

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М. В. ЛОМОНОСОВА**

Химический факультет

На правах рукописи



Плетнёв Филипп Игоревич

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

Специальность 02.00.10 – биоорганическая химия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
д. х. н., профессор РАН Сергиев П.В.

Москва – 2020

Оглавление

Список используемых сокращений	5
Введение	6
Актуальность проблемы	6
Степень разработанности темы	7
Цели и задачи исследования	7
Объект исследования	7
Предмет исследования	8
Научная новизна исследования	8
Теоретическая значимость исследования	8
Практическая значимость исследования	8
Методология диссертационного исследования	9
Основные положения, выносимые на защиту	9
Степень достоверности результатов	10
Апробация работы	10
Публикация работы	10
Личный вклад автора	11
Структура и объем диссертации	11
Обзор литературы	12
Стадии роста бактериальной культуры	12
Изменения в структуре и топологии ДНК	14
Регуляция транскрипции в стационарной фазе	18
σ^{70} – регулятор экспрессии генов домашнего хозяйства	20
Регуляция активности σ^{70} в стационарной фазе	21
σ^{38} – сигма фактор стационарной фазы	24
Некоторые регуляторы транскрипции в стационарной фазе	28
Строгий ответ	30
Процесс трансляции <i>E. coli</i> в стационарной фазе	35

Структура рибосомы <i>E. coli</i>	35
Механизмы защиты при незначительном голоде.....	37
Гибернация рибосом как ответ на усиливающийся голод	38
Трансляция в условиях длительного голода. Фаза смерти и запрограммированная клеточная гибель.....	42
Структурные особенности клеток в стационарной фазе роста	43
Микроэволюция бактерий в стационарной фазе	46
Заключение	48
Материалы и методы.....	50
Реактивы и биопрепараты	50
Штаммы	53
Олигонуклеотиды	53
Манипуляции с ДНК.....	55
Манипуляции с РНК	57
Манипуляции с клетками	59
Выделение рибосом, белков, клеточных экстрактов	64
Манипуляции с белками.....	65
Результаты.....	68
Постановка задачи	68
Полногеномное секвенирование штамма <i>ΔrimK</i> из Keio коллекции и получение новых штаммов	69
Влияние мутации I48S на кинетику роста и выживаемость клеток	70
Влияние мутации I48S на метаболическую активность клеток <i>E. coli</i>	72
Изучение транскриптома штамма I48S.....	79
Влияние мутации I48S на <i>in vitro</i> активность РНК-полимеразы.....	85
Получение делеции гена <i>rimK</i>	92
Определение статуса модификации белка S6 в стационарной фазе	95
Изучение регуляции экспрессии гена <i>rimK</i>	97

Поиск причины неконститутивности модификации S6.....	104
Обсуждение.....	107
Выводы	118
Список литературы.....	119
Приложения	129

Список используемых сокращений

(p)ppGpp – гуанозин-пентафосфат (тетрафосфат)

A – аденин или остаток адениловой кислоты

C – цитозин или остаток цитидиловой кислоты

G – гуанин или остаток гуаниловой кислоты

L – белки 50S субчастицы

MALDI – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация

S – белки 30S субчастицы

SDS – додецилсульфат натрия

T – тимин или остаток тимидиловой кислоты

ДЭ – дифференциальная экспрессия

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

кДа – килодальтон

КОЕ – колониеобразующая единица

мРНК – матричная РНК

МС – масс-спектрометрия

НТО – нетранслируемая область

ОЕ – оптические единицы

П.О. – пар оснований

ПААГ – полиакриламидный гель

ПКГ – программируемая клеточная гибель

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

РНКП – РНК-полимераза

рРНК – рибосомная РНК

ТА – систем токсин-антитоксин

тмРНК – транспортно-матричная РНК

тРНК – транспортная РНК

Введение

Актуальность проблемы

В отличие от лабораторных условий, в естественных условиях обитания бактериальная популяция постоянно подвергается воздействию различных стрессов. Негативное влияние окружающей среды, накопление токсичных отходов метаболизма при голоде, антибиотики – все это является предметом постоянной заботы для *Escherichia coli*. Одним из способов борьбы с голодом или агрессивными условиями окружающей среды является переход клеток в стационарную фазу. Подобный переход сопровождается активацией внутренних систем защиты от стресса, которые являются критически важными для бактериальной клетки. Для выживания в подобных неблагоприятных условиях она способна кардинально изменять свою организацию, как на молекулярном уровне, так и на уровне структурной организации отдельной клетки. Именно стационарная фаза представляет наибольший интерес с практической точки зрения, ведь именно в этом состоянии бактерии «вступают в бой» с человечеством посредством увеличения устойчивости к антибиотикам и другим стрессам [78]. Таким образом, в наше время, когда основы ключевых молекулярных процессов логарифмической фазы роста достаточно подробно описаны, изучение любых процессов, ассоциированных со стационарной фазой, представляет огромный интерес.

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

функциональной роли олигоглутамилирование рибосомного белка S6, но и исследование эффектов, оказываемых изучаемой мутацией σ^{70} на жизнедеятельность клеток *E. coli*.

Степень разработанности темы

Регион 1.1 является одним из наименее изученных доменов сигма-фактора σ^{70} . Ранее для него были описаны некоторые мутации (I53A [17], G52A и D61A, [142]), влияющие на стабильность промоторных комплексов, которые образуются РНКП, содержащей мутантную σ^{70} , однако их влияние на транскрипцию так и не было изучено *in vivo*. В свою очередь, олигоглутамилирование рибосомного белка S6 остается одной из последних модификаций рибосомы *E. coli*, для которой так и не была изучена ее функциональная роль.

Цели и задачи исследования

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

Для достижения целей исследования были поставлены следующие задачи:

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

Объект исследования

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

Предмет исследования

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

Научная новизна исследования

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

Теоретическая значимость исследования

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

Практическая значимость исследования

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

Методология диссертационного исследования

В данной работе использовались современные биохимические и молекулярно-биологические методы. Для изучения регуляции экспрессии гена *rimK*, а также для оценки метаболической активности клеток *E. coli* использовали флуоресцентно-активированную проточную цитометрию с помощью высокоскоростного клеточного сортера BD FACSAria III (Beckton Dickinson). Для определения статуса модификации белка S6 выделяли рибосомы и проводили идентификацию «отпечатков пептидных масс» с помощью масс-спектрометрии на приборе Ultraflex II (Bruker). Анализ влияния мутации I48S на регуляцию транскрипции проводили с помощью высокопроизводительного секвенирования РНК на платформе Illumina HiSeq2500. Выделение РНК, ДНК обратную транскрипцию и ПЦР проводили с помощью специализированных коммерчески доступных наборов реактивов. Иммуноблоттинг, количественный и качественный анализ белков и РНК осуществляли с помощью электрофореза.

Основные положения, выносимые на защиту

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

Степень достоверности результатов

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

Апробация работы

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

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

Публикация работы

Результаты работы представлены в публикациях в международных рецензируемых журналах, индексируемых в Web of Science и Scopus.

- 1) **Pletnev P.**, Pupov D., Pshanichnaya L., Esyunina D., Petushkov I., Nesterchuk M., Osterman I., Rubtsova M., Mardanov A., Ravin N., Sergiev P.,

Kulbachinskiy A., Dontsova O. Rewiring of growth-dependent transcription regulation by a point mutation in region 1.1 of the housekeeping σ factor // Nucleic Acids Res. 2020. №. 48(19), С. 10802-10819. IF 11,502 (Web of Science).

- 2) **Pletnev P.**, Nesterchuk M., Rubtsova M., Serebryakova M., Dmitrieva K., Osterman I., Bogdanov A., Sergiev P. Oligoglutamylolation of *E. coli* ribosomal protein S6 is under growth phase control // Biochimie. 2019. 167, С. 61-67. IF 3,413 (Web of Science).
- 3) **Pletnev P.**, Osterman I., Sergiev P., Bogdanov A., Dontsova O. Survival guide: *Escherichia coli* in the stationary phase // Acta Naturae (англоязычная версия). 2015 №4 (7), С. 22-33. IF 1,360 (Web of Science).

Личный вклад автора

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

Структура и объем диссертации

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

Обзор литературы

Данный обзор литературы посвящен теме регуляции экспрессии генов при переходе от состояния активного роста бактериальной культуры к стационарной фазе, в которой происходит кардинальное изменение метаболизма бактериальных клеток. Помимо вопросов регуляции экспрессии генов в обзоре освещаются основные понятия о стационарной фазе, а также некоторые особенности клеток, позволяющие им более эффективно выживать в условиях голода или стресса. Основой для данной главы стал обзор автора диссертации, опубликованный ранее [1, 111].

Стадии роста бактериальной культуры

Рост бактериальной культуры представляет собой последовательный процесс бинарного деления клеток, составляющих эту культуру, с образованием двух идентичных дочерних клеток.

В работе по изучению выживаемости клеток *Escherichia coli*, при культивировании в течение нескольких дней, была отмечена характерная форма кривой роста, которую можно разделить на пять фаз. Несмотря на различия в условиях культивирования, измерения и даже видовых особенностей, общая форма этой кривой, за исключением некоторых параметров, всегда остается неизменной. Характерная кривая роста бактериальной культуры приведена на рис. 1 [37].

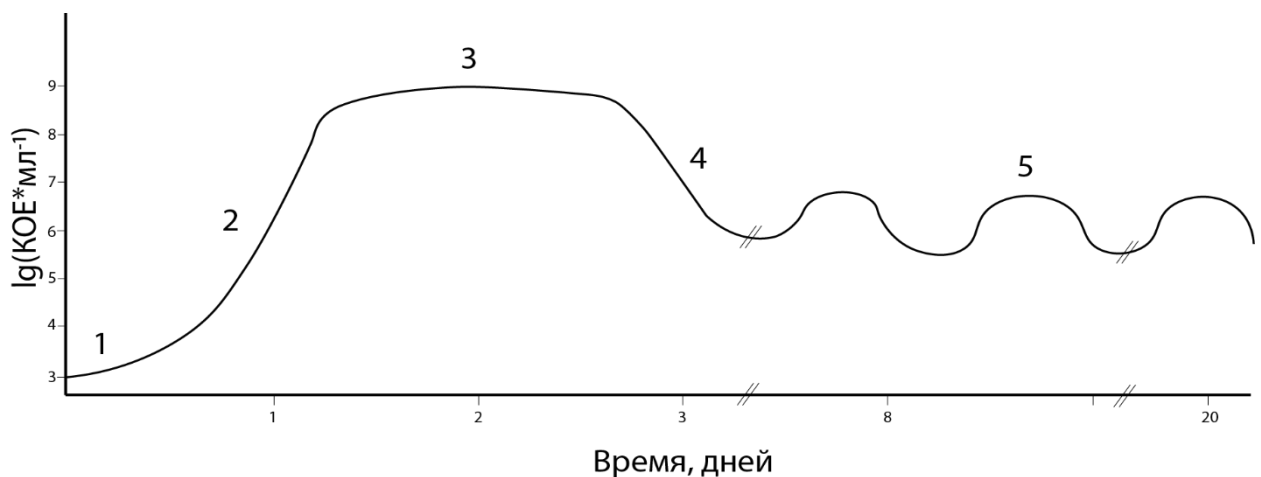


Рисунок 1. Кривая роста бактериальной культуры, на графике отмечены фазы роста 1 – лаг-фаза, 2 – логарифмическая фаза, 3 – стационарная фаза, 4 – фаза смерти, 5 – долговременная стационарная фаза.

В момент, когда клетки попадают в питательную среду после длительного голодания или стресса, можно наблюдать то, что принято называть лаг-фазой. Особенностью этой фазы является то, что в течение некоторого времени практически не наблюдается роста бактериальной культуры, что можно объяснить тем, что клеткам требуется время на адаптацию своего метаболизма к новым условиям окружающей среды. Длительность этой фазы определяется не только видом бактерии, но и тем, насколько долго культура находилась в условиях голода [109].

После адаптации метаболизма к новым условиям культивирования клетки начинают активное деление и входят в логарифмическую фазу роста. Так как бактериальные клетки размножаются бинарным делением, то увеличение количества клеток в среде за единицу времени хорошо аппроксимируется экспоненциальной функцией. Ключевой характеристикой роста культуры в логарифмической фазе является время удвоения количества клеток. Стоит отметить, что этот параметр напрямую зависит от среды культивирования и сильно уменьшается при переходе от богатой среды к более бедной. Для стандартного лабораторного штамма *E. coli* MG1655 К-12 время удвоения при 37°C в богатой среде составляет около 30 минут.

После исчерпания питательных веществ в окружающей среде, бактериальная культура переходит в стационарную фазу, которая характеризуется равновесием между количеством делящихся и гибнущих клеток, что отражается на кривой роста в виде плато. Стоит отдельно отметить, что термин стационарная фаза означает именно участок на кривой роста, при которой наблюдается равновесие между делящимися и гибнущими клетками, а не конкретное метаболическое состояние клеток. Стационарная фаза наступает в популяции клеток не только из-за нехватки ресурсов во внешней среде, но и из-за воздействия различных стрессовых агентов. Чем дольше бактериальная культура находится в стационарной фазе, тем активнее в среде накапливаются токсичные продукты катаболизма, что приводит к уменьшению количества жизнеспособных клеток. Этот этап роста бактериальной

культуры принято называть фазой смерти. Уменьшение титра жизнеспособных клеток часто объясняют двумя независимыми процессами, а именно, программируемой и случайной гибелью клеток.

Конец фазы смерти наступает после того, как значительная часть популяции клеток погибает, и остатки питательных веществ из мертвых клеток попадают в окружающую среду. Уцелевшие клетки могут использовать эти ресурсы для своего выживания, что приводит бактериальную культуру в состояние долговременной стационарной фазы, которая может сохраняться в культуре в течение нескольких недель и даже месяцев. Одной из характерных особенностей долговременной стационарной фазы является циклическое увеличение и снижение титра жизнеспособных клеток в популяции. Данный феномен был назван GASP-фенотипом (Growth Advantage in Stationary Phase), который объясняется появлением мутантных клеток, более приспособленных для роста в данных условиях, чем родительский штамм [82].

Изменения в структуре и топологии ДНК

ДНК *E. coli* представлена одной бактериальной хромосомой, имеющей кольцевую форму и образующую в цитоплазме бактерии структуру, называемую нуклеоидом. В состав нуклеоида также входят белки (регуляторные и структурные) и РНК [83].

За поддержание структуры нуклеоида отвечает множество белков, экспрессия которых зависит от фазы роста бактериальной культуры. Наиболее значимыми из структурных белков нуклеоида являются: IHF, HU, Dps, Fis, H-NS.

Активной формой H-NS является димер, характерной особенностью которого является наличие двух, противоположно направленных, ДНК-связывающих доменов, которые позволяют белку выступать в роли «мостика» между двумя дуплексами ДНК. Консенсусная последовательность сайта связывания H-NS является сильно вырожденной (WATCAANNNTTR) [73], однако, известно, что данный фактор проявляет большее сродство к изогнутой,

нежели к линейной ДНК [83]. В логарифмической фазе роста в клетке на 1 молекулу H-NS приходится 1400 п.о. ДНК [9].

Гистон-подобный гомодимерный белок HU состоит либо из двух субъединиц HU α , либо из двух субъединиц HU β . HU проявляет высокое (40%) структурное сходство с белком IHF. HU неспецифично связывает ДНК, но при этом имеет повышенное сродство к суперскрученным и неупорядоченным формам ДНК [53]. Считается, что HU способен вызывать и стабилизировать изгиб двойной спирали ДНК, при этом угол изгиба может меняться в широком диапазоне значений [132]. Случайное связывание HU приводит к большому числу «подвижных» изгибов ДНК (с углами поворота до 180 градусов), что, в конечном счете, способствует уменьшению длины линейной ДНК на 50% [83]. Наибольшее количество HU наблюдается в клетке во время логарифмической фазы и составляет примерно 1 молекулу белка на 550 п.о. ДНК [9].

Фактор стимуляции инверсии (Fis) представляет собой гомодимерный ДНК-связывающий белок. Он проявляет способность распознавать определенные консенсусные последовательности ДНК длиной 15 п.о. (GNTYAAAWTTTRANC) [127], однако может эффективно связывать ДНК и в случайных участках. Связывание Fis приводит к изгибанию ДНК на угол от 50 до 90 градусов. Многие сайты связывания Fis находятся в регуляторных участках оперонов и связывание белка в этих участках играет регуляторную роль. В частности, Fis регулирует транскрипцию рРНК, тРНК и оперонов рибосомных белков. Предполагается, что Fis является «сенсором» суперскрученности ДНК и обладает способностью, в зависимости от топологии ДНК, ингибировать экспрессию гена ДНК-гиразы [83]. Fis один из наиболее представленных структурных белков нуклеоида в логарифмической фазе, в которой на каждую молекулу Fis приходится 450 п.о. ДНК [9].

Клеточный фактор интеграции (IHF) представляет собой гетеродимерный белок, обладающий высокой специфичностью к консенсусной последовательности ДНК TCGATAAATT [29]. Связывание IHF с ДНК приводит к изгибу последней,

этот изгиб стабилизируется взаимодействием отрицательно заряженного остова ДНК и преимущественно положительно заряженной поверхностью белка. Показано, что связывание IHF может приводить к снижению линейной длины ДНК на 30% [83]. Концентрация IHF достигает максимума в стационарной фазе, когда на 1 молекулу белка приходится 335 п.о. геномной ДНК [9], предполагается, что IHF отвечает за организацию структуры нуклеоида в ранней стационарной фазе.

В стационарной фазе можно наблюдать изменение морфологии генетического материала бактерии – нуклеоид становится более конденсированным, что позволяет защищать ДНК от повреждений. Этот механизм защиты ДНК осуществляется при помощи белка Dps (ДНК-связывающий белок из голодающих клеток), который способен неспецифично связывать ДНК [102] и активен именно в периоды голода. Экспрессия *dps* находится под контролем σ^{70} -субъединицы РНК-полимеразы и белка OxyR при окислительном стрессе в логарифмической фазе, а в периоды голода его экспрессия контролируется σ^{38} -фактором [4]. После индукции синтеза в стационарной фазе, Dps становится наиболее представленным белком в клетке *E. coli* [4]. Мономеры Dps способны образовывать додекамеры в форме колец, которые при связывании с ДНК в присутствии ионов магния, способствуют образованию высокоупорядоченного и стабильного нуклеопротеидного комплекса, который был назван «биокристалл» [148]. Именно образование этого комплекса приводит к конденсации нуклеоида. Похоже, что глобальная защитная роль Dps против различных стрессов (голода, окислительного стресса, УФ-излучения и радиоактивности, термического стресса и рН) осуществляется за счет комбинации нескольких его свойств – способности конденсировать ДНК, хелатировать ионы железа и проявлять ферроксидазную активность, а также за счет его способности регулировать экспрессию генов [60, 102].

Еще одним белком, который способствует защите ДНК от повреждений в стационарной фазе, является CbpA (Curved DNA binding protein). Показано, что в логарифмической фазе он отсутствует в клетке, однако при наступлении

стационарной фазы, его количество возрастает до 10000 копий на одну клетку. Транскрипция гена *cbpA* также зависима от σ^{38} -субъединицы РНК-полимеразы [9]. СbpA способен связывать ДНК только в форме димера, что приводит к ее агрегации и позволяет защитить ее от повреждения. Показано, что ДНК в комплексе с этим белком защищена от деградации эндонуклеазами *in vitro* [28].

Из литературных данных видно, что структурные белки нуклеоида оказывают прямое влияние не только на структуру бактериальной хромосомы, но и активно участвуют в регуляции экспрессии генов. Стоит отметить тот факт, что внутриклеточная концентрация каждого из этих белков сильно зависит от фазы роста бактериальной культуры. Считается, что все эти белки выполняют схожие функции по компактизации и защите ДНК от повреждений, однако, за счет различий в механизме укладки ДНК использование того или иного структурного белка нуклеоида позволяет клетке более гибко адаптироваться к окружающим условиям, облегчая доступ к хромосоме в благоприятных условиях и максимально защищая генетический материал в случае стресса. Количество структурных белков нуклеоида на одну клетку *E. coli*, в зависимости от фазы роста, представлено на рис. 2.

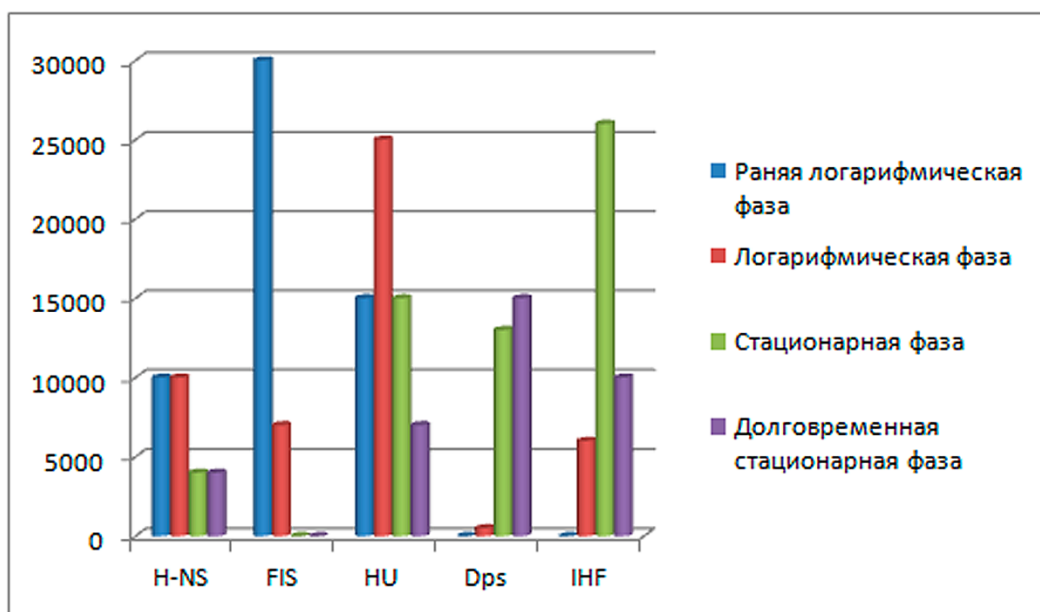


Рисунок 2. Нормированные (H-NS, Fis, HU, IHF – димеры, Dps – додекамер) количества копий структурных белков нуклеоида на клетку, в зависимости от фазы роста [9, 83].

Более детальное представление о распределении структурных факторов нуклеоида по всей длине хромосомы *E. coli* можно получить при изучении результатов иммунопреципитации хроматина с последующим секвенированием участков ДНК, совыделяющихся со структурными белками (ChIP-seq). Результаты подобного анализа приведены на рис. 3.

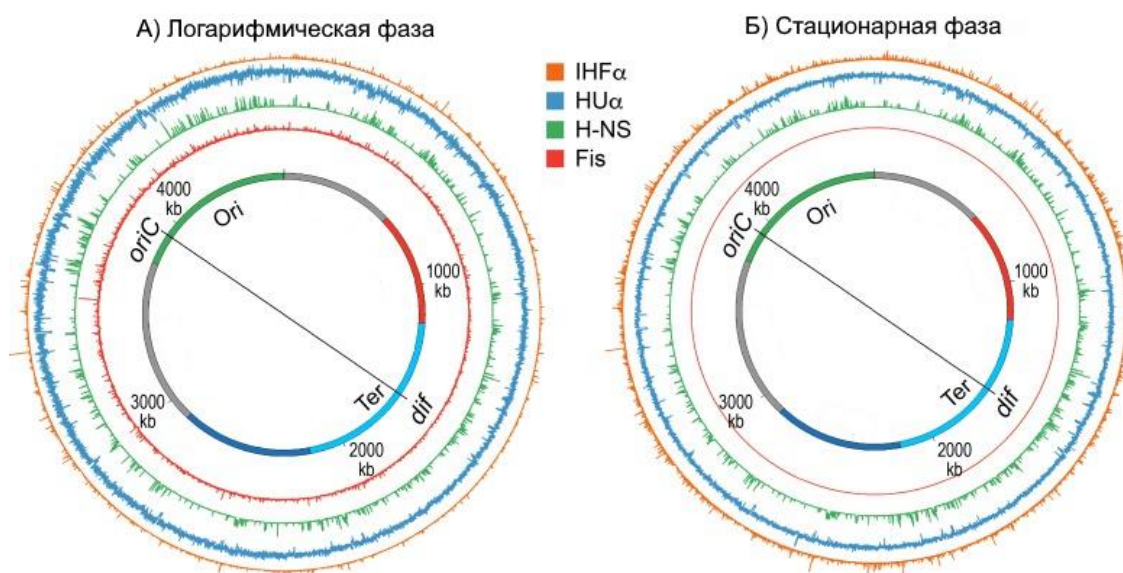


Рисунок 3. Распределение сайтов связывания структурных белков нуклеоида на хромосоме *Escherichia coli* [140]. На карте хромосомы отмечены точка начала репликации (*oriC*) и точка декатенации ДНК (*dif*). (А) Распределение в логарифмической фазе. (Б) Распределение в стационарной фазе.

Также, было показано, что метилирование цитозина в бактериальной ДНК может влиять на регуляцию экспрессии белков в стационарной фазе. При изучении штамма, нокаутного по гену метилтрансферазы Dcm было обнаружено, что в нем заметно повышена экспрессия генов стационарной фазы и, в частности, гена *groS*, кодирующего σ^{38} -субъединицу РНК-полимеразы [67].

Регуляция транскрипции в стационарной фазе

Ключевым этапом экспрессии генов является процесс транскрипции, в ходе которого происходит ДНК-зависимый синтез РНК. Именно транскрипция подвержена наибольшей регуляции как у бактерий, так и эукариот. Синтез РНК на матрице ДНК осуществляется ДНК-зависимой РНК-полимеразой.

У бактерий инициацию транскрипции осуществляет холофермент РНК-полимеразы, который состоит из минимального фермента и фактора инициации - σ -субъединицы или σ -фактора. Минимальный фермент состоит из пяти

субъединиц, а именно двух субъединиц α , β , β' и ω . Именно минимальный фермент содержит активный каталитический центр и выполняет функцию синтеза РНК. Для образования активного холофермента, способного синтезировать РНК, необходимо присоединение к РНК-полимеразе σ -субъединицы, которая отвечает за распознавание промотора [61]. Структура холофермента РНК-полимеразы *E. coli* приведена на рис. 4.

