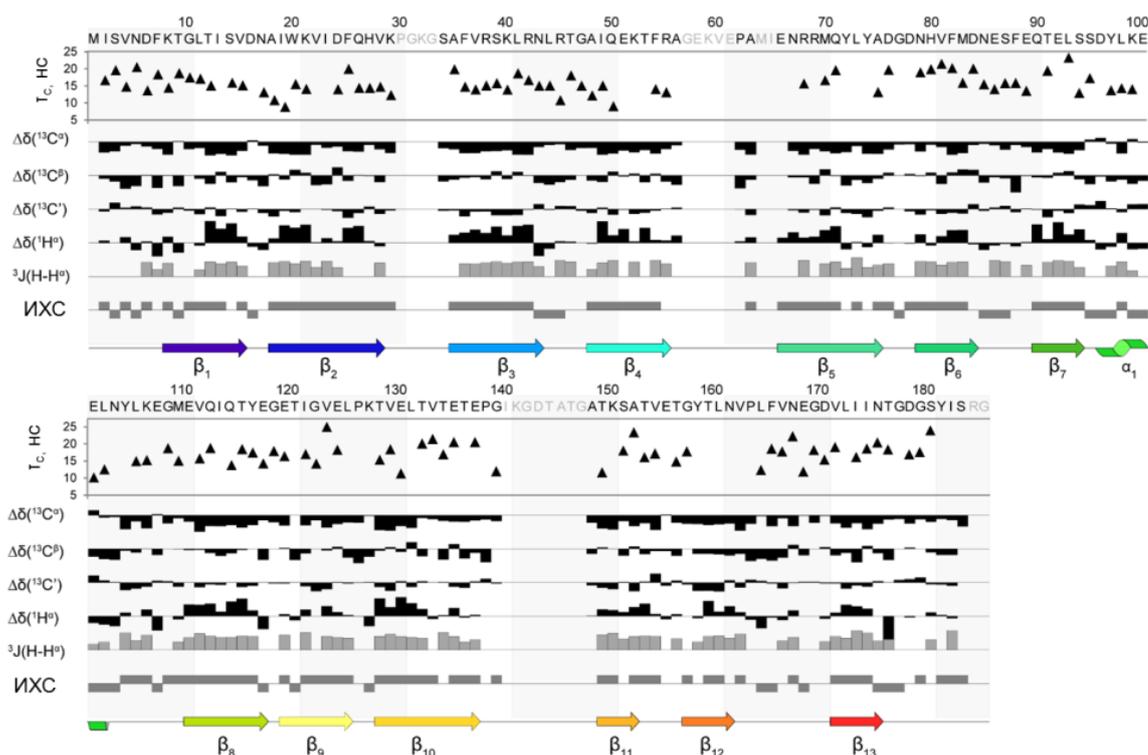


Рисунок 77. Индексы химического сдвига для аминокислотных остатков белка *SaEF-P*. Величины времени корреляции молекулярного движения τ_c полученные по данным T_1/T_2 релаксации показаны треугольниками. Положение элементов вторичной структуры белка показаны спиралью для α -спирали и стрелками для бета-тяжей.

Поскольку сигналы амидных протонов от остатков консервативного участка PGKP (а.о. 30-33) находящегося в петлях между β -тяжами β_2 и β_3 не наблюдались в спектрах ЯМР, мы дополнительно проанализировали конформационную подвижность данной области методом спектроскопии ЭПР [344-347]. Для этого был синтезирован белок *SaEF-P* с мутацией K32C и «пришита» спиновая метка MTSL ((*S*-(1-оксил-2,2,5,5-тетраметил-2,5-дигидро-1Н-пиррол-3-ил)метил метантиосульфат)) к тиольной группе цистеинового остатка (Рис. 78).

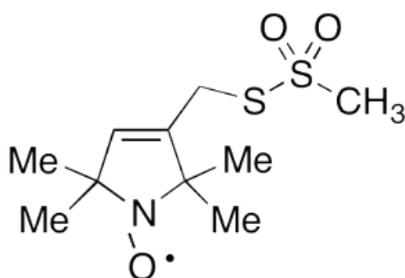


Рисунок 78. Химическая структура нитроксильной спиновой метки MTSL.

В спектре ЭПР метки MTSL в растворе фосфатного буфера наблюдалось 3 линии сверхтонкого расщепления, характерные для нитроксидного радикала в средах с низкой вязкостью, вызванных взаимодействием $S = 1/2$ и $I = 1$ для ядер ^{14}N . На основе параметров эксперимента $A_{\text{iso}} = 16,1$ Гс, $g_{\text{iso}} = 2,0059$ и литературных данных для водного раствора [348] можно оценить ширину линий отдельных компонентов: $\Delta B_{pp}^{+1} = 1.13$ Гс, $\Delta B_{pp}^0 = 1.12$ Гс, $\Delta B_{pp}^{-1} = 1.15$ Гс, а также время корреляции $\tau_R = 4 \cdot 10^{-11}$ с (40 пс) (Рис. 79 а).

Для добавления спиновой метки к белку *SaEF-P*^{K32C} в раствор добавляли 10-кратный избыток MTSL, инкубировали смесь в течение 12 часов при 4 °С и очищали белок методом эксклюзионной хроматографии. 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 А-компонент ($\Delta B_{pp}^{+1} = 1.62$ Гс, $\Delta B_{pp}^0 = 1.41$ Гс, $\Delta B_{pp}^{-1} = 2.54$ Гс), что означает, что спиновая метка была связана с белком. Время вращательной корреляции метки MTSL, связанной с *SaEF-P* составляло $\tau_R = 8 \cdot 10^{-10}$ с (Рис. 79 б). Таким образом, было показано, что консервативный участок РGКР (а.о. 30-33), находящийся в петлях между β -тяжами β_2 и β_3 , обладал высокой подвижностью в растворе и поэтому не наблюдался в спектрах ЯМР.

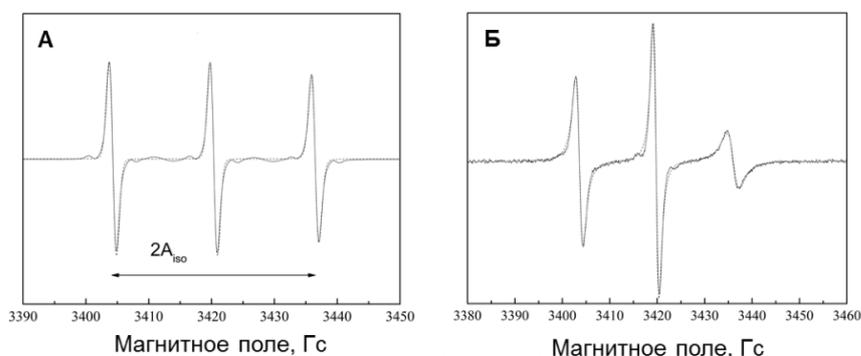


Рисунок 79. Спектры ЭПР нитроксильной спиновой метки MTSL (а) и белка *SaEF-P*^{K32C} с «пришитой» меткой MTSL к тиольной группе цистеинового остатка (б). Пунктиром показаны рассчитанные данные на основе аппроксимации спектров ЭПР в модуле Easyspin для Matlab [329].

Пространственная структура белка *SaEF-P* была рассчитана методом молекулярной динамики и симулированного отжига для минимизации энергии в программе ARIA [316] на основе экспериментально установленных значений химических сдвигов (двугранные углы), констант скорости обмена амидных протонов на дейтерий (водородные связи), констант остаточного диполь-дипольного взаимодействия и межъядерных ЯЭО контактов (Рис. 80).

Значения констант остаточного ДДВ получали на основе данных эксперимента ^1H - ^{15}N -IPAP-HSQC для образцов белков, обогащенных по изотопам ^{15}N , в растворе липид-детергентных бицелл на основе цвиттер-ионных или анионных насыщенных липидов DMPC/DHPC (молярное соотношение 3:1).

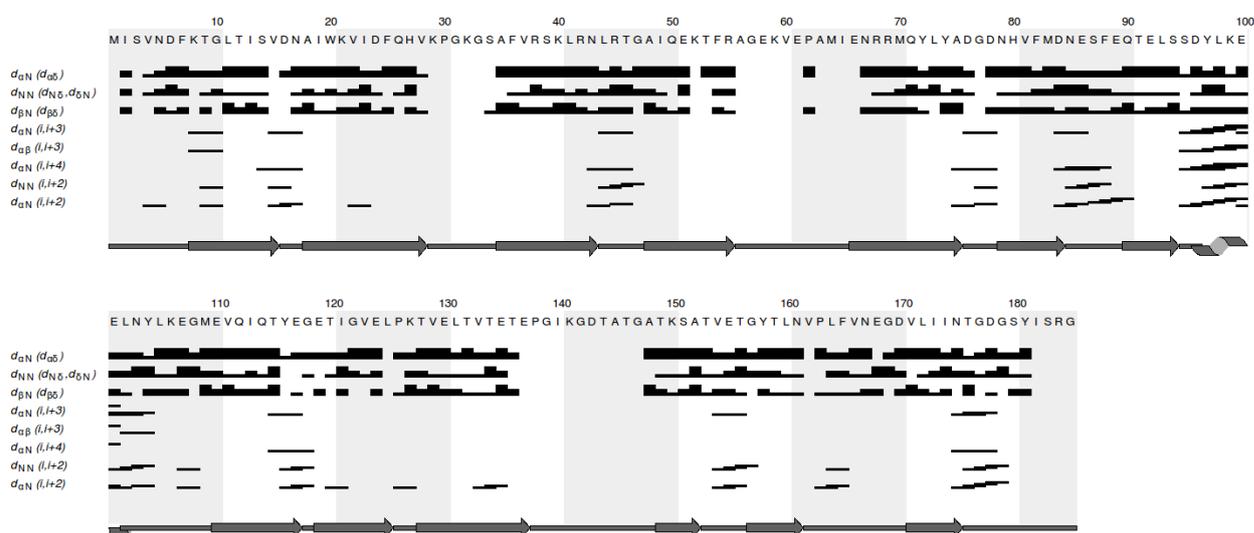


Рисунок 80. Межпротонные контакты ЯЭО и индексы химического сдвига для аминокислотных остатков белка *SaEF-P*. Толщина линий ЯЭО контактов соответствует интенсивностям кросс-пиков в спектрах NOESY.

Информация о структурных ограничениях, полученных из анализа спектров ЯМР приведена в таблице 3.6. Было рассчитано 500 структур белка, из которых в дальнейшем были отобраны 10 с наименьшей энергией. Структура белка *SaEF-P* приведена на рисунке 81. Данные депонированы в международную базу данных PDB с кодом 6RK3 (<https://www.rcsb.org/>).

Таблица 3.6. Набор пространственных ограничений, использовавшихся для расчёта структуры белка SaEF-P.

Всего ЯЭО контактов	3678
Дальнего диапазона ($ i-j > 4$)	1205
Среднего диапазона ($ i-j = 2,3,4$)	372
Последовательные ($ i-j = 1$)	1050
Внутриостаточные	1051
Водородные связи	157
Ограничений на двугранные углы ϕ, ψ	163
Констант остаточного ДДВ	118
Статистика Рамачадрана	
Наиболее предпочтительная область (%)	94,5
Разрешенная область (%)	100,0
Среднеквадратичное отклонение атомов основной цепи в ансамбле из 10 структур (Å)	$0,97 \pm 0,2$ Å

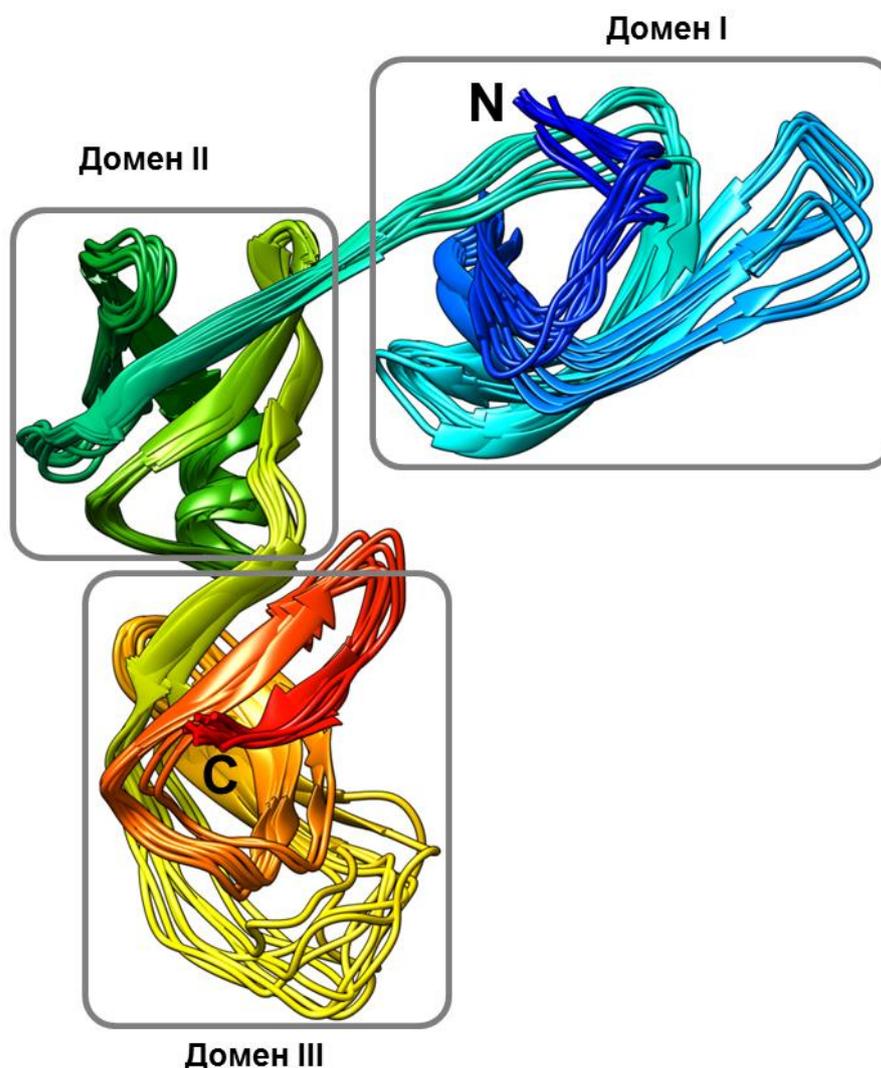


Рисунок 81. Структура SaEF-P полученная методом спектроскопии ЯМР (PDB ID: 6RK3). Представлен ансамбль из 10 структур.

Таким образом, методом спектроскопии ЯМР высокого разрешения было показано, что структура белка SaEF-P состоит из α -спирали и тринадцати β -нитей, и включает в себя три домена: домен I (а.о. 1-60), домен II (а.о. 66-126), домен III (а.о. 127-185).

Структурные исследования SaEF-P методом кристаллографии

Для подтверждения данных спектроскопии ЯМР высокого разрешения и получения более детальной структурной информации о белке SaEF-P мы использовали метод рентгеноструктурного анализа. Белок SaEF-P (10 мг/мл) был закристаллизован методом диффузии водяных паров. Монокристаллы SaEF-P (Рис. 82), пригодные для рентгеноструктурного анализа, были получены в следующих условиях: 0.2 М имидазол малат, pH = 5,5, 24% ПЭГ 600) при температуре 22 °С. Рост кристаллов происходил в течение 5-7 дней и для криопротекции использовался раствор 0,2 М имидазол малат с 33% ПЭГ 600, pH 5,5. Затем кристаллы подвергали крио-охлаждению путем погружения в жидкий азот и хранили до проведения экспериментов по РСА.

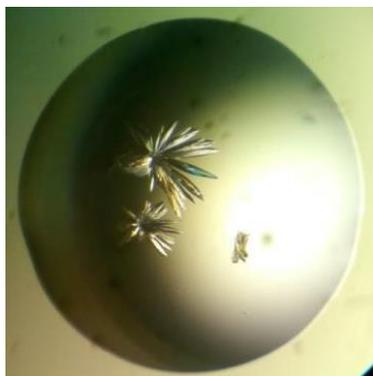


Рисунок 82. Кристаллы белка SaEF-P

Эксперименты по рентгеноструктурному анализу проводились на линии Gemini синхротрона ESRF (г. Гренобль, Франция). Регистрация дифракционных данных производилась с помощью детектора PILATUS 6M при длине волны 0.976254 Å. Расстояние от образца до детектора составляло 0.214770 м. Дифракционные изображения первоначально обрабатывали в программе XDS, осуществляли поиск дифракционных максимумов hkl,

определяли сингонию и параметры элементарной ячейки кристаллов. На этапе интегрирования определяли интегральную интенсивность дифракционных максимумов на дифрактограммах. Модули структурных факторов определяли на этапе шкалирования и приводили интенсивности к абсолютной шкале. Для определения положения молекулы исследуемого белка в элементарной ячейке кристалла применялся метод молекулярного замещения в пакете Phenix программы Phaser с использованием структуры белка Cth-95 из *Clostridium thermocellum*, 1,95 Å (PDB ID 1YBY) в качестве начальной модели. Уточнение начальной модели проводилось с помощью пакета phenix.refine. Модель строилась и корректировалась вручную в программе COOT.

Конечная структура SaEF-P была определена с разрешением 1.48 Å и депонирована в базу данных PDB с кодом 6RJI (Рис. 83). Информация о кристаллографических данных приведена в таблице 3.7.

Сравнение полученных структур в кристаллической фазе и в растворе показывает, что в обоих случаях белок SaEF-P имеет “L”-образную трехдоменную структуру с длиной плеч около 64 и 52 Å расположенных под углом 95 ° друг относительно друга, что напоминает трехмерную структуру тРНК (Рис. 83).

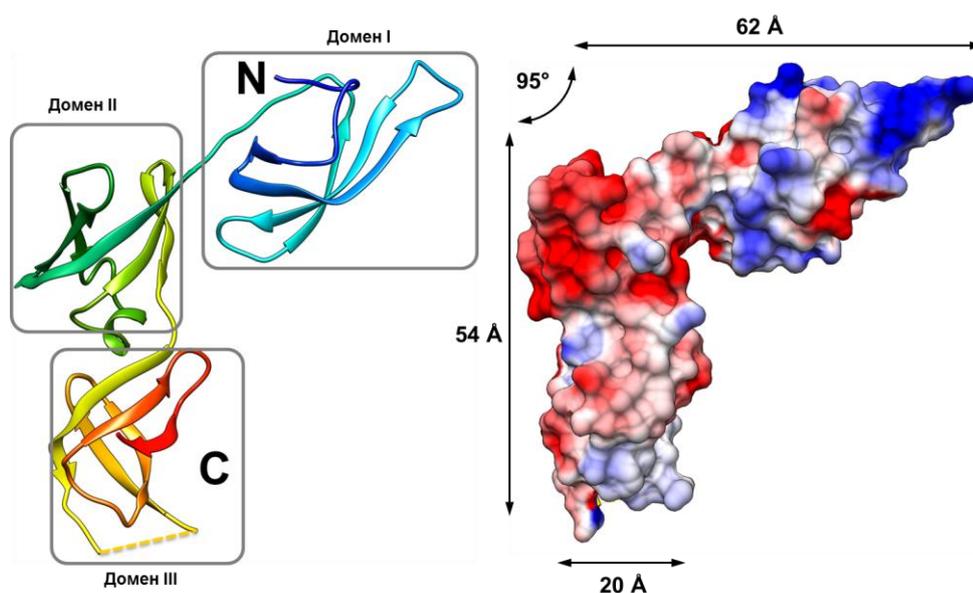


Рисунок 83. Структура SaEF-P полученная методом PCA (PDB ID: 6RJI).

Таблица 3.7. Кристаллографические данные, параметры съемки кристаллов *SaEF-P* (PDB ID: 6RJI). Сбор данных производился при 100 К.

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 не водородных 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
Разрешенная область (%)	1,14

Среднеквадратичное отклонение атомов основной цепи кристаллической структуры и структуры в растворе составило $1,04 \pm 0,2$ Å. По сравнению со структурой в растворе в кристаллической структуре *SaEF-P* лучше разрешены элементы β-складчатых структур (β5, β10, β11, β14). С другой стороны, в структуре, определенной методом ЯМР в растворе, формирование α-спирали наблюдалось на четыре аминокислотных остатка длиннее (Рис. 84). Наибольшее различие в структурах наблюдается между общим положением домена I (остатки 1–64) относительно доменов II (остатки 65–126) и III (остатки 127–185).