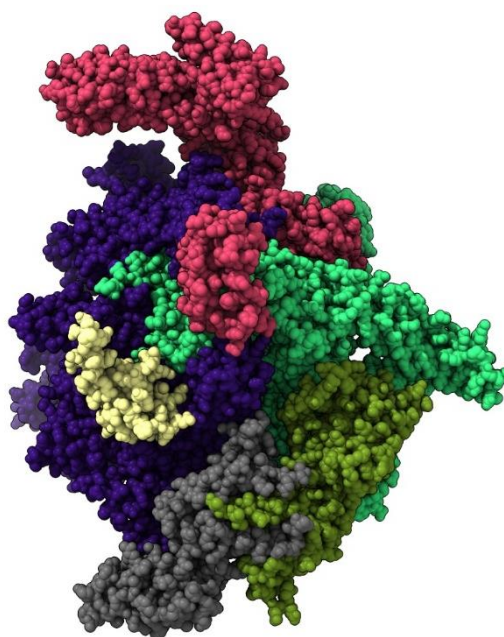


Рисунок 4. Структура холофермента РНК-полимеразы *E. coli*, содержащего σ^{70} -субъединицу. Красным цветом показана σ^{70} , болотным и серым цветом показаны α -субъединицы, зеленым цветом показана β -субъединица, фиолетовым цветом показана β' -субъединица, желтым цветом показана ω -субъединица. Структура получена методом криоэлектронной микроскопии (идентификатор PDB: 6PK1) [27].

В геноме *Escherichia coli* закодировано 7 σ -факторов, каждый из которых регулируют транскрипцию строго определенного набора генов, что достигается за счет различной специфичности σ -субъединиц к последовательностям промоторов. Именно σ -фактор является ключевым регулятором транскрипции. Использование различных σ -субъединиц для инициации транскрипции позволяет клетке быстро и эффективно изменить профиль экспрессируемых генов в ответ на различные сигналы. Список известных σ -факторов *Escherichia coli* приведен в табл. 1.

Таблица 1. Список σ -факторов *E. coli*

Сигма-фактор	Функция	Источник
RpoD (σ^{70})	Экспрессия генов домашнего хозяйства	[114]
RpoS (σ^{38})	Регуляция стационарной фазы и ответ на стресс	[84]
RpoF (σ^{28})	Биосинтез флагеллы и система хемотаксиса	[8]
RpoN (σ^{54})	Активация метаболизма азота	[59]
RpoH (σ^{32})	Ответ на тепловой шок	[130]
RpoE (σ^{24})	Ответ на стресс, связанный с повреждением мембраны	[115]
FecI (σ^{19})	Регуляция транспорта железа	[35]

σ^{70} – регулятор экспрессии генов домашнего хозяйства

Все основные бактериальные σ -факторы, ответственные за транскрипцию генов домашнего хозяйства, содержат четыре консервативных региона, каждый из которых имеет строго определенные функции, необходимые для инициации транскрипции. Регионы σ^2 и σ^4 отвечают за распознавание -10 и -35 элементов, соответственно. Гибкий линкер, образованный регионом σ^3 (а точнее, субрегионом $\sigma^3.2$), напрямую взаимодействует с матричной цепью промоторной ДНК в 5'-области относительно точки начала транскрипции и регулирует взаимодействие новосинтезированной РНК с ДНК-матрицей, а также, уход РНКП с промотора. Регион σ^1 состоит из двух субрегионов, $\sigma^1.1$ и $\sigma^1.2$. Регион $\sigma^1.2$ высоко консервативен среди основных бактериальных σ факторов, его функция заключается во взаимодействии с минимальным ферментом РНК-полимеразы и дискриминаторным элементом промотора, расположенным между -10-элементом и точкой начала транскрипции. В свою очередь, регион $\sigma^1.1$ слабо консервативен, однако, всегда характеризуется наличием большого количества отрицательно заряженных аминокислотных остатков.

Функциональная роль региона $\sigma^1.1$ в регуляции транскрипции понятна лишь частично. Показано, что регион $\sigma^1.1$ предотвращает связывание ДНК свободной сигма-субъединицей, в свою очередь, делеция этого региона стимулировала взаимодействие свободной σ^{70} -субъединицы с промоторной ДНК [32, 146].

Известно, что свободная σ^{70} -субъединица принимает компактную конформацию, необходимую для автоингибирования ее активности. Предполагается, что регион $\sigma^{1.1}$ стабилизирует данную форму фактора за счет взаимодействия с регионами σ^2 и σ^4 , которые отвечают за связывание промоторной ДНК [21, 124]. Помимо прочего, было показано, что регион $\sigma^{1.1}$ участвует в сборке холофермента РНКП и образовании промоторного комплекса [17, 50, 142, 146].

С помощью метода FRET (Фёрстеровский индуктивно-резонансный перенос энергии) было показано, что регион $\sigma^{1.1}$ расположен в ДНК-связывающем канале РНК-полимеразы, однако, связывание промоторной ДНК приводит к его транслокации и освобождению ДНК-связывающего канала [92], что было также подтверждено рентгеноструктурным анализом холофермента РНК-полимеразы *E. coli* [96]. Дополнительным подтверждением структурных данных стал биохимический анализ, которым было показано, что регион 1.1 может быть необходим для снижения стабильности открытого промоторного комплекса [118]. Несмотря на значимость данных, полученных на основе РНК-полимеразы *E. coli*, регион 1.1 слабо консервативен среди бактериальных σ -факторов и полностью отсутствует в большинстве альтернативных σ -субъединиц, что позволяет предложить его необязательность для инициации транскрипции.

Регуляция активности σ^{70} в стационарной фазе

σ^{70} является ключевым сигма фактором, который необходим для активного роста клеток *E. coli*. В логарифмической фазе роста порядка 60-95% пула сигма факторов представлено именно фактором σ^{70} [63]. Показано, что он регулирует транскрипцию генов, необходимых для процесса трансляции, а именно, опероны рибосомных белков, рРНК, тРНК, а также, гены, кодирующие факторы трансляции (более 50% активной транскрипции в логарифмической фазе роста представлено именно транскрипцией трансляционных генов). Изменение в условиях роста (такие как нехватка ресурсов и неоптимальная температура) или появление в окружающей среде стрессовых агентов приводит к значительному изменению в профиле

экспрессии генов, которое осуществляется как за счет замещения σ^{70} специализированными сигма-факторами, так и использованием различных факторов регуляции транскрипции. Важно отметить, что σ^{70} обладает наибольшим сродством к РНКП [86] и для смещения равновесия в конкуренции сигма-факторов за минимальный фермент РНК-полимеразы необходимо тем или иным образом ингибировать активность σ^{70} . Эволюционная значимость данного процесса подтверждается разнообразием механизмов ингибирования, осуществляемого не только за счет белковых факторов (например, Rsd), так и за счет некодирующих РНК (6S РНК).

6S РНК - регулятор активности σ^{70} в стационарной фазе

В стационарной фазе роста холофермент σ^{70} РНКП регулируется при помощи 6S РНК, которая связывается в районе ДНК-связывающего канала РНКП и ингибирует ее взаимодействие с промоторной ДНК. Впервые 6S РНК была открыта более 50 лет назад, однако, долгое время ее функция оставалась неизвестной [144]. Позже было показано, что она совыделяется с холоферментом РНК-полимеразы, содержащим σ^{70} -субъединицу, но не с минимальным ферментом РНКП или холоферментом, содержащим альтернативные сигма-факторы [45]. Внутриклеточная концентрация 6S достигает максимума в стационарной фазе роста, однако, она присутствует в значительном количестве и в логарифмической фазе [149]. При этом, в стационарной фазе большая часть пула σ^{70} РНКП находится в комплексе с 6S РНК. Несмотря на наличие данных о незначительном взаимодействии 6S РНК с РНКП, содержащей σ^{38} , функциональная роль взаимодействия 6S РНК с σ^{38} РНКП, так и не была показана. Известно, что 6S РНК активирует транскрипцию с некоторых σ^S -зависимых промоторов, при этом никак не влияя на уровень экспрессии *groS* [136].

Механизм ингибирования транскрипции σ^{70} -зависимых генов заключается в конкуренции между 6S РНК и промоторной ДНК за связывание σ^{70} РНКП. Предполагается, что сложная вторичная структура 6S РНК имитирует структуру ДНК в промоторном комплексе. При наступлении стационарной фазы накопление

6S РНК смещает равновесие в сторону образования транскрипционно-неактивных σ^{70} РНКП. Наиболее удивительной особенностью комплекса 6S РНК и РНКП стало открытие возможности РНК-зависимого синтеза коротких РНК, которые были названы пРНК [45]. Оказалось, что пониженная концентрация нуклеотидов в стационарной фазе препятствует синтезу пРНК и РНК-полимераза остается связанной с 6S РНК, что приводит к ее ингибированию. В свою очередь, при переходе к логарифмической фазе, концентрация нуклеотидов резко повышается и синтез пРНК становится возможным [149]. Важной особенностью пРНК является тот факт, что после синтеза пРНК остается связанной с матричной 6S РНК за счет комплементарных взаимодействий, что препятствует повторному связыванию с σ^{70} РНКП. Таким образом, было найдено объяснение того, почему при активном росте 6S РНК не способна ингибировать σ^{70} -зависимую транскрипцию.

Rsd – регулятор активности σ^{70} в стационарной фазе

Другим фактором ингибирования σ^{70} является белок Rsd (regulator of sigma D), который является представителем семейства анти-сигма-факторов. Rsd специфично связывает свободную σ^{70} [65] в регионе $\sigma 2$ [152] и $\sigma 4$ [128], которые отвечают за связывание -10 и -35-элементов, соответственно. Более того, связывание Rsd препятствует взаимодействию σ^{70} и минимального фермента РНКП [106]. Показано, что Rsd способен активировать транскрипцию с σ^S -зависимых промоторов, одновременно с этим ингибируя σ^{70} -зависимую транскрипцию. Предполагается, что за счет ингибирования σ^{70} увеличивается пул свободных РНКП, которые могут образовывать комплекс с альтернативными сигма-факторами, способными активировать транскрипцию генов, необходимых для ответа на стресс [65, 94]. Интересно, что концентрация Rsd в логарифмической фазе лишь в два раза ниже, чем в стационарной, однако, комплекс σ^{70} и Rsd был обнаружен исключительно в стационарной фазе [110], что предполагает наличие дополнительного механизма регуляции активности Rsd.

HscC - регулятор активности σ^{70} в стационарной фазе

Белок HscC принадлежит к семейству шаперонов Hsp70 и является негативным регулятором активности σ^{70} РНКП. Было показано, что повышенный уровень синтеза HscC приводит к практически полной остановке роста бактериальной культуры за счет подавления транскрипции σ^{70} -зависимых генов [6], что также было подтверждено *in vitro*. Точный механизм ингибирования остается неизвестен, однако, предполагается, что прямое взаимодействие между АТФазным доменом HscC и σ^{70} является ключевым для его ингибирующей активности [7].

σ^{38} – сигма фактор стационарной фазы

При неблагоприятных условиях роста или голоде бактериальные клетки переходят в стационарную фазу роста. Данная фаза характеризуется кардинальным изменением профиля экспрессии генов, а именно, ингибированием генов необходимых для активного роста и активацией генов, кодирующих факторы необходимые для выживания в неблагоприятных условиях. Главным регулятором транскрипции *E. coli* в стационарной фазе и при стрессе является σ^{38} -фактор, также известный как σ^S -фактор, кодируемый геном *rpoS*. Полногеномный анализ экспрессии генов, зависимых от σ^{38} -фактора, показал, что под прямой или косвенной регуляцией σ^{38} -субъединицы находится транскрипция порядка 10% генов *E. coli* [145].

σ^S -фактор отвечает за транскрипцию генов, участвующих в стрессовом ответе и вторичном метаболизме. Большая часть генов, регулируемых σ^{38} -субъединицей, подвержена дополнительной регуляции. Именно этот фактор является необходимым для перехода бактериальной культуры в стационарную фазу. Показано, что экспрессия многих σ^{38} -зависимых генов максимальна именно в момент перехода культуры из логарифмической в стационарную фазу роста [84].

σ^S -фактор является гомологом основного клеточного сигма-фактора - σ^{70} , который отвечает за транскрипцию генов домашнего хозяйства и обладает наибольшим сродством к РНК-полимеразе. Показано, что σ^{38} -субъединица способна узнавать те же консенсусные последовательности, что и σ^{70} , самыми значимыми из которых являются -10 и -35-элементы. Предполагается, что различие

между промоторами, которые узнаются этими сигма-факторами, состоит в одиночных заменах оснований в районе консенсусных гексамерных последовательностей нуклеотидов, то есть специфичность σ^{38} может определяться именно незначительным отклонением последовательности гексамера от консенсусной [40]. Также имеются данные о предпочтении σ^{38} РНКП промоторов с неоптимальными для σ^{70} последовательностями в области между -10 и -35 элементами [138]. На основе известных последовательностей σ^{38} -зависимых промоторов, было показано, что узнавание промотора σ^{38} РНКП улучшается в случае наличия АТ-богатого участка в положениях -10/+1 от точки начала транскрипции [84].

Экспрессия гена *proS*, кодирующего σ^{38} -субъединицу является объектом сложной регуляции на всех уровнях экспрессии гена (транскрипции, трансляции, активности фактора, стабильности самого σ^{38} и его мРНК), что, очевидно, позволяет усилить чувствительность ответа клетки на самые разнообразные стрессовые сигналы. Схема регуляции экспрессии и активности σ^{38} -субъединицы приведена на рис. 5 и подробно обсуждается далее.

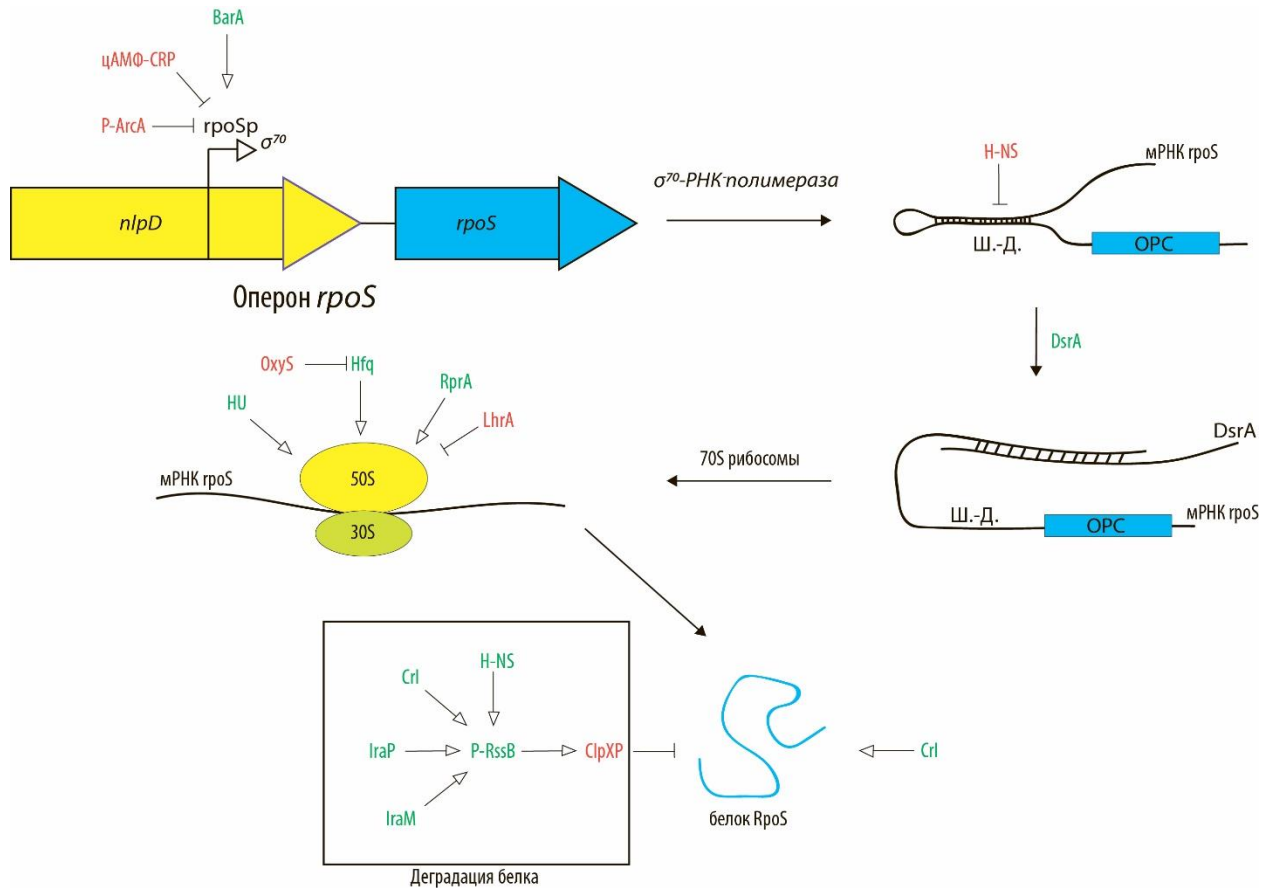


Рисунок 5. Схема регуляции экспрессии и активности σ^{38} . Красным цветом обозначены репрессоры, зеленым обозначены активаторы. Последовательность Шайн-Дальгарно обозначена «Ш.-Д.».

Транскрипция *rpoS* репрессируется фосфорилированной формой регулятора ArcA [93] и комплексом цАМФ-CRP [74]. Белок BarA необходим для индукции экспрессии в логарифмической фазе роста [99], а сигнальная молекула ppGpp позитивно влияет на базальный уровень синтеза σ^S [44]. Важно отметить, что при переходе из логарифмической в стационарную фазу экспрессия *rpoS* увеличивается на порядок [74]. Интересно, что нехватка азота приводит к экспрессии генов, регулируемых σ^S , однако, уровень экспрессии гена самой субъединицы увеличивается лишь в 2 раза, из-за чего предполагается, что азотный голод влияет скорее на активность самого сигма-фактора, а не на его экспрессию [54].

Показано, что на вторичную структуру, стабильность и способность к трансляции мРНК *rpoS* влияет множество факторов. мРНК гена *rpoS* содержит длинную 5'-НТО [30], которая играет важную роль в регуляции трансляции и стабильности этой мРНК. Регулятор H-NS связывается с мРНК и промотирует ее деградацию [19]. В свою очередь, малая РНК DsrA стабилизирует мРНК *rpoS* и

способствует инициации трансляции за счет разворачивания вторичной структуры мРНК в районе сайта посадки рибосомы [75]. Белок Hfq необходим для трансляции мРНК *rpoS* [98], а малая РНК OxyS репрессирует трансляцию *rpoS*, скорее всего, за счет изменения активности Hfq [154]. Совместное действие малой РНК RprA и белка HU стимулируют трансляцию *rpoS*, а белок LthA совместно с Hfq способен репрессировать трансляцию *rpoS* [88].

Во время логарифмической фазы роста, существует система деградации σ^S -субъединицы, основанная на высоко энергозависимой протеазе ClpXP, которая моментально расщепляет фактор σ^S в случае избытка энергии в клетке [125]. В качестве фактора-помощника ClpXP выступает белок RssB, необходимый для быстрого протеолиза σ^S . RssB отводится роль узнавания σ^S -фактора. Поли(А)-полимераза, белки IraP, IraM, Crl и H-NS усиливают эффект RssB [15, 121, 137, 156], интересно, что при этом сама транскрипция *rssB* находится под контролем σ^S . Нехватка источников углерода приводит к накоплению сигма-фактора из-за увеличения его стабильности, молекулярный механизм этого процесса не был исследован [153].

Множество регуляторных факторов усиливает способность σ^S вытеснять σ^{70} из минимального фермента РНК-полимеразы, среди которых некодирующая 6S РНК, белки Rsd и HscC, а также малая сигнальная молекула ppGpp [64]. Известно, что фактор сборки РНК-полимеразы Crl увеличивает активность σ^S , влияя на способность фактора к связыванию с минимальным ферментом РНК-полимеразы [137].

Если подвести итог, то активная экспрессия *rpoS* наблюдается в ответ на резкие изменения условий окружающей среды, при этом сложная система регуляции экспрессии этого гена и моментальная деградация σ^S в нормальных условиях роста позволяют клетке оперативно сменить профиль транскрипции в ответ на стресс и также быстро вернуться к использованию σ^{70} по окончании неблагоприятных условий.

Некоторые регуляторы транскрипции в стационарной фазе

Регуляция транскрипции в стационарной фазе не ограничивается сменой сигма-фактора, для регуляции на уровне экспрессии отдельных генов в бактериальной клетке существует большое количество регуляторов, специфичных для стационарной фазы.

Одним из таких регуляторов является высоко консервативный бактериальный белок Lrp (leucine-responsive regulatory protein), который может выступать как в роли репрессора, так и в роли активатора транскрипции. Этот белок является одним из главных регуляторов транскрипции в стационарной фазе. Lrp воздействует более чем на 400 генов *E. coli*, причем среди них находятся порядка 75% генов, активируемых в стационарной фазе роста. В их числе встречаются гены, ответственные за биосинтез аминокислот, катаболизм, систему транспорта питательных веществ, синтез пилей, метаболизм различных источников углерода [134]. Считается, что основной задачей Lrp является адаптация клеточного метаболизма соответственно условиям окружающей среды. Интересно, что Lrp увеличивает уровень анаболизма аминокислот, вместе с тем, снижая уровень их катаболизма [159].

Связывание лейцина оказывает прямое влияние на активность Lrp. Предполагается, что при наступлении голода происходит снижению внутриклеточной концентрации лейцина, что приводит к активации Lrp [22]. Мутации, нарушающие функцию ДНК-связывающего домена Lrp усиливают эффект GASP-фенотипа, в частности из-за того, что клетки с подобной мутацией способны лучше расти на некоторых аминокислотах [82]. Таким образом, данный белок способен активировать экспрессию генов, необходимых во время голода, и репрессировать гены, активные в логарифмической фазе роста.

Клеточный фактор интеграции (Integration Host Factor) IHF является гистон-подобным белком, участвующем в организации структуры бактериального нуклеоида. IHF связывается с определенными последовательностями ДНК и способен вызвать ее изгиб до 180 градусов, чем обеспечивает возможность

дистальных взаимодействий, что приводит к экспрессии некоторых генов. Количество ИФ в клетке зависит от стадии роста клеточной культуры и становится максимальным в момент перехода в стационарную фазу роста. ИФ является регулятором экспрессии многих генов *E. coli*, активных в стационарной фазе, например, *dps* и *osmY* [82].

Не только белковые регуляторы, но и малые РНК оказывают значительное влияние на экспрессию генов в стационарной фазе. Подобные РНК способны стимулировать трансляцию и оказывать влияние на стабильность специфичных мРНК. В геноме *E. coli* было обнаружено более 60 генов малых РНК, часть из которых отвечает за регуляцию ответа на стресс. Бактериальные малые РНК представляют собой короткие, от 80 до 100 нуклеотидов, молекулы рибонуклеиновой кислоты, для активности многих из них требуется связывание с шапероном Hfq [48]. Hfq способствует образованию комплекса между малыми РНК и AU-богатыми участками мРНК. Образование подобного комплекса может как стабилизировать мРНК, так и наоборот ускорять ее деградацию и ингибировать трансляцию. Известно, что малые РНК DsrA и RprA стимулируют трансляцию RpoS. В нормальных условиях роста 5'-НТО мРНК *rpoS* обладает вторичной структурой, блокирующей сайт посадки рибосом, а малые РНК DsrA и RprA способны взаимодействовать с 5'-НТО мРНК *rpoS* за счет комплементарных участков, что приводит к изменению вторичной структуры мРНК и открытию сайта посадки рибосом [87].

Другая малая РНК, OxyS, синтезируется в ответ на окислительный стресс и репрессирует трансляцию RpoS за счет конкурентного связывания шаперона Hfq [154]. Из других малых РНК, активных в стационарной фазе можно вспомнить *micA* и *gubB*, обе из которых вовлечены в регуляцию проницаемости внешней мембраны. Именно внешняя мембрана является первой линией обороны при контакте с окружающей средой. Для защиты клетки от повреждений происходит изменение состава мембран, что позволяет клетке переживать периоды стресса. Предполагается, что *micA* и *gubB*, совместно с Hfq, являются компонентами

системы антисенс ингибирования трансляции. РНК *rybB* контролирует экспрессию двух белков, компонентов внешней мембраны - *OmpC* и *OmpW*, в свою очередь малая РНК *micA* вызывает деградацию мРНК белка внешней мембраны *OmpA* [66].

Строгий ответ

Одним из первых описанных на молекулярном уровне механизмов регуляции экспрессии генов у бактерий стало ингибирование синтеза рРНК при аминокислотном голодании. С помощью генетического анализа была обнаружена мутация, приводящая к отсутствию ингибирования синтеза рРНК в ответ на аминокислотное голодание. Эту мутацию охарактеризовали как «ослабляющую строгость» влияния концентрации аминокислот на биосинтез рРНК [14]. Позже было показано, что данная мутация инактивировала ген *relA*, кодирующий белок RelA, являющийся (p)ppGpp синтетазой [23]. Последующие исследования показали, что синтез этой малой сигнальной молекулы является первичным ответом клетки практически на любой стресс. Известно, что регуляторная система строгого ответа способна контролировать репликацию, транскрипцию и трансляцию, а также активность ферментов стрессового ответа [16].

Синтез (p)ppGpp осуществляется двумя белками со схожими функциями – RelA и SpoT. RelA, или (p)ppGpp синтетаза I, обладает функцией синтеза гуанозин тетрафосфата, в то время как SpoT обладает двойной каталитической активностью – способностью синтезировать (p)ppGpp ((p)ppGpp синтетаза II) или деградировать его ((p)ppGpp гидролаза). Интересно отметить, что у большинства бактерий существует лишь один белок Rel, ответственный за синтез и деградацию (p)ppGpp. В свою очередь, у предка гамма- и бетапротеобактерий произошла дупликация гена *rel*, что привело к появлению генов, кодирующих RelA и SpoT, при этом в случае RelA был утерян гидролазный домен [55]. Активность RelA и SpoT регулируются различными стимулами. RelA отвечает за передачу сигнала о нехватке даже одной аминокислоты, в то время как SpoT может участвовать в передаче сигнала о нехватке источников углерода, фосфора, железа или жирных кислот [82]. Важно отметить, что термин (p)ppGpp относится к двум разным молекулам, а именно,

продуктам присоединения пиррофосфата к ГТФ (pppGpp) или ГДФ (ppGpp) [34]. Однако, обе малые сигнальные молекулы рассматривают как единое целое, что объясняется двумя причинами. Во-первых, внутри клетки происходит активное превращение pppGpp в ppGpp с помощью гуанозинпентафосфатазы GppA. Во-вторых, было показано, что обе сигнальные молекулы схожим образом влияют на транскрипцию и связываются в одинаковых сайтах на РНК-полимеразе. Тем не менее, активность ppGpp была заметно выше, чем активность pppGpp, что позволяет предположить, что именно ppGpp является ключевым регулятором строгого ответа [91]. Для удобства и, по описанным выше причинам, в дальнейшей работе будет употребляться именно термин ppGpp. Схема метаболизма ppGpp приведена на рис. 6.