Сравнение структуры EF-P из *S. aureus* с данными полученными для других организмов (*T. thermophilus*, код PDB: 1UEB; *P. aeruginosa*, код PDB: 3OYY; *C. thermocellum*, код PDB: 1YBY; *E. coli*, код PDB: 6ENJ) также указывает на различия в положении первого домена, что вместе с полученными нами, данными из релаксационных экспериментов ЯМР ^1H - ^{15}N T_1/T_2 и наличии быстрого химического обмена протонов, говорит о подвижности данной части белка (Рис. 84). Наибольшее отклонение положения домена I белка EF-P наблюдалось для *S. aureus* и *C. thermocellum*. Выравнивание аминокислотных последовательностей EF-P из *S. aureus*, *B. subtilis*, *C. thermocellum*, *E. coli*, *T. thermophilus* и *P. aeruginosa* показывает, что, несмотря на очень сходную топологию для доменов II и III, аминокислотная последовательность домена III гораздо более консервативна среди видов бактерий, чем у домена II (Рис. 84). В последовательности EF-P из *S. aureus* в концевой петле домена I присутствует консервативный мотив PGKG, в котором у ряда организмов имеются различные посттрансляционные модификации на остатке Lys32. Длина данной петли у EF-P из *S. aureus*, такая же, как и у EF-P других сравниваемых организмов. Для ответа на вопрос, имеется ли посттрансляционная модификация данного остатка в EF-P из *S. aureus*, было решено выделить данный белок из клеток *S. aureus* и проанализировать химический состав белка методом масс-спектрометрии.

5.2. Посттрансляционная модификация SaEF-P

Экспрессию белка SaEF-P с гистидиновым тагом (шесть а.о. His) на C-конце в клетках *S. aureus*. проводили на основе оптимизированного протокола для *E. coli* и очищали методом металлохелатной аффинной хроматографии и эксклюзионной хроматографии. Полученный образец анализировали методом электрофоретического анализа. Образец белка вырезали из ПААГ и анализировали методом масс-спектрометрии.

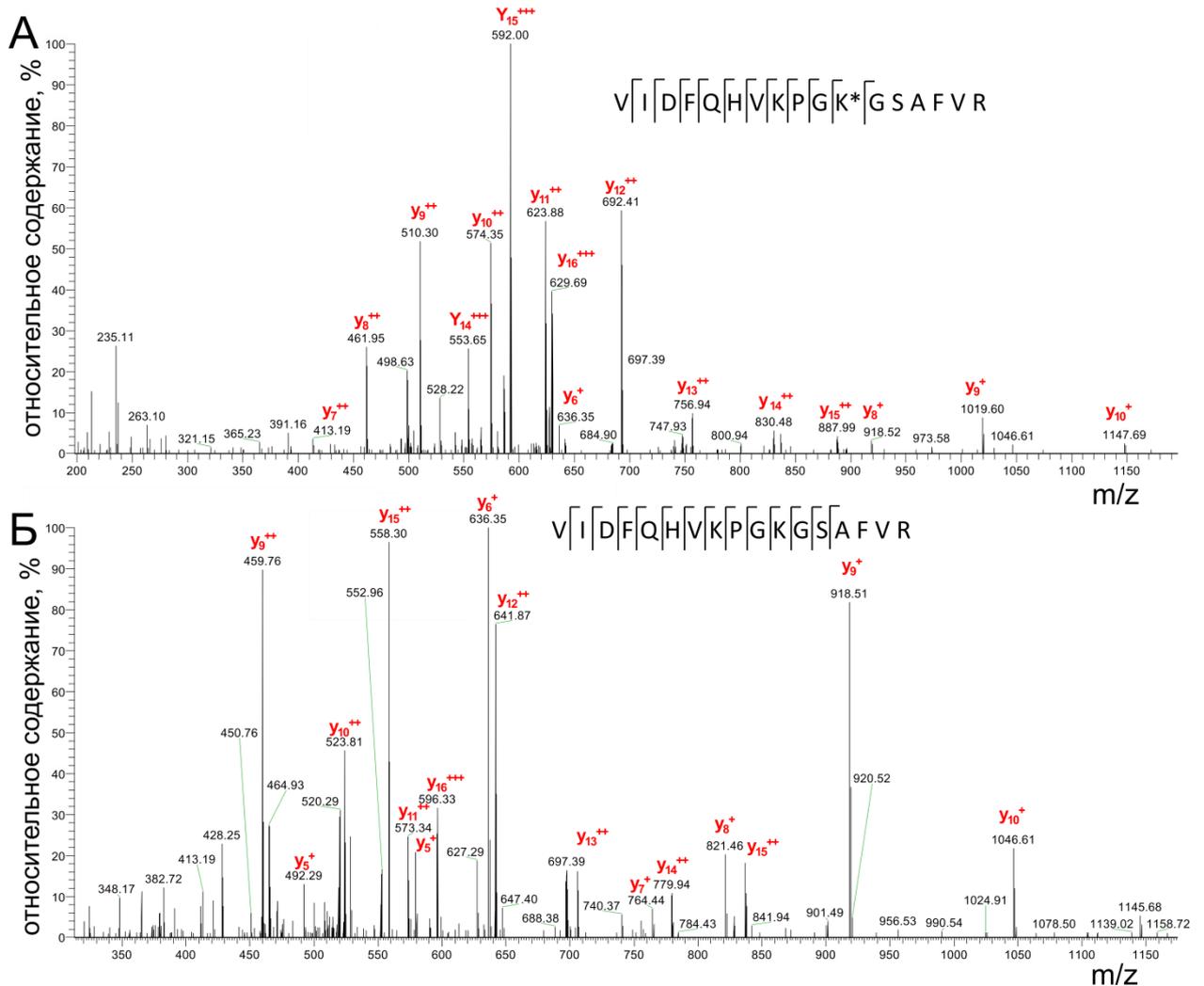


Рисунок 85. Результаты масс-спектрометрического анализа EF-P из *S. aureus*. А: спектр пептида с 5-аминопентанолом на K32; Б: спектр пептида без модификации остатка K32. приведена над спектрами, * - отмечен остаток K32. Серия пиков у-ионов пептида свидетельствует о 5-аминопентанолировании лизина в положении 32. По оси абсцисс отмечены значения отношения массы к заряду m/z.

На основе протеомного анализа «по восходящей» (в англоязычной литературе bottom-up), было идентифицировано две формы пептида с последовательностью VIDFQHNVKPGKGS AFVR (Рис. 85): с модификацией 5-аминопентанолом аминокислотного остатка K32 (1986,12 Да) и без него (1885,04 Да. Разность масс 101,08 Да). Поскольку были обнаружены две формы пептида, можно заключить, что модификация в виде 5-аминопентанола остатка K32 присутствует только у некоторой доли EF-P в клетке. Однако используемый метод не дает информации об относительном

соотношении модифицированного и не модифицированного пептида, поскольку модификация лизина влияет на эффективность ионизации.

Таким образом, результаты наших экспериментов показали, что фактор элонгации EF-P у *S. aureus* имеет посттрансляционную модификацию в виде 5-аминопентанола в положении K32 в высоко консервативном мотиве PGKG домена I. Этот результат позволяет расширить данные о недавно обнаруженных возможных ферментах модифицирующих EF-P и на *S. aureus* [349]. Для детального изучения данного явления возможно создание плазмиды для совместной экспрессии EF-P с модифицирующими ферментами, что позволит получать полностью модифицированный EF-P из *S. aureus* в достаточном количестве для структурных исследований. Также остается открытым вопрос как 5-аминопентанол структурно участвует в синтезе полипролина. На сегодняшний день отсутствует информация о точном расположении гидроксильной группы в модификации 5-аминопентанол [350], что не позволяет установить, участвует ли гидроксильная группа непосредственно в процессе синтеза полипролина. Также неизвестно насколько значимо отсутствие функционального белка EF-P будет влиять на выживаемость *S. aureus*, однако, по аналогии с другими организмами, можно предположить, что недостаток функционального белка EF-P может приводить к снижению выживаемости микроорганизмов и к потере вирулентности. Полученные результаты могут использоваться для разработки новых антистафилококковых препаратов направленных на ингибирование работы EF-P и модифицирующих его белков.

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

Одним из перспективных направлений поиска новых потенциальных мишеней для разработки антистафилококковым препаратов является выявление молекулярных аспектов строения рибосомы золотистого стафилококка и деталей ее взаимодействия с мРНК и тРНК. В данной главе описываются результаты исследований структуры рибосомы *S. aureus* с лигандами (мРНК, тРНК^{фМет}) методом криогенной просвечивающей электронной микроскопии. Полученные с высоким разрешением данные крио-ЭМ позволили визуализировать детали взаимодействия биомакромолекул в функциональных центрах рибосомы (ПТЦ и декодирующий центр), а также идентифицировать положение посттранскрипционных модификации рРНК. В качестве мишеней для разработки антибактериальных препаратов могут выступать ферменты, участвующие в образовании посттранскрипционных модификаций рРНК, поскольку ингибирование их работы может привести к нарушению в строении активных сайтов рибосомы и остановке биосинтеза белка у золотистого стафилококка.

6.1. Определение пространственной структуры комплекса 70S рибосомы *S. aureus* с мРНК и тРНК^{фМет}

Комплекс, состоящий из 70S рибосомы *S. aureus*, мРНК (5'-GGCAAGGAGGUAAAAAUGGUAAAAA-3'), тРНК^{фМет} и EF-P получали *in vitro* путем смешивания компонент на льду в соотношении 1:2,5:5:5 с концентрацией рибосом 60 нМ. Сначала к 70S рибосомам добавляли мРНК и инкубировали смесь при 37 °С в течение 15 минут. Затем добавляли тРНК^{фМет} и инкубировали смесь при 37 °С в течение 15, вносили EF-P и вновь инкубировали смесь при 37 °С в течение 15 минут и наносили

на сетки для крио-ЭМ. Регистрацию данных проводили на электронном микроскопе Titan Krios производства FEI. Для построения модели были взяты структуры 70S рибосом из модели PBD ID 5LI0, Р-тРНК и мРНК из модели элонгационного комплекса *T. thermophilus* (PBD ID 4V6F). Полученная модель была вначале вписана в электронную плотности вручную в программе Chimera, а затем с использованием программы Phenix (real-space refinement). Уточнение модели проводилось в программе COOT вручную. Для валидации модели мы использовали сервер MolProbity и model-to-map корреляцию в Phenix.

После 3D классификации мы не получили классов с плотностью в том месте, где согласно литературным источникам должен находиться EF-P - на границе E- и P- сайтов. Мы провели дополнительную классификацию с маской в месте, где должен связываться EF-P, и нашли два класса с небольшим количеством частиц, которые содержали дополнительные плотности (Рис. 86). Крио-ЭМ частиц, содержащих EF-P, было недостаточно для установления структуры комплекса с EF-P с высоким разрешением, однако дальнейшая обработка набора данных позволила установить структуру рибосомы *S. aureus* в комплексе с Р-тРНК и мРНК (без EF-P) с разрешением 3.2 Å (Рис. 86 и 84, Таб. 3.8). Для большей части структуры, и в частности для функциональных центров (ПТЦ и декодирующий центр) разрешение составило 2,8 Å, что позволяет визуализировать детали взаимодействия в функциональных центрах рибосомы, а также модификации рРНК (Рисунок 87 В, Г, Д). Данные депонированы в международную базу данных PDB с кодом 6YEF.

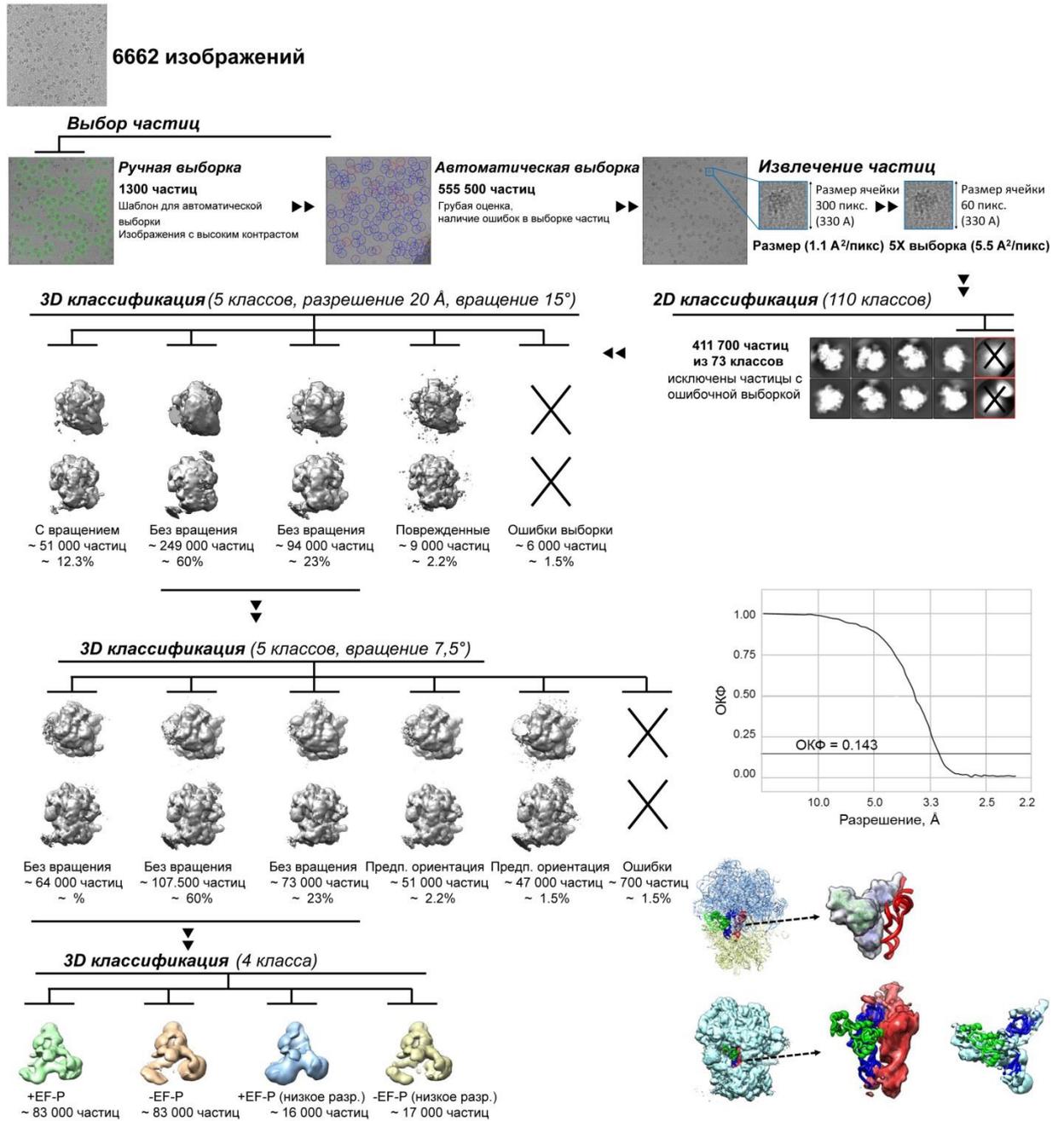


Рисунок 86. Классификация частиц в данных крио-ЭМ рибосомы *S. aureus* с SaEF-P, мРНК и тРНК^{фМет}.

Таблица 3.8. Данные крио-ЭМ 70S рибосомы *S. aureus* с мРНК и тРНК^{фМет}. Параметры эксперимента и статистические характеристики уточнения структур.

Сбор данных	
Микроскоп	Titan Krios S-FEG
Камера	CMOS (Gatan K2)
Напряжение (кВ)	300

Продолжение Таблицы 3.8.

Увеличение	96,000 X
Размер пикселя (Å/пиксель)	1,10
Диапазон дефокусировки (мкм)	(-1,5) – (-3,3)
Суммарная доза облучения ($\bar{\epsilon}/\text{Å}^2$)	60
Доза на кадр	~ 1,5
Уточнение структуры	
Общее число частиц	6662
Число частиц, используемое для 3D реконструкции	80 000
Разрешение (Å; ОКФ = 0.143)	3,2
Среднеквадратичные отклонения	
Длин связей (Å)	0,007
Углов связей (°)	0,901
Хиральности (°)	0
Атомов СА основной цепи	27 (0,53%)
Подтверждение структуры	
Число стерических перекрытий атомов (> 0.4 Å на 1 000 атомов)	2,52
<i>Белки</i>	
оценка MolProbity	1,39
Наиболее предпочтительных ротамеров	4191 (92,95%)
Статистика Рамачадрана	
Наиболее предпочтительная область (%)	4956 (94,94%)
Запрещенная область (%)	1 (0,02%)
Число некорректных водородных связей	0 (0,00%)
Число некорректных двугранных углов	30 (0,05%)
Цис-пролиновых остатков	0 (0,00%)
Цис-не пролиновых остатков	0 (0,00%)
<i>РНК</i>	
Корректное положение изломов плоскости углеводного кольца	12 (0,28%)
Корректные конформации атомов основной цепи	952 (20,60%)
Число некорректных водородных связей	1 (0,00%)
Число некорректных двугранных углов	8 (0,00%)

Полученная структура комплекса соответствует 70S инициаторному комплексу, сформированному до того как происходит аккомодация комплекса EF-Tu*тРНК в А-сайте. В структуре комплекса хорошо разрешены контакты между парами оснований последовательностей Шайна-Дальгарно и анти-Шайна-Дальгарно; взаимодействие AUG кодона и антикодона тРНК в Р-сайте, а также с высоким разрешением видна структура вакантного для связывания с тРНК А-сайта

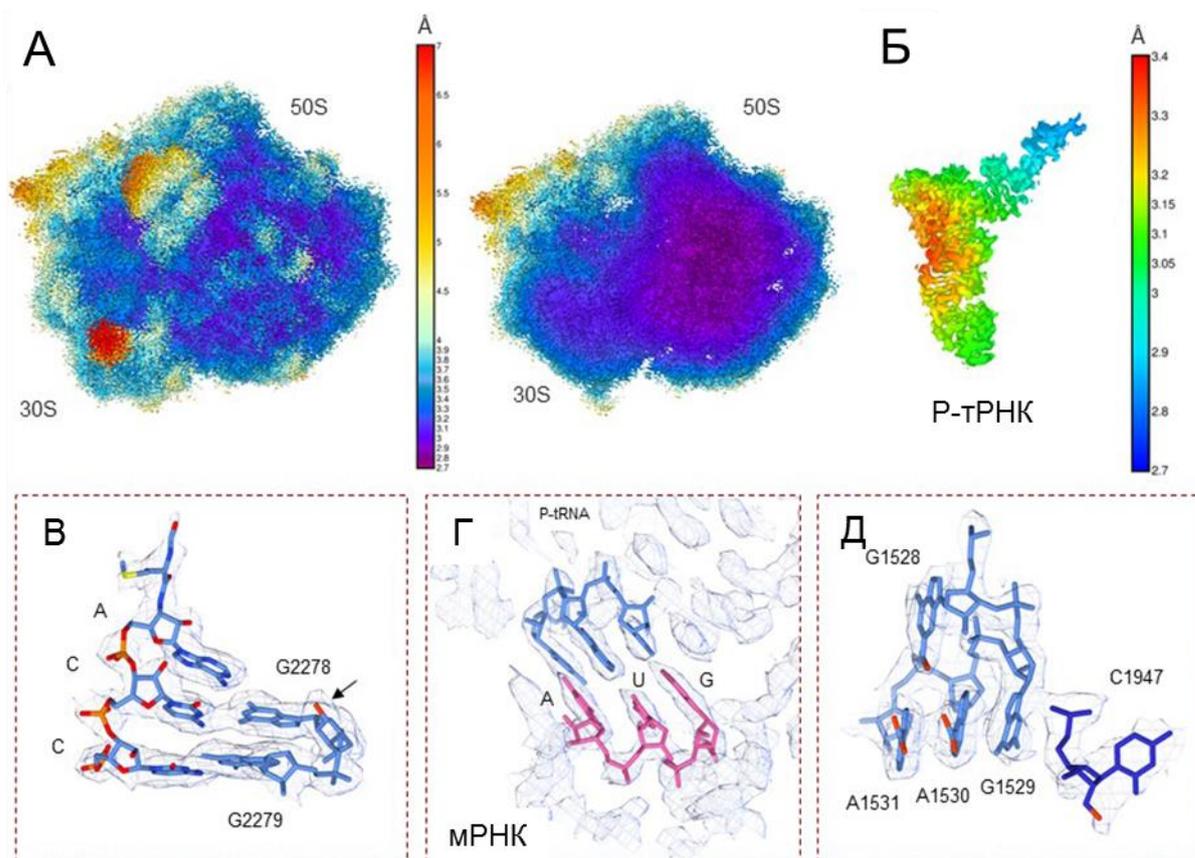


Рисунок 87. Структура рибосомы *S. aureus* с мРНК и тРНК^{фМет}. А: Распределение разрешения в структуре рибосомы *S. aureus*, определенной методом крио-ЭМ. Справа вид в разрезе. Б: Карта электронной плотности Р-тРНК с отображенным локальным разрешением. В, Г, Д: области карты электронной плотности с высоким разрешением (В: ССА-конец Р-тРНК; Модифицированный нуклеотид G2278 взаимодействует с цитозином С75 тРНК, модификация показана оранжевым цветом и стрелкой; Г: качество карты электронной плотности в центре декодирования, мРНК показана пурпурным, Р-тРНК - синим; Д: Сильно модифицированный кластер нуклеотидов вблизи центра декодирования, модификации окрашены в оранжевый цвет).