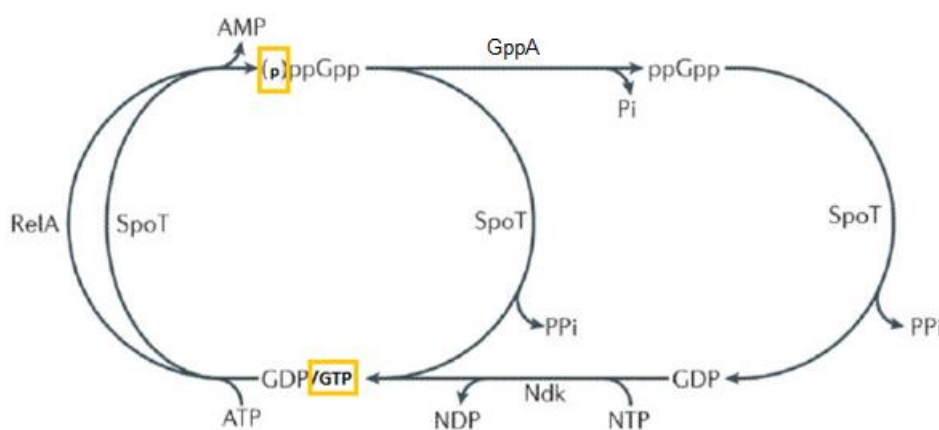


Рисунок 6. Схема метаболизма (p)ppGpp.

Одним из первых предложенных механизмов действия RelA был так называемый «прыжковый» механизм [34]. В благоприятных условиях роста, когда концентрация питательных веществ в среде способствует активному росту, RelA находится в ассоциированной с 70S рибосомами форме. В случае аминокислотного голодания в клетке накапливается деацилированная тРНК. Накопление деацилированных форм тРНК рано или поздно приводит к попаданию такой тРНК в А-сайт рибосомы, что приводит к остановке продвижения рибосомы по мРНК из-за невозможности протекания пептидилтрансферазной реакции, а следовательно, и транслокации рибосомы. Подобная пауза приводит к диссоциации комплекса, образованного RelA и рибосомой. В свободном виде RelA способен катализировать

перенос пирофосфата от АТФ к ГТФ или ГДФ [34]. Одной из особенностей подобного механизма является то, что RelA реагирует на недостаток даже одной аминокислоты [23]. Согласно этому механизму, при «застревании» рибосом происходит диссоциация их комплекса с RelA, при этом, единичный акт диссоциации сопровождается синтезом одной молекулы ppGpp. После этого свободный RelA способен «перепрыгнуть» на соседнюю рибосому, транслирующую мРНК, и, в случае если она также не способна вести синтез из-за деацилированной тРНК в А-сайте, то цикл повторяется, если же она активна, то RelA остается связанным на этой рибосоме в неактивной форме. Схема, иллюстрирующая этот механизм, приведена на рис. 7

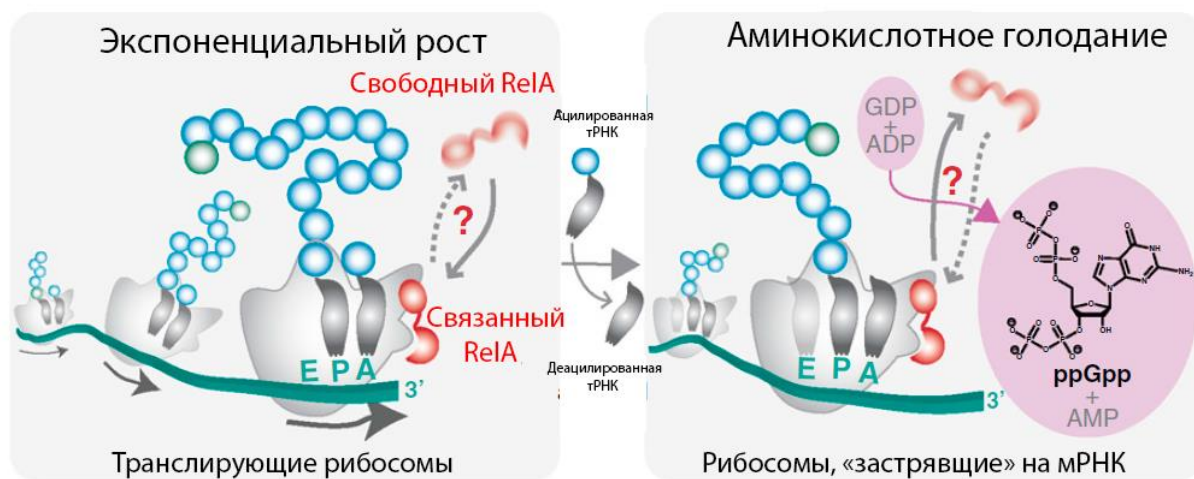


Рисунок 7. Схема «прыжкового» механизма синтеза ppGpp под действием RelA при аминокислотном голоде.

Однако, с появлением новых структурных и биохимических данных стало понятно, что существование «прыжкового» механизма является маловероятным [80]. В одном из последних исследований было показано, что на самом деле, RelA способен взаимодействовать с деацилированными тРНК *in vivo*, независимо от рибосом. Более того, оказалось, что именно RelA ответственен за доставку незаряженной тРНК в А-сайт рибосомы и только после этого происходит диссоциации RelA от рибосом, сопровождающаяся синтезом ppGpp. Таким образом, при наступлении голода RelA выступает неким аналогом трансляционного фактора EF-Tu [147].

В благоприятных условиях роста SpoT обладает лишь гидролитической активностью, что приводит к отсутствию в клетке гуанозин тетрафосфата, который синтезируется при случайном попадании деацилированной тРНК в А-сайт рибосомы. Однако, гидролитическая активность SpoT ингибируется при связывании с деацилированными тРНК. Подобный механизм ингибирования SpoT позволяет регулировать его гидролитическую активность таким образом, что лишь нехватка множества аминокислот способна приводить к доминированию функции ppGpp-синтетазы над функцией ppGpp-гидролазы [55]. SpoT также может взаимодействовать с ацилпереносящим белком, что позволяет ему контролировать количество жирных кислот в клетке. Данное предположение было доказано тем, что при понижении концентрации жирных кислот в клетке наблюдалась индукция синтеза ppGpp. Вероятно, этот механизм позволяет ему выступать в роли сенсора углеродного голода [100].

Механизм влияния строгого ответа на экспрессию генов при голоде или стрессе до сих пор изучен не полностью. Известно, что ключевым эффектором строгого ответа является именно молекула ppGpp, однако, ее влияние на метаболизм клетки проявляется через множество независимых механизмов. Влияние ppGpp на транскрипцию осуществляется, как минимум двумя ключевыми регуляторными путями. Во-первых, ppGpp взаимодействует с регулятором DksA, который способен дестабилизировать промоторные комплексы, за счет взаимодействия со вторичным каналом РНКП. Связывание ppGpp на границе контакта РНКП и DksA (так называемый сайт связывания ppGpp №2) заметно усиливает дестабилизацию промоторных комплексов, что приводит к еще большему снижению транскрипции оперонов, контролируемых промоторами, образующими нестабильные контакты с РНКП (наиболее известными мишенями DksA являются опероны рРНК, тРНК и рибосомных белков). Во-вторых, ppGpp может регулировать транскрипцию независимо от DksA за счет связывания с РНКП между субъединицами β' и ω (сайт связывания ppGpp №1). В одной из работ, посвященных изучению транскриптома штаммов *$\Delta relA \Delta spoT$* (ppGpp⁰), *$\Delta dksA$* и *$\Delta relA \Delta spoT \Delta dksA$* было показано, что

большинство генов, регулируемых строгим ответом, схожим образом контролируется как действием DksA и ppGpp в отдельности, так и совместным действием обоих факторов [2]. Однако, регуляция некоторых метаболических путей заметно отличалась для DksA и ppGpp. Так, отсутствие DksA приводило к активации экспрессии генов биосинтеза флагеллы и хемотаксиса, в то время как отсутствие ppGpp приводило к ингибированию их экспрессии. Помимо прочего, было найдено множество примеров связывания ppGpp с различными клеточными белками и предполагалось, что таким образом ppGpp способен регулировать строгий ответ не только за счет взаимодействия с РНКП. Недавняя работа по изучению транскриптома штамма с мутантными сайтами связывания ppGpp показала, что изменение в транскриптоме клетки при строгом ответе связаны исключительно со взаимодействием ppGpp с РНКП, однако, эти результаты не отрицают того факта, что взаимодействие ppGpp с различными белками, способно регулировать внутриклеточные процессы, не связанные с транскрипцией [119].

Несмотря на активное изучение процесса строгого ответа, механизм действия DksA и ppGpp изучен лишь частично, однако, предполагается, что они способны снижать стабильность промоторных комплексов за счет изменения в контактах РНКП и промоторной ДНК. Подобное действие приводит к ингибированию транскрипции нестабильных промоторных комплексов, таких как опероны рРНК и тРНК, и активации стабильных промоторных комплексов, таких как опероны биосинтеза аминокислот. Считается, что относительная стабильность промоторных комплексов и чувствительность к действию строгого ответа может определяться последовательностью дискриминаторного элемента, расположенного между -10-элементом промотора и точкой начала транскрипции. Действительно, промоторы, образующие нестабильные комплексы с РНКП содержат большое количество остатков G и C в дискриминаторном регионе, в то время как стабильные промоторы часто характеризуются большим количеством остатков A и T [52].

Таким образом, при наступлении голода или другого стресса происходит активация строгого ответа, приводящая к изменению транскрипционного профиля

клетки. Однако, когда условия окружающей среды приходят в благоприятное состояние, восстанавливается гидролитическая активность SpoT и уровень ppGpp снижается, что означает конец строгого ответа [64].

Процесс трансляции *E. coli* в стационарной фазе

Одним из центральных процессов в любой живой клетке является биосинтез белка. Ключевым участником процесса трансляции является рибосома – сложный нуклеопротеидный комплекс, способный синтезировать белок на матрице РНК. Ранее было замечено, что в стационарной фазе роста бактериальной культуры происходит сильное снижение уровня биосинтеза белка. Подобное наблюдение не вызывает удивления, ведь трансляция является наиболее энергозатратным процессом в клетке и, в условиях нехватки аминокислот и других ресурсов, бактериальной клетке нужно подавить трансляцию. Необходимо отметить, что процессы, влияющие на трансляцию в стационарной фазе, сильно зависят от длительности и глубины состояния голода. В ответ на голод активируются самые разные механизмы спасения отдельной клетки, а позже и всей бактериальной популяции.

Структура рибосомы *E. coli*

Перед тем, как перейти к рассмотрению различных механизмов ингибирования трансляции и «сохранения» аппарата биосинтеза, необходимо отдельно остановиться на структуре рибосомы, что важно для полного понимания механизмов, влияющих на статус трансляции.

Рибосома является сложным рибонуклеопротеидным комплексом, отвечающим за процесс трансляции нуклеотидной последовательности мРНК в аминокислотную последовательность белка. Рибосома *E. coli* (обозначаемая 70S, соответственно своему коэффициенту седиментации) состоит из двух неравных субчастиц – малой (30S) и большой (50S).

В состав малой субчастицы входит 16S рРНК длиной 1542 нуклеотида и 21 белок (от S1 до S21). Большая субъединица образуется двумя молекулами рРНК - 23S рРНК и 5S рРНК. Кроме того, в состав большой субчастицы входит более 30

белков, пронумерованных от L1 до L36. Интересно отметить, что белковой состав рибосомы может меняться в зависимости от фазы роста. Например, известно, что в стационарной фазе в состав малой субчастицы также включается белок S22, однако, функция этого белка так и не была подробно изучена [143]. Также было описано, что в зависимости от фазы роста меняется соотношение рибосомных белков L7 и L12. Белок L7 является ацетилированной формой белка L12, при этом в логарифмической фазе роста доминирует форма L12, а при переходе к стационарной фазе большая часть белка L12 превращается в форму L7 [103]. Функциональная роль данного превращения также не ясна. Структура рибосомы приведена на рис. 8.



Рисунок 8. Структура рибосомы *E. coli*, в комплексе с аминоксил-тРНК и фактором элонгации EF-Tu, полученная методом криоэлектронной микроскопии. Красным цветом показаны рРНК, остальное – рибосомные белки [38].

Механизмы защиты при незначительном голоде

При исчерпании питательных веществ в клетке накапливаются деацилированные тРНК и укороченные мРНК, на которых может происходить «застревание» рибосом, вызванное тем, что в процессе синтеза рибосома доходит до конца матричной РНК и так и не находит стоп-кодона, что препятствует процессу терминации. Причинами образования укороченных мРНК могут являться как ошибки в процессе транскрипции, так и химическое повреждение РНК, вызванное наличием в среде стрессовых агентов. «Застрявшая» рибосома остается ассоциированной с мРНК и не может быть освобождена из-за зависимости механизма терминации трансляции от наличия стоп-кодона. Подобные рибосомы могут быть спасены при помощи механизма транс-трансляции.

Транс-трансляция осуществляется комплексом тмРНК (транспортно-матричной РНК) с небольшим белком SmpV. тмРНК состоит из двух доменов: тРНК-подобного домена (TLD) и мРНК-подобного домена (MLD). Сходство TLD домена и тРНК проявляется не только в одинаковой структуре, но и в функциональном аспекте – этот домен узнается аланин-тРНК-синтетазой и 3'-конец тмРНК аминоацилируется остатком аланина [129].

В случае появления «застрявших» рибосом совместная работа тмРНК, SmpV и фактора элонгации EF-Tu позволяет распознать подобные рибосомы. После распознавания комплекс SmpV и тмРНК попадает в А-сайт рибосомы, где SmpV принимает форму, мимикрирующую под структуру анти-кодона аланиновой тРНК. После гидролиза молекулы ГТФ EF-Tu уходит и происходит перенос пептида с тРНК в Р-сайте на остаток аланина тмРНК в А-сайте, а трансляция возобновляется на матрице MLD домена тмРНК. В последовательности MLD закодирован С-концевой пептид, сигнализирующий о необходимости деградации данной полипептидной цепи. В результате транс-трансляции освобождается «застрявшая» рибосома, и потенциально вредный полипептид деградирует под действием протеаз [104].

Другим путем спасения рибосом, «зависших» в ожидании стоп-кодона, является использование белков ArfA и ArfB. Ген *arfA* кодирует короткий полипептид, состоящий из 72 аминокислот. На самом деле, функциональной формой этого белка является белок, транслируемый с укороченного рибонуклеазой III фрагмента мРНК. Длина этого полипептида составляет всего 55 аминокислот. Из-за отсутствия стоп-кодона на такой мРНК появление подобного полипептида возможно лишь в случае нарушения механизма транс-трансляции. ArfA способен связываться с «застывшей» рибосомой и рекрутировать к ней фактор терминации RF2, что приводит к отщеплению полипептидной цепи с пептидил-тРНК и высвобождению рибосом [25].

Схожий механизм осуществляется фактором ArfB, который связывается с пустым А-сайтом рибосом и катализирует гидролиз пептидил-тРНК независимо от факторов терминации трансляции.

Гибернация рибосом как ответ на усиливающийся голод

Синтез рибосом является чрезвычайно энерго- и ресурсозатратным. Именно поэтому должны существовать механизмы, позволяющие подавить избыточную трансляцию во время голода, но при этом сохранить имеющиеся рибосомы до лучших времен.

Оказалось, что механизм хранения неактивных рибосом действительно существует, и он представляет собой временное «выключение» рибосом. Этот процесс был назван гибернацией. Данный механизм реализуется в рамках строгого ответа, когда в случае нехватки аминокислот в клетке происходит накопление деацилированных тРНК, что является сигналом для синтеза молекулы ppGpp при помощи ассоциированного с рибосомами фермента RelA [147]. Именно ppGpp регулирует экспрессию генов, кодирующих белки гибернации рибосомы.

Основным путем гибернации является образование из активных 70S рибосом «спящих» 100S димеров, а также неактивных 70S мономеров. Главными гибернационными белками *E. coli* являются HPF, RMF и YfiA.

Первые два белка отвечают за образование неактивных 100S димеров. На первой стадии белок RMF связывается с 16S рРНК непосредственно в регионе последовательности анти-Шайн-Дальгарно. Именно этот участок является критически важным для инициации трансляции у прокариот, и само связывание этого белка ингибирует трансляцию. Особенно важным является то, что RMF не может связываться с транслирующими рибосомами, что предотвращает образование недосинтезированных белков, которые могут быть токсичны для клетки. Связывание гибернационного фактора в этом районе приводит к повороту головы малой субчастицы. Подобное изменение конформации способствует образованию рибосомных димеров 90S. После димеризации двух рибосом и образования 90S димера происходит связывание гибернационного фактора HPF, который дополнительно стабилизирует данную структуру и закрывает доступ тРНК в А- и Р-сайты рибосом. Образовавшийся комплекс двух 70S рибосом вместе с белками HPF и RMF обозначают как 100S рибосомы. Димеризация рибосом является обратимой, когда клетка попадает в богатую питательными веществами среду, комплекс факторов гибернации и рибосом диссоциирует с образованием двух активных 70S рибосом [112, 129].

Другим путем гибернации рибосом является связывание 70S рибосомами белка Y (YfiA), что приводит к образованию неактивных мономеров 70S. N-концевая часть белка Y схожа с белком HPF и также связывается в районе сайта посадки тРНК. При этом, C-конец белка препятствует посадке белка RMF в районе последовательности анти-Шайна-Дальгарно на 16S рРНК. Связавшись с рибосомой, YfiA ингибирует ее активность и препятствует ее диссоциации на отдельные субчастицы. Когда клетка попадает в благоприятные условия, белок Y покидает рибосому, в результате чего трансляция возобновляется [112]. Сайты связывания трех гибернационных факторов, описанных выше, приведены на рис. 9.

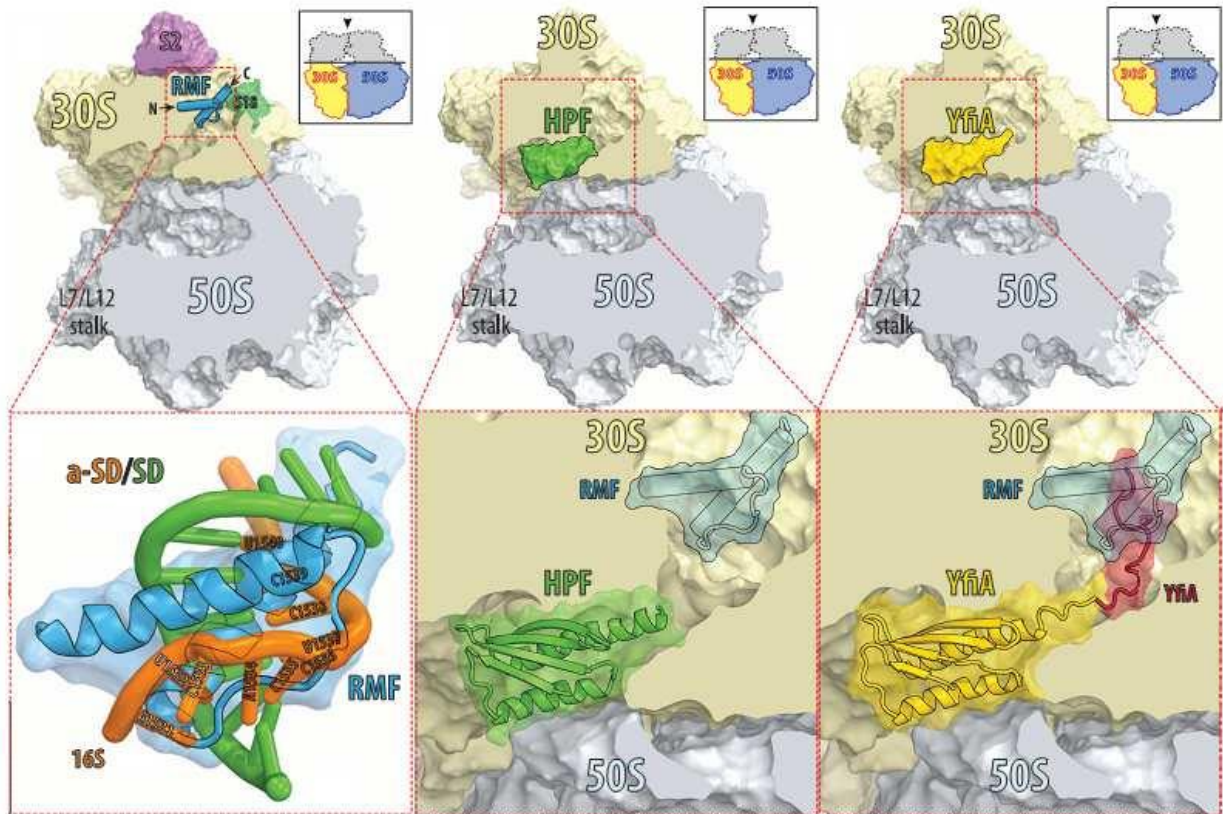


Рисунок 9 Сайты связывания гибрационных факторов RMF (показан синим цветом), HPF (показан зелёным цветом) и YfiA (показан жёлтым цветом) [112].

Помимо факторов YfiA, HPF и RMF в литературе есть данные о еще нескольких потенциальных факторах гибрации трансляции, однако их функция не была изучена столь подробно.

Одним из предполагаемых факторов гибрации рибосом является белок YqjD. Показано, что его максимальная внутриклеточная концентрация достигается в стационарной фазе роста, а экспрессия гена *yqjD* напрямую зависит от σ^{38} -фактора. При экспрессии гена *yqjD* с плазмидного вектора происходила остановка роста клеток, что позволило предположить ингибирование белком YqjD одного из жизненно важных процессов в клетке. Авторы одной из работ показали, что YqjD совыделяется с рибосомами, также значительное количество белка было обнаружено в клеточном дебрисе, а следовательно, он может быть связан с клеточной мембраной. Интересной особенностью данного белка является наличие двух функционально значимых доменов. С-концевой домен является трансмембранным, а N-концевой домен отвечает за связывание с рибосомами (как

70S, так и 100S). Предполагается, что YqjD способен ингибировать трансляцию за счет релокации рибосом к внутренней мембране клетки. Интересно, что в геноме *E. coli* также закодированы два паралога YqjD, а именно, белки ElaB и YgaM, однако их связь с ингибированием трансляции так и не была изучена [151].

Белок RsfS (YbeB) также является фактором, ингибирующим трансляцию, однако механизм его действия противоположен действию факторов гибернации RMF и YfiA. RsfS связывается с большой субчастицей рибосомы и препятствует сборке 70S рибосомы, что делает невозможным процесс инициации трансляции, однако, он не способен вызывать диссоциацию уже собранных 70S рибосом [56]. Было замечено, что в штамме Δ *rsfS* остаточная активность трансляции при переходе к стационарной фазе была выше, чем в штамме дикого типа.

Фактор EttA представляет собой интересный случай ингибирования трансляции по механизму, отличному от прочих факторов гибернации рибосомы. Ингибирование трансляции под действием EttA происходит на этапе образования первой пептидной связи, что позволяет подавить трансляцию даже после успешной инициации [12]. Предполагается, что EttA связывается в E-сайте рибосомы и препятствует переходу рибосомы к элонгации. Считается, что, в отличие от факторов гибернации рибосомы, EttA необходим не столько для ингибирования трансляции при голоде, сколько для контроля скорости роста бактериальной популяции. Особенностью EttA является его способность реагировать на соотношение внутриклеточной концентрации АТФ и АДФ. Снижение количества доступного АТФ приводит к активации EttA и ингибированию трансляции [26].

Важно отметить, что большое разнообразие факторов ингибирования трансляции приводит к тому, что в штаммах с делецией генов, кодирующих эти факторы, не наблюдается значительного отклонения фенотипа от нормы. Общим фенотипом для всех этих штаммов является незначительное снижение конкурентоспособности нокаутов в стационарной фазе при совместном культивировании со штаммом дикого типа.

Таким образом, литературные данные свидетельствуют о комплексном влиянии строгого ответа на биосинтез белка в бактериальной клетке. Под действием $rrpG$ не только подавляется экспрессия аппарата биосинтеза белка, но и через гибернационные факторы ингибируется сама трансляция.

Трансляция в условиях длительного голода. Фаза смерти и запрограммированная клеточная гибель

Когда в окружающей среде практически полностью исчезают питательные вещества и накапливаются предельные количества токсичных отходов метаболизма, активируется система программируемой клеточной гибели (ПКГ), целью которой является уничтожение большей части популяции. Однако, подобный механизм предусматривает сохранение небольшого количества клеток нетронутыми. Таким «самопожертвованием» клеток популяция снижает нагрузку на оставшиеся бактерии, которые при появлении новых ресурсов смогут продолжить свой рост.

Именно система трансляции особенно чувствительна к усиливающемуся голоду, и, как было описано выше, при помощи компонентов трансляционного аппарата, в частности рибосом, происходит передача сигнала о голоде всем компонентам бактериальной клетки [129]. Механизм ПКГ основывается на хорошо изученной системе Токсин-Антитоксин (ТА), суть которой заключается в наличии двух генов, кодирующих, соответственно, белок, токсичный для клетки, и белок, позволяющий нейтрализовать действия токсина. В случае необходимости запуска клеточной гибели происходит деградация белка и подавление экспрессии гена антитоксина, что приводит к накоплению активной формы токсина и гибели клетки.

Наиболее изученным и важным модулем ТА является система *mazEF*, которая выявлена у множества прокариот. Данный модуль состоит из двух генов, находящихся в одном опероне – *mazF* и *mazE*, первый из которых кодирует стабильный цитотоксический белок, а второй кодирует лабильный белок антитоксин, легко разрушаемый АТФ-зависимой протеазой ClpAP. В нормальных

условиях, гены обоих белков экспрессируются, что не дает токсину влиять на клетку из-за образования комплекса токсин-антитоксин.

В условиях голода активируется синтез ppGpp, который ингибирует транскрипцию оперона *mazEF*, после чего происходит быстрая деградация MazE и высвобождение MazF. Токсичность MazF обуславливается его эндорибонуклеазной активностью, специфичной к последовательности АСА в мРНК, а также к 3'-концу 16S рРНК [155]. Отщепление 3'-конца 16S рРНК приводит к «потере» рибосомами последовательности анти-Шайн-Дальгарно, необходимой для трансляции канонических мРНК. Ранее было показано, что подобные «обезглавленные» рибосомы проявляют высокую селективность к синтезу малых белков, среди которых оказались как белки «смерти», убивающие клетку, так и белки, необходимые для сохранения малой популяции клеток. Предполагается, что таким образом система *mazEF* осуществляет программируемую клеточную гибель, статистически уничтожая большую часть клеток в культуре, сохраняя при этом малую популяцию нетронутой [5].

Позже было показано, что эта система ПКГ регулируется при помощи сигнального пептида, названного EDF (Extracellular Death Factor) и имеющего последовательность NNWNN. Данный пептид является компонентом системы межклеточной связи в культуре, которая была названа Quorum Sensing (QS). Показано, что при критической плотности в бактериальной культуре появляется пептид EDF, способный легко проникать в клетки. Этот пептид значительно повышает активность MazF, при этом снижая способность MazE ингибировать токсин. Таким образом, во всех клетках, в которые попал EDF, активируется путь программируемой клеточной гибели, и лишь малая популяция клеток остается нетронутой и способной к дальнейшему выживанию [95].

Структурные особенности клеток в стационарной фазе роста

Как обсуждалось выше, переход в стационарную фазу роста сопровождается накоплением альтернативного сигма-фактора σ^{38} . Смена σ -субъединицы, контролирующей экспрессию генов, оказывает влияние не только на

метаболические и регуляторные пути, но и кардинально изменяет саму физиологию бактериальной клетки. Показано, что гены, экспрессия которых контролируется σ^{38} , участвуют в изменении морфологии клетки, стрессовом ответе, адаптации метаболизма к голоду и выживанию в долговременной стационарной фазе.

Бактерии в стационарной фазе претерпевают критически важную для выживания адаптацию своей морфологии. Клетки становятся меньше вследствие двух процессов, редукционного деления и образования карликовых клеток [105].

Редукционное деление вызывается тем, что инициация процессов репликации ДНК и деления клеток происходит в момент перехода клеток в стационарную фазу, когда из-за нехватки ресурсов дальнейший рост клетки заблокирован на всех уровнях регуляции. В стационарной фазе клетки не могут делиться и из-за возможной случайной инициации репликации ДНК появляются клетки с удвоенным количеством хромосом. На самом деле, бактериальная культура в стационарной фазе чрезвычайно гетерогенна по своему хромосомному составу. Оказывается, что при росте *E. coli* в богатой среде клетки из стационарной фазы содержат 1, 2, 4 или 8 эквивалентов хромосом, причем 2 и 4 хромосомы наиболее распространены. Необходимо отметить, что при выращивании на бедной среде наблюдается в основном 1 или 2 копии хромосом на клетку [3]. Возможными причинами гетерогенности клеток по содержанию хромосом может быть то, что в клетках в стационарной фазе роста происходит нарушение процессов терминации репликации или декатенации ДНК [3]. Независимо от причины, факт того, что клетки в стационарной фазе содержат различное число хромосом необходимо учитывать при рассмотрении выживаемости клеток, частоты мутаций и стабильности генома. Клетки, образованные редукционным делением, обладают коккоидной формой. Данная морфологическая особенность может объясняться влиянием гена *bolA*, который активно экспрессируется в стационарной фазе под контролем σ^{38} .

Наиболее вероятно, что VolA влияет на морфологию клеток за счет регулирования транскрипции генов *dacA* (ген, кодирующий пенициллин-связывающий белок 5, PBP5), *dacC* (ген, кодирующий пенициллин-связывающий белок 6, PBP6) и *atpC* (ген, кодирующий β -лактамазу) – эти белки обладают D,D-карбокситепептидазной активностью и участвуют в процессе образования предшественников пептидогликанового слоя мембраны. Считается, что они могут влиять на степень сшивания пептидогликанов клеточной оболочки за счет регуляции количества доступных для сшивок компонентов [120]. Редукционное деление является адаптацией клеток к агрессивным условиям внешней среды и приводит к увеличению соотношения площади поверхности клетки к ее объему. Стоит отметить, что редукционное деление не является процессом, индуцируемым голодом, а является следствием наступления голода в момент активного деления клеток.

В противоположность редукционному делению, образование карликовых клеток как раз активируется голоданием. Этот процесс характеризуется постоянным уменьшением размера клеток. Данный механизм является следствием деградации не только эндогенных ресурсов, но и клеточной оболочки, особенно цитоплазматической мембраны и клеточной стенки. У некоторых грамотрицательных бактерий, например, *E. coli*, в стационарной фазе наружная мембрана не деградирует и не сжимается, подобно внутренней, что приводит к увеличению области периплазмы [113].

Отличительной особенностью адаптации к стационарной фазе является образование клеточной оболочки, способной эффективно противостоять агрессивной внешней среде. Образование подобного усиленного барьера включает в себя обширные изменения на всех уровнях структуры бактериальной оболочки: внутренней и внешней мембран, периплазмы и пептидогликанов. Во внешней мембране увеличивается концентрация липосахаридов, снижается доля белков, а также увеличивается количество молекулярных сшивок между липопротеидами внешней мембраны и слоем пептидогликанов. В периплазме накапливаются

олигосахариды, например трегалоза, которые несут функцию осмопротекторов. Слой пептидогликанов (пептидогликаны – класс прочных и эластичных полимеров, которые служат неким «амортизатором» стрессового воздействия на клеточную оболочку) уширяется. Недавно было показано, что в стационарной фазе происходит синтез D-аминокислот, которые способны модифицировать слой пептидогликанов за счет включения в состав полимера [72]. В структуре внутренней мембраны происходит ряд значительных изменений. Происходит уменьшение количества мононенасыщенных жирных кислот, с попутным увеличением доли полиненасыщенных жирных кислот. Также, ненасыщенные жирные кислоты превращаются в циклопропиловые производные, и, при переходе клетки к стационарной фазе роста, увеличивается соотношение количества дифосфатидилглицерола (кардиолипин) к количеству фосфатидилэтаноламина. Следствием всех этих изменений является образование жесткой структуры внутренней мембраны и уменьшение ее текучести [105].

Микроэволюция бактерий в стационарной фазе

Бактериальная популяция может адаптироваться к неблагоприятным условиям самыми неожиданными способами. Во время наблюдения за выживаемостью клеток в стационарной фазе было обнаружено, что при инкубации культуры без смены питательной среды достаточное длительное время, на кривой роста культуры появляется характерное циклическое увеличение и уменьшение количества жизнеспособных клеток. Данный феномен был назван GASP-фенотипом (Growth Advantage in Stationary Phase), что можно перевести как «фенотип преимущества роста в стационарной фазе». Подобное поведение культуры объясняется появлением в популяции мутантных клеток, более приспособленных к данным условиям, нежели родительский штамм [37].

GASP-фенотип опосредован несколькими ключевыми мутациями, которые происходят в стационарной фазе. Одна из таких мутаций приводит к снижению активности σ^{38} , при этом штамм с делецией гена *rpoS* не приводил к характерному фенотипу. Предполагается, что эта мутация дает преимущество к выживанию за

счет плейотропных эффектов. Возможно, этот эффект обусловлен тем, что каким-то образом нарушает равновесие в конкуренции сигма-факторов за РНК-полимеразу [82].

Другой мутацией, а точнее группой мутаций, приводящей к GASP-фенотипу, являются мутации в генах *lrp* и *sgaC*, а также геномная перестройка, приводящая к инактивации гена *cstA* и активации оперона *ybeJ-gltJKL* [157]. Подобные мутанты проявляют повышенную способность использовать аминокислоты, поступающие в окружающую среду из погибших клеток. Интересно, что мутация в белке Lrp оказывает влияние не только на новосинтезированный белок, но и на уже существующий Lrp, так как мутантная версия белка способна нарушать активность белка с родительской аминокислотной последовательностью [158]. В свою очередь, геномная перестройка приводит к деактивации гена, кодирующего олигопептид пермеазу и активации оперона, в котором закодированы белки-транспортеры глутаминовой и аспарагиновой кислот. Таким образом, за счет потери способности деградировать олигопептиды клетка получает повышенную способность использовать мономерные аминокислоты, поступающие в среду из мертвых клеток. После дополнительной инкубации в среде, в клетках, имеющих мутацию в гене *rpoS*, происходит активация оперона *bgl*. Это приводит к появлению популяции, способной использовать арил- β -гликозиды салицин и арбутин в качестве источник углерода [85].

Интересным является появление в стационарной фазе популяции клеток, способной к выживанию, но не поддающейся культивированию в лабораторных условиях (VBNC-фенотип). Данный фенотип проявляется как ответ на самые разнообразные стрессы и встречается у многих бактерий. Молекулярная природа этого механизма так и не была установлена, однако ясно, что за ним стоит не какой-то конкретный регуляторный путь, а глобальная смена метаболизма клетки. Особенностью VBNC-фенотипа является колоссальное снижение метаболизма и изменение морфологии клеток. Вероятно, таким образом клетка пытается пережить стресс, перейдя в состояние «гибернации» и отгородившись от неблагоприятной

среды непроницаемым барьером. Также мало известно и о механизме выхода из этого состояния [57].

Заключение

В естественных условиях большую часть своей «жизни» бактериальные клетки проводит именно в стационарной фазе. Нехватка ресурсов, накопление стрессовых агентов и постоянная конкуренция между разными видами микроорганизмов привела к созданию чрезвычайно комплексной системы защиты от стресса и голода.

Адаптация клетки к неоптимальным условиям осуществляется на всех уровнях ее организации. Во-первых, для снижения вероятности повреждения внешней оболочки мембраны происходит ее перестройка, а также меняется пространственная структура клетки, снижается ее проницаемость для различных соединений, способных вызывать нарушение метаболизма клетки. Во-вторых, геном становится более компактным и по своей структуре и свойствам больше напоминает кристалл, чем традиционный комплекс ДНК и белков, способный к активному ремоделированию, необходимому для регуляции экспрессии генов. Кроме того, масштабные изменения происходят и в профиле экспрессии генов. За счет использования альтернативных сигма-субъединиц и минорных регуляторных факторов происходит полное изменение профиля транскрипции, останавливается экспрессия генов столь энергозатратного аппарата биосинтеза белка и активируется транскрипция генов, необходимых для ответа на различные стрессы. Более того, для ингибирования транскрипции генов домашнего хозяйства существует множество независимых и взаимозаменяемых механизмов, что приводит, например, к тому, что нокауты по генам, кодирующим σ^S РНК или анти-сигма фактор Rsd не вызывает появления значимого фенотипа. Подобное разнообразие путей переключения транскрипции с регулонов, отвечающих за активный рост, на регулоны ответа на стресс показывают эволюционную значимость способности быстрого перехода в состояние «сна», в котором клетка защищена от вредных воздействий. При этом, сложная система контроля синтеза и

стабильности σ^{38} позволяет не только быстро активировать экспрессию генов ответа на стресс, но и также быстро вернуться к состоянию активного роста.

Важной особенностью перехода в стационарную фазу является процесс выключения биосинтеза белка. Именно трансляция является самым энергозатратным процессом в клетке, а одна только транскрипция трансляционных генов составляет не менее 50% всей активной транскрипции в логарифмической фазе. Описаны разнообразные механизмы регуляции трансляции в стационарной фазе, однако большинство этих механизмов связаны с тремя процессами: ингибированием самой трансляции, выключением биосинтеза трансляционного аппарата, а также временным сохранением рибосом и защите их от повреждения. Однако, в данном случае, важность процесса трансляции заключается не в непосредственной регуляции экспрессии генов, а в его способности выступать в качестве сенсора стресса, как в виде голода, так и путем повреждающего действия стрессовых агентов. Именно рибосома является первым и ключевым компонентом активации строгого ответа, который в дальнейшем полностью ремоделирует транскрипцию и саму структурную организацию генома и клетки.

Сложность изучения клеток в стационарной фазе привела к тому, что многие гены, экспрессия которых происходит при переходе или в самой стационарной фазе, так и не получили детального описания, а некоторые не были изучены в принципе. В отличие от клеток в логарифмической фазе, низкая метаболическая активность «стационарных» клеток не позволяет использовать широко распространенные методы функциональной геномики для установления функции того или иного гена. Однако, именно стационарная фаза представляет наибольший интерес с практической точки зрения, ведь именно в этом состоянии бактерии «вступают в бой» с человечеством посредством увеличения устойчивости к антибиотикам и другим стрессам. Таким образом, в наше время, когда основы ключевых молекулярных процессов логарифмической фазы роста достаточно подробно описаны, изучение любых процессов, ассоциированных со стационарной фазой, представляет огромный интерес.

Материалы и методы

Реактивы и биопрепараты

В работе были использованы следующие реактивы и препараты:

Химмед: соляная кислота, уксусная кислота, гидроксид натрия, гидроксид калия

Ферейн: этиловый спирт

Helicon: гидрофосфат натрия, дигидрофосфат калия, хлорид калия, хлорид аммония, ацетат аммония, борная кислота, хлорид натрия, ацетат натрия, ЭДТА, N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота (HEPES), персульфат аммония, Tween 20, акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, бакто-агар, агароза для электрофореза, Triton X-100, додецилсульфат натрия, хлорид магния, хлорид кальция, ТЕМЕД, 2-меркаптоэтанол, сахароза, изопропил-1-тио-β-D-галактопиранозид (ИПТГ), глюкоза, дрожжевой экстракт, Кумасси R250

Sigma: хлорид марганца (II), ампициллин, канамицин, ципрофлоксацин, бромфеноловый синий, ксиленианол, бромистый этидий, хлорамфеникол, арабиноза, нитрат серебра, формальдегид, аминокислоты, ацетонитрил, гидрокарбонат аммония

Amresco: среда LB, мочевины, ДМСО, 1,4-дителиотреитол (DTT), трис(оксиметил)аминометан (Tris), таблетки PBS, бычий сывороточный альбумин, глицерин

Thermo Scientific: T4 ДНК-лигаза, T4 PНК, PCR Master Mix, эндонуклеазы рестрикции, 1,4-дителиотреитол, нуклеозидтрифосфаты, Chaps, ДНКаза I, РНКаза А, Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit, Maxima Reverse Transcriptase, Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x), GlycoBlue, DpnI, Trizol.

NEB: Q5 ДНК-полимераза.

Евроген: набор реагентов для выделения ДНК из агарозного геля Cleanup mini, набор реагентов для выделения плазмид Plasmid miniprep и олигодезоксирибонуклеотиды.

Lumiprobe: олигодезоксирибонуклеотиды

Roche: Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail.

В работе использовали ферменты фирм: Thermo Scientific (США), Promega (США), New England Biolabs (США), Roche (Франция), Helicon (Россия), СибЭнзим (Россия).

Буферы и растворы

Микробиологические среды:

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

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

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

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

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

MOPS: 40 мМ MOPS (3-морфолинопропансульфоная кислота)-KOH (pH 7,4), 1,32 мМ K₂HPO₄, 4 мМ трицина, 0,01 мМ FeSO₄, 9,5 мМ NH₄Cl, 0,276 мМ K₂SO₄, 0,5 мкМ CaCl₂·2H₂O, 0,5 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl, 3 нМ (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 0,4 мкМ H₃BO₃, 30 нМ CoCl₂, 9,5 нМ CuSO₄, 80 нМ MnCl₂, 10 мМ ZnSO₄

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

Растворы для белкового электрофореза и иммуноблоттинга:

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

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

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

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

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

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

Растворы для окрашивания белковых гелей серебром:

Раствор тиосульфата натрия: **0,03% Na₂S₂O₃.**

Раствор нитрата серебра: 0,1% AgNO₃; 0,04% формальдегид.

Проявитель: 4% Na₂CO₃; 0,0006% Na₂S₂O₃; 0,04% формальдегид.

Раствор для остановки окрашивания: 10% уксусная кислота.

Растворы для подготовки образцов белков к MALDI:

Буфер для промывки: 50 мМ NH₄HCO₃; 40% ацетонитрил.

Раствор для трипсинолиза: 10 нг/мкл трипсин; 100 мМ NH₄HCO₃.

Раствор для окончания трипсинолиза: **0,5% трифторуксусная кислота.**

Растворы для электрофореза в агарозном геле:

TBE: 100 мМ Tris-HCl; 100 мМ H₃BO₃; 2 мМ EDTA pH 8,3.

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

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

Буферы для выделения рибосом, рибосомных белков:

Связывающий буфер (для выделения рибосом): 20 мМ Hepes-KOH (pH 7.5); 10 мМ Mg(OAc)₂; 100 мМ NH₄OAc; 2 мМ дитиотреитол.

Диссоциирующий буфер (для выделения рибосом): 20 мМ Hepes-KOH (pH 7.5);

1 мМ Mg(OAc)₂; 100 мМ NH₄OAc; 2 мМ дитиотреитол.

Буфер для суммарного рибосомного белка: 20 мМ Tris-HCl (pH 7,4), 4 мМ Mg(OAc)₂, 400 мМ NH₄Cl, 0,2 мМ ЭДТА, 5 мМ 2-меркаптоэтанол.

Буферы для работы с ДНК:

Буферы для эндонуклеаз рестрикции фирм: Thermo Scientific (США), Promega (США), New England Biolabs (США), Roche (Франция), Helicon (Россия), СибЭнзим (Россия).

Штаммы

Штамм	Описание
BW25113	<i>lacI^q rrrB^{T14} ΔlacZWJ16 hsdR514 ΔaraBADAH33 ΔrhaBADLD78</i>
JW0836 (<i>ΔrimK-Keio</i>)	<i>lacI^q rrrB^{T14} ΔlacZWJ16 hsdR514 ΔaraBADAH33 ΔrhaBADLD78, ΔrimK::kan</i>
JM109	<i>e14- (McrA-) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(rK- mK+) supE44 relA1 (lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI^qZ M15]</i>
BL21 (DE3)	<i>F⁻ dcm ompT hsdS(rB- mB-) gal ΔDE3</i>
I48S	BW25113 <i>rpoD-I48S-Cm</i>
WT	BW25113 <i>rpoD-WT-Cm</i>
<i>ΔrimK</i>	BW25113 <i>rpoD-WT-Cm, ΔrimK::kan</i>

Олигонуклеотиды

Праймеры для внесения и проверки мутаций T143G в гене *rpoD*

Название праймера	Последовательность (5'-3')
RpoD_Cm_Chk_F	5'-TGATGCCCGCTGGCGATTCAGG-3'
RpoD_Cm_Chk_R	5'-TTGAAGCGTATCGCGAGCTG-3'
rpoD_F	5'-ATCGAAGACATCATCCAAATGAT-3'
rpoD_R	5'-TCATCGTCCAGATCTTCCTG-3'
rpoD st F	5'-TGGAGCAAAACCCGCAGTCAC-3'
rpoD st R	5'-GCATCCGGTGCTTCTCCATCAC-3'

Манипуляции с ДНК

Выделение плазмидной ДНК

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

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

Разделение фрагментов ДНК в агарозном геле

Агарозный гель готовился с учетом длины фрагмента ДНК. Для этого смешивали нужное количество агарозы с соответствующим объемом раствора 1xTBE (1% гель - 1 г агарозы на 100 мл раствора 1x TBE). Далее раствор прогревали до полного растворения агарозы. Расплавленную агарозу охлаждали до ~ 40–50°C и добавляли необходимое количество (до 0.01 %) водного раствора бромистого этидия с концентрацией 10 мг/мл, перемешивали, выливали в специальную форму с гребенками. После застывания геля образцы наносились в ячейки и проводили электрофорез при силе тока ~ 100 мА. Изображение геля получали с помощью камеры с УФ лампой (прибор ChemiDoc (Bio-Rad)).

Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля

Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля осуществлялось с помощью набора реагентов фирмы Евроген согласно протоколу с использованием фирменных реагентов. Часть агарозного геля, содержащую нужный фрагмент ДНК, растворяли при 55°C в Связывающем буфере (Евроген) в соотношении на 100 мкг геля 300 мкл буфера. Затем получившийся раствор пропускали через колонку для выделения ДНК (Евроген). Колонку промывали 750 мкл Промывочного раствора (Евроген). ДНК элюировали 30 мкл деионизированной воды.

Приготовление вектора и вставки

Составляли следующую реакционную смесь:

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

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

Лигирование

Составляли следующую реакционную смесь:

Компонент	Количество
Вектор	20 нг
Вставка	10–50 нг (3x–10x избыток)
10x буфер для T4 ДНК-лигазы	1 мкл
H ₂ O	до 10 мкл

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

ПЦР

Составляли следующую реакционную смесь:

Компонент	Количество
10x буферный раствор для Taq-полимеразы	5мкл
Матричная ДНК (плазмидная или геномная)	5–50 нг
Праймер 1	15–20 пмоль
Праймер 2	15–20 пмоль
Смесь dNTP	0,2 мМ каждого
Mg(OAc) ₂	2,5 мМ
H ₂ O	до 49 мкл

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

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

Секвенирование плазмид и ПЦР-продуктов

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

Манипуляции с РНК

Выделение суммарной РНК

К осадкам клеток добавляли реагент Trizol и ресуспендировали. Инкубировали клетки в Trizol в течение 10 минут на комнатной температуре. Центрифугировали при 12000×g и температуре +4°C в течение 10 мин, супернатант переносили в новую пробирку. Добавляли хлороформ из расчёта 200 мкл хлороформа на 1 мл Trizol. Перемешивали, инкубировали 2-5 минут при комнатной температуре. Центрифугировали при 12000×g и температуре +4°C в течение 15 мин. Водную фазу собирали в новую пробирку и добавляли равный объём

изопропанола. Инкубировали на комнатной температуре в течение 15 минут, центрифугировали при максимальных оборотах настольной центрифуги и температуре +4°C в течение 15 мин. Отбирали изопропанол, осадок 2 раза промывали 70% этанолом. Центрифугировали при максимальных оборотах, температуре +4°C в течение 15 мин. Отбирали этанол, сушили осадок РНК в термостате и растворяли в воде.

Количественный ПЦР с обратной транскрипцией

Для проведения анализа методом количественного ПЦР выделяли РНК из 1 мл клеточной культуры в стационарной фазе и 5 мл культуры в логарифмической фазе роста с помощью реактива Trizol. 1 мкг РНК обрабатывали ДНКазой (Thermo Scientific DNase I), проводили реакцию обратной транскрипции с помощью Thermo Scientific™ Maxima™ First Strand cDNA Synthesis Kit (в состав набора входит смесь случайных олигонуклеотидов и олиго-dT праймер). Для количественной ПЦР использовали набор Thermo Scientific SYBR Green PCR Master Mix (2x). ПЦР проводили на приборе CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System, анализ результатов проводили с помощью программы Bio-rad CFX manager. В качестве внутреннего контроля использовали пару праймеров на 16S РНК.

Транскриптомный анализ

Клетки штаммов WT и I48S выращивали в среде LB при 37°C в течение 24 часов. Полученные культуры разбавляли свежей средой LB и выращивали 48 часов (образцы стационарной фазы) или до $ОП_{600} = 0.6$ (образцы логарифмической фазы). Полученные культуры осаждали центрифугированием при 5000 об/мин 5 мин при 4°C. Выделяли суммарную РНК с помощью реактива Trizol (Thermo Scientific). Образцы РНК обрабатывали ДНКазой I (Thermo Scientific) и очищали с помощью набора PureLink RNA Mini Kit (Thermo Scientific). Целостность РНК проверяли с помощью денатурирующего гель-электрофореза.

Библиотеки мРНК создавали с помощью набора NEBNext® mRNA Library Prep Reagent Set for Illumina® согласно инструкции производителя (New England Bio-Labs Inc., Ipswich, MA, USA). Полученные библиотеки секвенировали на

платформе Illumina HiSeq 2500. Для каждого образца было получено 4,5 миллиона прочтений длиной 50 п.о. Для сборки транскриптома использовали референсный геном *E. coli* K12 MG1655 (идентификатор GCA_000005845.2). Дифференциальная экспрессия генов рассчитывалась с использованием пакета программ RSEM v1.3.1.

Манипуляции с клетками

Измерение кривой роста клеток

Инокулировали 2 мл среды LB или MOPS колонией клеток дикого типа или I48S. Культуру выращивали при 37°C и постоянном перемешивании в течение 12 часов. Полученную культуру клеток разбавляли 1:100, инкубировали при 37°C и постоянном перемешивании. Каждые 30-40 минут отбирали аликвоту клеток и измеряли оптическую плотность на длине волны 600 нм. Измерение проводили в течение 10 часов.

Определение титра клеток

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

Измерение выживаемости клеток в стационарной фазе роста

Инокулировали 10 мл среды LB колонией клеток дикого типа или I48S. Культуру выращивали при 37°C и умеренном перемешивании в течение 12 суток. Раз в сутки отбирали 1 мкл культуры для измерения клеточного титра.

Приготовление компетентных клеток

Несколько колоний клеток переносили в колбу с 50 мл LB, растили при интенсивном перемешивании при 18°C до $A_{600} \sim 0,6$. После этого клетки охлаждали во льду в течение 10 мин и осаждали центрифугированием при 5000 об/мин 5 мин при 4°C. Сливали супернатант, центрифугировали повторно при 5000 об/мин 5 мин при 4°C. Отбирали остатки супернатанта и ресуспендировали осадок клеток

в 15 мл ТВ, полученную суспензию инкубировали 10 мин при 0°C. Центрифугировали суспензию при 3000 об/мин 10 мин при 4°C, сливали супернатант, после чего повторно центрифугировали при 5000 об/мин 5 мин при 4°C и отбирали остатки супернатанта.

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

Трансформация компетентных клеток

Суспензию компетентных клеток размораживали во льду, добавляли 1 мкл раствора плазмидной ДНК или 10 мкл лигазной смеси, инкубировали 30 мин при 0°C. Затем прогревали смесь в термостате в течение 40–50 сек при 42°C, охлаждали до 0°C, добавляли 500 мкл LB и инкубировали 1 час при 37°C, интенсивно перемешивая. Аликвоту 100–200 мкл (в случае плазмидной ДНК) или полный объем (в случае лигазной смеси) трансформационной смеси высевали на чашку Петри с твердой средой LB, содержащей соответствующие антибиотики. Инкубировали чашку при 37°C в течение 16ч.

Получение штаммов WT и I48S

Штаммы были созданы с использованием фаговой системы рекомбинации, которая широко используется для получения нокаутных штаммов *E. coli* (lambda RED system) [31]. С помощью данной системы был создан штамм, содержащий точечную мутацию T143G, а также контрольный штамм без мутации. На первом этапе мы приготовили кассеты для внесения генетических конструкций в геном на основе плазида pCA24N. С помощью олигонуклеотидов rpoD st F и rpoD end R проводили ПЦР на матрице геномной ДНК штаммов BW25113 и JW0836. Полученные ПЦР-продукты, содержащие кодирующий участок гена *rpoD* с мутацией и без вносили в плазмиду pCA24N с помощью эндонуклеаз рестрикции и последующего лигирования. На матрице полученных плазмид проводили ПЦР с

олигонуклеотидами *rpoD_F* и *rpoD_R*, что позволило нам получить линейный ПЦР-продукт, содержащий либо ген *rpoD* дикого типа, либо ген с заменой T143G. Помимо гена *rpoD*, ПЦР-продукт включал в себя ген устойчивости к хлорамфениколу (Cm^R). 5'-конец ПЦР-продукта был комплементарен кодирующему региону *rpoD*, а 3'-конец – некодирующему региону ДНК в 3'-области относительно гена *rpoD*.