Установленная структура дополняет полученные ранее структуры рибосомных комплексов бактерий в различных состояниях, что дает возможность провести сравнительный анализ аналогичных состояний трансляции рибосом из разных видов бактерий: 70S рибосомы (PDB: 5LI0) и 70S рибосомы с Е-тРНК, Р-тРНК и мРНК из *S. aureus* (PDB: 5TCU), 70S рибосомой с Р-тРНК и мРНК из *B. subtilis* (PDB: 3J9W) и 70S рибосомой с Е-тРНК, Р-тРНК и мРНК (PDB: 4V6G) из *T. Thermophilus*.

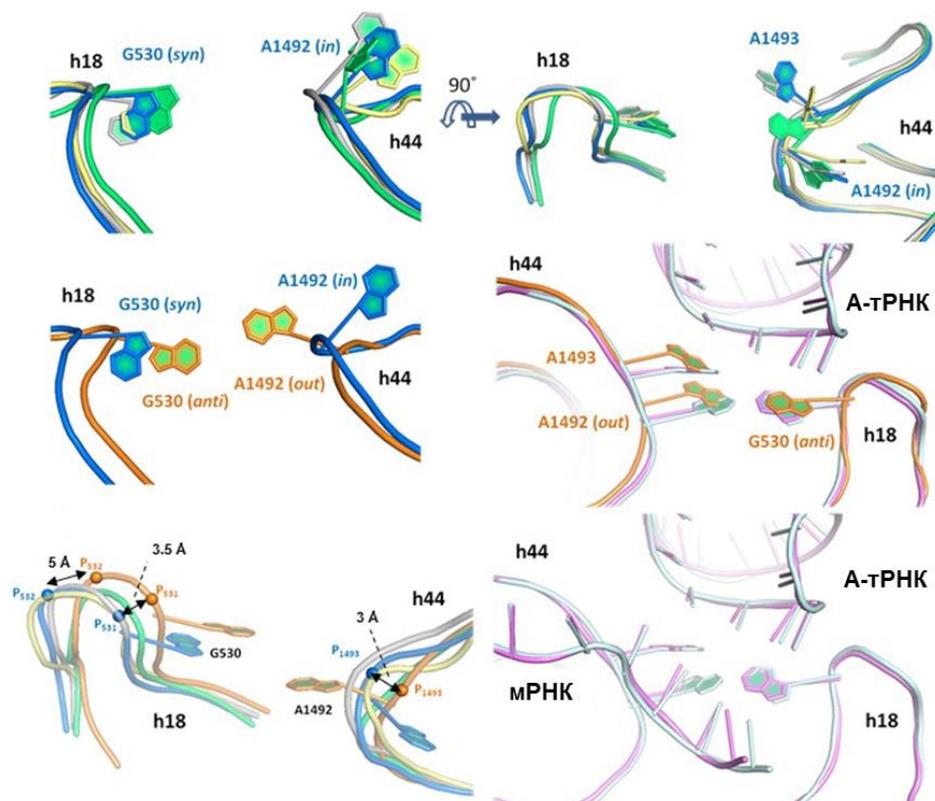


Рисунок 88. Расположение спиралей h18 и h44 16S рРНК в структуре 70S рибосом: синим, показана структура полученного нами комплекса *S. aureus*, серым - 70S рибосома с Р-тРНК и мРНК из *B. subtilis* (PDB: 3J9W), зеленым - 70S рибосома с Е-тРНК, Р-тРНК и мРНК из *T. Thermophilus* (PDB: 4V6G), оранжевым - 70S рибосома с Е-тРНК, Р-тРНК и мРНК из *S. aureus* (PDB: 5TCU), желтым – вакантная 70S рибосома *S. aureus* (PDB: 5LI0). А, Б: Сходства и различия в положении 16S рРНК в сравниваемых моделях. В: Движения спиралей h18 и h44 в сравниваемых структурах. Были рассчитаны расстояния между фосфатами (P) сахарофосфатного остова 16s рРНК. Г: Сравнение элонгационных комплексов рибосом с А-тРНК (4V5C, бледно-голубой), (4V7L, пурпурный) и без (5TCU, оранжевый). Д: Кодон-антикодонное взаимодействие А-тРНК и мРНК в структурах 4V5C (бледно-голубой) и 4V7L (пурпурный).

Основные отличия наблюдались в положении подвижной спирали h18 рРНК (Рис 88). В нашей структуре спираль h18 имеет то же положение, что и в вакантной 70S рибосоме *S. aureus* и в модели из *B. subtilis* с тРНК в Р-сайте. Похожее небольшое смещение h18 в сторону h44 наблюдалось и в модели рибосомы *T. thermophilus*. Для всех этих моделей нуклеотид G530 в спирали h18 наблюдается в син конформации и нуклеотид A1492 в спирали h44 не выпетлен, что соответствует состоянию инициации. В этих структурах нуклеотид A1493 в целом находится в неупорядоченном состоянии. В

отличие от структуры с E- и P-тРНК из *S. aureus*, G530 из спирали h18 находится в анти конформации и смещен в направлении выпетленного нуклеотида A1492 спирали h44. Такие конформации нуклеотидов соответствуют состоянию элонгации, однако в полученной нами модели сайт A-тРНК оказался пустым. По всей вероятности, структура центра декодирования в модели E-тРНК, P-тРНК и мРНК из *S. aureus* (PDB: 5TCU) из работы [351] отличается от общепринятой. Сравнение структуры 30S субъединицы рибосомы *S. aureus* с тРНК в E- и P-сайтах (PDB: 5TCU) и 30S субъединиц с E, P и A тРНК из *T. thermophilus* (PDB: 4V5C, 4V7L) демонстрирует те же положения спиралей и нуклеотидов. Вероятно, переход от комплекса инициации с пустым A-сайтом к элонгационному комплексу с тРНК в A-сайте сопровождается движением спирали h18 16S рРНК по направлению к повернутому нуклеотиду A1492 из спирали h44. Такое положение нуклеотида A1492 стабилизируется за счет стекинг взаимодействия с A1493. Таким образом, нуклеотиды A1492 и G530 способствуют корректному кодон-антикодновому взаимодействию между мРНК и A тРНК. Однако движение спирали h18 не приводит к сходимости сахарофосфатных остовов h44 и h18, за счет сдвига, обеспечиваемого вращением A1492.

6.2. Посттранскрипционные модификации рРНК *S. aureus*

Моделирование и отнесение модификаций рРНК были основаны на анализе карты электронной плотности, определенной методом крио-ЭМ. Утверждение о наличии модификации нами принималось, только если в карте электронной плотности она была хорошо разрешена, а также, если ее расположение соответствовало ранее экспериментально подтвержденным другими методами модификациям наблюдаемых в рибосомах *E. coli* и *T. thermophilus*. В полученной модели удалось найти 10 сайтов модификаций рРНК *S. aureus* (Рис. 89, 90). Также анализ полученной структуры показал возможность наличия нескольких дополнительных модификаций рРНК, для

которых ранее отсутствовали экспериментальные данные. Общий обзор всех установленных в данной работе модификаций рРНК приведен в таблице 3.9.

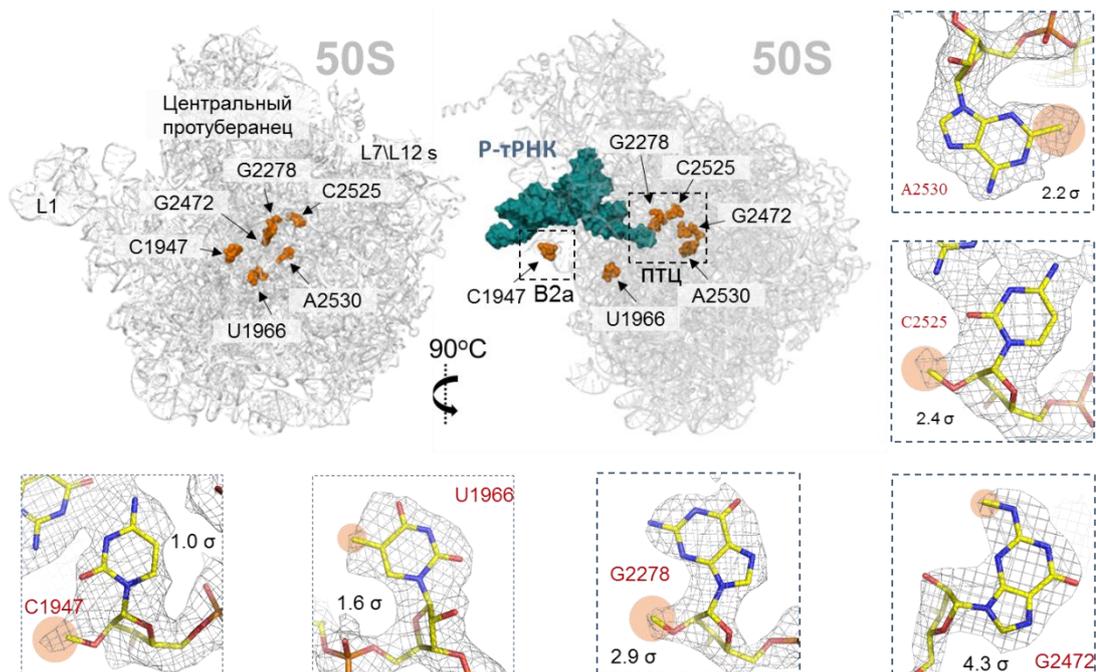


Рисунок 89. Модификации рРНК в 50S субъединице *S. aureus*. В квадратах показаны области карты электронной плотности. Модификации отмечены оранжевыми кругами.

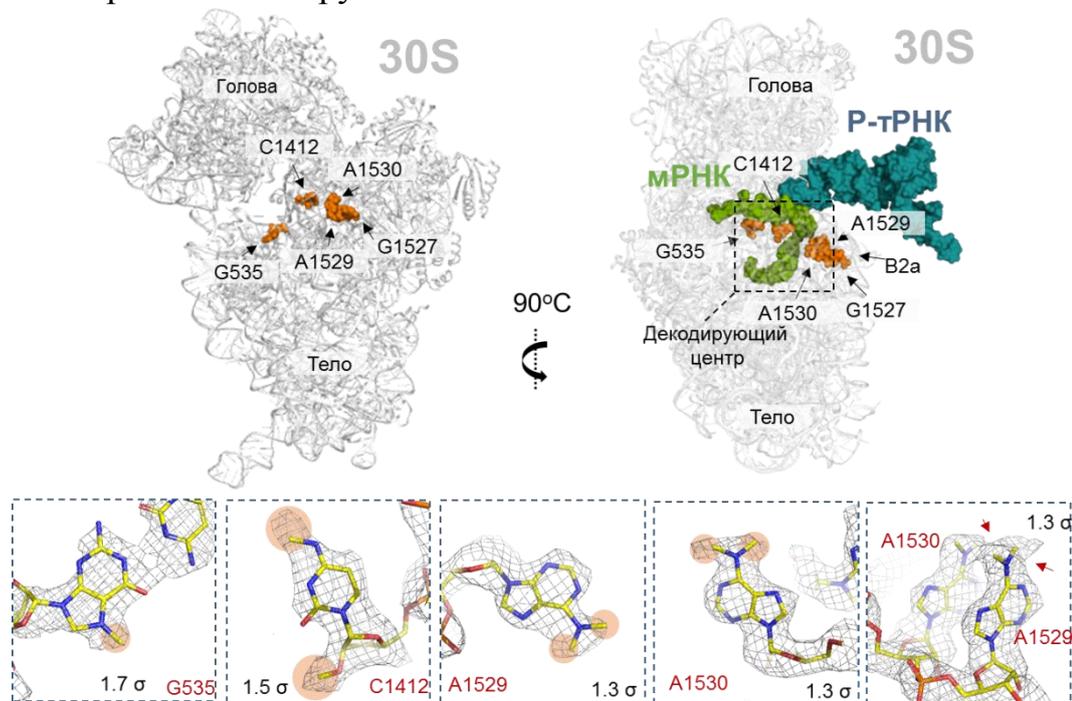


Рисунок 90. Модификации рРНК в 30S субъединице *S. aureus*. В квадратах показаны области карты электронной плотности. Модификации отмечены оранжевыми кругами.

Таблица 3.9. Модификации рРНК *S. aureus*.

Положение в <i>E. coli</i>	Положение в <i>S. aureus</i>	Тип модификации	Расположение модификации	Модифицирующий фермент в <i>E. coli</i>	Возможный модифицирующий фермент в <i>S. aureus</i> (% гомологии с <i>E. coli</i> , если не указано иное)	Результаты нокаута и возможности для ингибирования модификации
23S рРНК						
-	C1947	2'-О-Метилцитидин	H69, межсубъединичный мостик	-	SQA11259.1 (48,36 % <i>M. tuberculosis</i> XYZ)	<i>M. tuberculosis</i> метилтрансфераза tlyA является фактором вирулентности и участвует в гемолитической деятельности [352, 353].
U1939	U1966	5-Метилуридин	ПТЦ, А-сайт	RlmD	WP_037590442.1 (28,82 %)	Инактивация метилтрансферазы <i>E. coli</i> оказывает умеренное влияние на рост клеток [354, 355].
G2251	G2278	2'-О-Метилгуанозин	ПТЦ, Р-сайт	RlmB	WP_072490807 (38,62 %)	Консервативен во всех царствах жизни. Удаление RlmB в <i>E. coli</i> приводит к незначительным изменениям в фенотипе [57].
G2445	G2472	N2-Метилгуанозин	ПТЦ	RlmKL	WP_037588129.1 (32,63 %) 38,76 % <i>N. meningitidis</i> RlmK 32,79 % <i>N. meningitidis</i> RlmL	Нокаут гена метилтрансферазы снижает скорость роста <i>E. coli</i> [356].
C2498	C2525	2'-О- Метилцитидин	ПТЦ, ССА-конец Р-тРНК	RlmM	Не обнаружен	Не оказывает значительного влияния на рост клеток [357].
A2503	A2530	2-Метиладенозин	ПТЦ, А-сайт	RlmN	WP_061395092 (37,79%)	Консервативен во всех царствах жизни. Восприимчивость к антибиотикам в ПТЦ.

Продолжение таблицы 3.9.

Положение в <i>E. coli</i>	Положение в <i>S. aureus</i>	Тип модификации	Расположение модификации	Модифицирующий фермент в <i>E. coli</i>	Возможный модифицирующий фермент в <i>S. aureus</i> (% гомологии с <i>E. coli</i> , если не указано иное)	Результаты нокаута и возможности для ингибирования модификации
16S рРНК						
G527	G535	N7- Метилгуанозин	A-сайт, сайт связывания стрептомицина	RsmG	WP_025906214.1 (35,58 %)	Улучшение роста в некоторых условиях [358], устойчивость к стрептомицину [359, 360].
C1402	C1412	N4, O 2' Диметилцитидин	P-сайт, декодирующий центр	RsmH, RsmI	WP_156980516.1 (43,96 %)	Консервативен во всех царствах жизни. Отсутствие метилирования основания повышает эффективность использования AUU кодона в качестве иницирующего. Мутация цитозина в этой позиции приводит к снижению скорости роста [361].
A1518	A1529	N6- Диметиладенозин	P-сайт, декодирующий центр	KsgA	WP_153158791.1 (34,87 %)	Консервативен во всех царствах жизни. Вызывает дефицит метилирующих структур в декодирующем центре [60]. Удаление гена метилтрансферазы в <i>E. coli</i> снижает точность инициации трансляции и элонгации [63], снижается скорость роста клеток и повышается устойчивость к касугамицину, который действует на инициацию трансляции [362]
A1519	A1530					

Модификации 23S рРНК *S. aureus*

В полученной карте электронной плотности большой субъединицы рибосомы наблюдалось наличие шести сайтов модификации. Мы нашли электронную плотность соответствующую метильной группе в 2'-О рибозе нуклеотида С1947. Метилированный нуклеотид С1947 находится в функционально важном положении - в области межсубъединичного моста В2а, в которой петля h69 23S рРНК контактирует с h44 16S рРНК. Многие бактерии, включая *E. coli*, не имеют этой модификации, потому что они не обладают соответствующей 2'-О-метилтрансферазой *tlyA* [363]. Было показано, что TlyA действует как фактор вирулентности и, вероятно, участвует в биогенезе рибосом и гемолитической активности [352, 353, 364]. Несмотря на то, что инактивация *tlyA* приводит к устойчивости к капреомицину и виомициновым антибиотикам [363], это может выступать в качестве потенциальной мишени для исследований ингибирования рибосом *S. aureus*, так как данный белок участвует в вирулентности и основных биохимических процессах. Функции гомолога TlyA у *S. aureus* до сих пор не изучены.

В карте электронной плотности нуклеотида U1966 наблюдается характерный излом, который формирует пространство для метильной группы в положении С5. Данный нуклеотид может взаимодействовать с аминоксильным концом тРНК в А-сайте. Метилтрансфераза RlmCD в *B. subtilis* модифицирует нуклеотиды U747 и U1939 в 23S рРНК [354], так что вполне вероятно, что *S. aureus* также обладает данной метилтрансферазой в отличие от *E. coli*. Мы наблюдали плохо разрешенную дополнительную электронную плотность для возможной модификации в позиции U792 (что соответствует нуклеотиду U747 в *E. coli*), но полученные экспериментальные данные не позволяют сделать однозначный вывод о наличии данной модификации в этом положении. Возможно дальнейшие исследования

аналога RlmCD у *S. aureus* позволят выявить наличие модификации нуклеотида U792.

Мы также нашли электронную плотность, которая, возможно, соответствует метильной группе на 2'-О рибозе нуклеотида G2278. Модифицированный нуклеотид G2278 располагается в ПТЦ в Р-петле 23S рРНК и напрямую связан с ССА концом Р-тРНК. Модификация расположена с другой стороны от Р-тРНК в непосредственной близости от трех нуклеотидов U2476, C2092 и A2477. Модификация, вероятно, может играть роль в правильном размещении Р-тРНК, поддерживая конформацию взаимодействующих нуклеотидов. Несмотря на положение модификации в важном функциональном центре, удаление гена *rlmB* не приводит к существенным отличиям в фенотипе [57].

Недалеко от предыдущей модификации наблюдается электронная плотность для дополнительной метильной группы в положении N2 нуклеотида G2472. Модифицированный нуклеотид G2472 расположен в спирали h74 23S рРНК рядом с ПТЦ. Нуклеотид G2472 образует комплементарную пару с нуклеотидом C2092, который находится в непосредственной близости от ССА конца Р-тРНК. Метильная группа может ослабить водородную связь между N2 нуклеотида G2472 и O2 нуклеотида C2092, тем самым косвенно повлиять на стабильность области ПТЦ [356]. С другой стороны, модификация также может косвенно влиять на взаимодействие с остатком Arg74 белка L4. В *E. coli* фермент RlmKL модифицирует как нуклеотид G2445 (эквивалентно G2472 у *S. aureus*), так и нуклеотид G2069 [365]. В наших данных мы не смогли обнаружить наличие модификации в позиции нуклеотида G2096 (соответствующей G2069 в *E. coli*), возможно, из-за низкого разрешения карты электронной плотности в этой области. Стоит отметить, что в сходстве с бактериями рода *Neisseria* у *S. aureus* могут существовать два отдельных белковых гомолога RlmK и RlmL, соответствующих двум различным доменам метилтрансферазы RlmKL [365].

В той же области карты электронной плотности хорошо видно наличие модификации в 2'-О рибозы C2525 (Рис. 89). Модифицированный нуклеотид C2525 находится в пептидилтрансферазной петле. Он взаимодействует с A2524, который расположен в непосредственной близости от белка L16 и ССА конца Р-тРНК. Благодаря этому взаимодействию модифицированный нуклеотид C2525 может влиять на связывание Р-тРНК. Также вероятно, что модификация может влиять на конформацию нуклеотида C2525. Важность данной модификации в *S. aureus* остается неясной, однако исследования делеции гена метилтрансферазы RlmM, которая модифицирует нуклеотид C2498 в *E. coli*, не показали значительного влияния на рост клеток [357].

Высокое разрешение карты электронной плотности в области ПТЦ позволило установить наличие модификации в позиции нуклеотида A2530 в виде дополнительной метильной группы. Модифицированный нуклеотид A2530 находится в функционально важном месте ПТЦ. Он создает часть кармана связывания А-сайта для боковой цепи аминокислоты А-тРНК. Модификация, вероятно, усиливает взаимодействие между нуклеотидами A2086 и A2530, и таким образом, вероятно, стабилизирует петлю рРНК в ПТЦ, которая формирует стенку пептидного туннеля. Удаление гена соответствующей метилтрансферазы YfgB/RlmN изменяет точность трансляции в *E. coli* [366] и дает незначительное увеличение чувствительности к ряду пептидилтрансферазных антибиотиков [367]. В клинических изолятах *E. coli* дополнительное метилирование A2503 метилтрансферазой Cfr обеспечивает устойчивость к широкому спектру антибиотиков связывающихся с ПТЦ [368, 369]. Ранее в работе [367] было предположено, что у *S. aureus* по аналогии с *E. coli* должна быть метильная модификация в положении нуклеотида A2503 23S рРНК. Однако авторы по ошибке указали, что модификация находится в той же (а не в эквивалентной) позиции нуклеотида A2503 в *E. coli*. Основываясь на наших данных, мы подтвердили наличие модификации в виде метилирования нуклеотида A2530 у *S. aureus*, который структурно эквивалентен положению A2503 в *E. coli*.

У *S. aureus* имеется модифицирующий белок OrfX, который является гомологом YbeA, чья функция заключается в метилировании рРНК на конце шпильки 69 (нуклеотид U1915 в *E. coli*). Для *S. aureus* было показано, что OrfX участвует в метилировании 70S рибосомы [370]. Установлено, что потеря OrfX у бактерий не влияет на процессы выживаемости, роста и восприимчивость к оксациллину *in vitro*. Модификация нуклеотида U1942 (эквивалент U1915 в *E. coli*), по-видимому, присутствует и у *S. aureus*, однако качество наших данных не позволяет нам однозначно установить наличие модификации. Поскольку активность YbeA требует предварительного превращения нуклеотида в псевдоуридин [371], вероятно, должна присутствовать модификация псевдоуридина U1942 у *S. aureus*. Таким образом, в *S. aureus* должен присутствовать, гомолог псевдоуридинсинтазы RluD, модифицирующий три сайта (Ψ1911, Ψ1915 и Ψ1917 в *E. coli*), которые расположены на границе раздела субъединиц и взаимодействуют с тРНК в Р- и А-сайтах. Таким образом, в виду важности данного кластера из трех модификаций гомолог RluD может быть подходящей мишенью для исследований ингибирования трансляции *S. aureus*.

Метилирование рибозы в положении нуклеотида U2579 (U2552 в *E. coli*) является одной из наиболее консервативных модификаций, обнаруженных во всех трех царствах жизни. Эта модификация находится в важном функциональном центре, а именно, в А-петле 23S рРНК и может влиять на связывание aa-тРНК с А-сайтом [372]. Дефицит соответствующего модифицирующего фермента RlmE приводит к серьезным нарушениям в фенотипе *E. coli* [373]. Скорее всего, модификация также присутствует в рибосоме *S. aureus*, однако, хотя карта электронной плотности крио-ЭМ в этой области достаточно высокого качества, мы не смогли с уверенностью определить ее наличие. Мы предполагаем, что гомолог RrmE у *S. aureus* может быть многообещающей мишенью для разработки ингибиторов трансляции.

Модификации 16S рРНК S. aureus

Разрешение карты электронной плотности в области малой субъединицы рибосомы позволило нам обнаружить пять сайтов модификации. Модифицированный нуклеотид G535 (эквивалент G527 в *E. coli*) расположен в петле спирали h18 рядом с А-сайтом 30S субъединицы и сайтом связывания стрептомицина. Метилированный нуклеотид образует Уотсон-Криковскую пару с нуклеотидом C530, а метильная группа занимает положение возле остатка Asn59 белка uL9. В клетках *E. coli* стрептомицин связывается с четырьмя различными участками 16S рРНК, включая нуклеотиды G526 и G527 [360]. Одним из перспективных направлений исследований является установление роли модификации G535 у клеток *S. aureus* в приобретенной устойчивости к стрептомицину.

Другой модифицированный нуклеотид расположен в h44 16S рРНК в центре Р-сайта и непосредственно связывается с кодоном мРНК. Согласно карте электронной плотности с высоким разрешением в данной области нуклеотид C1413 содержит две высоко консервативные модификации: 2'-О-метилирование рибозы и метилирование основания в положении N4. Метильная группа в N4 непосредственно связывается с центральным нуклеотидом Р-кодона. Метилирование основания также может быть важным для взаимодействия нуклеотида C1413 с нуклеотидом A1512. Метилирование рибозы, возможно, играет роль в формировании третичной структуры рРНК. Данные модификации, скорее всего, участвуют в формировании Р-сайта малой субъединицы и могут стабилизировать взаимодействия с мРНК в Р-сайте. Ранее было показано, что метилирование нуклеотида C1402 в *E. coli* необходимо для правильного позиционирования рамки считывания и распознавания старт-кодонов [361]. В настоящее время информация о значимости этих модификаций у *S. aureus* отсутствует. В непосредственной близости нуклеотида C1413 мы исследовали консервативную сильно модифицированную тринуклеотидную петлю 1528-1531, которая находится в

прямом контакте с модифицированным нуклеотидом C1947 23S рРНК (см. выше по тексту). Мы обнаружили два универсально консервативных диметилированных нуклеотида A1530 и A1531, которые находятся в стекинг-взаимодействии друг с другом, и метилированный нуклеотид G1528. Данная группа нуклеотидов находится в спирали h45, в непосредственной близости от места взаимодействия Р-тРНК с мРНК, и может быть вовлечена в формирование декодирующего центра. В соответствии с этим в работе [374] было показано, что отсутствие этих модификаций приводит к изменению структуры декодирующего центра.

Положение модифицированного нуклеотида G1207 в *E. coli* (а также G1189 в *T. thermophilus*) в нашей модели соответствует позиции нуклеотида C1218 в спирали h34, которая участвует в процессах транслокации и декодирования [375, 376]. В рибосоме *E. coli* нуклеотид G1207 взаимодействует с нуклеотидом C1051 (C1051 пространственно эквивалентен G1063 у *S. aureus*). Таким образом, у *S. aureus* имеется замена пары нуклеотидов G-C по сравнению с *E. coli* и *T. thermophilus*. На основе анализа карты электронной плотности мы предполагаем наличие метильной группы в положении N2 нуклеотида G1063 (Рис. 90). В работе [377] было показано, что замена нуклеотида G1207 на пиримидины у *E. coli* приводит к гибели клеток, поэтому исследования возможного функционального гомолога метилтрансферазы RsmC45 у *S. aureus* представляют собой интерес.

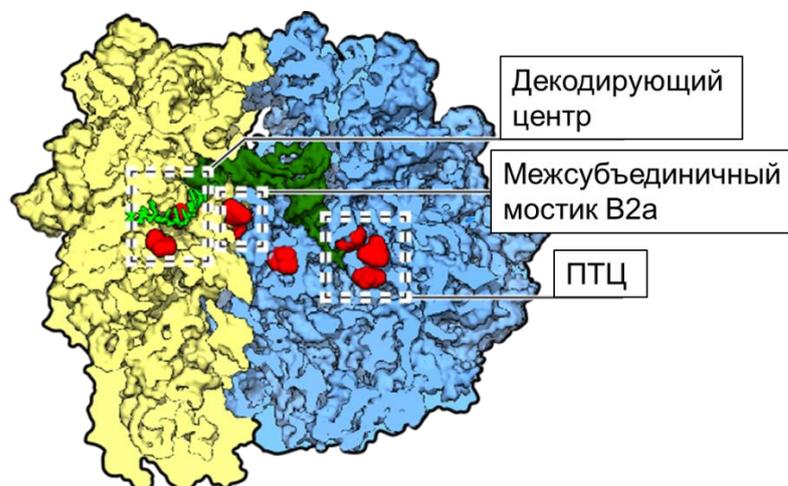


Рисунок 91. Расположение модификаций рРНК *S. aureus*.

Общий вид с расположением модификаций рРНК в структуре рибосомы *S. aureus* приведен на рисунке 91. Модифицированные нуклеотиды расположены вблизи функциональных центров рибосомы (ПТЦ, декодирующий центр и межсубъединичный мостик). Таким образом, нами была получена методом крио-ЭМ с высоким разрешением структура 70S рибосомы *S. aureus*, содержащая мРНК и Р-тРНК. Установлено наличие 10 модификаций рРНК и описано их окружение и предложены функции для некоторых из них. Мы проанализировали особенности центра декодирования у *S. aureus* и описали движение спиралей h18 и h44 при переходе в состояние элонгации. Полученные результаты закладывают базис для дальнейших исследований модификаций рРНК у *S. aureus*, функций метилтрансфераз *S. aureus* и механизмов устойчивости к антибиотикам.

Заключение

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 удлинённой формы белка HRF с рибосомой. Показано, что связывание N-концевого домена фактора гибернации SaHRF 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 макромолекулярная кристаллография, спектроскопия ЯМР, криогенная просвечивающая электронная микроскопия) впервые установлено, что аминокислотные остатки F160, V162, I173, Y175, I185 играют ключевую роль в димеризации белка SaHRF 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.

Совокупность результатов, представленных в диссертации, позволили существенно расширить знания в области механизмов биосинтеза белка у золотистого стафилококка; интерпретировать новые молекулярные механизмы, лежащие в основе его устойчивости к антибиотикам; получить новую информацию о механизме антибактериальных пептидов протегринов, активных в отношении штаммов золотистого стафилококка.

Благодарности

Автор выражает благодарность родителям, супруге, родным и друзьям за поддержку во время осуществления работы.

Хочу особо поблагодарить научных консультантов Юсупова Марата Миратовича и Клочкова Владимира Васильевича за возможность работы над интересным проектом, за постановку научной задачи, продуктивное обсуждение процесса и результатов работы, за постоянное внимание, личную поддержку и участие, а также за организацию стажировок в Институте генетики, молекулярной и клеточной биологии (IGBMC, г. Страсбург, Франция). Валидову Шамилю Завдатовичу за всевозможную помощь в работе по клонированию белков. Хусаинову Искандеру Шамилевичу за помощь при регистрации и обработке данных криоэлектронной микроскопии. Фатхуллину Булату Фаязовичу за помощь в определении структур белков методом кристаллографии.

Выражаю благодарность всем своим коллегам по лаборатории Структурной биологии Института фундаментальной медицины и биологии КФУ за плодотворное обсуждение результатов экспериментов и теплую дружественную атмосферу в коллективе.

Выражаю благодарность заведующему кафедрой медицинской физики Института физики КФУ Аганову Альберту Вартановичу, преподавателям и сотрудникам кафедры и лаборатории ЯМР Института физики за поддержку во время работы над диссертацией и помощь в организации экспериментов по спектроскопии ЯМР.

За финансовую поддержку работы автор выражает благодарность : Министерству образования и науки РФ (государственное задание КФУ на 2012-2014 гг., проектное финансирование 2014-2015 гг. – Глава 3) Российскому научному фонду (грант 16-14-10014 – Глава 4.; грант 17-74-20009 – Главы 5 и 6), программе «5-100» (за стажировки и конференции), посольству Франции в России (стипендия им. И.И. Мечникова).

Список цитируемой литературы

1. Molecular epidemiology and antibiotic resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* circulating in the Russian Federation / V. Gostev, A. Kruglov, O. Kalinogorskaya et al. // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2017. – Vol. 53. – P. 189-194.
2. Protegrin-1: a broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with in vivo activity / D. A. Steinberg, M. A. Hurst, C. A. Fujii et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1997. – Vol. 41, N. 8. – P. 1738-42.
3. Yoshida H., Wada A. The 100S ribosome: ribosomal hibernation induced by stress // *RNA*. – 2014. – Vol. 5, N. 5. – P. 723-32.
4. Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice / J. Cavanagh, W. J. Fairbrother, A. G. Palmer, N. J. Skelton, M. Rance - New York: Elsevier Science, 2007. – 912 P.
5. Эрнст Р., Боденхаузен Дж., Вокаун А. ЯМР в одном и двух измерениях. – М.: Мир, 1990. – 711с.
6. Daragan V. A., Mayo K. H. Motional model analyses of protein and peptide dynamics using C-13 and N-15 NMR relaxation // *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. – 1997. – Vol. 31. – P. 63-105.
7. Investigation of Exchange Processes by 2-Dimensional Nmr-Spectroscopy / J. Jeener, B. H. Meier, P. Bachmann et al. // *Journal of Chemical Physics*. – 1979. – Vol. 71, N. 11. – P. 4546-4553.
8. Determination of preferred conformations of ibuprofen in chloroform by 2D NOE spectroscopy / I. A. Khodov, S. V. Efimov, V. V. Klochkov et al. // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2014. – Vol. 65. – P. 65-73.
9. Use of a combination of the RDC method and NOESY NMR spectroscopy to determine the structure of Alzheimer's amyloid A β 10-35 peptide in solution and in SDS micelles / K. S. Usachev, A. V. Filippov, O. N. Antzutkin et al. // *European Biophysics Journal*. – 2013. – Vol. 42, № 11-12. – P. 803-810.

10. Evidence of oligomerization of bovine insulin in solution given by NMR / S. V. Efimov, Y. O. Zgadzay, N. B. Tarasova et al. // *European Biophysics Journal*. – 2018. – Vol. 47, N. 8. – P. 881-889.
11. Dalgarno D. C., Levine B. A., Williams R. J. Structural information from NMR secondary chemical shifts of peptide alpha C-H protons in proteins // *Bioscience Reports*. – 1983. – Vol. 3, N. 5. – P. 443-452.
12. Wuthrich K., Billeter M., Braun W. Pseudo-Structures for the 20 Common Amino-Acids for Use in Studies of Protein Conformations by Measurements of Intramolecular Proton Proton Distance Constraints with Nuclear Magnetic-Resonance // *Journal of Molecular Biology*. – 1983. – Vol. 169, N. 4. – P. 949-961.
13. Wishart D. S., Sykes B. D., Richards F. M. The chemical shift index: a fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy // *Biochemistry*. – 1992. – Vol. 31, N. 6. – P. 1647-1651.
14. Cornilescu G., Delaglio F., Bax A. Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology // *Journal of Biomolecular NMR*. – 1999. – Vol. 13, N. 3. – P. 289-302.
15. Chemical shift assignments and the secondary structure of the Est3 telomerase subunit in the yeast *Hansenula polymorpha* / S. S. Mariasina, S. V. Efimov, O. A. Petrova et al. // *Biomolecular NMR Assignments*. – 2018. – Vol. 12, N. 1. – P. 57-62.
16. NMR assignments of the WBSCR27 protein related to Williams-Beuren syndrome / S. S. Mariasina, O. A. Petrova, I. A. Osterman et al. // *Biomolecular NMR Assignments*. – 2018. – Vol. 12, N. 2. – P. 303-308.
17. NMR assignments of the N-terminal domain of *Ogataea polymorpha* telomerase reverse transcriptase / V. I. Polshakov, O. A. Petrova, Y. Y. Parfenova et al. // *Biomolecular NMR Assignments*. – 2016. – Vol. 10, N. 1. – P. 183-187.
18. Backbone and side-chain chemical shift assignments for the ribosome-inactivating protein trichobakin (TBK) / V. V. Britikov, E. V. Britikova, A. S.

- Urban et al. // *Biomolecular NMR Assignments*. – 2020. – Vol. 14, N. 1. – P. 55-61.
19. Protein structure determination from NMR chemical shifts / A. Cavalli, X. Salvatella, C. M. Dobson et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2007. – Vol. 104, N. 23. – P. 9615-9620.
 20. Consistent blind protein structure generation from NMR chemical shift data / Y. Shen, O. Lange, F. Delaglio et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2008. – Vol. 105, N. 12. – P. 4685-4690.
 21. Tjandra N. Establishing a degree of order: obtaining high-resolution NMR structures from molecular alignment // *Structure*. – 1999. – Vol. 7, N. 9. – P. 205-211.
 22. Ishima R., Torchia D. A. Protein dynamics from NMR // *Nature Structural & Molecular Biology* – 2000. – Vol. 7, N. 9. – P. 740-743.
 23. NMR relaxation parameters of methyl groups as a tool to map the interfaces of helix-helix interactions in membrane proteins / D. M. Lesovoy, K. S. Mineev, P. E. Bragin et al. // *Journal of Biomolecular NMR*. – 2017. – Vol. 69, N. 3. – P. 165-179.
 24. Accurate measurement of dipole/dipole transverse cross-correlated relaxation [Formula: see text] in methylenes and primary amines of uniformly [Formula: see text]-labeled proteins / D. M. Lesovoy, M. A. Dubinnyi, S. B. Nolde et al. // *Journal of Biomolecular NMR*. – 2019. – Vol. 73, N. 5. – P. 245-260.
 25. Structure and dynamics in solution of the stop codon decoding N-terminal domain of the human polypeptide chain release factor eRF1 / V. I. Polshakov, B. D. Eliseev, B. Birdsall et al. // *Protein Science*. – 2012. – Vol. 21, N. 6. – P. 896-903.
 26. Eukaryotic class 1 translation termination factor eRF1 - the NMR structure and dynamics of the middle domain involved in triggering ribosome-dependent

- peptidyl-tRNA hydrolysis / E. V. Ivanova, P. M. Kolosov, B. Birdsall et al. // FEBS Journal. – 2007. – Vol. 274, N. 16. – P. 4223-4237.
27. Structure and dynamics in solution of the complex of *Lactobacillus casei* dihydrofolate reductase with the new lipophilic antifolate drug trimetrexate / V. I. Polshakov, B. Birdsall, T. A. Frenkiel et al. // Protein Science. – 1999. – Vol. 8, N. 3. – P. 467-481.
28. Kay L. E., Torchia D. A., Bax A. Backbone dynamics of proteins as studied by ¹⁵N inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy: application to staphylococcal nuclease // Biochemistry. – 1989. – Vol. 28, N. 23. – P. 8972-8979.
29. Molecular-Dynamics with Coupling to an External Bath / H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. Vangunsteren et al. // Journal of Chemical Physics. – 1984. – Vol. 81, N. 8. – P. 3684-3690.
30. Nilges M., Clore G. M., Gronenborn A. M. Determination of three-dimensional structures of proteins from interproton distance data by dynamical simulated annealing from a random array of atoms. Circumventing problems associated with folding // FEBS Letters. – 1988. – Vol. 239, N. 1. – P. 129-136.
31. Structural Studies of Component of Lysoamidase Bacteriolytic Complex from *Lysobacter* sp. XL1 / S. Tishchenko, A. Gabdulkhakov, B. Melnik et al. // The Protein Journal. – 2016. – Vol. 35, N. 1. – P. 44-50.
32. Structural studies of ribosomal proteins / S. V. Nikonov, N. A. Nevskaya, R. V. Fedorov et al. // Biological Chemistry. – 1998. – Vol. 379, N. 7. – P. 795-805.
33. Crystal structure of the S15-rRNA complex / A. Nikulin, A. Serganov, E. Ennifar et al. // Nature Structural & Molecular Biology – 2000. – Vol. 7, N. 4. – P. 273-277.
34. Comparison of X-ray and NMR structures: is there a systematic difference in residue contacts between X-ray- and NMR-resolved protein structures? / S. O. Garbuzynskiy, B. S. Melnik, M. Y. Lobanov et al. // Proteins. – 2005. – Vol. 60, N. 1. – P. 139-147.

35. The structures of mutant forms of Hfq from *Pseudomonas aeruginosa* reveal the importance of the conserved His57 for the protein hexamer organization / O. Moskaleva, B. Melnik, A. Gabdulkhakov et al. // *Acta Crystallographica Section F*. – 2010. – Vol. 66, N. 7. – P. 760-764.
36. Богдан Т. В. Основы рентгеновской дифрактометрии // Учебно-методическое пособие к общему курсу «Кристаллохимия». – 2012. – 64 с.
37. Cryo-Electron Microscopy of Vitri-fied Specimens / J. Dubochet, M. Adrian, J. J. Chang et al. // *Quarterly Reviews of Biophysics*. – 1988. – Vol. 21, N. 2. – P. 129-228.
38. Orlova E. V., Saibil H. R. Structural analysis of macromolecular assemblies by electron microscopy // *Chemical Reviews*. – 2011. – Vol. 111, N. 12. – P. 7710-7748.
39. Bottcher B., Wynne S. A., Crowther R. A. Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy // *Nature*. – 1997. – Vol. 386, N. 6620. – P. 88-91.
40. Seeing the herpesvirus capsid at 8.5 Å / Z. H. Zhou, M. Dougherty, J. Jakana et al. // *Science*. – 2000. – Vol. 288, N. 5467. – P. 877-880.
41. Yu X., Jin L., Zhou Z. H. 3.88 Å structure of cytoplasmic polyhedrosis virus by cryo-electron microscopy // *Nature*. – 2008. – Vol. 453, N. 7193. – P. 415-419.
42. A 3D cellular context for the macromolecular world / A. Patwardhan, A. Ashton, R. Brandt et al. // *Nature Structural & Molecular Biology*. – 2014. – Vol. 21, N. 10. – P. 841-845.
43. Wang L., Sigworth F. J. Cryo-EM and single particles // *Physiology*. – 2006. – Vol. 21. – P. 13-18.
44. Wade R. H. The phase contrast characteristics in bright field electron microscopy // *Ultramicroscopy*. – 1978. – Vol. 3, N. 3. – P. 329-334.
45. Jensen G. Cryo-EM Part B: 3-D Reconstruction. – New York: Academic Press, 2010. – 456 p.