Внесение кассеты в геномную ДНК

Клетки BW25113 трансформировали плазмидой pKD46. Полученные штаммы выращивали ночную культуру в среде SOB при 30°C. Ночную культуру разбавляли средой SOB в 100 раз до конечного объема 100 мл. К культуре клеток добавляли ампициллин (50 мкг/мл) и 10мМ арабинозу, растили при интенсивном перемешивании при 30°C до $A_{600} = 0,6$. После этого клетки осаждали центрифугированием при 5000 об/мин 5 мин при 4°C. Сливали супернатант, центрифугировали повторно при 5000 об/мин 5 мин при 4°C. Отбирали остатки супернатанта и ресуспендировали осадок клеток в 25 мл 10% раствора глицерина в деионизованной воде. Центрифугировали суспензию при 5000 об/мин 5 мин при 4°C, сливали супернатант, после чего повторно центрифугировали при 5000 об/мин 5 мин при 4°C и отбирали остатки супернатанта. Повторяли описанную выше процедуру промывки клеток 10% глицерином. Полученный промытый осадок клеток ресуспендировали в 0,4 мл 10% раствора глицерина в деионизованной воде, суспензию аликвотили по 100 мкл и замораживали в жидком азоте. К аликвоте электрокомпетентных клеток BW25113-pKD46 добавляли 5 мкл раствора полученных ранее ПЦР-продуктов и осуществляли электропорацию (1,8 кВ). После электропорации к суспензии добавляли 5-кратный объем SOC, инкубировали при 37°C и высевали полученную суспензию на чашку Петри с твердой средой LB, содержащей хлорамфеникол (34 мкг/мл). Инкубировали чашку при 37°C в течение 24 ч, что приводило к утрате клетками плазмиды pKD46.

Анализ полученных клонов

Полученные колонии высевали в жидкую среду LB, выращивали ночные культуры. 5 мкл ночной культуры помещали в 0,2 мл пробирку, клетки осаждали центрифугированием 5000 об/мин, 5 минут, отбирали супернатант. Полученный осадок ресуспендировали в 5 мкл реакционной смеси и проводили ПЦР с праймерами RpoD_Cm_Chk_F и RpoD_Cm_Chk_R. Длину полученного ПЦР-продукта определяли с помощью электрофореза в агарозном геле. В случае успешной вставки кассеты в геномную ДНК полученный ПЦР продукт секвенировали.

Получение штамма $\Delta rimK$

5 мл среды LB инокулировали колонией штамма JW0836 ($\Delta rimK$ Keio) и растили 24 часа при 37°C. Ночную культуру разбавляли в 100 раз свежей LB, добавляли глюкозу до конечной концентрации 0,2% и CaCl₂ до конечной концентрации 5 мМ. Инкубировали культуру клеток 30-60 минут при 37°C и активном перемешивании. После инкубации добавляли 100 мкл раствора фага P1 с титром 10⁹ БОЕ (бляшкообразующих единиц). Культуру инкубировали 2-3 часа при 37°C и активном перемешивании до лизиса клеток. О степени лизиса судили по прозрачности культуры и появлению взвеси клеточного дебриса. К смеси добавляли 200 мкл хлороформа и инкубировали 5 минут при активном перемешивании, после чего центрифугировали суспензию при 10000 об/мин 10 минут при 4°C и фильтровали с помощью фильтра с размером пор 0,45 мкм. Полученный фаговый лизат хранили в холодильнике при 4°C. Для фаговой трансдукции 5 мл среды LB инокулировали колонией штамма BW25113 и растили 24 часа при 37°C. 1,5 мл полученной культуры центрифугировали при 10000 об/мин 5 минут при 4°C. Осадок клеток ресуспендировали в стерильном растворе, содержащем 10 мМ MgCl₂ и 5 мМ CaCl₂. К 100 мкл культуры клеток добавляли 1 мкл фагового лизата, полученного ранее. Смесь инкубировали 30 минут при 37°C и активном перемешивании, после чего добавляли 1 мл LB и 200 мкл 1М цитрата натрия и инкубировали 60 минут при 37°C. Полученную культуру клеток втирали в чашки Петри с агаризованной средой LB и канамицином (50 мкг/мл) и

инкубировали 24 часа при 37°C. Полученные колонии проверяли на делецию гена *rimK* с помощью ПЦР и иммуноблоттинга с антителами на рибосомный белок S6.

Получение плазмиды для экспрессии гена rimK с мутациями в АТФ-связывающем сайте

За основу была взята плаزمида pET33b-*rimK*, содержащая ген *rimK* под контролем промотора T5-lac. С помощью олигонуклеотидов *rimK_mut_F* и *rimK_mut_R* проводили сайт-специфический мутагенез, приводящий к заменам R211G, S212I и N213A. Полученную плазмиду проверяли методами ПЦР и секвенированием.

Определение количества спящих клеток (ампициллиновый тест)

Ночную культуру клеток WT и I48S растили 48 часов в среде MOPS с добавлением 0,2% глюкозы при 37°C. После чего к культуре клеток добавляли свежую глюкозу (0,2%) вместе с ампициллином (50 мкг/мл) или ципрофлоксацином (10 мкг/мл), инкубировали при 37°C и умеренном перемешивании и определяли титр клеток через разные промежутки времени. Для сравнения использовали клеточный титр исходной культуры без антибиотика.

Подготовка к проточной цитофлуориметрии

Отдельные колонии штаммов BW25113 (WT) и I48S, трансформированные репортерными плазмидами переносили в 5 мл LB и выращивали ночные культуры. Ночную культуру пересевали в свежую среду LB 1:100 и растили до стационарной фазы (48 часов) и повторяли пересев в свежую среду. Каждые 60 минут отбирали объем культуры, эквивалентный 1 ОЕ, собирали клетки центрифугированием при 5000 об/мин, 4°C в течение 10 мин. Супернатант отбрасывали и ресуспендировали осадок в 1 мл PBS. Повторно скручивали клетки центрифугированием при 5000 об/мин, 4°C в течение 10 мин и также отбрасывали супернатант. Ресуспендировали осадок в 1 мл PBS. Все измерения проводились на клеточном сортере FACS BDScience Рубцовой М.П. Флуоресцентный сигнал регистрировали при длинах волн поглощения/испускания: 405/460 нм (синяя форма белка), 555/610 нм (красная форма белка).

Измерение уровня de novo трансляции

Индивидуальную колонию помещали в среду MOPS, в которую были добавлены все аминокислоты (40 мг/л каждая), кроме валина и растили 48 часов при 37°C и активном перемешивании. Полученную ночную культуру разбавляли в 50 раз в 5 мл среды MOPS с аминокислотами, кроме валина. В определённый момент (указано в обсуждении результатов) к среде с клетками добавляли радиоактивный валина-¹⁴C (Perkin Elmer, США) в разведении 1:500 (0.1 µCi). Встраивание радиоактивного валина-¹⁴C останавливали скручиванием клеток через 10 минут в случае логарифмической фазы, 30 минут в случае лаг фазы и через 2 часа в случае стационарной фазы. Клетки промывали раствором PBS и суспендировали в буфере для лизиса. Клетки нагревали до 95°C, инкубировали 10 минут, затем полученный раствор центрифугировали и отбирали супернатант. Помеченные образцы разделяли в одномерном денатурирующем ПААГ. Авторадиограмму регистрировали при помощи сканера GE Healthcare.

Выделение рибосом, белков, клеточных экстрактов

Выделение фракции рибосом

К 400 мл среды LB добавляли 4 мл свежей ночной культуры клеток и инкубировали при 37°C и перемешивании 180 об/мин до A₆₀₀ 0,5-0,8. Клетки охлаждали во льду в течение 20 мин (все дальнейшие манипуляции проводили при +4°C) и осаждали центрифугированием при 5000 об/мин 10 мин в роторе JA-10 в препаративной центрифуге Beckman. Осадок ресуспендировали в 10 мл охлажденного связывающего буфера, суспензию центрифугировали, сливали супернатант. Промытый осадок ресуспендировали в 3 мл связывающего буфера. Суспензию обрабатывали ультразвуком во льду 4 раза по 15 сек с перерывом в 45 сек.

Клеточный дебрис осаждали центрифугированием в роторе JA-20 при 15000 об/мин в течение 30 мин в препаративной центрифуге Beckman. Супернатант наносили на градиент сахарозы 10-40%. Центрифугирование в сахарозном градиенте проводили на ультрацентрифуге Beckman L7-55 в роторе SW-32-Ti

при 18000 об/мин в течение 16 ч. 70S фракцию рибосом собирали в отдельную пробирку, доводили до нужного объема раствором сахарозы в связывающем буфере и осаждали центрифугированием при 70000 об/мин в роторе MLA-80 в течение 1 часа. Сливали супернатант, осадки растворяли в связывающем буфере, определяли оптическую плотность полученного раствора при 260 нм. Раствор разделяли на аликвоты по 100 мкл, замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80°C.

Манипуляции с белками

Белковый электрофорез в ПААГ в денатурирующих условиях

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

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

Иммуноблоттинг

Проводили белковый электрофорез в 18% ПААГ в денатурирующих условиях. Замачивали мембрану PVDF в этиловом спирте 2 минуты, промывали 5 минут в дистиллированной воде, затем мембрану и гель замачивали 5-10 минут в буфере для переноса. Гель помещали на 3 листа фильтровальной бумаги Watman 3MM, смоченных в буфере для переноса, накрывали мембраной, 3 листами фильтровальной бумаги Watman 3MM, смоченных в буфере для переноса. Перенос проводили при 100 мА 2 часа в буфере для переноса. Далее мембрану блокировали в 5% растворе BSA в TBST (1мл/см²) в течение 12 часов, промывали TBST 4 раза по 5 минут.

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

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

Окрашивание белковых ПААГ серебром

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

Идентификация белковых зон в ПААГ

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

Результаты

Постановка задачи

Основной целью данной диссертации являлось изучение функции олигоглутамилирования рибосомного белка S6, в частности, с помощью исследования фенотипа штамма $\Delta rimK$ из Keio-коллекции нокаутных штаммов (штамм JW0836). Мы обнаружили, что штамм с делецией гена *rimK*, полученный из коллекции Keio, содержащей нокаутные штаммы *E. coli*, характеризуется различными фенотипическими аномалиями, связанными с выживаемостью и метаболической активностью клеток. Неожиданно оказалось, что при комплементации делеции гена *rimK* плазмидным вектором, содержащим ген *rimK* нормализация фенотипа не происходила, несмотря на восстановление модификации белка S6. Более того, P1 трансдукция локуса *rimK* из штамма $\Delta rimK$ в штамм дикого типа приводила к полному восстановлению нормального фенотипа. С учетом полученных результатов был сделан вывод о том, что аномалии штамма $\Delta rimK$ из Keio коллекции могут быть вызваны сторонней мутацией. В соответствии с нашим предположением, полногеномное секвенирование штамма $\Delta rimK$ из Keio коллекции показало наличие точечной мутации в гене *rpoD*, который кодирует главный транскрипционный фактор *E. coli* - σ^{70} -субъединицу РНК-полимеразы. Тот факт, что данная мутация находится в самом неизученном домене σ^{70} -субъединицы и приводит ко множественным аномалиям в бактериальном метаболизме, делает актуальным и значимым не только изучение функциональной роли олигоглутамилирование рибосомного белка S6, но и исследование эффектов, оказываемых изучаемой мутацией на жизнедеятельность клеток *E. coli*.

В рамках диссертации требовалось решить следующие задачи: создать новые штаммы *E. coli*, содержащие независимо полученные делецию гена *rimK* и мутацию в гене *rpoD*, изучить функциональную роль олигоглутамилирования рибосомного белка S6, а также, исследовать влияние замены I48S в σ^{70} -субъединице на жизнедеятельность *E. coli*.

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

Образцы геномной ДНК из штаммов BW25113 (WT) и JW0836 (*ArimK* Keio) были переданы для секвенирования нашим коллегам из лаборатории Николая Равина ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН. С помощью полногеномного секвенирования исследуемых штаммов мы обнаружили точечную мутацию T143G в кодирующей части гена *rpoD*, которая приводит к замене 48 аминокислотного остатка изолейцина на серин (I48S) в регионе 1.1 сигма-фактора РНК-полимеразы σ^{70} . Для изучения влияния мутации I48S на бактериальную физиологию мы создали два новых штамма *E. coli* с использованием фаговой системы рекомбинации, которая широко используется для получения нокаутных штаммов *E. coli* (lambda RED system) [31]. С помощью данной системы был создан штамм, содержащий точечную мутацию T143G, а также контрольный штамм без мутации. Мутация была внесена в геном штамма BW25113 с помощью линейного ПЦР-продукта, содержащего либо ген *rpoD* дикого типа, либо ген с заменой T143G. Помимо гена *rpoD*, ПЦР-продукт включал в себя ген устойчивости к хлорамфениколу (Cm^R). 5'-конец ПЦР-продукта был комплементарен кодирующему региону *rpoD*, а 3'-конец – некодирующему региону ДНК в 3'-области относительно гена *rpoD*. Таким образом, нами были созданы два новых штамма *E. coli*: BW25113 *rpoD*-I48S-*Cm* (далее I48S) и BW25113 *rpoD*-WT-*Cm* (далее WT). Схема полученных и исходных штаммов представлена на рис. 10.

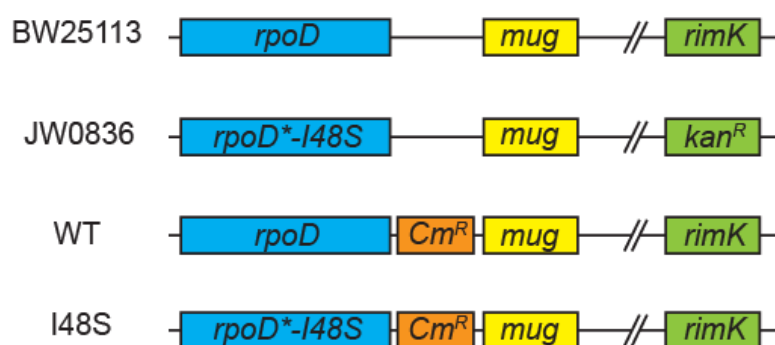


Рисунок 10. Схема полученных и исходных штаммов. BW25113 – штамм дикого типа, использованный в качестве контроля при секвенировании и для получения новых штаммов; JW0836 - штамм *ArimK* из Keio коллекции; WT - BW25113 *rpoD*-WT-*Cm*; I48S - BW25113 *rpoD*-I48S-*Cm*.

Полученные штаммы были проверены методами ПЦР и секвенирования ДНК. Результаты секвенирования новых и исходных штаммов приведены на рис. 11.

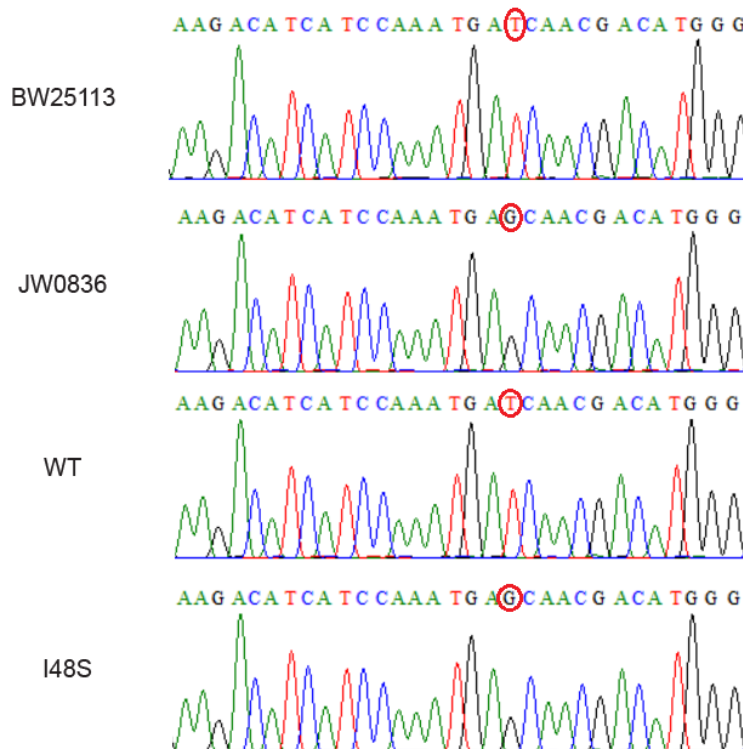


Рисунок 11. Результат секвенирования гена *rpoD*. Приведён фрагмент хроматограмм, целевой нуклеотид отмечен красным кружком. BW25113 – штамм дикого типа из Keio коллекции; JW0836 - штамм *ΔrimK* из Keio коллекции; WT - BW25113 *rpoD*-WT-Cm; I48S - BW25113 *rpoD*-I48S-Cm.

Влияние мутации I48S на кинетику роста и выживаемость клеток

Для изучения влияния мутации I48S на бактериальную физиологию мы сравнили скорость роста штаммов дикого типа и I48S, результаты измерений приведены на рис. 12. Время удвоения в логарифмической фазе роста было сравнимо для обоих штаммов (40.8 ± 1.7 мин и 46.4 ± 2.1 мин в среде LB, 142.6 ± 12.8 мин и 176.4 ± 4.8 мин в минимальной среде MOPS, 125.9 ± 6.1 мин и 146.1 ± 5.3 мин в минимальной среде MOPS с добавлением 20 аминокислот для дикого типа и I48S, соответственно). Однако, в случае штамма с мутацией мы наблюдали значительную задержку при переходе от лаг фазы к логарифмической. Средняя продолжительность лаг фазы исследуемых штаммов составила 56.3 ± 2.7 мин и 95.3 ± 1.7 мин в среде LB, 258.4 ± 9.4 мин и 321.6 ± 12.1 мин в минимальной среде MOPS, 119.8 ± 6.1 мин и 211.6 ± 5.7 в минимальной среде MOPS с добавлением 20

аминокислот для дикого типа и I48S, соответственно. Наблюдаемый нами фенотип свидетельствует о возможном нарушении механизма адаптации бактериальной культуры к новым условиям окружающей среды [116].

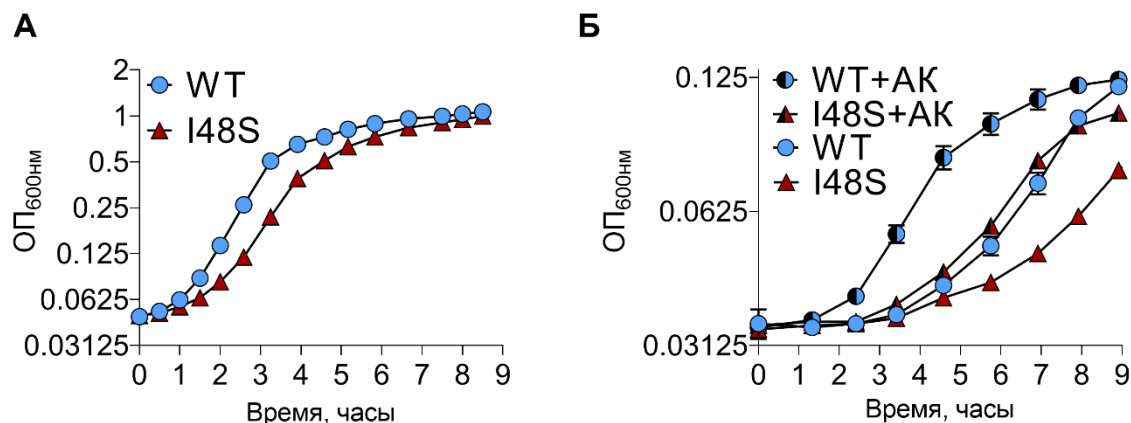


Рисунок 12. (А) Кривые роста штаммов WT и I48S в среде LB. Каждая точка представляет собой среднее значение оптической плотности для трех биологических реплик на длине волны 600 нм. Погрешность измерения добавлена на график, но была меньше физического размера точек графика. (Б) Кривые роста штаммов WT и I48S в минимальной среде MOPS без аминокислот и с добавлением 20 протеиногенных аминокислот. Каждая точка представляет собой среднее значение оптической плотности для трех биологических реплик на длине волны 600 нм.

Одной из возможных причин замедленного выхода из стационарной фазы является сниженный титр клеток, способных к делению. Для проверки данной гипотезы мы измеряли титр клеток дикого типа и I48S при долговременной инкубации в стационарной фазе в течение двенадцати дней. Анализ КОЕ, приведенный на рис. 13, показал, что выживаемость клеток в стационарной фазе была сравнима для обоих штаммов. Таким образом, можно предположить, что изучаемая нами мутация не влияет на выживаемость клеток в стационарной фазе.

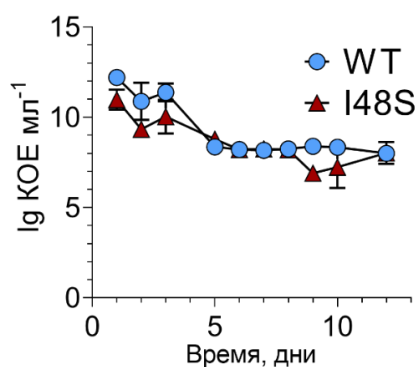


Рисунок 13. Титр клеток штаммов WT и I48S при длительном культивировании. Каждая точка представляет собой среднее значение титра клеток для трех биологических реплик. КОЕ - колониеобразующие единицы.

Другой причиной подобного дефекта роста может являться аномальная адаптация метаболизма мутантных клеток во время выхода из стационарной фазы.

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

Одной из ключевых стратегий выживания бактериальной популяции является образование различных покоящихся форм [79]. Подобные клетки характеризуются сниженным метаболизмом и практически нечувствительны к антибиотикам [68]. При улучшении условий окружающей среды бактериальная популяция разделяется на субпопуляции: часть клеток начинает активно делиться, в то время как значительная доля клеток остается в спящем состоянии [117]. В случае добавления антибиотиков к культуре клеток происходит гибель активно делящихся бактерий, однако, в целом, популяция получает возможность выжить именно благодаря различным формам покоящихся клеток, резистентным к антибиотикам [117].

Одним из наиболее простых способов проверки возможного влияния мутации I48S на образование покоящихся клеток является ампициллиновый тест. Суть эксперимента заключается в том, что клетки в стационарной фазе роста пересевают в свежую среду с добавлением бактерицидного антибиотика ампициллина и собирают образцы культуры через равные промежутки времени. Собранные клетки отмывают от антибиотика и определяют титр клеток. Поскольку покоящиеся клетки резистентны к действию антибиотиков, то падение титра клеток при добавлении ампициллина в лаг фазе объясняется гибелью именно метаболически активных клеток. С помощью ампициллинового теста мы обнаружили, что в первые три часа инкубации с антибиотиком, титр покоящихся клеток мутантного штамма был значительно ниже, чем титр покоящихся клеток штамма дикого типа (рис. 14А). Подобный результат позволяет предположить, что в штамме I48S доля клеток, активировавших свой метаболизм сразу после посева в свежую среду, была значительно выше, чем в штамме дикого типа. В свою очередь, «пробуждение» штамма дикого типа занимает значительно больше времени, что делает его более устойчивым к действию ампициллина. В тоже время,

при дальнейшей инкубации с антибиотиком мы наблюдали сравнимое падение титра обоих штаммов, что свидетельствует о повышенной чувствительности к ампициллину именно в лаг фазе. (рис. 14А). Похожие результаты были получены при инкубации исследуемых культур клеток с ципрофлоксацином – антибиотиком с механизмом действия, отличным от ампициллина, что дополнительно подтверждает предположение о сниженном титре покоящихся клеток в штамме I48S (Рис. 14Б).

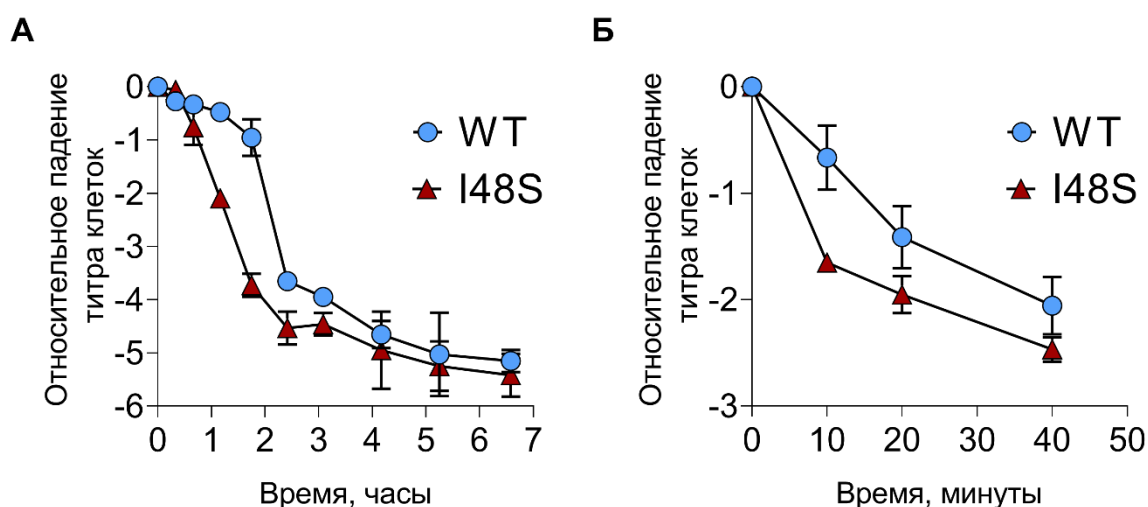


Рисунок 14. Кривая падения относительного титра клеток дикого типа и мутанта после пересева в среду с антибиотиком. Каждая точка соответствует среднему титру трех биологических реплик. (А) Падение титра после обработки клеток ампициллином. (Б) Падение титра после обработки клеток ципрофлоксацином.