46. Carroni M., Saibil H. R. Cryo electron microscopy to determine the structure of macromolecular complexes // *Methods*. – 2016. – Vol. 95. – P. 78-85.
47. Structural and evolutionary insights into ribosomal RNA methylation / P. V. Sergiev, N. A. Aleksashin, A. A. Chugunova et al. // *Nature Chemical Biology*. – 2018. – Vol. 14, N. 3. – P. 226-235.
48. Agrawal R. K., Sharma M. R. Structural aspects of mitochondrial translational apparatus // *Current Opinion in Structural Biology*. – 2012. – Vol. 22, N. 6. – P. 797-803.
49. Decatur W. A., Fournier M. J. rRNA modifications and ribosome function // *Trends in Biochemical Sciences*. – 2002. – Vol. 27, N. 7. – P. 344-351.
50. Sergiev P. V., Golovina A. Y., Prokhorova I. V., Sergeeva O. V., Osterman I. A., Nesterchuk M. V., Burakovsky D. E., Bogdanov A. A., Dontsova O. A. *Enzymes to Function. Ribosomes Structure, Function, and Dynamics: Modifications of Ribosomal RNA: From Enzymes to Function*. – Vienna: Springer, 2011. – 442 p.
51. Structural insights into the role of rRNA modifications in protein synthesis and ribosome assembly / Y. S. Polikanov, S. V. Melnikov, D. Soll et al. // *Nature Structural & Molecular Biology* – 2015. – Vol. 22, N. 4. – P. 342-344.
52. High-resolution structure of the *Escherichia coli* ribosome / J. Noeske, M. R. Wasserman, D. S. Terry et al. // *Nature Structural & Molecular Biology*. – 2015. – Vol. 22, N. 4. – P. 336-341.
53. Clustering of modified nucleotides at the functional center of bacterial ribosomal RNA / R. Brimacombe, P. Mitchell, M. Osswald et al. // *FASEB Journal*. – 1993. – Vol. 7, N. 1. – P. 161-167.
54. Sergeeva O. V., Bogdanov A. A., Sergiev P. V. What do we know about ribosomal RNA methylation in *Escherichia coli*? // *Biochimie*. – 2015. – Vol. 117. – P. 110-118.
55. Tuning the ribosome: The influence of rRNA modification on eukaryotic ribosome biogenesis and function / K. E. Sloan, A. S. Warda, S. Sharma et al. // *RNA Biology*. – 2017. – Vol. 14, N. 9. – P. 1138-1152.

56. An atlas of RNA base pairs involving modified nucleobases with optimal geometries and accurate energies / M. Chawla, R. Oliva, J. M. Bujnicki et al. // *Nucleic Acids Res.* – 2015. – Vol. 43, N. 19. – P. 9573.
57. Lovgren J. M., Wikstrom P. M. The rlmB gene is essential for formation of Gm2251 in 23S rRNA but not for ribosome maturation in *Escherichia coli* // *Journal of Bacteriology.* – 2001. – Vol. 183, N. 23. – P. 6957-6960.
58. Identification of two *Escherichia coli* pseudouridine synthases that show multisite specificity for 23S RNA / L. Huang, J. Ku, M. Pookanjanatavip et al. // *Biochemistry.* – 1998. – Vol. 37, N. 45. – P. 15951-15957.
59. Nucleotide modifications in three functionally important regions of the *Saccharomyces cerevisiae* ribosome affect translation accuracy / A. Baudin-Baillieu, C. Fabret, X. H. Liang et al. // *Nucleic Acids Research.* – 2009. – Vol. 37, N. 22. – P. 7665-7677.
60. Modification of 16S ribosomal RNA by the KsgA methyltransferase restructures the 30S subunit to optimize ribosome function / H. Demirci, F. T. Murphy, R. Belardinelli et al. // *RNA.* – 2010. – Vol. 16, N. 12. – P. 2319-2324.
61. Song X., Nazar R. N. Modification of rRNA as a 'quality control mechanism' in ribosome biogenesis // *FEBS Letters.* – 2002. – Vol. 523, N. 1-3. – P. 182-186.
62. Cundliffe E. Ribosomal modification and resistance in antibiotic-producing organisms // *Biochemical Society Symposia.* – 1987. – Vol. 53. – P. 1-8.
63. van Buul C. P., Visser W., van Knippenberg P. H. Increased Translational Fidelity Caused by the Antibiotic Kasugamycin and Ribosomal Ambiguity in Mutants Harboring the Ksga Gene // *FEBS Letters.* – 1984. – Vol. 177, N. 1. – P. 119-124.
64. One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes / S. Melnikov, A. Ben-Shem, N. G. de Loubresse et al. // *Nature Structural & Molecular Biology.* – 2012. – Vol. 19, N. 6. – P. 560-567.

65. Cryo-EM structure and rRNA model of a translating eukaryotic 80S ribosome at 5.5-angstrom resolution / J. P. Armache, A. Jarasch, A. M. Anger et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2010. – Vol. 107, N. 46. – P. 19748-19753.
66. The Structure of the Eukaryotic Ribosome at 3.0 angstrom Resolution / A. Ben-Shem, N. G. de Loubresse, S. Melnikov et al. // *Science*. – 2011. – Vol. 334, N. 6062. – P. 1524-1529.
67. Structural rearrangements of the ribosome at the tRNA proofreading step / L. Jenner, N. Demeshkina, G. Yusupova et al. // *Nature Structural & Molecular Biology*. – 2010. – Vol. 17, N. 9. – P. 1072-1076.
68. Structural aspects of messenger RNA reading frame maintenance by the ribosome / L. B. Jenner, N. Demeshkina, G. Yusupova et al. // *Nature Structural & Molecular Biology*. – 2010. – Vol. 17, N. 5. – P. 555-560.
69. The ribosome triggers the stringent response by RelA via a highly distorted tRNA / X. Agirrezabala, I. S. Fernandez, A. C. Kelley et al. // *EMBO Reports*. – 2013. – Vol. 14, N. 9. – P. 811-816.
70. Structure of vitamin B12 / D. C. Hodgkin, J. Kamper, M. Mackay et al. // *Nature*. – 1956. – Vol. 178, N. 4524. – P. 64-66.
71. Atomic positions in rhombohedral 2-zinc insulin crystals / T. L. Blundell, J. F. Cutfield, S. M. Cutfield et al. // *Nature*. – 1971. – Vol. 231, N. 5304. – P. 506-511.
72. Crowfoot D., Bunn C. W., Rogers-Low B. W., Turner-Jones A. *Chemistry of Penicillin*. – Princeton: Princeton University Press, 1949. – 310 p.
73. Watson J. D., Crick F. H. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid // *Nature*. – 1953. – Vol. 171, N. 4356. – P. 737-738.
74. Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å resolution, obtained by X-ray analysis / M. F. Perutz, M. G. Rossmann, A. F. Cullis et al. // *Nature*. – 1960. – Vol. 185, N. 4711. – P. 416-422.

75. Bystrov V. F. Spin-spin coupling and the conformational states of peptide systems // *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. – 1976. – Vol. 10, N. 2. – P. 41-82.
76. Williamson M. P., Havel T. F., Wuthrich K. Solution conformation of proteinase inhibitor IIA from bull seminal plasma by ¹H nuclear magnetic resonance and distance geometry // *Journal of Molecular Biology*. – 1985. – Vol. 182, N. 2. – P. 295-315.
77. Cryo-electron microscopy of viruses / M. Adrian, J. Dubochet, J. Lepault et al. // *Nature*. – 1984. – Vol. 308, N. 5954. – P. 32-36.
78. NMR analysis of a 900K GroEL GroES complex / J. Fiaux, E. B. Bertelsen, A. L. Horwich et al. // *Nature*. – 2002. – Vol. 418, N. 6894. – P. 207-211.
79. Vasiliev V. D. Morphology of the ribosomal 30S subparticle according to electron microscopic data // *Acta biologica et medica Germanica*. – 1974. – Vol. 33, N. 5-6. – P. 779-793.
80. Structural study of translating 70 S ribosomes from *Escherichia coli*. I. Electron microscopy / V. D. Vasiliev, O. M. Selivanova, V. I. Baranov et al. // *FEBS Letters*. – 1983. – Vol. 155, N. 1. – P. 167-72.
81. Lake J. A. Ribosome structure determined by electron microscopy of *Escherichia coli* small subunits, large subunits and monomeric ribosomes // *Journal of Molecular Biology*. – 1976. – Vol. 105, N. 1. – P. 131-139.
82. Kastner B., Stoffler-Meilicke M., Stoffler G. Arrangement of the subunits in the ribosome of *Escherichia coli*: demonstration by immunoelectron microscopy // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1981. – Vol. 78, N. 11. – P. 6652-6656.
83. Wagenknecht T., Carazo J. M., Radermacher M., Frank J. Three-dimensional reconstruction of the ribosome from *Escherichia coli* // *Biophys J*. – 1989. – Vol. 55, N. 3. – P. 455-64.
84. The 70S *Escherichia coli* ribosome at 23 Å resolution: fitting the ribosomal RNA / H. Stark, F. Mueller, E. V. Orlova et al. // *Structure*. – 1995. – Vol. 3, N. 8. – P. 815-821.

85. Solution structure of the *E. coli* 70S ribosome at 11.5 Å resolution / I. S. Gabashvili, R. K. Agrawal, C. M. Spahn et al. // *Cell*. – 2000. – Vol. 100, N. 5. – P. 537-549.
86. Some X-ray diffraction patterns from single crystals of the large ribosomal subunit from *Bacillus stearothermophilus* / A. Yonath, H. D. Bartunik, K. S. Bartels et al. // *Journal of Molecular Biology*. – 1984. – Vol. 177, N. 1. – P. 201-206.
87. Characterization of single crystals of the large ribosomal particles from *Bacillus stearothermophilus* / A. Yonath, M. A. Saper, I. Makowski et al. // *Journal of Molecular Biology*. – 1986. – Vol. 187, N. 4. – P. 633-636.
88. Purification and characterization of ribosomal proteins from the 30 S subunit of the extreme halophile *Halobacterium marismortui* / M. Shoham, J. Dijk, R. Reinhardt et al. // *FEBS Letters*. – 1986. – Vol. 204, N. 2. – P. 323-330.
89. Crystallization of 70S Ribosomes and 30S Ribosomal-Subunits from *Thermus Thermophilus* / S. D. Trakhanov, M. M. Yusupov, S. C. Agalarov et al. // *FEBS Letters*. – 1987. – Vol. 220, N. 2. – P. 319-322.
90. Crystallization of 30S subparticles from *Thermus Thermophilus* ribosomes / M. M. Yusupov, S. D. Trakhanov, V. V. Barynin et al. // *Doklady Akademii Nauk SSSR*. – 1987. – Vol. 292, N. 5. – P. 1271-1274.
91. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution / N. Ban, P. Nissen, J. Hansen et al. // *Science*. – 2000. – Vol. 289, N. 5481. – P. 905-920.
92. Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstrom resolution / F. Schluenzen, A. Tocilj, R. Zarivach et al. // *Cell*. – 2000. – Vol. 102, N. 5. – P. 615-623.
93. Structure of the 30S ribosomal subunit / B. T. Wimberly, D. E. Brodersen, W. M. Jr. Clemons et al. // *Nature*. – 2000. – Vol. 407, N. 6802. – P. 327-339.
94. X-ray crystal structures of 70S ribosome functional complexes / J. H. Cate, M. M. Yusupov, G. Z. Yusupova et al. // *Science*. – 1999. – Vol. 285, N. 5436. – P. 2095-2104.

95. Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution / M. M. Yusupov, G. Z. Yusupova, A. Baucom et al. // *Science*. – 2001. – Vol. 292, N. 5518. – P. 883-896.
96. The path of messenger RNA through the ribosome / G. Z. Yusupova, M. M. Yusupov, J. H. Cate et al. // *Cell*. – 2001. – Vol. 106, N. 2. – P. 233-241.
97. Crystal structure of a 70S ribosome-tRNA complex reveals functional interactions and rearrangements / A. Korostelev, S. Trakhanov, M. Laurberg et al. // *Cell*. – 2006. – Vol. 126, N. 6. – P. 1065-1077.
98. Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution / B. S. Schuwirth, M. A. Borovinskaya, C. W. Hau et al. // *Science*. – 2005. – Vol. 310, N. 5749. – P. 827-834.
99. Zhang W., Dunkle J. A., Cate J. H. Structures of the ribosome in intermediate states of ratcheting // *Science*. – 2009. – Vol. 325, N. 5943. – P. 1014-1017.
100. Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA / M. Selmer, C. M. Dunham, F. V. T. Murphy et al. // *Science*. – 2006. – Vol. 313, N. 5795. – P. 1935-1942.
101. Crystal Structure of the Eukaryotic Ribosome / A. Ben-Shem, L. Jenner, G. Yusupova et al. // *Science*. – 2010. – Vol. 330, N. 6008. – P. 1203-1209.
102. Crystal structure of the eukaryotic 60S ribosomal subunit in complex with initiation factor 6 / S. Klinge, F. Voigts-Hoffmann, M. Leibundgut et al. // *Science*. – 2011. – Vol. 334, N. 6058. – P. 941-948.
103. Crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with initiation factor 1 / J. Rabl, M. Leibundgut, S. F. Ataide et al. // *Science*. – 2011. – Vol. 331, N. 6018. – P. 730-736.
104. Lomakin I. B., Steitz T. A. The initiation of mammalian protein synthesis and mRNA scanning mechanism // *Nature*. – 2013. – Vol. 500, N. 7462. – P. 307-311.
105. Blaha G., Stanley R. E., Steitz T. A. Formation of the first peptide bond: the structure of EF-P bound to the 70S ribosome // *Science*. – 2009. – Vol. 325, N. 5943. – P. 966-970.

106. Initiation of translation in bacteria by a structured eukaryotic IRES RNA / T. M. Colussi, D. A. Costantino, J. Zhu et al. // *Nature*. – 2015. – Vol. 519, N. 7541. – P. 110-113.
107. A new understanding of the decoding principle on the ribosome / N. Demeshkina, L. Jenner, E. Westhof et al. // *Nature*. – 2012. – Vol. 484, N. 7393. – P. 256-259.
108. Structural basis for the rescue of stalled ribosomes: structure of YaeJ bound to the ribosome / M. G. Gagnon, S. V. Seetharaman, D. Bulkley et al. // *Science*. – 2012. – Vol. 335, N. 6074. – P. 1370-1372.
109. Gagnon M. G., Lin J., Bulkley D., Steitz T. A. Crystal structure of elongation factor 4 bound to a clockwise ratcheted ribosome // *Science*. – 2014. – Vol. 345, N. 6197. – P. 684-687.
110. Guo Z., Noller H. F. Rotation of the head of the 30S ribosomal subunit during mRNA translocation // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2012. – Vol. 109, N. 50. – P. 20391-20394.
111. Structural aspects of messenger RNA reading frame maintenance by the ribosome / L. B. Jenner, N. Demeshkina, G. Yusupova et al. // *Nature Structural & Molecular Biology*. – 2010. – Vol. 17, N. 5. – P. 555-560.
112. Structural rearrangements of the ribosome at the tRNA proofreading step / L. Jenner, N. Demeshkina, G. Yusupova et al. // *Nature Structural & Molecular Biology*. – 2010. – Vol. 17, N. 9. – P. 1072-1078.
113. Korostelev A. A. Structural aspects of translation termination on the ribosome // *RNA*. – 2011. – Vol. 17, N. 8. – P. 1409-1421.
114. Structural basis for translation termination on the 70S ribosome / M. Laurberg, H. Asahara, A. Korostelev et al. // *Nature*. – 2008. – Vol. 454, N. 7206. – P. 852-857.
115. Conformational changes of elongation factor G on the ribosome during tRNA translocation / J. Lin, M. G. Gagnon, D. Bulkley et al. // *Cell*. – 2015. – Vol. 160, N. 1-2. – P. 219-227.

116. Crystal structures of the ribosome in complex with release factors RF1 and RF2 bound to a cognate stop codon / S. Petry, D. E. Brodersen, F. V. T. Murphy et al. // *Cell*. – 2005. – Vol. 123, N. 7. – P. 1255-1266.
117. Polikanov Y. S., Blaha G. M., Steitz T. A. How hibernation factors RMF, HPF, and YfiA turn off protein synthesis // *Science*. – 2012. – Vol. 336, N. 6083. – P. 915-918.
118. Pulk A., Cate J. H. Control of ribosomal subunit rotation by elongation factor G // *Science*. – 2013. – Vol. 340, N. 6140. – P. 1235970.
119. The ribosome uses two active mechanisms to unwind messenger RNA during translation / X. Qu, J. D. Wen, L. Lancaster et al. // *Nature*. – 2011. – Vol. 475, N. 7354. – P. 118-121.
120. Structural insights into the translational infidelity mechanism / A. Rozov, N. Demeshkina, E. Westhof et al. // *Nature Communications*. – 2015. – Vol. 6. – P. 7251.
121. Elongation factor G bound to the ribosome in an intermediate state of translocation / D. S. Tourigny, I. S. Fernandez, A. C. Kelley et al. // *Science*. – 2013. – Vol. 340, N. 6140. – P. 1235490.
122. Insights into translational termination from the structure of RF2 bound to the ribosome / A. Weixlbaumer, H. Jin, C. Neubauer et al. // *Science*. – 2008. – Vol. 322, N. 5903. – P. 953-956.
123. Crystal structures of 70S ribosomes bound to release factors RF1, RF2 and RF3 / J. Zhou, A. Korostelev, L. Lancaster et al. // *Current Opinion in Structural Biology*. – 2012. – Vol. 22, N. 6. – P. 733-42.
124. Crystal structures of EF-G-ribosome complexes trapped in intermediate states of translocation / J. Zhou, L. Lancaster, J. P. Donohue et al. // *Science*. – 2013. – Vol. 340, N. 6140. – P. 1236086.
125. How the ribosome hands the A-site tRNA to the P site during EF-G-catalyzed translocation / J. Zhou, L. Lancaster, J. P. Donohue et al. // *Science*. – 2014. – Vol. 345, N. 6201. – P. 1188-1191.

126. Kuhlbrandt W. Cryo-EM enters a new era // *Elife*. – 2014. – Vol. 3. – P. e03678.
127. Kuhlbrandt W. Biochemistry. The resolution revolution // *Science*. – 2014. – Vol. 343, N. 6178. – P. 1443-1444.
128. Effect of fringe-artifact correction on sub-tomogram averaging from Zernike phase-plate cryo-TEM / G. P. Kishchenko, R. Danev, R. Fisher et al. // *Journal of Structural Biology*. – 2015. – Vol. 191, N. 3. – P. 299-305.
129. Structure of the human 80S ribosome / H. Khatter, A. G. Myasnikov, S. K. Natchiar et al. // *Nature*. – 2015. – Vol. 520, N. 7549. – P. 640-645.
130. 2.2 A resolution cryo-EM structure of beta-galactosidase in complex with a cell-permeant inhibitor / A. Bartesaghi, A. Merk, S. Banerjee et al. // *Science*. – 2015. – Vol. 348, N. 6239. – P. 1147-1151.
131. High-resolution cryo-electron microscopy structure of the *Trypanosoma brucei* ribosome / Y. Hashem, A. des Georges, J. Fu et al. // *Nature*. – 2013. – Vol. 494, N. 7437. – P. 385-389.
132. Cryo-EM structure of the *Plasmodium falciparum* 80S ribosome bound to the anti-protozoan drug emetine / W. Wong, X. C. Bai, A. Brown et al. // *Elife*. – 2014. – Vol. 3. – P. e03080.
133. Structures of the human and *Drosophila* 80S ribosome / A. M. Anger, J. P. Armache, O. Berninghausen et al. // *Nature*. – 2013. – Vol. 497, N. 7447. – P. 80-85.
134. The complete structure of the large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome / B. J. Greber, D. Boehringer, M. Leibundgut et al. // *Nature*. – 2014. – Vol. 515, N. 7526. – P. 283-286.
135. Ribosome. The complete structure of the 55S mammalian mitochondrial ribosome / B. J. Greber, P. Bieri, M. Leibundgut et al. // *Science*. – 2015. – Vol. 348, N. 6232. – P. 303-308.
136. Cryo-EM structure of the small subunit of the mammalian mitochondrial ribosome / P. S. Kaushal, M. R. Sharma, T. M. Booth et al. // *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2014. – Vol. 111, N. 20. – P. 7284-7289.
137. Structure of the large ribosomal subunit from human mitochondria / A. Brown, A. Amunts, X. C. Bai et al. // *Science*. – 2014. – Vol. 346, N. 6210. – P. 718-722.
138. Structure of the yeast mitochondrial large ribosomal subunit / A. Amunts, A. Brown, X. C. Bai et al. // *Science*. – 2014. – Vol. 343, N. 6178. – P. 1485-1489.
139. Ribosome. The structure of the human mitochondrial ribosome / A. Amunts, A. Brown, J. Toots et al. // *Science*. – 2015. – Vol. 348, N. 6230. – P. 95-98.
140. Manuell A. L., Quispe J., Mayfield S. P. Structure of the chloroplast ribosome: novel domains for translation regulation // *PLOS Biology*. – 2007. – Vol. 5, N. 8. – P. e209.
141. Structure of the *Bacillus subtilis* 70S ribosome reveals the basis for species-specific stalling / D. Sohmen, S. Chiba, N. Shimokawa-Chiba et al. // *Nature Communications*. – 2015. – Vol. 6. – P. 6941.
142. Structure of the mammalian ribosome-Sec61 complex to 3.4 Å resolution / R. M. Voorhees, I. S. Fernandez et al. // *Cell*. – 2014. – Vol. 157, N. 7. – P. 1632-1643.
143. Visualization of the hybrid state of tRNA binding promoted by spontaneous ratcheting of the ribosome / X. Agirrezabala, J. Lei, J. L. Brunelle et al. // *Molecular Cell*. – 2008. – Vol. 32, N. 2. – P. 190-197.
144. Structural characterization of mRNA-tRNA translocation intermediates / X. Agirrezabala, H. Y. Liao, E. Schreiner et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2012. – Vol. 109, N. 16. – P. 6094-6099.
145. Structural snapshots of actively translating human ribosomes / E. Behrmann, J. Loerke, T. V. Budkevich et al. // *Cell*. – 2015. – Vol. 161, N. 4. – P. 845-857.

146. Structure of the ribosome with elongation factor G trapped in the pretranslocation state / A. F. Brilot, A. A. Korostelev, D. N. Ermolenko et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2013. – Vol. 110, N. 52. – P. 20994-20999.
147. Structure and dynamics of the mammalian ribosomal pretranslocation complex / T. Budkevich, J. Giesebrecht, R. B. Altman et al. // *Molecular Cell*. – 2011. – Vol. 44, N. 2. – P. 214-224.
148. Regulation of the mammalian elongation cycle by subunit rolling: a eukaryotic-specific ribosome rearrangement / T. V. Budkevich, J. Giesebrecht, E. Behrmann et al. // *Cell*. – 2014. – Vol. 158, N. 1. – P. 121-131.
149. Molecular architecture of a eukaryotic translational initiation complex / I. S. Fernandez, X. C. Bai et al. // *Science*. – 2013. – Vol. 342, N. 6160. – P. 1240585.
150. Initiation of translation by cricket paralysis virus IRES requires its translocation in the ribosome / I. S. Fernandez, X. C. Bai, G. Murshudov et al. // *Cell*. – 2014. – Vol. 157, N. 4. – P. 8230-831.
151. Structure of the mammalian ribosomal pre-termination complex associated with eRF1.eRF3.GDPNP / A. des Georges, Y. Hashem, A. Unbehaun et al. // *Nucleic Acids Research*. – 2014. – Vol. 42, N. 5. – P. 3409-3418.
152. Structure of the mammalian ribosomal 43S preinitiation complex bound to the scanning factor DHX29 / Y. Hashem, A. des Georges, V. Dhote et al. // *Cell*. – 2013. – Vol. 153, N. 5. – P. 1108-1119.
153. Hepatitis-C-virus-like internal ribosome entry sites displace eIF3 to gain access to the 40S subunit / Y. Hashem, A. des Georges, V. Dhote et al. // *Nature*. – 2013. – Vol. 503, N. 7477. – P. 539-543.
154. Structural Changes Enable Start Codon Recognition by the Eukaryotic Translation Initiation Complex / T. Hussain, J. L. Llacer, I. S. Fernandez et al. // *Cell*. – 2014. – Vol. 159, N. 3. – P. 597-607.

155. Cryo-EM of Ribosomal 80S Complexes with Termination Factors Reveals the Translocated Cricket Paralysis Virus IRES / M. Muhs, T. Hilal, T. Mielke et al. // *Molecular Cell*. – 2015. – Vol. 57, N. 3. – P. 422-432.
156. Cryo-EM visualization of the ribosome in termination complex with apo-RF3 and RF1 / J. Pallesen, Y. Hashem, G. Korkmaz et al. // *Elife*. – 2013. – Vol. 2. – P. e00411.
157. Visualization of two transfer RNAs trapped in transit during elongation factor G-mediated translocation / D. J. Ramrath, L. Lancaster, T. Sprink et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2013. – Vol. 110, N. 52. – P. 20964-20969.
158. Domain movements of elongation factor eEF2 and the eukaryotic 80S ribosome facilitate tRNA translocation / C. M. Spahn, M. G. Gomez-Lorenzo, R. A. Grassucci et al. // *EMBO Journal*. – 2004. – Vol. 23, N. 5. – P. 1008-1019.
159. Cryo-EM visualization of a viral internal ribosome entry site bound to human ribosomes: the IRES functions as an RNA-based translation factor / C. M. Spahn, E. Jan, A. Mulder et al. // *Cell*. – 2004. – Vol. 118, N. 4. – P. 465-475.
160. Structures of yeast 80S ribosome-tRNA complexes in the rotated and nonrotated conformations / E. Svidritskiy, A. F. Brilot, C. S. Koh et al. // *Structure*. – 2014. – Vol. 22, N. 8. – P. 1210-1218.
161. Cryo-EM structure of the mammalian eukaryotic release factor eRF1-eRF3-associated termination complex / D. Taylor, A. Unbehaun, W. Li et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2012. – Vol. 109, N. 45. – P. 18413-18418.
162. Blow D. *Outline of Crystallography for Biologists* // Oxford University Press. – 2002. – P. 278.
163. Structural basis for the inhibition of the eukaryotic ribosome / N. G. de Loubresse, I. Prokhorova, W. Holtkamp et al. // *Nature*. – 2014. – Vol. 513, N. 7519. – P. 517-522.

164. Wilson D. N. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance // *Nature Reviews Microbiology*. – 2014. – Vol. 12, N. 1. – P. 35-48.
165. Ogston A. Micrococcus Poisoning // *Journal of Anatomy and Physiology*. – 1882. – Vol. 17, N. 1. – P. 24-58.
166. Crossley K. B., Jefferson K. K., Archer G. L., Fowler V. G. Staphylococci in human diseases. – New York: Churchill Livingstone, 2009. – 640 p.
167. Le Loir Y., Baron F., Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning // *Genetics and Molecular Research*. – 2003. – Vol. 2, N. 1. – P. 63-76.
168. Active Bacterial Core Surveillance Program of the Emerging Infections Program N. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities / S. K. Fridkin, J. C. Hageman, M. Morrison et al. // *The New England Journal of Medicine*. – 2005. – Vol. 352, N. 14. – P. 1436-1444.
169. A glimpse of streptococcal toxic shock syndrome from comparative genomics of *S. suis* 2 Chinese isolates / C. Chen, J. Tang, W. Dong et al. // *PLOS One*. – 2007. – Vol. 2, N. 3. – P. e315.
170. Campion J. J., McNamara P. J., Evans M. E. Evolution of ciprofloxacin-resistant *Staphylococcus aureus* in *in vitro* pharmacokinetic environments // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2004. – Vol. 48, N. 12. – P. 4733-4744.
171. Emergence and spread of gentamicin-susceptible strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Belgian hospitals / O. Denis, A. Deplano, R. De Ryck et al. // *Microbial Drug Resistance-Mechanisms Epidemiology and Disease*. – 2003. – Vol. 9, N. 1. – P. 61-71.
172. Hiramatsu K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2001. – Vol. 1, N. 3. – P. 147-155.
173. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / K. Hiramatsu, L. Cui, M. Kuroda et al. // *Trends Microbiol.* – 2001. – Vol. 9, N. 10. – P. 486-493.

174. Zhang W. S., Shen X. Z., Yang Y. H. Epidemiology, emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. – 2008. – Vol. 10, N. 3. – P. 426-430.
175. National Nosocomial Infections Surveillance S. Changes in the epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units in US hospitals, 1992-2003 / R. M. Klevens, J. R. Edwards, F. C. Tenover et al. // *Clinical Infectious Diseases*. – 2006. – Vol. 42, N. 3. – P. 389-391.
176. Lowy F. D. *Staphylococcus aureus* infections // *The New England Journal of Medicine*. – 1998. – Vol. 339, N. 8. – P. 520-532.
177. Foster T. J. The *Staphylococcus aureus* "superbug" // *Journal of Clinical Investigation*. – 2004. – Vol. 114, N. 12. – P. 1693-1696.
178. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance / M. T. Holden, E. J. Feil, J. A. Lindsay et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2004. – Vol. 101, N. 26. – P. 9786-9791.
179. Novick R. P. Mobile genetic elements and bacterial toxinoses: the superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus* // *Plasmid*. – 2003. – Vol. 49, N. 2. – P. 93-105.
180. Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the agr and/or sarA loci / P. M. Dunman, E. Murphy, S. Haney et al. // *Journal of Bacteriology*. – 2001. – Vol. 183, N. 24. – P. 7341-7353.
181. Vandenesch F., Kornblum J., Novick R. P. A temporal signal, independent of agr, is required for hla but not spa transcription in *Staphylococcus aureus* // *Journal of Bacteriology*. – 1991. – Vol. 173, N. 20. – P. 6313-6320.
182. Kluytmans J., van Belkum A., Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks // *Clinical Microbiology Reviews*. – 1997. – Vol. 10, N. 3. – P. 505-520.
183. Vandenberg M. F., Verbrugh H. A. Carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical relevance // *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. – 1999. – Vol. 133, N. 6. – P. 525-534.

184. Kaliner M. A. Human nasal respiratory secretions and host defense // *American Review of Respiratory Disease*. – 1991. – Vol. 144, N. 3. – P. S52-56.
185. *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism / T. Jin, M. Bokarewa, T. Foster et al. // *Journal of Immunology*. – 2004. – Vol. 172, N. 2. – P. 1169-1176.
186. *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with l-lysine / A. Peschel, R. W. Jack, M. Otto et al. // *Journal of Experimental Medicine*. – 2001. – Vol. 193, N. 9. – P. 1067-1076.
187. Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus* / A. Bera, S. Herbert, A. Jakob et al. // *Molecular Microbiology*. – 2005. – Vol. 55, N. 3. – P. 778-787.
188. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis / S. E. Cosgrove, G. Sakoulas, E. N. Perencevich et al. // *Clinical Infectious Diseases*. – 2003. – Vol. 36, N. 1. – P. 53-59.
189. Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. 1929 // *Bulletin of the World Health Organization*. – 2001. – Vol. 79, N. 8. – P. 780-790.
190. Rammelkamp C. H., Keefer C. S. Penicillin: Its Antibacterial Effect in Whole Blood and Serum for the *Hemolytic Streptococcus* and *Staphylococcus Aureus* // *Journal of Clinical Investigation*. – 1943. – Vol. 22, N. 5. – P. 649-657.
191. Parker M. T., Jevons M. P. A Survey of Methicillin Resistance in *Staphylococcus Aureus* // *Postgraduate Medical Journal*. – 1964. – Vol. 40. – P. 170-178.

192. Neu H. C. The crisis in antibiotic resistance // *Science*. – 1992. – Vol. 257, N. 5073. – P. 1064-1073.
193. McManus M. C. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents // *American Journal of Health-System Pharmacy*. – 1997. – Vol. 54, N. 12. – P. 1420-1433.
194. Bondi A., Dietz C. C. Penicillin resistant staphylococci // *Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine*. – 1945. – Vol. 60. – P. 55-58.
195. Pootoolal J., Neu J., Wright G. D. Glycopeptide antibiotic resistance // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. – 2002. – Vol. 42. – P. 381-408.
196. Aldred K. J., Kerns R. J., Osheroff N. Mechanism of quinolone action and resistance // *Biochemistry*. – 2014. – Vol. 53, N. 10. – P. 1565-1574.
197. Andriole V. *The Quinolones*. – New York: Academic Press, 2000. – 517 p.
198. The specific inhibition of the DNA-directed RNA synthesis by rifamycin / G. Hartmann, K. O. Honikel, F. Knusel et al. // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1967. – Vol. 145, N. 3. – P. 843-844.
199. Effect of rifamycin on protein synthesis / C. Calvori, L. Frontali, L. Leoni et al. // *Nature*. – 1965. – Vol. 207, N. 995. – P. 417-418.
200. McClure W. R., Cech C. L. On the mechanism of rifampicin inhibition of RNA synthesis // *Journal of Biological Chemistry*. – 1978. – Vol. 253, N. 24. – P. 8949-8956.
201. NorM, a putative multidrug efflux protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and its homolog in *Escherichia coli* / Y. Morita, K. Kodama, S. Shiota et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1998. – Vol. 42, N. 7. – P. 1778-1782.
202. Tran J. H., Jacoby G. A., Hooper D. C. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein QnrA with *Escherichia coli* topoisomerase IV // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2005. – Vol. 49, N. 7. – P. 3050-3052.

203. Tran J. H., Jacoby G. A., Hooper D. C. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2005. – Vol. 49, N. 1. – P. 118-125.
204. Hooper D. C. Mode of action of fluoroquinolones // Drugs. – 1999. – Vol. 58, N. S.2. – P. 6-10.
205. Goldstein B. P. Resistance to rifampicin: a review // The Journal of Antibiotics. – 2014. – Vol. 67, N. 9. – P. 625-630.
206. Hermann T. Drugs targeting the ribosome // Current Opinion in Structural Biology. – 2005. – Vol. 15, N. 3. – P. 355-366.
207. Tenson T., Mankin A. Antibiotics and the ribosome // Molecular Microbiology. – 2006. – Vol. 59, N. 6. – P. 1664-1677.
208. Blaha G. M., Polikanov Y. S., Steitz T. A. Elements of ribosomal drug resistance and specificity // Current Opinion in Structural Biology. – 2012. – Vol. 22, N. 6. – P. 750-758.
209. SnapShot: Antibiotic inhibition of protein synthesis I / D. Sohmen, J. M. Harms, F. Schlunzen et al. // Cell. – 2009. – Vol. 138, N. 6. – P. 1248.e1.
210. Wilson D. N. On the specificity of antibiotics targeting the large ribosomal subunit // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2011. – Vol. 1241. – P. 1-16.
211. Wang G. Human antimicrobial peptides and proteins // Pharmaceuticals. – 2014. – Vol. 7, N. 5. – P. 545-594.
212. Mangoni M. L. Host-defense peptides: from biology to therapeutic strategies // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2011. – Vol. 68, N. 13. – P. 2157-2159.
213. Егоров Ц. А., Одинцова Т. И. Защитные пептиды иммунитета растений // Биоорганическая химия. – 2012. – Т. 38, №. 1. – С. 7-17.
214. CAMP: Collection of sequences and structures of antimicrobial peptides / F. H. Wagh, L. Gopi, R. S. Barai et al. // Nucleic Acids Research. – 2014. – Vol. 42. – P. D1154-8.

215. Boman H. G. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts // Journal of Internal Medicine. – 2003. – Vol. 254, N. 3. – P. 197-215.
216. Nguyen L. T., Haney E. F., Vogel H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action // Trends in Biotechnology. – 2011. – Vol. 29, N. 9. – P. 464-472.
217. Hancock R. E., Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences // Trends in Microbiology. – 2000. – Vol. 8, N. 9. – P. 402-410.
218. Barreto-Santamaria A., Patarroyo M. E., Curtidor H. Designing and optimizing new antimicrobial peptides: all targets are not the same // Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences. – 2019. – Vol. 56, N. 6. – P. 351-373.
219. Activity of Antimicrobial Peptides and Conventional Antibiotics against Superantigen Positive *Staphylococcus aureus* Isolated from the Patients with Neoplastic and Inflammatory Erythrodermia / W. Baranska-Rybak, O. Cirioni, M. Dawgul et al. // Chemotherapy Research and Practice. – 2011. – Vol. 2011. – P. 270932.
220. Drug delivery systems designed to overcome antimicrobial resistance / T. N. Pham, P. Loupias, A. Dassonville-Klimpt et al. // Medicinal Research Reviews. – 2019. – Vol. 39, N. 6. – P. 2343-2396.
221. *In Silico* Structural Evaluation of Short Cationic Antimicrobial Peptides / I. Passarini, S. Rossiter, J. Malkinson et al. // Pharmaceutics. – 2018. – Vol. 10, N. 3.
222. Peschel A., Sahl H. G. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance // Nature Reviews Microbiology. – 2006. – Vol. 4, N. 7. – P. 529-536.
223. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms // Nature. – 2002. – Vol. 415, N. 6870. – P. 389-395.
224. Inoue S. *In situ* A β pores in AD brain are cylindrical assembly of A β protofilaments // Amyloid. – 2008. – Vol. 15, N. 4. – P. 223-233.

225. Boman H. G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity // Annual Review of Immunology – 1995. – Vol. 13. – P. 61-92.
226. Host defense peptides and their antimicrobial-immunomodulatory duality / L. Steinstraesser, U. Kraneburg, F. Jacobsen et al. // Immunobiology. – 2011. – Vol. 216, N. 3. – P. 322-333.
227. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses / M. G. Scott, D. J. Davidson, M. R. Gold et al. // Journal of Immunology. – 2002. – Vol. 169, N. 7. – P. 3883-3891.
228. Potential of immunomodulatory host defense peptides as novel anti-infectives / D. M. Easton, A. Nijnik, M. L. Mayer et al. // Trends in Biotechnology. – 2009. – Vol. 27, N. 10. – P. 582-590.
229. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells / Y. De, Q. Chen, A. P. Schmidt et al. // Journal of Experimental Medicine. – 2000. – Vol. 192, N. 7. – P. 1069-1074.
230. Papo N., Shai Y. Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes? // Peptides. – 2003. – Vol. 24, N. 11. – P. 1693-1703.
231. NMR structure of a full-length single-pass membrane protein NRADD / K. D. Nadezhdin, S. A. Goncharuk, A. S. Arseniev et al. // Proteins. – 2019. – Vol. 87, N. 9. – P. 786-790.
232. HER2 Transmembrane Domain Dimerization Coupled with Self-Association of Membrane-Embedded Cytoplasmic Juxtamembrane Regions / P. E. Bragin, K. S. Mineev, O. V. Bocharova et al. // Journal of Molecular Biology. – 2016. – Vol. 428, N. 1. – P. 52-61.
233. Structural and thermodynamic insight into the process of "weak" dimerization of the ErbB4 transmembrane domain by solution NMR / E. V. Bocharov, K. S. Mineev, M. V. Goncharuk et al. // Biochimica et Biophysica Acta. – 2012. – Vol. 1818, N. 9. – P. 2158-2170.

234. Yeaman M. R., Yount N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance // *Pharmacological Reviews*. – 2003. – Vol. 55, N. 1. – P. 27-55.
235. Role of membrane lipids in the mechanism of bacterial species selective toxicity by two alpha/beta-antimicrobial peptides / R. F. Eppard, M. A. Schmitt, S. H. Gellman et al. // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2006. – Vol. 1758, N. 9. – P. 1343-1350.
236. Detergent-type membrane fragmentation by MSI-78, MSI-367, MSI-594, and MSI-843 antimicrobial peptides and inhibition by cholesterol: a solid-state nuclear magnetic resonance study / D. K. Lee, A. Bhunia, S. A. Kotler et al. // *Biochemistry*. – 2015. – Vol. 54, N. 10. – P. 1897-1907.
237. Cholesterol reduces pardaxin's dynamics-a barrel-stave mechanism of membrane disruption investigated by solid-state NMR / A. Ramamoorthy, D. K. Lee, T. Narasimhaswamy et al. // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2010. – Vol. 1798, N. 2. – P. 223-227.
238. Hoskin D. W., Ramamoorthy A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2008. – Vol. 1778, N. 2. – P. 357-75.
239. Soblosky L., Ramamoorthy A., Chen Z. Membrane interaction of antimicrobial peptides using E. coli lipid extract as model bacterial cell membranes and SFG spectroscopy // *Chemistry and Physics of Lipids*. – 2015. – Vol. 187. – P. 20-33.
240. Snyder D. S., McIntosh T. J. The lipopolysaccharide barrier: correlation of antibiotic susceptibility with antibiotic permeability and fluorescent probe binding kinetics // *Biochemistry*. – 2000. – Vol. 39, N. 38. – P. 11777-11787.
241. A synergism between temporins toward Gram-negative bacteria overcomes resistance imposed by the lipopolysaccharide protective layer / Y. Rosenfeld, D. Barra, M. Simmaco et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2006. – Vol. 281, N. 39. – P. 28565-28574.
242. Lipopolysaccharide, a key molecule involved in the synergism between temporins in inhibiting bacterial growth and in endotoxin neutralization / M.