Для подтверждения предыдущих результатов и более подробного описания метаболизма штамма с мутацией мы провели анализ *de novo* синтеза белка в разных фазах роста бактериальной культуры. Клетки выращивали до стационарной фазы (48 часов) в бедной среде со всеми протеиногенными аминокислотами, кроме валина. Особенностью используемой среды также являлась низкая концентрация глюкозы (0,1%), что приводило к тому, что голод наступал именно из-за нехватки источника углерода. Таким образом, добавление глюкозы к культуре приводило к практически моментальной активации метаболизма. Культуру клеток в стационарной фазе делили на три равные части. К одной из них добавляли радиоактивный валин-¹⁴C и растили клетки еще 1 час (стационарная фаза), к другой части клеток добавляли глюкозу в смеси с радиоактивным валином (лаг фаза). Для

измерения *de novo* трансляции в логарифмической фазе сначала добавляли глюкозу и лишь через несколько часов добавляли радиоактивный валин. Таким образом мы изучали *de novo* синтез белка на всех стадиях роста. После инкубации выделяли суммарный белок из клеток, разделяли денатурирующим гель-электрофорезом и анализировали уровень синтеза белка по включению радиоактивной аминокислоты. Результаты эксперимента приведены на рис. 15.

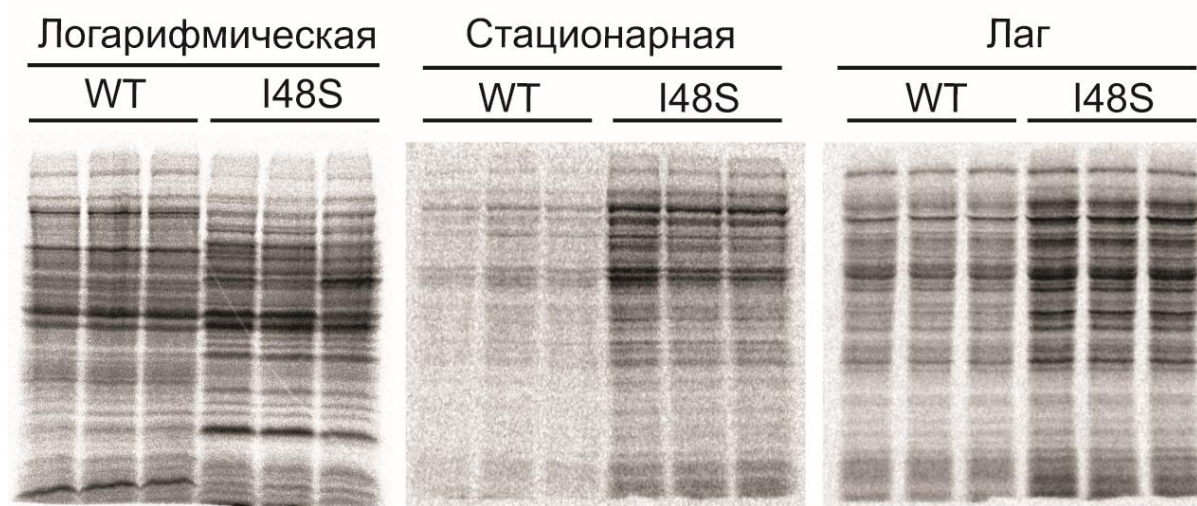


Рисунок 15. Авторадиограмма *de novo* синтезированного белка в штаммах дикого типа и мутанта. Для каждой фазы и штамма измерение уровня *de novo* трансляции было проведено на 3 биологических репликах. Контроль нанесения суммарного белка проводили с помощью окрашивания белковых гелей краской Кумасси перед экспозицией.

Как видно из приведенного выше рисунка, отличия в трансляции наблюдаются как на количественном, так и на качественном уровне. Ожидаемо, в логарифмической фазе, уровень синтеза суммарного белка в обоих штаммах был одинаков, однако, профиль синтезируемых белков значительно различался (рис. 15 слева). В стационарной фазе клетки дикого типа практически полностью подавляли биосинтез белка, в то время как мутант демонстрировал более высокий уровень остаточной трансляции (рис. 15 в центре). Похожая ситуация наблюдалась и в случае измерения эффективности трансляции при выходе из стационарной фазы (рис. 15 справа). Полученные результаты свидетельствуют о том, что клетки штамма I48S имеют повышенный уровень синтетической активности

(метаболизма) в стационарной фазе, а также во время перехода от стационарной фазы к логарифмической (лаг фаза).

Как было упомянуто выше, спящие клетки характеризуются минимальной метаболической активностью, включая гибернацию процесса трансляции. Для измерения динамики синтетической активности в индивидуальных клетках бактериальной культуры, мы использовали репортерную конструкцию на основе флуоресцентного белка FastFT [131]. Особенностью FastFT является то, что у новосинтезированного белка длина волны испускания флуоресценции находится в синей области спектра, а через некоторое время после синтеза происходит его окисление и смещение длины волны испускания флуоресценции в красную область спектра. Время полупревращения синей формы в красную составляет 7,5 часов, в то время как созревание синей формы происходит практически мгновенно (время полупревращения около 9 минут). Фактически, подобное превращение позволяет оценивать как количество новосинтезированного белка в клетке, так и количество белка, синтезированного значительно раньше. Схема контрольного эксперимента представлена на рис. 16.

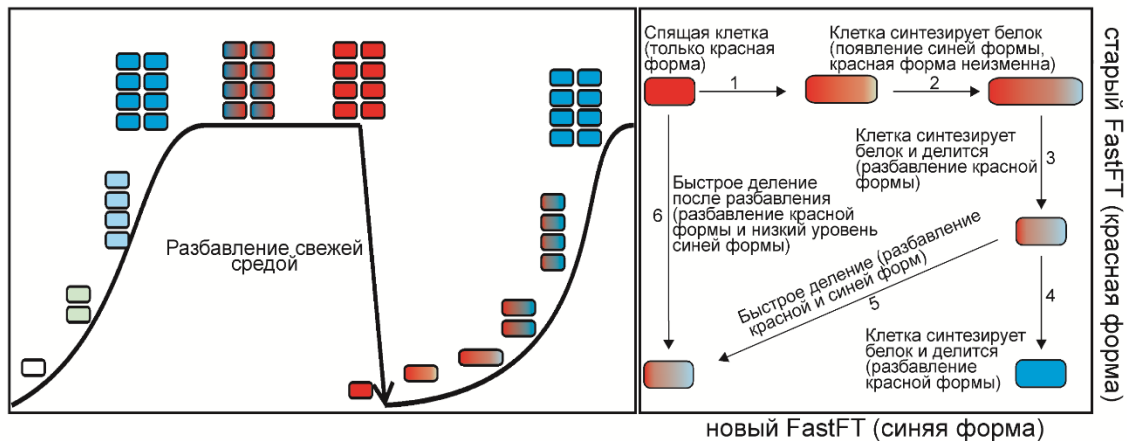


Рисунок 16. Левая часть – схема эксперимента с флуоресцентным белком-таймером FastFT. Клетки выращивали до достижения стационарной фазы (48 часов) в среде LB, пока весь FastFT не созрел до красной формы. После разбавления клеток свежей средой клетки начинают синтезировать новый белок FastFT синего цвета. Правая часть – схематичное изображение результатов проточной цитометрии. В левом верхнем углу расположены «спящие» клетки, в правом нижнем углу расположены активно делящиеся клетки.

Культуру клеток выращивали в течение 48 часов до стационарной фазы, за это время FastFT, синтезированный в логарифмической фазе, полностью созрел

до красной формы (рис. 16, левая часть). Анализ клеток в стационарной фазе с помощью проточной цитометрии показал одну популяцию, содержащую только красную форму FastFT (рис. 16, правая часть). После разбавления культуры свежей питательной средой, клетки начинали синтез синей формы FastFT, причем до начала деления, мы могли детектировать обе формы белка во всех «проснувшихся» клетках. Быстрое деление в логарифмической фазе роста приводило к разбавлению красной формы белка, в то время как синяя форма активно накапливалась внутри клеток.

Описанный выше эксперимент был воспроизведен для исследуемых штаммов WT и I48S. Плазмидой, несущей ген, кодирующий белок FastFT под контролем фагового промотора T5, были трансформированы клетки дикого типа и I48S. Культуру клеток выращивали в течение 48 часов в среде LB до наступления стационарной фазы и анализировали с помощью проточной цитометрии, что позволило одновременно измерять уровень новосинтезированного и «старого» FastFT, транслированного в предшествующей логарифмической фазе. Результат анализа, приведенный на рис. 17, показал, что, как и ожидалось, клетки дикого типа полностью ингибируют биосинтез белка в стационарной фазе (рис. 17а, 4% метаболически активных клеток), в то время как популяция мутантных клеток содержала значительную субпопуляцию клеток, продолжавших трансляцию репортерного белка (рис. 17б, 22% метаболически активных клеток).

Разбавление стационарной культуры клеток свежей средой выявило существенное различие в динамике активации метаболизма между штаммами дикого типа и I48S. Через 60 минут после разбавления свежей средой клетки дикого типа образовывали три популяции (рис. 17в). Большая часть клеток дикого типа оставалась «спящей» (49%), 27% культуры были представлены поделившимися клетками (популяция клеток со сниженным уровнем «красной» флуоресценции), в то время как 23% популяции начинали синтез синей формы FastFT без деления (популяция с увеличенным уровнем «синей» флуоресценции, но без снижения уровня «красной» флуоресценции). В отличие от дикого типа, только 34%

культуры мутанта были представлены спящими клетками и, что интересно, мы обнаружили четыре субпопуляции клеток с различной белок синтезирующей активностью. Дополнительная популяция была представлена поделившимися клетками с высоким уровнем синтетической активности (рис. 17г, обратите внимание на популяцию с увеличенной «синей» и сниженной «красной» флуоресценцией, отмеченную стрелкой).

После трех часов инкубации в свежей среде 37% клеток дикого типа оставались «спящими» (рис. 17ё), в сравнении с 10% популяции клеток I48S (рис. 17ж). Анализ динамики синтеза FastFT в клетках дикого типа и мутанта при выходе из стационарной фазы показал, что штамм дикого типа поддерживает субпопуляцию «спящих» клеток даже через 7 часов после пересева (рис. 17з, й, л, н), в то время как популяция «спящих» клеток целиком исчезала из культуры штамма I48S уже через 6 часов после разбавления свежей средой (рис. 17и, к, м, о).

Стоит отметить, что доля делящихся клеток была практически неизменна для обоих штаммов после двух часов инкубации в свежей среде. Наблюдаемое нами снижение популяции «спящих» клеток в штамме I48S на всех временах инкубации в свежей среде по большей части объясняется большей долей неделящихся клеток с повышенным уровнем синтетической активности (рис. 17в, г, обратите внимание на популяцию в правом верхнем квадранте).

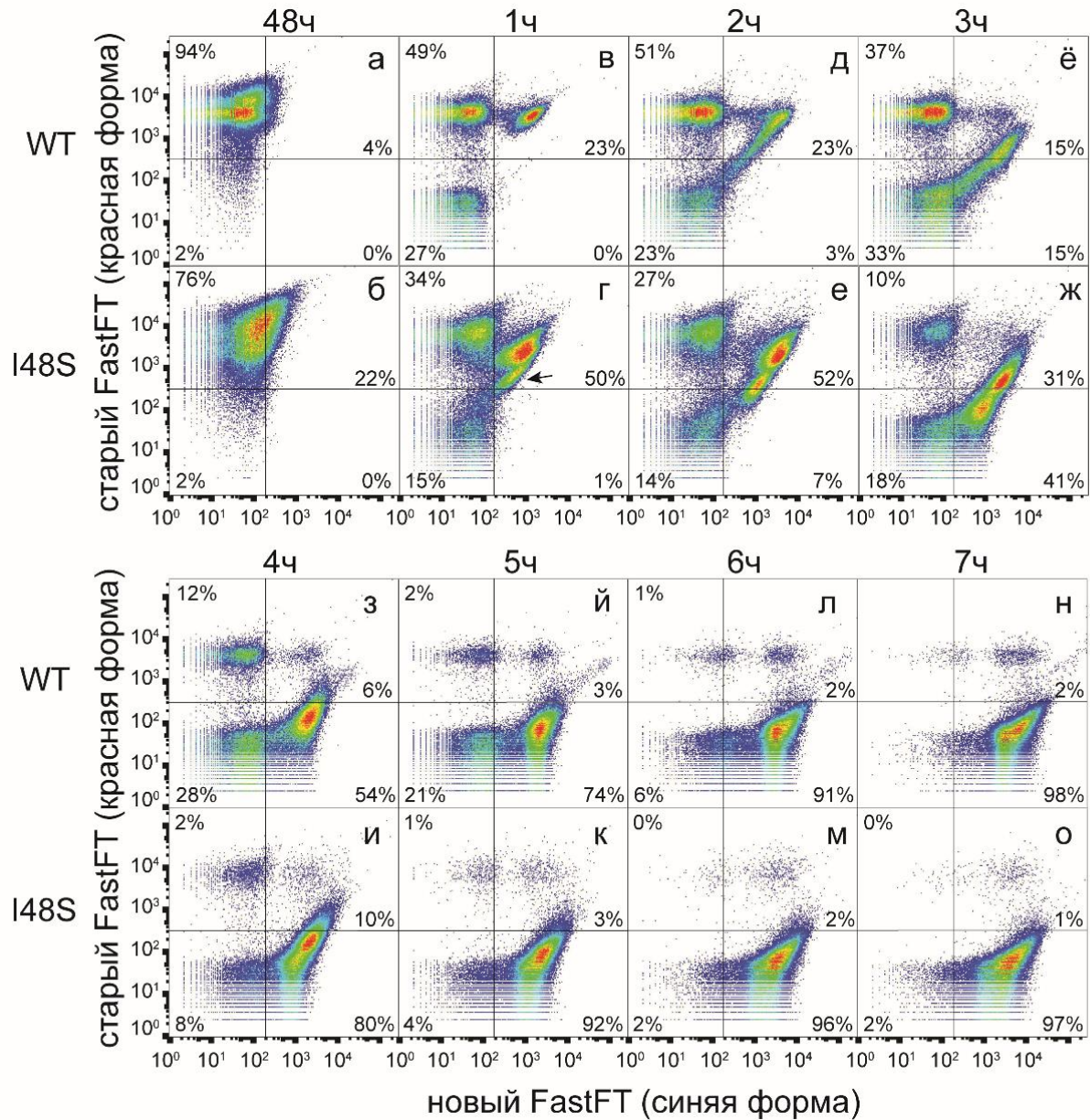


Рисунок 17. Результаты флуоресцентно-активированной проточной цитометрии клеток WT и I48S, трансформированных репортерной конструкцией FastFT. Каждая точка соответствует единичной клетке, по вертикали отложена интенсивность «красной» флуоресценции, а по горизонтали отложена интенсивность «синей» флуоресценции. Псевдоцвета соответствуют количеству клеток в каждой точке графика, где синий цвет соответствует единичным клеткам, а ярко-красный цвет обозначает высокую концентрацию клеток с одинаковым соотношением флуоресценции. Отмеченное время отражает время инкубации клеток в свежей среде после пересева культуры.

Анализ результатов эксперимента по экспрессии гена флуоресцентного таймера FastFT показал, что после разбавления свежей средой культура клеток дикого типа разделяется на три популяции, представленные метаболически активными и «спящими» клетками. В свою очередь, в штамме с мутацией в гене *rpoD* мы наблюдали более высокую долю метаболически активных клеток, а также

дополнительную популяцию, представленную активно делящимися клетками с высоким уровнем синтетической активности. Таким образом, сниженный титр «спящих клеток» и повышенный уровень трансляции хорошо коррелирует с результатами, полученными с помощью проточной цитометрии. Вероятнее всего, наблюдаемая задержка при переходе от стационарной фазы к логарифмической может объясняться значительным нарушением регуляции транскрипции в штамме с мутацией в сигма-факторе РНК-полимеразы, в связи с чем клеткам требуется заметно больше времени для адаптации к новым условиям.

Изучение транскриптома штамма I48S

σ^{70} является основным транскрипционным фактором *E. coli*, так что весьма вероятно, что мутация в гене *proD* может оказывать значительное влияние на транскриптом. Для изучения транскрипционных эффектов, оказываемых РНКП I48S, штаммы дикого типа и I48S выращивали до логарифмической ($ОП_{600nm} = 0,6$) и стационарной фазы (48 часов инкубации в LB), после чего клетки собирали и выделяли суммарную РНК. Выделенную РНК проанализировали методом денатурирующего гель-электрофореза, в каждую дорожку наносили одинаковое количество РНК. Для удобства одновременного анализа малых и длинных РНК, заливали акриламидный гель из двух частей (4% и 20%). Результаты анализа приведены на рис. 18.

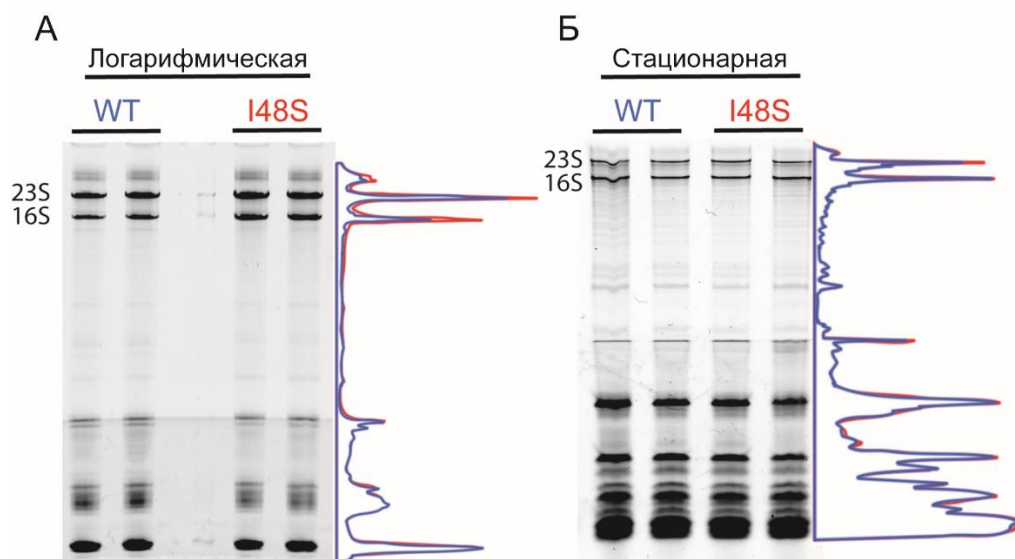


Рисунок 18. Электрофореграмма суммарной клеточной РНК в денатурирующем акриламидном геле. (А) Суммарная РНК из клеток дикого типа и I48S в логарифмической фазе. (Б) Суммарная РНК из клеток дикого типа и I48S в стационарной фазе. Приведены результаты для двух реплик каждого штамма. Справа приведен профиль интенсивности зон РНК для репрезентативной реплики. Слева от электрофореграмм указаны позиции 23S и 16S рРНК. Окрашивание проводили с помощью бромистого этидия.

Даже при анализе методом гель-электрофореза были очевидны количественные и качественные изменения в профиле экспрессируемых РНК в логарифмической фазе роста (обратите внимание на интенсивность полос, соответствующих 16S и 23S РНК, а также на профиль представленных РНК). Подготовленные образцы (три биологические реплики для каждого штамма в логарифмической и стационарных фазах роста) были переданы нашим коллегам из отдела молекулярной биологии микроорганизмов ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологий» Российской академии наук под руководством Николая Равина для секвенирования суммарной РНК. Биоинформатический анализ результатов секвенирования, содержащих таблицу с указанием дифференциально экспрессируемых генов, проводился автором диссертации.

По результатам секвенирования оказалось, что доля рРНК среди суммарной РНК составила 85-87% и 73-78% для штаммов I48S и WT, соответственно, что хорошо согласуется с результатами анализа методом денатурирующего гель-электрофореза. Также был проведён анализ дифференциальной экспрессии (ДЭ) для белок-кодирующих генов. Первичный анализ ДЭ генов проводили с помощью сервиса “Functional annotation” на веб-сервере David [58] и сервиса “Analysis” на

веб-сервере базы данных STRING [133]. Метаболические пути, которые были достоверно обогащены среди ДЭ генов, были выявлены с помощью применения аннотации KEGG и GO. Нами было обнаружено, что уровень экспрессии 886 и 148 генов достоверно различался между диким типом и мутантным штаммом в логарифмической и стационарной фазах, соответственно (модуль отношения количества РНК в мутанте по сравнению с диким типом ≥ 1.5 ; P-значение < 0.05) (рис. 19А, приложение: таблица 2 и таблица 3).

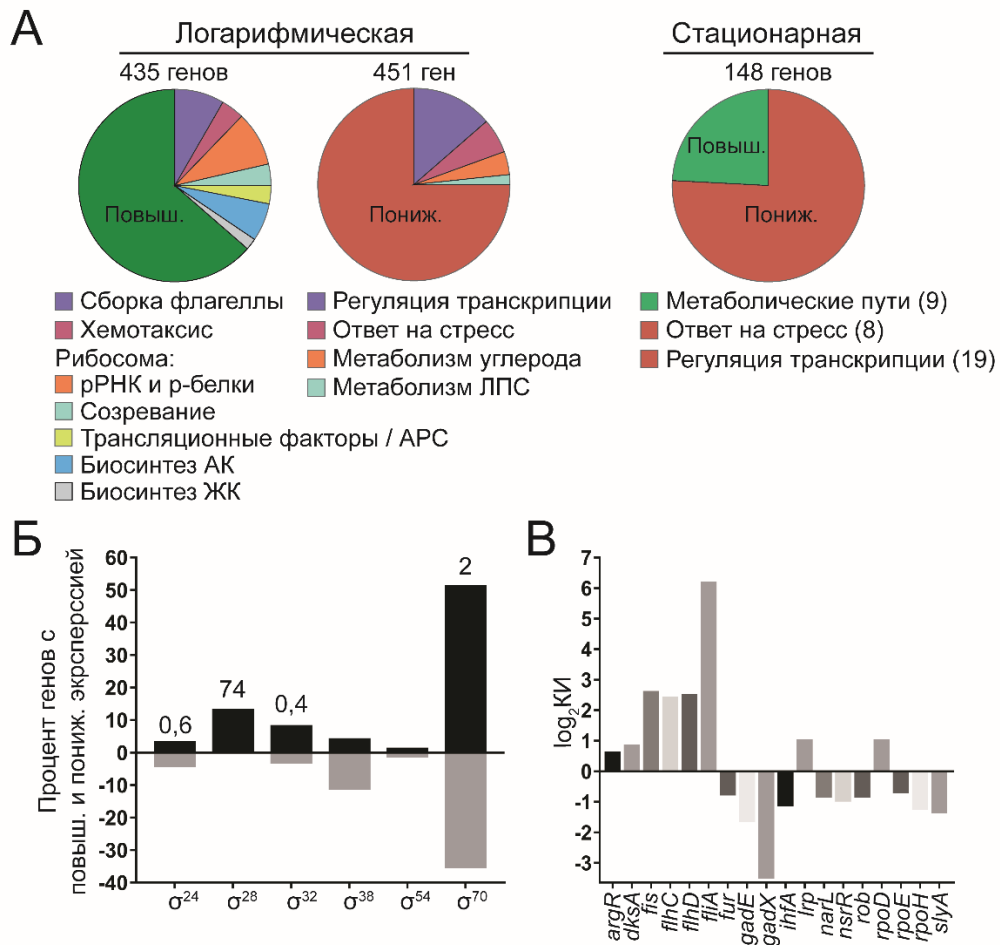


Рисунок 19. (А) Круговая диаграмма, отражающая количество генов с повышенной и пониженной экспрессией (Модуль кратности изменения экспрессии $|KI| \geq 1.5$; P-значение < 0.05) в логарифмической и стационарной фазах культуры мутантных клеток. Достоверно обогащённые метаболические пути среди генов с дифференциальной экспрессией приведены под диаграммой. (Б) График, отражающий процент генов с повышенной и пониженной экспрессией в логарифмической фазе, принадлежащих к разным сигмулонам (регулонам σ -факторов). КИ экспрессии соответствующих σ -факторов приведена над столбцами. (В) График КИ экспрессии ключевых факторов регуляции транскрипции в логарифмической фазе.

Среди дифференциально экспрессирующихся генов в логарифмической фазе наблюдалось достоверное обогащение множества регуляторных путей. В штамме

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

Для более полного понимания характера изменения регуляции транскрипции в логарифмической фазе роста штамма I48S, мы визуализировали результаты секвенирования РНК с помощью сервиса “Omics Dashboard” на веб-сервере EcoCyc [69]. На рис. 19Б приведен результат анализа ДЭ генов с помощью сервиса “Omics Dashboard”. Видно, что в логарифмической фазе роста происходит комплексное нарушение баланса в конкуренции сигма-факторов. В соответствие с анализом обогащенных регуляторных путей, активность регулона σ^{28} была значительно повышена. В то же время, активность сигмулона σ^{38} была снижена за счет понижения экспрессии генов, ответственных за ответ на стресс. Наблюдаемое увеличение активности сигмулона σ^{32} по большей части объяснялось повышенным синтезом рРНК, экспрессия генов которых регулируется как σ^{70} , так и σ^{32} . Подводя итог, анализ активности сигмулонов продемонстрировал значительный сдвиг от экспрессии генов, связанных с ответом на стресс, к генам необходимым для активного роста бактериальной культуры. Отдельно стоит отметить, что ДЭ генов, кодирующих ключевые факторы транскрипции (рис. 19В), заметно осложняет анализ полученных данных и делает практически невозможным разделение первичных и вторичных эффектов, оказываемых мутацией I48S на регуляцию транскрипции.

Одной из наиболее интересных особенностей транскриптома штамма I48S в логарифмической фазе роста являлось то, что все обогащенные регуляторные пути

с повышенной экспрессией регулируются DksA и строгим ответом [122]. Более того, паттерн ДЭ генов в штамме I48S был схож с результатами, полученными для штамма $\Delta dksA$ [2]. В частности, активность промоторов генов, кодирующих рРНК (*rrnB* P1), рибосомные белки (*rpsNp*, *rpsU* P2 и прочие), компоненты системы сборки флагеллы (*flhDp* и *fliAp1*) и ферменты биосинтеза жирных кислот (*fabHp*) также была значительно повышена в штамме $\Delta dksA$ в логарифмической фазе роста [76, 77, 101, 107]. Транскриптомный анализ штамма $\Delta dksA$ показал повышение экспрессии генов биосинтеза флагеллы и хемотаксиса, при этом была заметно снижена экспрессия генов, кодирующих компоненты систем ответа на стресс, что коррелирует с транскриптомом штамма I48S. Необходимо отметить, что DksA является ключевым активатором транскрипции генов биосинтеза аминокислот и его инактивация приводит к снижению их экспрессии, однако, данный метаболический путь был обогащен среди генов с повышенной экспрессии в штамме I48S [108]. В то же время, в мутантном штамме практически не изменялся уровень синтеза мРНК, кодирующих регуляторы строгого ответа RelA (отсутствие ДЭ), SpoT и DksA (незначительное повышение экспрессии) (приложение, таблица 2).