- L. Mangoni, R. F. Epand, Y. Rosenfeld et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – Vol. 283, N. 34. – P. 22907-22917.
243. Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux // *Science*. – 1994. – Vol. 264, N. 5157. – P. 382-388.
244. Bhunia A., Domadia P. N., Bhattacharjya S. Structural and thermodynamic analyses of the interaction between melittin and lipopolysaccharide // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2007. – Vol. 1768, N. 12. – P. 3282-3291.
245. High-resolution solution structure of a designed peptide bound to lipopolysaccharide: transferred nuclear Overhauser effects, micelle selectivity, and anti-endotoxic activity / S. Bhattacharjya, P. N. Domadia, A. Bhunia et al. // *Biochemistry*. – 2007. – Vol. 46, N. 20. – P. 5864-5874.
246. Bhunia A., Ramamoorthy A., Bhattacharjya S. Helical hairpin structure of a potent antimicrobial peptide MSI-594 in lipopolysaccharide micelles by NMR spectroscopy // *Chemistry*. – 2009. – Vol. 15, N. 9. – P. 2036-2040.
247. Porcelli F., Verardi R., Shi L., Henzler-Wildman K. A., Ramamoorthy A., Veglia G. NMR structure of the cathelicidin-derived human antimicrobial peptide LL-37 in dodecylphosphocholine micelles // *Biochemistry*. – 2008. – Vol. 47, N. 20. – P. 5565-5572.
248. Solution structure and interaction of the antimicrobial polyphemusins with lipid membranes / J. P. Powers, A. Tan, A. Ramamoorthy et al. // *Biochemistry*. – 2005. – Vol. 44, N. 47. – P. 15504-15513.
249. Structure and orientation of pardaxin determined by NMR experiments in model membranes / F. Porcelli, B. Buck, D. K. Lee et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279, N. 44. – P. 45815-45823.
250. Durr U. H., Sudheendra U. S., Ramamoorthy A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2006. – Vol. 1758, N. 9. – P. 1408-1425.

251. Ramamoorthy A. Beyond NMR spectra of antimicrobial peptides: dynamical images at atomic resolution and functional insights // *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*. – 2009. – Vol. 35, N. 4. – P. 201-207.
252. Structures of the dimeric and monomeric variants of magainin antimicrobial peptides (MSI-78 and MSI-594) in micelles and bilayers, determined by NMR spectroscopy / F. Porcelli, B. A. Buck-Koehntop, S. Thennarasu et al. // *Biochemistry*. – 2006. – Vol. 45, N. 18. – P. 5793-5799.
253. Spatial structure of heptapeptide A β (16-22) (beta-amyloid A β (1-40) active fragment) in solution and in complex with a biological membrane model / K. S. Usachev, S. V. Efimov, A. R. Yulmetov et al. // *Magnetic Resonance in Chemistry*. – 2012. – Vol. 50, N. 12. – P. 784-792.
254. Usachev K. S., Filippov A. V., Klochkov V. V. Structure of amyloid-beta peptides in a complex with model membranes // *Tsitologiya*. – 2014. – Vol. 56, N. 6. – P. 453-455.
255. Hancock R. E. Peptide antibiotics // *Lancet*. – 1997. – Vol. 349, N. 9049. – P. 418-422.
256. All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides / D. Wade, A. Boman, B. Wahlin et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1990. – Vol. 87, N. 12. – P. 4761-4765.
257. All-D-magainin: chirality, antimicrobial activity and proteolytic resistance / R. Bessalle, A. Kapitkovsky, A. Gorea et al. // *FEBS Letters*. – 1990. – Vol. 274, N. 1-2. – P. 151-155.
258. Breukink E., de Kruijff B. The lantibiotic nisin, a special case or not? // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1999. – Vol. 1462, N. 1-2. – P. 223-234.
259. Hirakura Y., Kobayashi S., Matsuzaki K. Specific interactions of the antimicrobial peptide cyclic beta-sheet tachyplesin I with lipopolysaccharides // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2002. – Vol. 1562, N. 1-2. – P. 32-36.

260. Vunnam S., Juvvadi P., Merrifield R. B. Synthesis and antibacterial action of cecropin and proline-arginine-rich peptides from pig intestine // *The Journal of Peptide Research*. – 1997. – Vol. 49, N. 1. – P. 59-66.
261. Shai Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1999. – Vol. 1462, N. 1-2. – P. 55-70.
262. Correlation between anti-bacterial activity and pore sizes of two classes of voltage-dependent channel-forming peptides / L. Beven, O. Helluin, G. Molle et al. // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1999. – Vol. 1421, N. 1. – P. 53-63.
263. Sansom M. S. The biophysics of peptide models of ion channels // *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. – 1991. – Vol. 55, N. 3. – P. 139-235.
264. Membrane pores induced by magainin / S. J. Ludtke, K. He, W. T. Heller et al. // *Biochemistry*. – 1996. – Vol. 35, N. 43. – P. 13723-13728.
265. Mechanism of synergism between antimicrobial peptides magainin 2 and PGLa / K. Matsuzaki, Y. Mitani, K. Y. Akada et al. // *Biochemistry*. – 1998. – Vol. 37, N. 43. – P. 15144-15153.
266. Structure and orientation of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 within phospholipid membranes / E. Gazit, I. R. Miller, P. C. Biggin et al. // *Journal of Molecular Biology*. – 1996. – Vol. 258, N. 5. – P. 860-870.
267. Sitaram N., Nagaraj R. Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1999. – Vol. 1462, N. 1-2. – P. 29-54.
268. Brogden K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? // *Nature Reviews Microbiology*. – 2005. – Vol. 3, N. 3. – P. 238-250.
269. Bellm L., Lehrer R. I., Ganz T. Protegrins: new antibiotics of mammalian origin // *Expert Opinion on Investigational Drugs*. – 2000. – Vol. 9, N. 8. – P. 1731-1742.

270. Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins / V. N. Kokryakov, S. S. Harwig, E. A. Panyutich et al. // *FEBS Letters*. – 1993. – Vol. 327, N. 2. – P. 231-236.
271. In vitro activity of Protegrin-1, alone and in combination with clinically useful antibiotics, against *Acinetobacter baumannii* strains isolated from surgical wounds / G. Morroni, O. Simonetti, A. Brenciani et al. // *Medical Microbiology and Immunology*. – 2019. – Vol. 208, N. 6. – P. 877-883.
272. Synthesis and solution structure of the antimicrobial peptide protegrin-1 / A. Aumelas, M. Mangoni, C. Roumestand et al. // *European Journal of Biochemistry*. – 1996. – Vol. 237, N. 3. – P. 575-583.
273. Solution structure of protegrin-1, a broad-spectrum antimicrobial peptide from porcine leukocytes / R. L. Fahrner, T. Dieckmann, S. S. Harwig et al. // *Chemical Biology*. – 1996. – Vol. 3, N. 7. – P. 543-550.
274. Structure of the 70S ribosome from human pathogen *Staphylococcus aureus* / I. Khusainov, Q. Vicens, A. Bochler et al. // *Nucleic Acids Research*. – 2016. – Vol. 44, N. 21. – P. 10491-10504.
275. Russell J. B., Cook G. M. Energetics of bacterial growth: balance of anabolic and catabolic reactions // *Microbiology Reviews*. – 1995. – Vol. 59, N. 1. – P. 48-62.
276. Szaflarski W., Nierhaus K. H. Question 7: optimized energy consumption for protein synthesis // *Origins of Life and Evolution of Biospheres*. – 2007. – Vol. 37, N. 4-5. – P. 423-428.
277. Conservation of two distinct types of 100S ribosome in bacteria / M. Ueta, C. Wada, T. Daifuku et al. // *Genes to Cells*. – 2013. – Vol. 18, N. 7. – P. 554-574.
278. Ribosome binding proteins YhbH and YfiA have opposite functions during 100S formation in the stationary phase of *Escherichia coli* / M. Ueta, H. Yoshida, C. Wada et al. // *Genes to Cells*. – 2005. – Vol. 10, N. 12. – P. 1103-1112.

279. Role of HPF (hibernation promoting factor) in translational activity in *Escherichia coli* / M. Ueta, R. L. Ohniwa, H. Yoshida et al. // Journal of Biochemistry. – 2008. – Vol. 143, N. 3. – P. 425-433.
280. Ueta M., Wada C., Wada A. Formation of 100S ribosomes in *Staphylococcus aureus* by the hibernation promoting factor homolog SaHPF // Genes to Cells. – 2010. – Vol. 15, N. 1. – P. 43-58.
281. Expression of a small (p)ppGpp synthetase, YwaC, in the (p)ppGpp(0) mutant of *Bacillus subtilis* triggers YvyD-dependent dimerization of ribosome / K. Tagami, H. Nanamiya, Y. Kazo et al. // Microbiologyopen. – 2012. – Vol. 1, N. 2. – P. 115-134.
282. Ribosome dimerization is essential for the efficient regrowth of *Bacillus subtilis* / G. Akanuma, Y. Kazo, K. Tagami et al. // Microbiology. – 2016. – Vol. 162, N. 3. – P. 448-458.
283. Basu A., Yap M. N. Ribosome hibernation factor promotes *Staphylococcal* survival and differentially represses translation // Nucleic Acids Research. – 2016. – Vol. 44, N. 10. – P. 4881-4893.
284. A glimpse on *Staphylococcus aureus* translation machinery and its control / I. Khusainov, A. Marena, M. Cerciati et al. // Molecular Biology (Moscow). – 2016. – Vol. 50, N. 4. – P. 549-557.
285. Structure of the 100S ribosome in the hibernation stage revealed by electron cryomicroscopy / T. Kato, H. Yoshida, T. Miyata et al. // Structure. – 2010. – Vol. 18, N. 6. – P. 719-724.
286. Structure of hibernating ribosomes studied by cryoelectron tomography *in vitro* and *in situ* / J. O. Ortiz, F. Brandt, V. R. Matias et al. // Journal of Cell Biology. – 2010. – Vol. 190, N. 4. – P. 613-621.
287. Structural basis for the control of translation initiation during stress / A. Vila-Sanjurjo, B. S. Schuwirth, C. W. Hau et al. // Nature Structural & Molecular Biology. – 2004. – Vol. 11, N. 11. – P. 1054-1059.
288. Solution structure of the *E. coli* ribosome hibernation promoting factor HPF: Implications for the relationship between structure and function / A. Sato, T.

- Watanabe, Y. Maki et al. // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2009. – Vol. 389, N. 4. – P. 580-585.
289. Hovmoller S., Zhou T., Ohlson T. Conformations of amino acids in proteins // Acta Crystallographica Section D. – 2002. – Vol. 58, N. 5. – P. 768-776.
290. Rajkovic A., Ibba M. Elongation Factor P and the Control of Translation Elongation // Annual Review of Microbiology. – 2017. – Vol. 71. – P. 117-131.
291. Entropic Contribution of Elongation Factor P to Proline Positioning at the Catalytic Center of the Ribosome / L. K. Doerfel, I. Wohlgemuth, V. Kubyshkin et al. // Journal of the American Chemical Society. – 2015. – Vol. 137, N. 40. – P. 12997-13006.
292. The highly conserved LepA is a ribosomal elongation factor that back-translocates the ribosome / Y. Qin, N. Polacek, O. Vesper et al. // Cell. – 2006. – Vol. 127, N. 4. – P. 721-733.
293. Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* / J. Schnier, H. G. Schwelberger, Z. Smit-McBride et al. // Molecular and Cellular Biology. – 1991. – Vol. 11, N. 6. – P. 3105-3114.
294. A paralog of lysyl-tRNA synthetase aminoacylates a conserved lysine residue in translation elongation factor P / T. Yanagisawa, T. Sumida, R. Ishii et al. // Nature Structural & Molecular Biology. – 2010. – Vol. 17, N. 9. – P. 1136-1143.
295. The tRNA synthetase paralog PoxA modifies elongation factor-P with (R)-beta-lysine / H. Roy, S. B. Zou, T. J. Bullwinkle et al. // Nature Chemical Biology. – 2011. – Vol. 7, N. 10. – P. 667-669.
296. Posttranslational synthesis of hypusine: evolutionary progression and specificity of the hypusine modification / E. C. Wolff, K. R. Kang, Y. S. Kim et al. // Amino Acids. – 2007. – Vol. 33, N. 2. – P. 341-350.

297. eIF5A and EF-P: two unique translation factors are now traveling the same road / D. Rossi, R. Kuroshu, C. F. Zanelli et al. // *Wiley Interdisciplinary Reviews-RNA*. – 2014. – Vol. 5, N. 2. – P. 209-222.
298. Bailly M., de Crecy-Lagard V. Predicting the pathway involved in post-translational modification of elongation factor P in a subset of bacterial species // *Biology Direct*. – 2010. – Vol. 5. – P. 3.
299. Cyclic Rhamnosylated Elongation Factor P Establishes Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* / A. Rajkovic, S. Erickson, A. Witzky et al. // *MBio*. – 2015. – Vol. 6, N. 3. – P. e00823.
300. Post-translational modification by beta-lysylation is required for activity of *Escherichia coli* elongation factor P (EF-P) / J. H. Park, H. E. Johansson, H. Aoki et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2012. – Vol. 287, N. 4. – P. 2579-2590.
301. Doerfel L. K., Rodnina M. V. Elongation factor P: Function and effects on bacterial fitness // *Biopolymers*. – 2013. – Vol. 99, N. 11. – P. 837-845.
302. Translation elongation factor EF-P alleviates ribosome stalling at polyproline stretches / S. Ude, J. Lassak, A. L. Starosta et al. // *Science*. – 2013. – Vol. 339, N. 6115. – P. 82-85.
303. Crystal structure of hyperthermophilic archaeal initiation factor 5A: a homologue of eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A) / M. Yao, A. Ohsawa, S. Kikukawa et al. // *Journal of Biochemistry*. – 2003. – Vol. 133, N. 1. – P. 75-81.
304. Crystal structure of human eIF5A1: insight into functional similarity of human eIF5A1 and eIF5A2 / Y. Tong, I. Park, B. S. Hong et al. // *Proteins*. – 2009. – Vol. 75, N. 4. – P. 1040-1045.
305. Structural Basis for Polyproline-Mediated Ribosome Stalling and Rescue by the Translation Elongation Factor EF-P / P. Huter, S. Arenz, L. V. Bock et al. // *Molecular Cell*. – 2017. – Vol. 68, N. 3. – P. 515-527.
306. Alejo J. L., Blanchard S. C. Miscoding-induced stalling of substrate translocation on the bacterial ribosome // *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America. – 2017. – Vol. 114, N. 41. – P. E8603-E8610.
307. Maintenance of protein synthesis reading frame by EF-P and m(1)G37-tRNA / H. B. Gamper, I. Masuda, M. Frenkel-Morgenstern et al. // *Nature Communications*. – 2015. – Vol. 6. – P. 7226.
308. Elongation factor-P at the crossroads of the host-endosymbiont interface / A. Rajkovic, A. Witzky, W. Navarre et al. // *Microbial Cell*. – 2015. – Vol. 2, N. 10. – P. 360-362.
309. Piotto M., Saudek V., Sklenar V. Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions // *Journal Biomolecular NMR*. – 1992. – Vol. 2, N. 6. – P. 661-665.
310. Hwang T. L., Shaka A. J. Water Suppression That Works. Excitation Sculpting Using Arbitrary Wave-Forms and Pulsed-Field Gradients // *Journal of Magnetic Resonance Series A*. – 1995. – Vol. 112. – P. 275-279.
311. Gardner K. H., Kay L. E. The use of ^2H , ^{13}C , ^{15}N multidimensional NMR to study the structure and dynamics of proteins // *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. – 1998. – Vol. 27. – P. 357-406.
312. The relationship between amide proton chemical shifts and secondary structure in proteins / T. Asakura, K. Taoka, M. Demura et al. // *Journal Biomolecular NMR*. – 1995. – Vol. 6, N. 3. – P. 227-236.
313. Montelione M. E., Rauenbuehler P., Wagner G. Accurate measurements of long-range heteronuclear coupling constants from homonuclear 2D NMR spectra of isotope-enriched proteins // *Journal of Magnetic Resonance*. – 1989. – Vol. 82. – P. 198–204.
314. Baxter N. J., Williamson M. P. Temperature dependence of ^1H chemical shifts in proteins // *Journal Biomolecular NMR*. – 1997. – Vol. 9, N. 4. – P. 359-369.
315. Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination / A. T. Brunger, P. D. Adams, G. M. Clore et al. // *Acta Crystallographica Section D*. – 1998. – Vol. 54, N. 5. – P. 905-921.

316. Bardiaux B., Malliavin T., Nilges M. ARIA for solution and solid-state NMR // *Methods in Molecular Biology*. – 2012. – Vol. 831. – P. 453-483.
317. PROCHECK, a program to check the stereochemical quality of protein structures / R. A. Laskowski, M. W. MacArthur, D. S. Moss et al. // *Journal of Applied Crystallography*. – 1993. – Vol. 26. – P. 283-291.
318. UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis / E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang et al. // *Journal of Computational Chemistry*. – 2004. – Vol. 25, N. 13. – P. 1605-1612.
319. Kabsch W. Xds // *Acta Crystallographica Section D*. – 2010. – Vol. 66, N. 2. – P. 125-132.
320. Phaser crystallographic software / A. J. McCoy, R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams et al. // *Journal of Applied Crystallography*. – 2007. – Vol. 40, N. 4. – P. 658-674.
321. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution / P. D. Adams, P. V. Afonine, G. Bunkoczi et al. // *Acta Crystallographica Section D*. – 2010. – Vol. 66, N. 2. – P. 213-221.
322. Emsley P., Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics // *Acta Crystallographica Section D*. – 2004. – Vol. 60, N. 12. – P. 2126-2132.
323. Scipion: A software framework toward integration, reproducibility and validation in 3D electron microscopy / J. M. de la Rosa-Trevin, A. Quintana, L. Del Cano et al. // *Journal of Structural Biology*. – 2016. – Vol. 195, N. 1. – P. 93-99.
324. Xmipp 3.0: an improved software suite for image processing in electron microscopy / J. M. de la Rosa-Trevin, J. Oton, R. Marabini et al. // *Journal of Structural Biology*. – 2013. – Vol. 184, N. 2. – P. 321-328.
325. Rohou A., Grigorieff N. CTFFIND4: Fast and accurate defocus estimation from electron micrographs // *Journal of Structural Biology*. – 2015. – Vol. 192, N. 2. – P. 216-221.

326. A pattern matching approach to the automatic selection of particles from low-contrast electron micrographs / V. Abrishami, A. Zaldivar-Peraza, J. M. de la Rosa-Trevin et al. // *Bioinformatics*. – 2013. – Vol. 29, N. 19. – P. 2460-2468.
327. Scheres S. H. RELION: implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination // *Journal of Structural Biology*. – 2012. – Vol. 180, N. 3. – P. 519-530.
328. Kucukelbir A., Sigworth F. J., Tagare H. D. Quantifying the local resolution of cryo-EM density maps // *Nature Methods*. – 2014. – Vol. 11, N. 1. – P. 63-65.
329. Stoll S., Schweiger A. EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR // *Journal of Magnetic Resonance*. – 2006. – Vol. 178, N. 1. – P. 42-55.
330. Repair of global regulators in *Staphylococcus aureus* 8325 and comparative analysis with other clinical isolates / S. Herbert, A. K. Ziebandt, K. Ohlsen et al. // *Infection and Immunity*. – 2010. – Vol. 78, N. 6. – P. 2877-2889.
331. Oligomerization of protegrin-1 in the presence of DPC micelles. A proton high-resolution NMR study / C. Roumestand, V. Louis, A. Aumelas et al. // *FEBS Letters*. – 1998. – Vol. 421, N. 3. – P. 263-267.
332. Activity of protegrins against yeast-phase *Candida albicans* / Y. Cho, J. S. Turner, N. N. Dinh et al. // *Infection and Immunity*. – 1998. – Vol. 66, N. 6. – P. 2486-93.
333. Lazaridis T., He Y., Prieto L. Membrane interactions and pore formation by the antimicrobial peptide protegrin // *Biophysical Journal*. – 2013. – Vol. 104, N. 3. – P. 633-642.
334. Vivcharuk V., Kaznessis Y. N. Dimerization of protegrin-1 in different environments // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2010. – Vol. 11, N. 9. – P. 3177-3194.
335. Membrane-bound dimer structure of a beta-hairpin antimicrobial peptide from rotational-echo double-resonance solid-state NMR / R. Mani, M. Tang, X. Wu et al. // *Biochemistry*. – 2006. – Vol. 45, N. 27. – P. 8341-8349.

336. Колосова О. А. Исследование пространственной структуры антимикробных пептидов – протегринов (PG-2 - PG-5) в растворе с мицеллами методами спектроскопии ЯМР высокого разрешения: дис. на соиск. учен. степ. кан. физ.- мат. наук –Каз. (Прив.) фед. ун-т. / О. А. Колосова: Казань. – 2018. – 121 с.
337. Bolintineanu D. S., Kaznessis Y. N. Computational studies of protegrin antimicrobial peptides: a review // *Peptides*. – 2011. – Vol. 32, N. 1. – P. 188-201.
338. Jang H., Ma B., Nussinov R. Conformational study of the protegrin-1 (PG-1) dimer interaction with lipid bilayers and its effect // *BMC Structural Biology*. – 2007. – Vol. 7. – P. 21.
339. Defining the genetic relationship of protegrin-related sequences and the *in vivo* expression of protegrins / M. K. Choi, M. T. Le, H. Cho et al. // *FEBS Journal*. – 2014. – Vol. 281, N. 24. – P. 5420-5431.
340. Аюпов Р. Х. Биохимические и структурные исследования фактора регуляции трансляции SaHPF: дис. на соиск. учен. степ. кан. биол. наук –Каз. (Прив.) фед. ун-т. / Р. Х. Аюпов: Казань. – 2017. – 102 с.
341. TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts / Y. Shen, F. Delaglio, G. Cornilescu et al. // *Journal Biomolecular NMR*. – 2009. – Vol. 44, N. 4. – P. 213-223.
342. Schanda P., Forge V., Brutscher B. HET-SOFAST NMR for fast detection of structural compactness and heterogeneity along polypeptide chains // *Magnetic Resonance in Chemistry*. – 2006. – Vol. 44. – P. 177-184.
343. A simple method for improving protein solubility and long-term stability / A. P. Golovanov, G. M. Hautbergue, S. A. Wilson et al. // *Journal of the American Chemical Society*. – 2004. – Vol. 126, N. 29. – P. 8933-8939.
344. Structural rearrangements in mRNA upon its binding to human 80S ribosomes revealed by EPR spectroscopy / A. A. Malygin, D. M. Graifer, M. I. Meschaninova et al. // *Nucleic Acids Research*. – 2018. – Vol. 46, N. 2. – P. 897-904.

345. Exploring the interactions of short RNAs with the human 40S ribosomal subunit near the mRNA entry site by EPR spectroscopy / A. A. Malygin, O. A. Krumkacheva, D. M. Graifer et al. // *Nucleic Acids Research*. – 2019. – Vol. 47, N. 22. – P. 11850-11860.
346. Doubly Spin-Labeled RNA as an EPR Reporter for Studying Multicomponent Supramolecular Assemblies / A. A. Malygin, D. M. Graifer, M. I. Meschaninova et al. // *Biophysical Journal*. – 2015. – Vol. 109, N. 12. – P. 2637-2643.
347. Complementary-addressed site-directed spin labeling of long natural RNAs / E. S. Babaylova, A. A. Malygin, A. A. Lomzov et al. // *Nucleic Acids Research*. – 2016. – Vol. 44, N. 16. – P. 7935-7943.
348. Misra S. K. Multifrequency Electron Paramagnetic Resonance: Theory and Applications. – Weinheim: Wiley, 2011. – 1056 p.
349. EF-P Posttranslational Modification Has Variable Impact on Polyproline Translation in *Bacillus subtilis* / A. Witzky, K. R. Hummels, R. Tollerson et al. // *MBio*. – 2018. – Vol. 9, N. 2. – P. e00306-18.
350. Translation Control of Swarming Proficiency in *Bacillus subtilis* by 5-Aminopentanoylated Elongation Factor P / A. Rajkovic, K. R. Hummels, A. Witzky et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2016. – Vol. 291, N. 21. – P. 10976-10985.
351. Structural Basis for Linezolid Binding Site Rearrangement in the *Staphylococcus aureus* Ribosome / M. J. Belousoff, Z. Eyal, M. Radjainia et al. // *mBio*. – 2017. – Vol. 8, N. 3. – P. e00395-17.
352. Molecular characterization of tlyA gene product, Rv1694 of *Mycobacterium tuberculosis*: A non-conventional hemolysin and a ribosomal RNA methyl transferase / A. Rahman, S. S. Srivastava, A. Sneha et al. // *BMC Biochemistry*. – 2010. – Vol. 11. – P. 35
353. *Mycobacterium tuberculosis* TlyA Protein Negatively Regulates T Helper (Th) 1 and Th17 Differentiation and Promotes Tuberculosis Pathogenesis / M.

- A. Rahman, P. Sobia, V. P. Dwivedi et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2015. – Vol. 290, N. 23. – P. 14407-14417.
354. A single methyltransferase YefA (RlmCD) catalyses both m(5)U747 and m(5)U1939 modifications in *Bacillus subtilis* 23S rRNA / B. Desmolaize, C. Fabret, D. Bregeon et al. // *Nucleic Acids Research*. – 2011. – Vol. 39, N. 21. – P. 9368-9375.
355. YbeA is the m(3)Psi methyltransferase RlmH that targets nucleotide 1915 in 23S rRNA / E. Purta, K. H. Kaminska, J. M. Kasprzak et al. // *RNA*. – 2008. – Vol. 14, N. 10. – P. 2234-2244.
356. Identification of *Escherichia coli* m(2) G methyltransferases: I. The ycbY gene encodes a methyltransferase specific for G2445 of the 23 S rRNA / D. V. Lesnyak, P. V. Sergiev, A. A. Bogdanov et al. // *Journal of Molecular Biology*. – 2006. – Vol. 364, N. 1. – P. 20-25.
357. YgdE is the 2'-O-ribose methyltransferase RlmM specific for nucleotide C2498 in bacterial 23S rRNA / E. Purta, M. O'Connor, J. M. Bujnicki et al. // *Molecular Microbiology*. – 2009. – Vol. 72, N. 5. – P. 1147-1158.
358. Phenotypic Landscape of a Bacterial Cell / R. J. Nichols, S. Sen, Y. J. Choo et al. // *Cell*. – 2011. – Vol. 144, N. 1. – P. 143-156.
359. Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria / S. Okamoto, A. Tamaru, C. Nakajima et al. // *Molecular Microbiology*. – 2007. – Vol. 63, N. 4. – P. 1096-1106.
360. Brakieringras L., Phoenix P. The Control of Accuracy during Protein-Synthesis in *Escherichia Coli* and Perturbations of This Control by Streptomycin, Neomycin, or Ribosomal Mutations // *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology*. – 1984. – Vol. 62, N. 5. – P. 231-244.
361. Kimura S., Suzuki T. Fine-tuning of the ribosomal decoding center by conserved methyl-modifications in the *Escherichia coli* 16S rRNA // *Nucleic Acids Research*. – 2010. – Vol. 38, N. 4. – P. 1341-1352.

362. Poldermans B., Bakker H., Vanknippenberg P. H. Studies on the Function of 2 Adjacent N-6,N-6-Dimethyladenosines near the 3' End of 16-S Ribosomal-Rna of *Escherichia Coli* .4. Effect of the Methylgroups on Ribosomal-Subunit Interaction // Nucleic Acids Research. – 1980. – Vol. 8, N. 1. – P. 143-151.
363. Capreomycin binds across the ribosomal subunit interface using tlyA-encoded 2 '-O-methylations in 16S and 23S rRNAs / S. K. Johansen, C. E. Maus, B. B. Plikaytis et al. // Molecular Cell. – 2006. – Vol. 23, N. 2. – P. 173-182.
364. Molecular modeling and in silico characterization of *Mycobacterium tuberculosis* TlyA: Possible misannotation of this tubercle bacilli-hemolysin / N. E. Arenas, L. M. Salazar, C. Y. Soto et al. // BMC Structural Biology. – 2011. – Vol. 11. – P. 16.
365. Base methylations in the double-stranded RNA by a fused methyltransferase bearing unwinding activity / S. Kimura, Y. Ikeuchi, K. Kitahara et al. // Nucleic Acids Research. – 2012. – Vol. 40, N. 9. – P. 4071-4085.
366. Benitez-Paez A., Villarroya M., Armengod M. E. The *Escherichia coli* RlmN methyltransferase is a dual-specificity enzyme that modifies both rRNA and tRNA and controls translational accuracy // RNA. – 2012. – Vol. 18, N. 10. – P. 1783-1795.
367. The methyltransferase YfgB/RlmN is responsible for modification of adenosine 2503 in 23S rRNA / S. M. Toh, L. Q. Xiong, T. Bae et al. // RNA. – 2008. – Vol. 14, N. 1. – P. 98-106.
368. Arenz S., Wilson D. N. Blast from the Past: Reassessing Forgotten Translation Inhibitors, Antibiotic Selectivity, and Resistance Mechanisms to Aid Drug Development // Molecular Cell. – 2016. – Vol. 61, N. 1. – P. 3-14.
369. Identification of 8-methyladenosine as the modification catalyzed by the radical SAM methyltransferase Cfr that confers antibiotic resistance in bacteria / A. M. B. Giessing, S. S. Jensen, A. Rasmussen et al. // RNA. – 2009. – Vol. 15, N. 2. – P. 327-336.
370. Characterization of the *Staphylococcus aureus* rRNA Methyltransferase Encoded by orfX, the Gene Containing the Staphylococcal Chromosome

- Cassette mec (SCCmec) Insertion Site / S. Boundy, M. K. Safo, L. Wang et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – Vol. 288, N. 1. – P. 132-140.
371. Identification of pseudouridine methyltransferase in *Escherichia coli* / R. Ero, L. Peil, A. Liiv et al. // *RNA*. – 2008. – Vol. 14, N. 10. – P. 2223-2233.
372. U2552 methylation at the ribosomal A-site is a negative modulator of translational accuracy / M. Widerak, R. Kern, A. Malki et al. // *Gene*. – 2005. – Vol. 347, N. 1. – P. 109-114.
373. The FtsJ/RrmJ heat shock protein of *Escherichia coli* is a 23 S ribosomal RNA methyltransferase / T. Caldas, E. Binet, P. Bouloc et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2000. – Vol. 275, N. 22. – P. 16414-16419.
374. Modification of 16S ribosomal RNA by the KsgA methyltransferase restructures the 30S subunit to optimize ribosome function / H. Demirci, F. Murphy, R. Belardinelli et al. // *RNA*. – 2010. – Vol. 16, N. 12. – P. 2319-2324.
375. The path of mRNA through the bacterial ribosome: A site-directed crosslinking study using new photoreactive derivatives of guanosine and uridine / P. V. Sergiev, I. N. Lavrik, V. A. Wlasoff et al. // *RNA*. – 1997. – Vol. 3, N. 5. – P. 464-475.
376. Involvement of Helix 34 of 16 S rRNA in decoding and translocation on the ribosome / A. Kubarenko, P. Sergiev, W. Wintermeyer et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2006. – Vol. 281, N. 46. – P. 35235-35244.
377. Jemiolo D. K., Taurence J. S., Giese S. Mutations in 16S Ribosomal RNA in *Escherichia Coli* at Methyl Modified Sites - G966, C967, and G1207 // *Nucleic Acids Research*. – 1991. – Vol. 19, N. 15. – P. 4259-4265.

Список авторских публикаций по теме диссертации**Статьи в рецензируемых научных изданиях индексируемые базами****Scopus, Web of Science:**

- A1. High-resolution NMR structure of the antimicrobial peptide protegrin-2 in the presence of DPC micelles / K.S. Usachev, S.V. Efimov, O.V. Kolosova, A.V. Filippov, V.V. Klochkov // *Journal of Biomolecular NMR*. – 2015. – Vol. 61. – P. 227-234.
- A2. Antimicrobial peptide protegrin-3 adopt an antiparallel dimer in the presence of DPC micelles: A high-resolution NMR study / K.S. Usachev, S.V. Efimov, O.A. Kolosova, E.A. Klochkova, A.V. Aganov, V.V. Klochkov // *Journal of Biomolecular NMR*. – 2015. – Vol.62. – P. 71-79.
- A3. Antimicrobial Peptide Protegrins Interact with DPC Micelles by Apolar Hydrophobic Cluster: Structural Studies by High-Resolution NMR Spectroscopy / O.A. Kolosova, K.S. Usachev, A.V. Aganov, V.V. Klochkov // *BioNanoScience*. – 2016. – Vol. 6. – P. 317–319.
- A4. Oligomerization of the antimicrobial peptide protegrin-5 in membrane-mimicking environment. Structural studies by high-resolution NMR spectroscopy / K.S. Usachev, O.A. Kolosova, E.A. Klochkova, A.R. Yulmetov, A.V. Aganov, V.V. Klochkov // *European Biophysics Journal*. – 2017. – Vol. 46. – P. 293-300.
- A5. Structures and dynamics of hibernating ribosomes from *Staphylococcus aureus* mediated by intermolecular interactions of HPF / I. Khusainov, Q. Vicens, R. Ayupov, K. Usachev, A. Myasnikov, A. Simonetti, Sh. Validov, B. Kieffer, G. Yusupova, M. Yusupov, Y. Hashem // *The EMBO journal*. – 2017. – Vol. 36, N. 14. – P. 2073-2087.
- A6. Выделение и очистка белка HPF из *Staphylococcus aureus* и анализ его структуры методом спектроскопии ЯМР / Р.Х. Аюпов, К.С. Усачев, И.Ш. Хусаинов, Б. Киеффер, М.М. Юсупов // *Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки*. – 2017. – Т. 152, № 2. – С.332-341.

- A7. NMR assignments of the N-terminal domain of *Staphylococcus aureus* Hibernation Promoting Factor (SaHPF) / K.S. Usachev, R.Kh. Ayupov, Sh. Z. Validov, I. Sh. Khusainov, M.M. Yusupov // Biomolecular NMR Assignments. – 2018. – Vol. 12. – P. 85-89.
- A8. Backbone and side chain NMR assignments for the ribosome Elongation Factor P (EF-P) from *Staphylococcus aureus* / K.S. Usachev, Golubev A.A., Sh.Z. Validov, V.V. Klochkov, A.A. Aganov, I. Sh. Khusainov, M.M. Yusupov // Biomolecular NMR Assignments. 2018. – Vol. 12. – P. 351-355.
- A9. Элонгационный фактор P: новые механизмы работы и эволюционное разнообразие регуляции трансляции (Обзор) / А.А. Голубев, Ш.З. Валидов, К.С. Усачев, М.М. Юсупов // Молекулярная биология. – 2019. – Т.53, №4. – С. 561-573.
- A10. Structural Dynamics of a SpinLabeled ribosome Elongation Factor P (EF-P) from *Staphylococcus aureus* by EPR Spectroscopy / K.S. Usachev E.A. Klochkova, A.A. Golubev, S.Z. Validov, F.F. Murzakhanov, M.R. Gafurov, V.V. Klochkov, A.V. Aganov, I.Sh. Khusainov, M.M. Yusupov // SN Applied Sciences. – 2019. – Vol. 1. – P. 442(1-4).
- A11. Solution structure of the N-terminal domain of the *Staphylococcus aureus* Hibernation Promoting Factor / K.S. Usachev, S.Z. Validov, I.Sh. Khusainov, A.A. Varfolomeev, V.V. Klochkov, A.V. Aganov, M.M. Yusupov // Journal of Biomolecular NMR. – 2019. – Vol. 73, N. 5. – P. 223-227.
- A12. Гибернация – стадия функционирования рибосом (Обзор) / К.С. Усачев, М.М. Юсупов, Ш.З. Валидов // Биохимия. – 2020. – Т. 85, № 11. – С. 1690-1700.
- A13. Dimerization of long Hibernation Promoting Factor from of *Staphylococcus aureus*: structural analysis and biochemical characterization / K.S. Usachev*, B.F. Fatkhullin*, E.A. Klochkova, A.K. Miftakhov, A.S. Golubev, A.G. Bikhullin, L.I. Nurullina, N.S. Garaeva, D.R. Islamov, A.G. Gabdulkhakov, N.V. Lekontseva, S.V. Tishchenko, V.A. Balobanov, I.Sh.

- Khusainov, M.M. Yusupov, Sh.Z. Validov // *Journal of Structural Biology*. – 2020. – Vol. 209, N.1. – P. 107408(1-7).
- A14. NMR and crystallographic structural studies of the Elongation Factor P from *Staphylococcus aureus* / A. Golubev, B. Fatkhullin, A. Gabdulkhakov, A. Bikmullin, L. Nurullina, N. Garaeva, D. Islamov, E. Klochkova, V. Klochkov, A. Aganov, I. Khusainov, Sh. Validov, G. Yusupova, M. Yusupov, K. Usachev // *European Biophysics Journal*. – 2020. – Vol. 49. – P. 223-230.
- A15. Cryo-EM structure of the ribosome functional complex of the human pathogen *Staphylococcus aureus* at 3.2 Å resolution / A. Golubev, B. Fatkhullin, I. Khusainov, L. Jenner, A. Gabdulkhakov, Sh. Validov, G. Yusupova, M. Yusupov, K. Usachev // *FEBS Letters*. – 2020. – Vol. 594. – P. 3551-3567.
- A16. Posttranslational modification of Elongation Factor P from *Staphylococcus aureus* / A. Golubev, L. Negroni, F. Krasnovid, Sh. Validov, G. Yusupova, M. Yusupov, K. Usachev // *FEBS Open Bio*. – 2020. – Vol. 10. – P. 1342-1347.

*равный вклад

Избранные тезисы докладов на научных конференциях индексируемые базами Scopus, Web of Science, РИНЦ:

- A17. Hibernating ribosomes of *Staphylococcus aureus* as a potential target for new therapeutics / I. Khusainov, S. Validov, R. Ayupov, K. Usachev, M. Yusupov // *FEBS OpenBio*. – 2018. – Vol. 8, N. S1. – P. 430.
- A18. *Staphylococcus aureus* hibernation promoting factor interaction with 70S ribosome determined by high resolution NMR spectroscopy / K. Usachev, S. Validov, I. Khusainov, R. Ayupov, V. Klochkov, A. Aganov, B. Kieffer, M. Yusupov // *FEBS OpenBio*. – 2018. – Vol. 8, N. S1. – P. 433.
- A19. Solution NMR structure of Hibernation Promoting Factor reveals detailed interface of ribosome dimerization in *Staphylococcus aureus* / K.S. Usachev, A.G. Bikmullin, B.F. Fatkhullin, I.S. Khusainov, A.G. Gabdulkhakov, S.Z.

- Validov, V.V. Klochkov, A.V. Aganov, B. Kieffer, M.M. Yusupov // *Molecular Biology of the Cell*. – 2018 – Vol. 29, N. 26. – P. 629-630.
- A20. Crystal structure of C-terminal domain homodimer of Hibernation Promoting Factor from *Staphylococcus aureus* / B.F. Fatkhullin, A.G. Gabdulkhakov, N. Lekontceva, S.V. Tischenko, I.S. Khusainov, S.Z. Validov, A. Finkelstein, K.S. Usachev, M.M. Yusupov // *Molecular Biology of the Cell*. – 2018 – Vol. 29, N. 26. – P. 630.
- A21. Analysis of the polyproline protein content of *Staphylococcus aureus* / A. Golubev, D. Blokhin, I. Khusainov, Sh. Validov, M. Yusupov, K. Usachev // *Molecular Biology of the Cell*. – 2018 – Vol. 29, N. 26. – P. 604-605.
- A22. Elongation factor P: on the journey to a new type of post translational modification / Sh. Validov, A. Golubev, I. Khusainov, K. Usachev // *Molecular Biology of the Cell*. – 2018 – Vol. 29, N. 26. – P. 605-606.
- A23. Structure investigations of PG-4 by High Resolution NMR spectroscopy / O. Kolosova, K. Usachev, E. Klochkova, V. Klochkov // *Molecular Biology of the Cell*. – 2018 – Vol. 29, N. 26. – P. 561.
- A24. Структурные исследования механизма гибернации рибосом *Staphylococcus aureus* с целью поиска новых мишеней для антибиотиков / К.С. Усачев, И.Ш. Хусаинов, Б.Ф. Фатхуллин, Ш.З. Валидов, В.В. Клочков, А.В. Аганов, М.М. Юсупов // *Наука и инновационные технологии*. – 2018. – Т. 3, N. 8. – С. 64-66.
- A25. Structural and functional studies of the *Staphylococcus aureus* ribosome hibernation / K. Usachev, I. Khusainov, B. Fatkhullin, Sh. Validov, M. Yusupov // *International Journal of Biomedicine*. – 2019. – Vol. 9, N. S1. – P. 11-12.