Для валидации результатов секвенирования, мы выбрали по 10 ДЭ генов из каждой фазы роста, ответственных за регуляцию ответа на стресс и метаболической активности и провели анализ дифференциальной экспрессии методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией (рис. 20). Для всех отобранных матриц результаты ПЦР с обратной транскрипцией отлично согласовались с результатами полнотранскриптомного анализа.

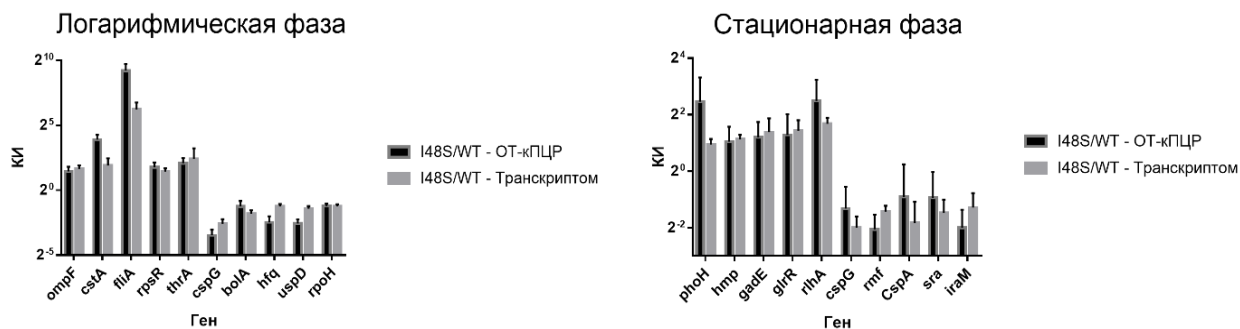


Рисунок 20. Анализ влияния мутации I48S на экспрессию генов в логарифмической и стационарной фазах роста с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией и секвенирования РНК. Абсолютные значения, полученные с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией, нормировались на уровень экспрессии гена *rrsA*, кодирующего 16S рРНК. Приведенные данные представляют собой средние значения и стандартные отклонения для трех биологических реплик. Левые столбцы соответствуют результатам ОТ-кПЦР, правые полнотранскриптомному анализу.

Анализ ДЭ генов в стационарной фазе показал обогащение категории метаболических путей (9 генов) и категорий регуляции транскрипции (19 генов) и ответа на стресс (8 генов) для генов с повышенной и пониженной экспрессией, соответственно. В стационарной фазе 45% дифференциально экспрессированных генов кодировали белки с неизвестной функцией, что может частично объясняться тем, что метаболические пути, специфичные для стационарной фазы изучены намного более слабо, чем пути, отвечающие за рост клеток в логарифмической фазе. Среди наиболее интересных ДЭ генов можно отметить *raiA*, *rmf* и *sra*. *raiA* и *rmf* кодируют факторы гибернации рибосомы, необходимые для ингибирования трансляции в стационарной фазе [112]. Функция *Sra* (также известного как рибосомный белок S22) не была полностью изучена, однако, известно, что S22 ассоциирован с рибосомами именно в стационарной фазе [62]. Также мы проанализировали экспрессию гена *ssrS*, кодирующего 6S РНК, необходимую для подавления активности σ^{70} РНКП в стационарной фазе роста [20, 24]. По результатам полнотранскриптомного анализа и ОТ-кПЦР Мы обнаружили, что уровень 6S РНК был снижен в 1,5-2 раза в стационарной и логарифмической фазах роста (рис. 21).

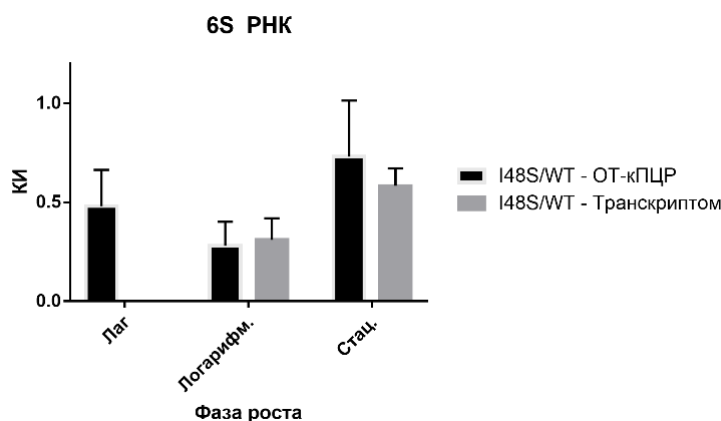


Рисунок 21. Анализ влияния мутации I48S на экспрессию гена *ssrS* в лаг, логарифмической и стационарной фазах роста с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией и секвенирования РНК. Абсолютные значения, полученные с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией, нормировались на уровень экспрессии гена *rrsA*, кодирующего 16S рРНК. Приведенные данные представляют собой средние значения и стандартные отклонения для трех биологических реплик. Левые столбцы соответствуют результатам ОТ-кПЦР, правые полнотранскриптомному анализу.

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

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

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

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

значительно облегчает уход полимеразы с промотора, а с другой стороны делает подобный комплекс крайне чувствительным к действию регуляторных факторов. В литературе описано множество регуляторных механизмов, способных влиять на активность промотора *rrnB* P1, среди которых, чувствительность к негативной сверхспирализации ДНК и концентрации инициаторных НТФ (снижение обоих приводит к уменьшению активности промотора в стационарной фазе роста). Помимо прочего, активность *rrnB* P1 ингибируется совместным действием транскрипционного фактора DksA (концентрация которого постоянна во всех фазах роста) и малой сигнальной молекулой ppGpp, синтезируемой в ответ на стресс и голодание. DksA дестабилизирует промоторные комплексы рРНК за счет взаимодействия со вторичным каналом РНКП, в то время как ppGpp усиливает действие DksA связыванием на границе контакта РНКП и DksA (так называемый сайт 2) и между субъединицами β' и ω (сайт 1). Механизм действия обоих факторов изучен лишь частично, однако, предполагается, что они способны снижать стабильность промоторных комплексов за счет изменения в контактах РНКП и промоторной ДНК.

Эксперименты по сравнению активности холоферментов РНКП дикого типа и РНКП I48S проводились на плазмидной матрице, содержащей промотор *rrnB* P1, контролирующей экспрессию РНК длиной 88 п.о., терминация транскрипции которой осуществляется за счет терминатора *hisT*. Также данная плазида содержит точку начала репликации *rMB1*, активность которой регулируется транскрипцией регуляторной РНК I длиной 105 п.о. Известно, что промотор РНК I образует крайне стабильные комплексы с РНКП, которые устойчивы к действию DksA и ppGpp. Таким образом, мы использовали отношение активности данных промоторов как меру регуляции промотора *rrnB* P1. Результаты эксперимента приведены на рис. 22.

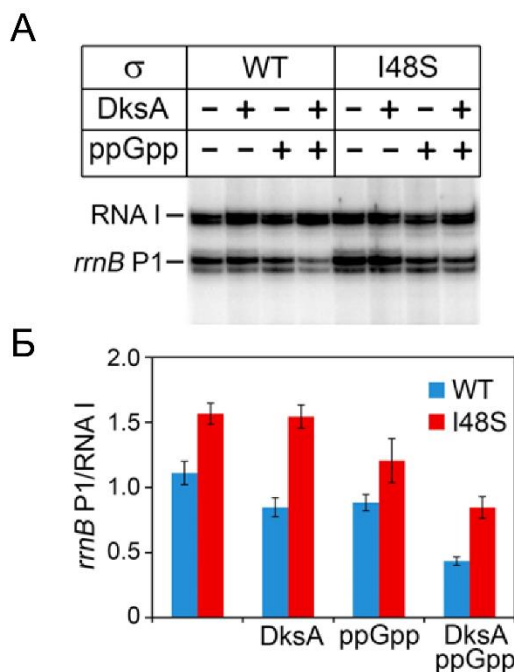


Рисунок 22. Активность холоферментов РНКП WT и I48S. (А) Электрофореграмма транскриптов РНК I и репортерной РНК *rrnB* P1, синтезированных *in vitro*. Наличие или отсутствие регуляторных факторов отмечено в таблице. (Б) Уровень относительной активности РНКП WT и I48S.

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

Для изучения возможной причины повышенной устойчивости РНКП I48S к действию DksA, мы сравнили активность РНКП дикого типа и I48S при разных концентрациях DksA. Результаты исследования приведены на рис. 23.

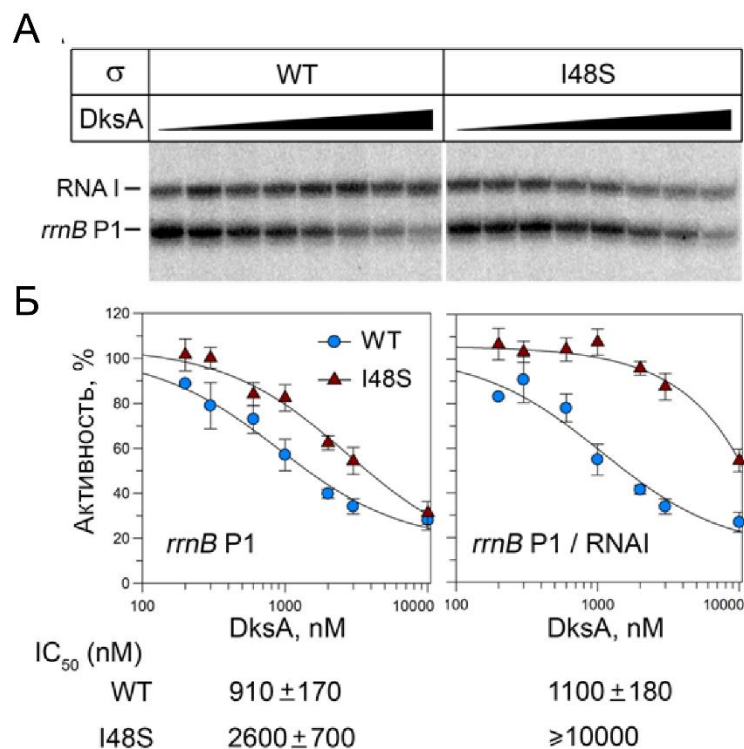


Рисунок 23. Устойчивость РНКП WT и I48S к действию DksA. (А) Электрофореграмма транскриптов РНК I и репортерной РНК *rrnB* P1, синтезированных *in vitro*. Возрастание концентрации DksA в реакции *in vitro* транскрипции схематично представлено в таблице. (Б) Остаточная активности РНКП WT и I48S под действием DksA. Слева приведена остаточная активность промотора *rrnB* P1, справа приведена остаточная относительная активность *rrnB* P1 (rrnB P1/РНК I). Указаны концентрации полумаксимального ингибирования РНК-полимераз (IC_{50}).

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

Поскольку плавление ДНК при инициации транскрипции на промоторе *rrnB* P1 является быстро обратимым процессом, изменение в стабильности промоторного комплекса является важным регуляторным механизмом, необходимым для контроля синтеза рРНК. Для того, чтобы найти причину повышенной активности мутантной РНКП, мы сравнили время полужизни промоторных комплексов для РНКП дикого типа и I48S. Измерение проводили путем инкубации предварительно сформированных промоторных комплексов вместе с конкурирующей ДНК (Фрагмент ДНК, содержащий -10-элемент, имитирующий транскрипционную вилку и дуплекс ДНК, расположенной после точки начала транскрипции) или гепарином, с последующим измерением остаточной активности РНКП. Для предотвращения реинициации транскрипции, все реакции проводились в присутствии рифампицина. Результаты эксперимента приведены на рис. 24.

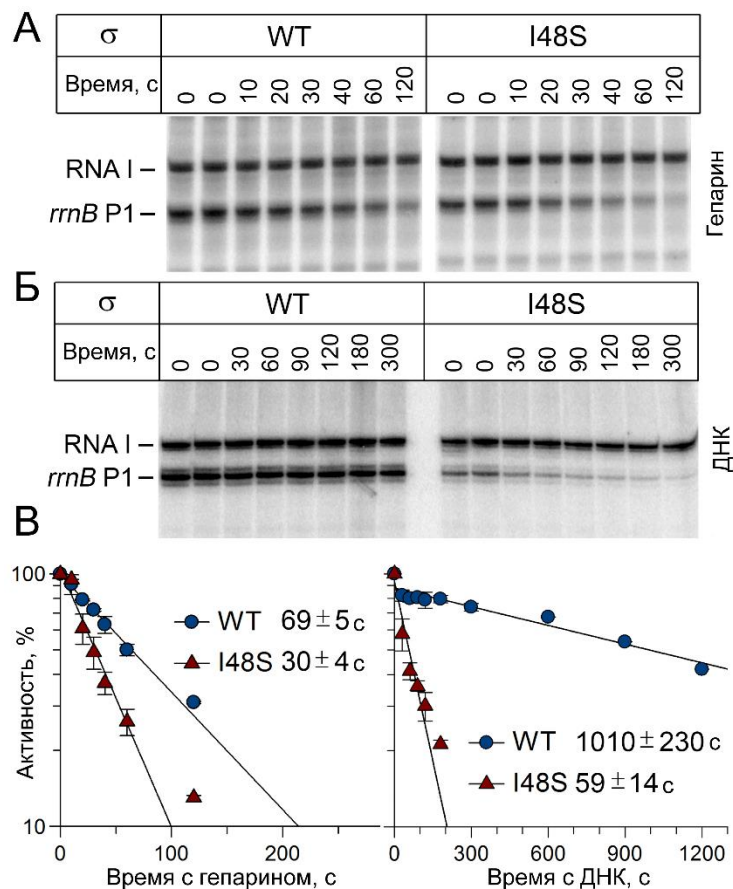


Рисунок 24. Время полужизни промоторных комплексов *rrnB* P1. (А,Б) Электрофореграмма транскриптов РНК I и репортерной РНК *rrnB* P1, синтезированных *in vitro*. В таблице отмечено время инкубации с гепарином или конкурирующей ДНК, соответственно. (В) Зависимость остаточной активности РНКП WT и I48S от времени инкубации с гепарином (слева) или конкурирующей ДНК (справа).

Как и ожидалось, активность промотора РНК I, который образует стабильный комплекс с РНКП, была неизменна для обеих РНК-полимераз. В противоположность этому, на промоторе *rrnB* P1 мутантная РНКП образовывала комплексы с заметно меньшим временем полужизни, чем РНКП дикого типа (1010 секунд для дикого типа и 59 секунд для мутанта в случае конкурирующей ДНК; 69 секунд для дикого типа и 30 секунд для мутанта в случае гепарина). Как видно, конкурирующая ДНК, содержащая фрагмент ДНК, расположенный после точки начала транскрипции, вызывает вытеснение промоторной ДНК из образованных комплексов намного эффективнее, чем гепарин. Можно предположить, что мутация I48S нарушает взаимодействие между РНКП и участком ДНК, расположенным после точки начала транскрипции на стадии инициации транскрипции. Таким образом, можно сделать вывод о том, что мутация I48S приводит к значительной дестабилизации взаимодействия между РНКП и промотором. Интересным является тот факт, что еще большая дестабилизация уже нестабильного комплекса РНКП и промотора *rrnB* P1 не препятствует инициации транскрипции с промотора *rrnB* P1, в то время как ингибирующее действие DksA на транскрипцию рибосомных промоторов объясняется именно снижением стабильности промоторных комплексов. Известно, что другие мутации в регионе 1.1 (G52A и D61A, [142]) также приводили к дестабилизации промоторных комплексов, что косвенно подтверждает достоверность полученных нами результатов.

Как известно, в свободном состоянии σ^{70} -субъединица принимает компактную конформацию, которая препятствует связыванию промоторной ДНК. Мы проверили, насколько мутация I48S может влиять на ДНК-связывающие свойства свободной σ^{70} -субъединицы. С помощью метода УФ-сшивок была проанализирована способность σ^{70} связывать одноцепочечный ДНК-олигонуклеотид, содержащий -10-элемент промотора (ТАТААТ). Результаты эксперимента приведены на рис. 25.

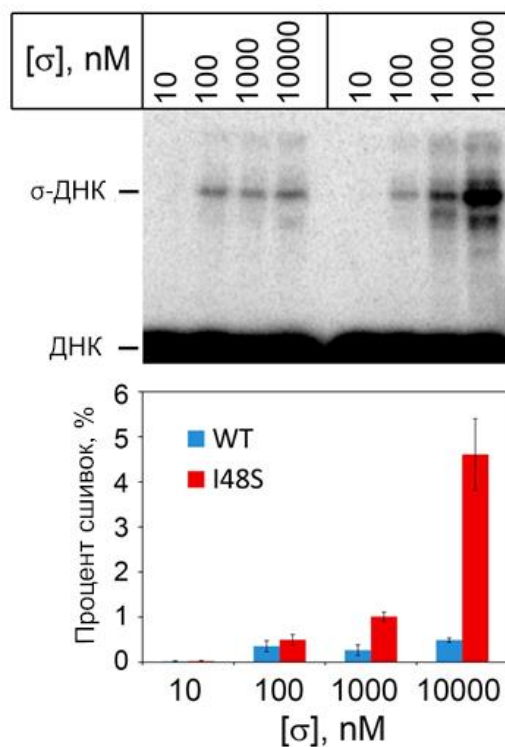


Рисунок 25. ДНК-связывающие свойства свободной σ^{70} . Сверху приведена электрофореграмма продуктов реакции после обработки УФ. Отмечено положение свободного ДНК-олигонуклеотида и комплекса σ^{70} -субъединицы с ДНК-олигонуклеотидом. Снизу приведен анализ электрофореграммы с указанием процентного содержания комплекса σ^{70} -субъединицы с ДНК-олигонуклеотидом.

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

Дополнительным подтверждением предыдущих данных является результат регистрации спектров кругового дихроизма σ^{70} с мутацией I48S и без нее (рис. 26). Нами было обнаружено изменение в спектрах КД в районе 195-220 нм, что свидетельствует о структурных изменениях в свободной σ^{70} . Несмотря на достоверность наблюдаемых изменений, достаточно сложно сделать однозначный вывод о природе нарушений в структуре мутантной σ^{70} .

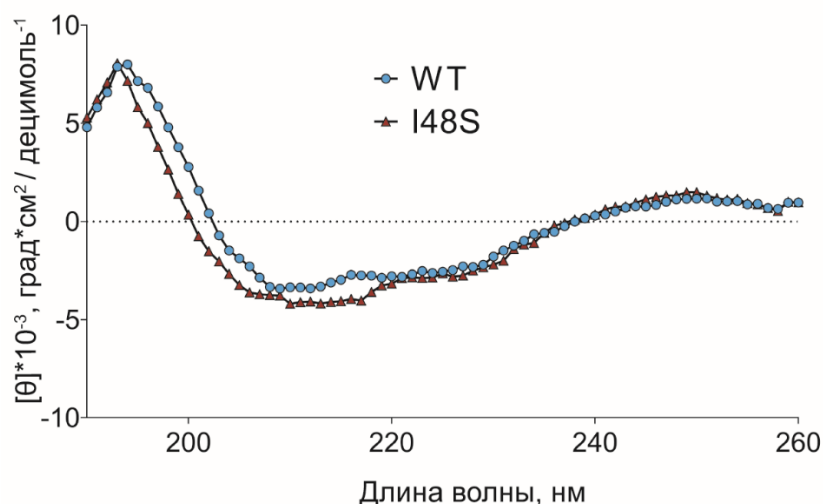


Рисунок 26. Анализ изменений в конформации свободной σ^{70} с помощью регистрации спектров кругового дихроизма. Спектры (190-260 нм) регистрировались при помощи 5 сканирований для каждого образца.

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

Получение делеции гена *rimK*

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

функциональной роли олигоглутамилирования S6 стало получение штамма $\Delta rimK$ без сторонних мутаций.

Для получения нокаута гена *rimK* мы решили воспользоваться тем, что у нас уже имеется штамм с делецией этого гена (JW0836) и использовали метод P1 трансдукции. Этот метод основан на том, что в зараженных фагом P1 клетках *E. coli*, с некоторой вероятностью, при сборке новых капсидов фага, возможно ошибочное включение в капсид участка геномной ДНК бактерии, а не фага. При заражении подобным фагом штамма-реципиента возможна гомологичная рекомбинация фрагмента ДНК штамма донора и геномной ДНК реципиента. Если в участке ДНК, принесенном в клетку фагом, присутствовал ген, дающий клеткам устойчивость к какому-либо антибиотику, то при выращивании на селективной среде можно получить только те колонии, в которых произошла гомологичная рекомбинация целевого участка ДНК. Поскольку нокауты в Keio-коллекции были получены именно заменой целевого гена на ген устойчивости к антибиотику – этот способ идеально подходит для наших целей, как более эффективный и простой, чем традиционные способы получения нокаутов.

При помощи этого метода нами был получен новый штамм с делецией гена *rimK* на основе штамма *E. coli* - BW25113 *rpoD-WT-Cm* (подробно описан ранее). Новый штамм был проверен при помощи ПЦР с праймерами на участок хромосомы, в котором закодирован ген *rimK*. В случае замены гена фермента на ген устойчивости к канамицину должен был быть получен более длинный ПЦР-продукт. Гель-электрофорез ПЦР-продуктов приведен на рис. 27.

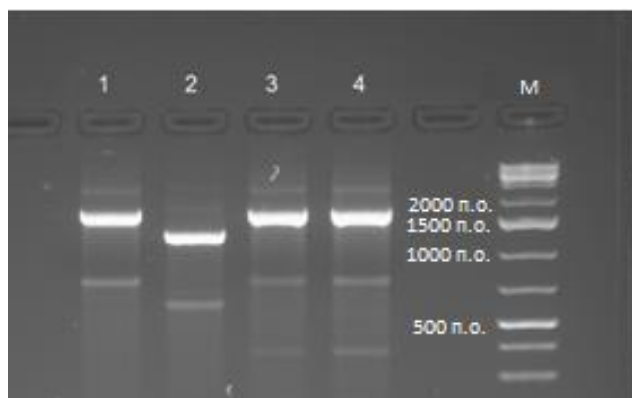


Рисунок 27. Результат проверки штаммов на делецию гена *rimK* методом ПЦР. 1 – штамм $\Delta rimK$ из KeiO-коллекции, 2 – дикий тип, 3 – штамм $\Delta rimK$ после трансдукции (клон 1), 4 – штамм $\Delta rimK$ после трансдукции (клон 2).

Дополнительной проверкой делеции гена *rimK* стал иммуноблоттинг суммарного белка из штаммов $\Delta rimK$ и дикого типа с помощью антител на рибосомный белок S6. В случае нокаута, белок S6 не имеет модификации в стационарной фазе и должен обладать большей подвижностью при белковом геле-электрофорезе в денатурирующих условиях. Результаты иммуноблоттинга приведены на рис. 28

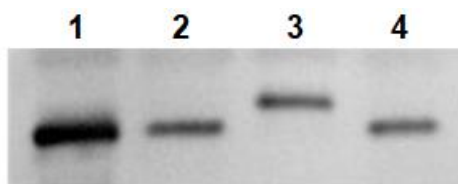


Рисунок 28. Иммуноблоттинг белка S6. 1, 2 – образцы из штамма $\Delta rimK$ в стационарной и логарифмической фазах, соответственно; 3, 4 – образцы из штамма WT в стационарной и логарифмической фазах, соответственно.

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

Определение статуса модификации белка S6 в стационарной фазе

Несмотря на удобство метода иммуноблоттинга для определения модификации S6, данный метод не обладает достаточной разрешающей способностью для определения точного количества добавленных остатков глутаминовой кислоты. Нам необходимо было найти более точный и чувствительный способ определения наличия модификации, чем использованный ранее. Таким методом стал масс-спектрометрический анализ «отпечатков пептидных масс».

Для исследования числа остатков глутаминовой кислоты, присоединяемых к S6, мы выделяли рибосомы из клеток штаммов дикого типа и *ΔrimK*, находящихся в логарифмической и стационарной фазах. После этого проводили одномерный гель-электрофорез рибосом в денатурирующих условиях, вырезали из геля зону, соответствующую по массе белку S6, обрабатывали трипсином и проводили масс-спектрометрический анализ «отпечатков пептидных масс». Как и ожидалось, спектры рибосом нокаутного штамма не содержали пептидов, соответствующих модифицированному белку S6. Однако, оказалось, что 2 модифицированных изоформы белка S6 присутствуют и в логарифмической фазе. В случае стационарной фазы, белок S6 из дикого типа представлен в виде 4 изоформ, соответствующих последовательно модифицированному белку S6. Что особенно важно, в стационарной фазе отсутствует немодифицированная форма S6. Полученные спектры рибосомного белка S6 приведены на рис. 29

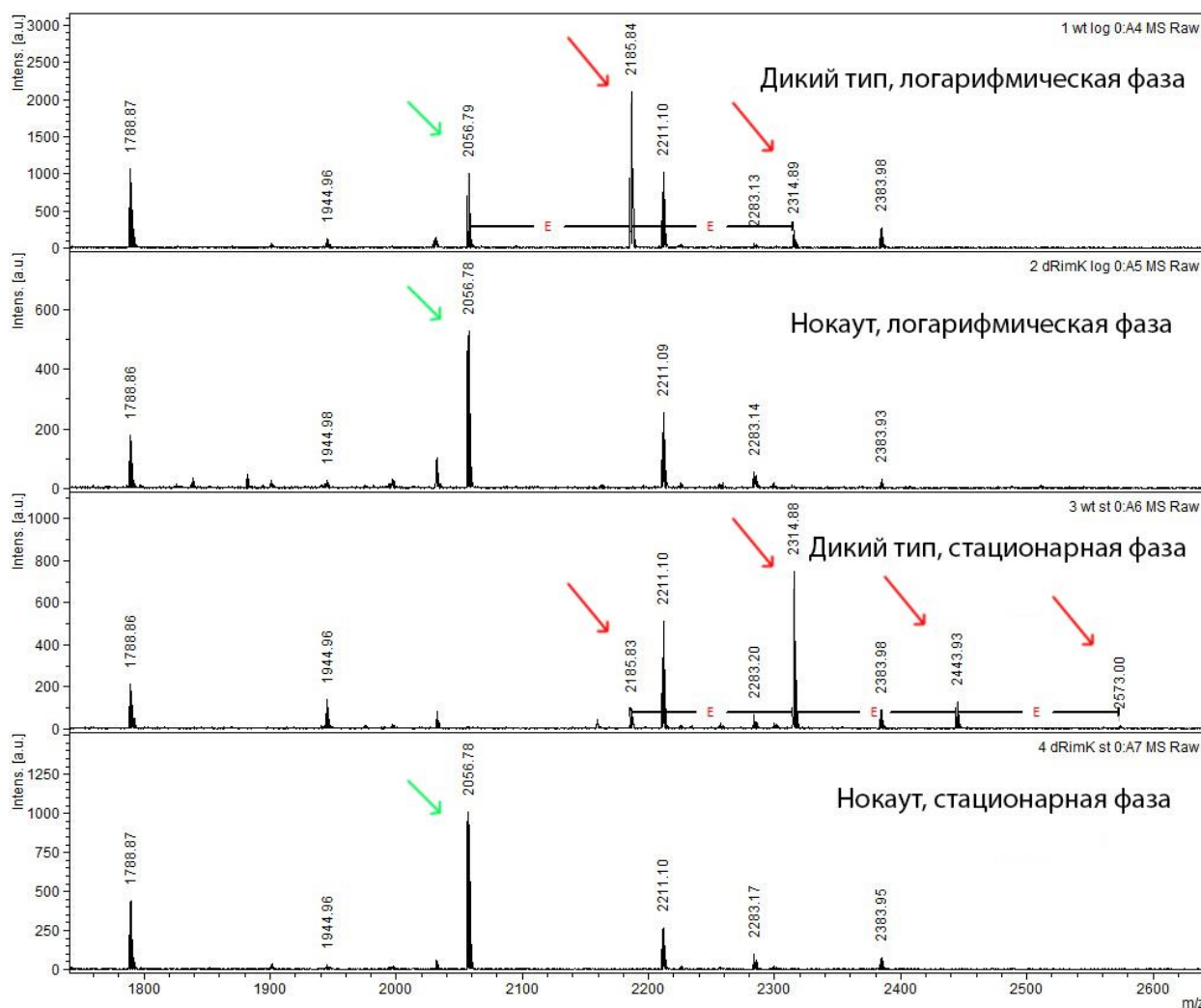


Рисунок 29. Масс-спектры рибосомного белка S6, выделенного из штаммов дикого типа и *ΔrimK*. Красными стрелками отмечены пептиды, содержащие дополнительные остатки глутаминовой кислоты, зелеными стрелками отмечен пептид, соответствующий немодифицированному С-концу S6.

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

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

соответствующий мономодифицированному белку S6, в остальном паттерн модификации не изменяется. Масс-спектры рибосомного белка S6 при инкубации в стационарной фазе в течение 4 дней приведены на рис. 30.

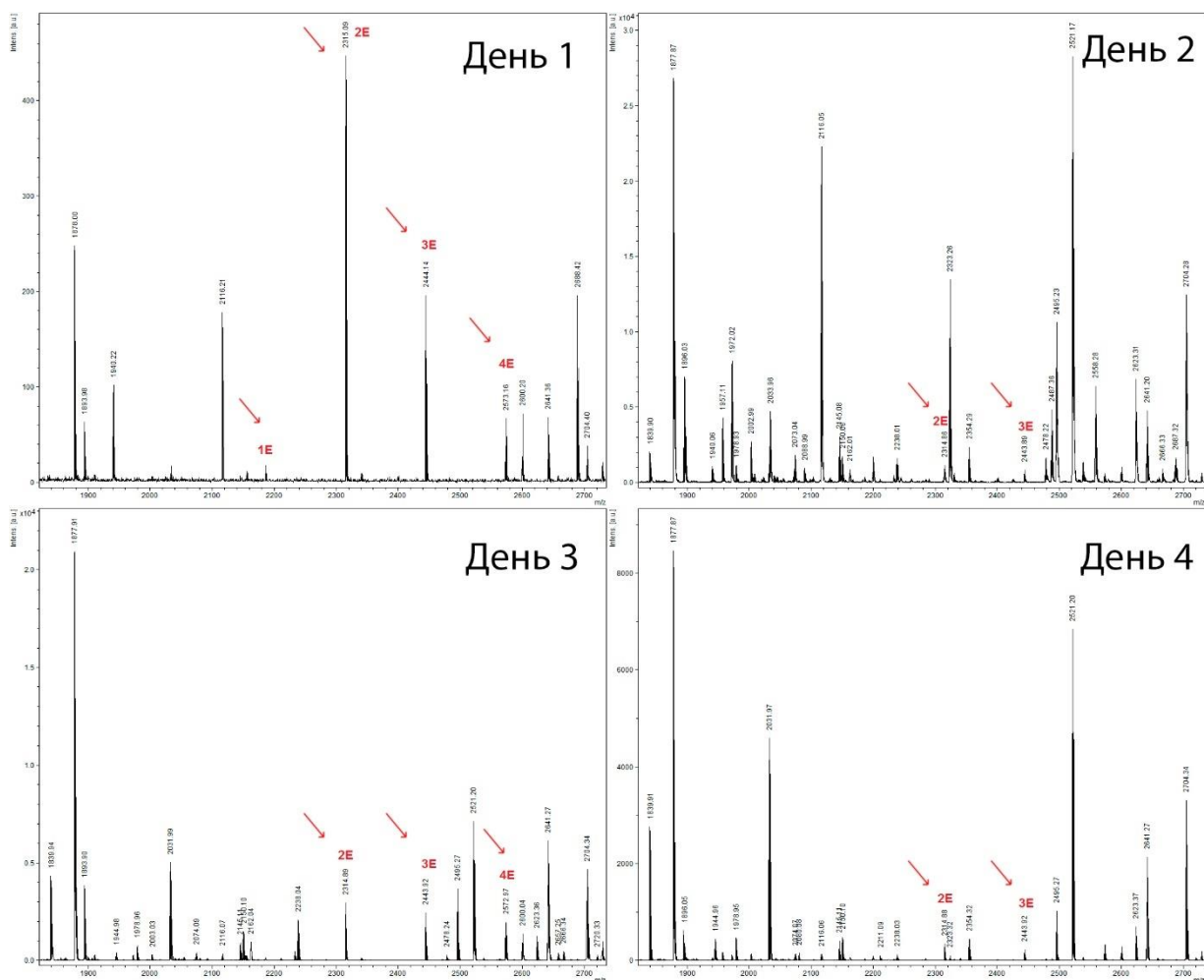


Рисунок 30. Масс-спектры рибосомного белка S6, выделенного из клеток, находящихся в долговременной стационарной фазе. Красными стрелками отмечены пептиды, содержащие дополнительные остатки глутаминовой кислоты.

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

Изучение регуляции экспрессии гена *rimK*

Следующий вопрос, который нас заинтересовал – если модификация присутствует и в логарифмической, и в стационарной фазе, то может ли это

означать, что экспрессия гена *rimK* происходит в обеих фазах? В таком случае не ясно, почему в клетках логарифмической фазы отсутствует полностью модифицированный белок. Для поиска ответа на этот вопрос мы решили измерить уровень экспрессии *rimK* в зависимости от фазы роста бактериальной культуры.

Для исследования регуляции экспрессии RimK мы воспользовались репортерной конструкцией, содержащей ген флуоресцентного белка Fast Fluorescence Timer (FastFT), спектральные свойства которого подробно описаны ранее в тексте диссертации. Основой для создания такого репортера стала плазмида pASK-IBA4, в последовательности которой есть ген, кодирующий белок FastFT под контролем фагового промотора T5, узнаваемого клеточной РНК-полимеразой. На первой стадии клонирования мы создали три сайта рестрикции в регуляторной области гена *FastFT*, что позволило в дальнейшем независимо менять регуляторные участки этого гена. Схема полученной плазмиды приведена на рис. 31.

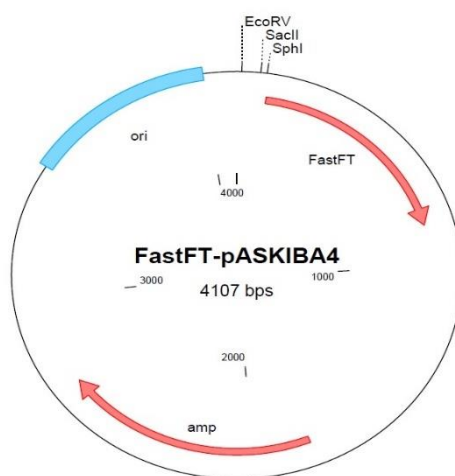


Рисунок 31. Схема плазмиды FastFT-pASKIBA4. Отмечены ген флуоресцентного белка (*FastFT*) и ген устойчивости к ампицилину (*amp*), а также 3 сайта рестрикции, введенные нами для дальнейшего клонирования.

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

- 1) Контрольная плазмида с неизменной регуляторной областью

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

Таким образом, конструкции 2,3 и 4 позволяют оценить активность и влияние каждого регуляторного элемента гена *rimK* на экспрессию кодирующей части гена за счет того, что под их контролем находится экспрессия флуоресцентного белка. Отдельно стоит остановиться на последнем репортере. Его особенностью является то, что регуляторная область для него была взята из гена *rpoS*, кодирующего σ^{38} -субъединицу

РНК-полимеразы, который активен исключительно в стационарной фазе, что позволило использовать данный репортер, как контроль наступления стационарной фазы в популяции.

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

Первое, что мы заметили – это то, что картина флуоресценции клеток с репортерной конструкцией №4 полностью соответствует клеткам с контрольной конструкцией под регуляцией промотора T5. Из этого можно сделать вывод о том,

что 5'-НТО гена *rimK* либо никак, либо очень слабо влияет на экспрессию флуоресцентного белка. Следовательно, регуляция экспрессии *rimK* осуществляется не на стадии инициации трансляции. Результаты проточной цитофлуориметрии репортера №4, в сравнении с контрольной конструкцией, приведены на рис. 32.

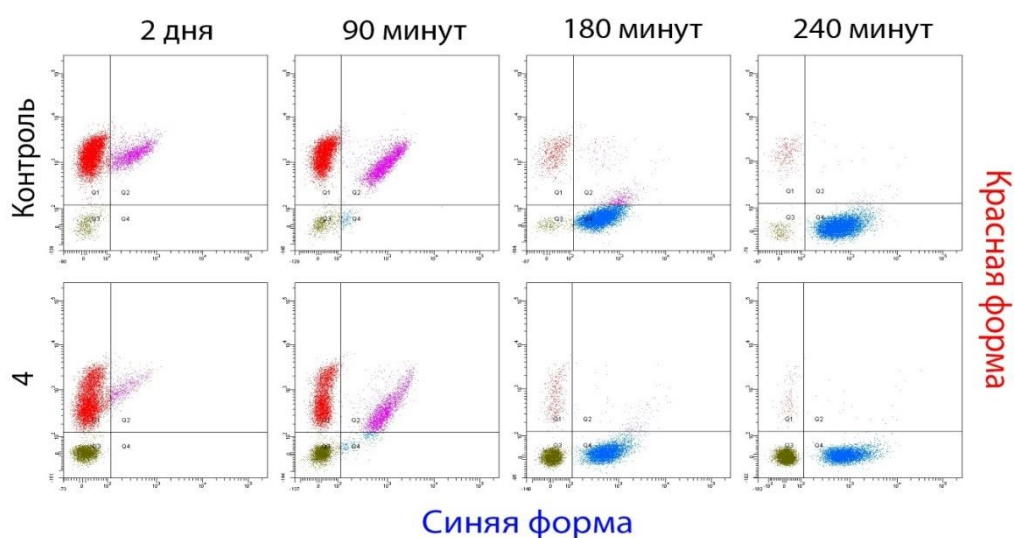
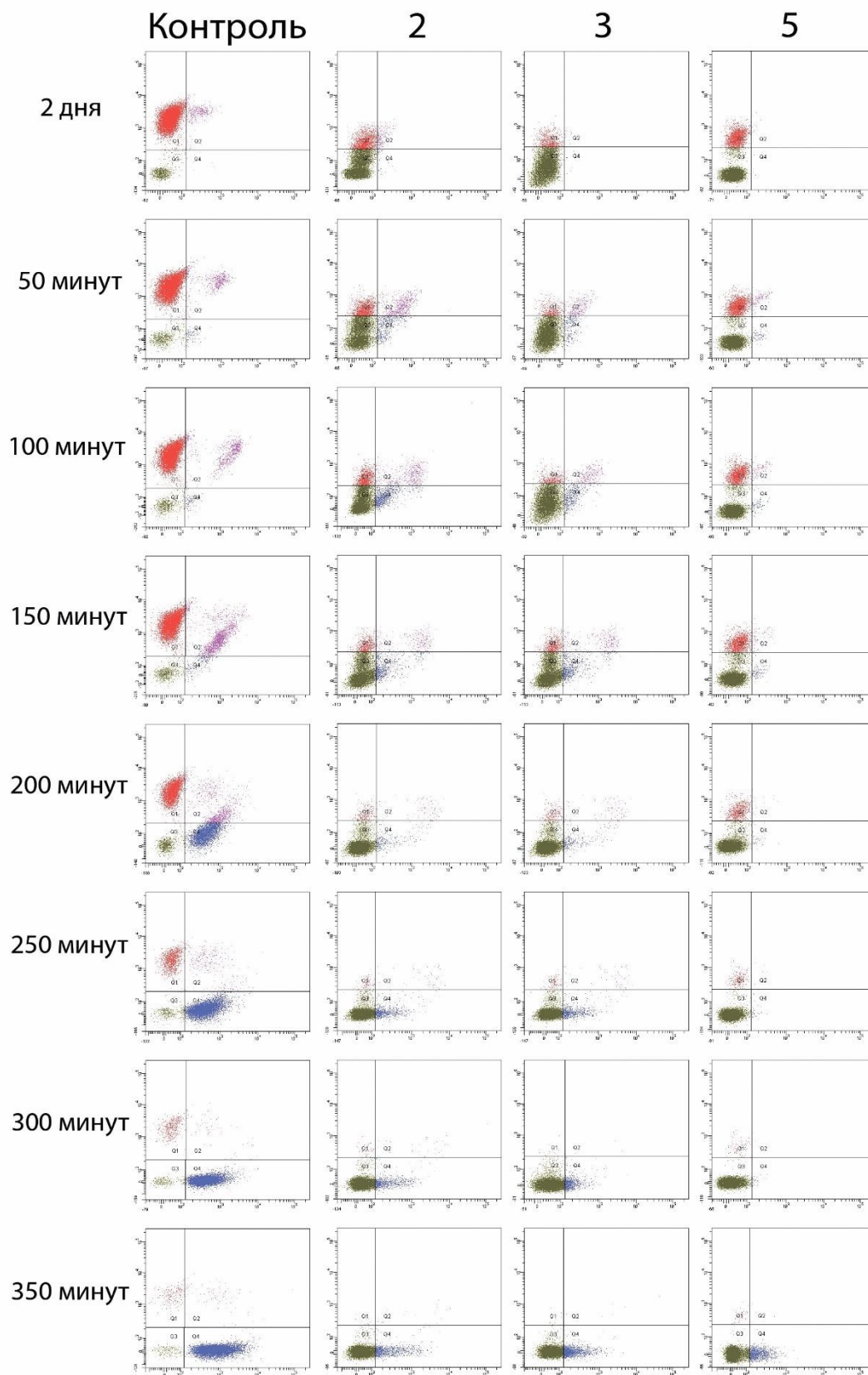


Рисунок 32. Результаты проточной цитофлуориметрии штамма с репортерной конструкцией №4, в сравнении с контрольным репортером

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

логарифмическую фазу. Вероятно, при выходе из стационарной фазы на некоторое время активируется случайная экспрессия множества генов из-за неокончательной адаптации клетки к новым условиям и неактивности некоторых регуляторных путей.

Важно отметить, что конструкции №2 и №3, содержащие полный регуляторный участок гена *rimK* и отличающиеся наличием в конструкции №2 гибридного белка RimK и FastFT, практически не отличаются картиной флуоресценции, что означает отсутствие обратной связи между экспрессией гена и количеством белка в клетке. Результаты цитофлуориметрии приведены на рис. 33.



Красная форма

Синяя форма

Рисунок 33. Результаты проточной цитофлуориметрии штамма с репортерной конструкцией №4, в сравнении с контрольным репортером

Уровень экспрессии гена *rimK* на разных стадиях роста бактериальной культуры был также проанализирован с помощью метода количественной ПЦР с обратной транскрипцией. В качестве контрольных генов, экспрессия которых чувствительна к фазе роста, использовались *glnS*, кодирующий глутамин тРНК-лигазу (контроль для логарифмической фазы), и *rmf*, кодирующий фактор гибернации рибосом (контроль для стационарной фазы). Нормировка уровня экспрессии между разными образцами проводилась с помощью пары олигонуклеотидов, комплементарных 16S рРНК. Результаты эксперимента приведены на рис. 34.

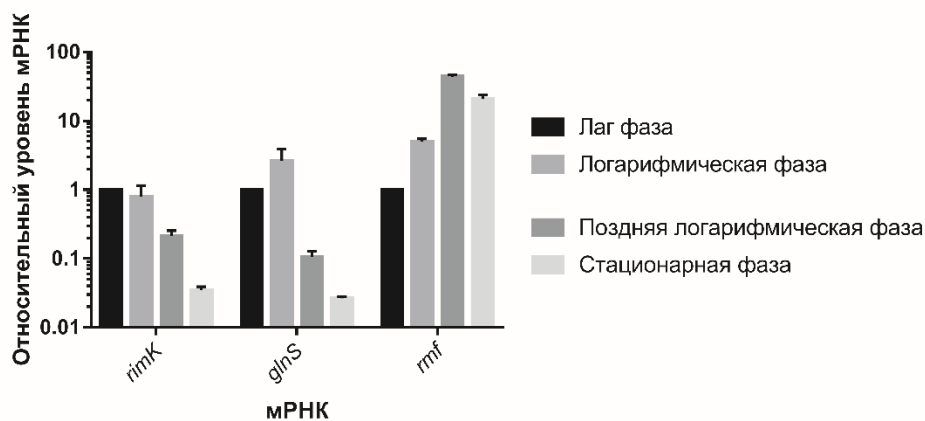


Рисунок 34. Результаты анализа экспрессии *rimK* методом количественного ПЦР с обратной транскрипцией

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

Поиск причины неконститутивности модификации S6

Согласно полученным результатам, специфичность модификации к стационарной фазе роста не может объясняться экспрессией гена *rimK*, что позволяет предположить наличие регуляторного механизма, влияющего либо на активность RimK, либо на появление в стационарной фазе дополнительных факторов, позволяющих осуществить модификацию. Для проверки гипотезы о зависимости модификации от факторов, специфичных для стационарной фазы, мы трансформировали клетки дикого типа и $\Delta rimK$ плазмидой с конститутивной экспрессией *rimK*. В качестве контроля использовалась аналогичная плазида с геном, кодирующим белок RimK с мутациями в АТФ-связывающем сайте, которые полностью ингибировали его активность (R211G, S212I, N213A). Полученные клетки выращивали до логарифмической фазы и анализировали статус модификации методом иммуноблоттинга. Результаты данного анализа приведены на рис. 35.

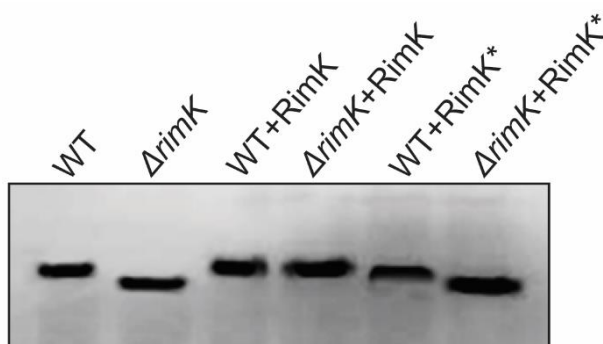


Рисунок 35. Иммуноблоттинг белка S6 в логарифмической фазе. Штамм подписан над дорожкой мембраны. Образцы WT и $\Delta rimK$ были собраны в стационарной фазе для контроля. RimK – фермент с аминокислотной последовательностью дикого типа, RimK* – фермент с инактивированным АТФ-связывающим сайтом.

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

Как известно, стационарная фаза характеризуется ингибированием транскрипции и трансляции. Логично предположить, что ингибирование

биосинтеза белка может являться причиной появления модификации S6 в стационарной фазе, в то время как активно транслирующие рибосомы могут быть «защищены» от подобной модификации. Для проверки нашей гипотезы мы обрабатывали клетки дикого типа различными антибиотиками, вызывающими ингибирование трансляции и транскрипции, после чего из полученных образцов выделяли суммарный белок и анализировали статус модификации S6 методом иммуноблоттинга. Результаты анализа приведены на рис. 36

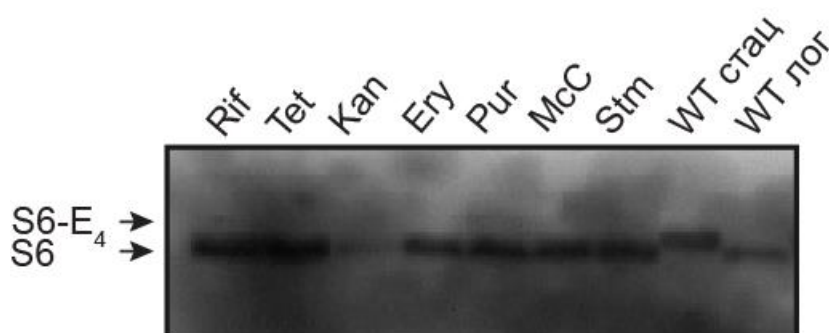


Рисунок 36. Иммуноблоттинг белка S6 в логарифмической фазе после обработки антибиотиками. В качестве контроля использовались клетки дикого типа и *ΔrimK* из стационарной фазы. Тип антибиотика подписан над дорожкой мембраны.

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

Известно, что активность RimK из *Pseudomonas fluorescens* активируется малой сигнальной молекулой цикло-ди-ГМФ [81]. Для проверки релевантности данного механизма регуляции активности RimK *E. coli* мы изучили статус модификации S6 в штаммах с инактивированными цикло-ди-ГМФ фосфодиэстеразами *pdeR* и *pdeF*, а также в штамме с инактивированной дигуанилат циклазой *DgcM* [10, 69]. Как видно из результатов анализа методом

иммуноблоттинга (рис.37), в данных штаммах статус модификации S6 не изменяется.

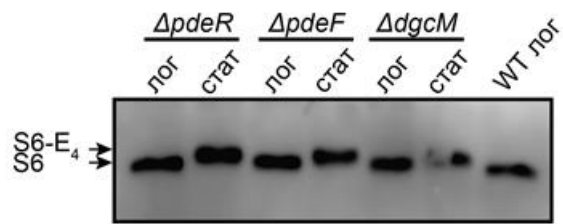


Рисунок 37. Иммуноблоттинг белка S6 в штаммах с инактивированными генами метаболизма цикло-ди-ГМФ.

Обсуждение

При переходе к стационарной фазе, происходят кардинальные изменения на всех уровнях организации бактериальной клетки. Данный переход осуществляется за счет самых разнообразных регуляторных путей, многие из которых поддерживаются независимыми механизмами. Например, известно, что в геноме *E. coli* закодировано шесть факторов гибернации рибосом, которые отвечают за ингибирование трансляции при переходе к стационарной фазе. Подобное разнообразие факторов может объясняться как различной специфичностью «гибернаторов» к различным стрессовым условиям, так и крайне высокой значимостью процесса ингибирования трансляции в стационарной фазе, что привело к созданию множества систем, дублирующих функцию друг друга. Подтверждением последней гипотезы может являться тот факт, что одиночные нокауты генов факторов гибернации не приводят к появлению значимого фенотипа, по крайней мере в лабораторных условиях. Все же, подобные штаммы обладают чуть меньшей выживаемостью при конкуренции со штаммом дикого типа в длительной стационарной фазе. Пример гибернационных факторов хорошо показывает, что изучение стационарной фазы в лабораторных условиях дополнительно усложняется тем, что в естественных условиях бактерии не только подвергаются постоянному стрессу со стороны окружающей среды, но активно конкурируют с другими микроорганизмами за ограниченное количество ресурсов. Таким образом, функциональная значимость многих генов может раскрываться лишь при строго определенных условиях, которые могут быть недостижимы в лаборатории.

Олигоглутамилирование рибосомного белка S6 ферментом RimK является интересным примером необычной посттрансляционной модификации, результатом которой является добавление аминокислот, незакодированных в геноме. В то время как, за редким исключением [70, 90], большинство модификаций рибосомных РНК являются конститутивными [126], известно, что посттрансляционные модификации рибосомных белков могут подвергаться регуляции [43, 47]. Наши

данные свидетельствуют о том, что посттрансляционное добавление остатков глутаминовой кислоты на С-конец белка S6 происходит в стационарной фазе роста. Логично предположить, что подобная зависимость от фазы роста может объясняться некой регуляторной функцией данной модификации. Исследования штамма *ΔrimK* из коллекции нокаутных штаммов привело к обнаружению множества аномалий фенотипа, связанных с нарушением регуляции перехода к стационарной фазе. Однако, контрольные эксперименты показали, что наблюдаемый нами фенотип является не следствием делеции гена *rimK*, а наличием сторонней мутации в σ^{70} -субъединице РНК-полимеразы. Создание нового штамма *ΔrimK* без сторонних мутаций привело к полному исчезновению достоверно детектируемых аномалий фенотипа, поэтому мы решили изучить вопрос регуляции появления самой модификации.

Известно, что в бактериальных клетках *Pseudomonas fluorescens* активность RimK зависит от вспомогательных белков RimA и RimB, гены которых находятся в одном опероне с *rimK*, и малой сигнальной молекулы цикло-ди-ГМФ. Судя по всему, в клетках *E. coli* активность RimK не регулируется схожим образом, что соотносится с отсутствием генов *rimA* и *rimB*, которые кодируют цикло-ди-ГМФ фосфодиэстеразы, в одном опероне с *rimK*. Более того, делеция генов *E. coli*, кодирующих цикло-ди-ГМФ фосфодиэстеразы *pdeR* и *pdeF*, а также дигуанилат циклазу *DgcM*, не привела к изменению в характере появления модификации. Исследование экспрессии *rimK* опровергло регуляцию появления модификации за счет специфичности синтеза RimK к стационарной фазе роста. Ингибирование процесса трансляции и транскрипции действием антибиотиков также не приводило к появлению модификации в логарифмической фазе роста. Единственным стимулом, способным вызвать олигоглутамилирование S6, был переход культуры клеток в стационарную фазу. Более того, эксперимент по синтезу RimK с плазмидного вектора показал, что при повышенном уровне RimK полная модификация S6 может происходить и в логарифмической фазе роста, независимо от факторов, ассоциированных со стационарной фазой. На основе полученных

данных, мы предполагаем, что появление модификации может быть вызвано не каким-то конкретным регуляторным механизмом, а кинетикой биосинтеза рибосом. В логарифмической фазе роста ген *rpsF* активно экспрессируется вместе с другими генами, кодирующими компоненты трансляционного аппарата. Поскольку концентрация RimK во всех фазах роста чрезвычайно низка, он не способен эффективно модифицировать стремительно растущий пул рибосом. При переходе в стационарную фазу, биосинтез рибосом ингибируется, что позволяет RimK осуществить модификацию S6 в составе ранее собранных рибосом (рис. 38).

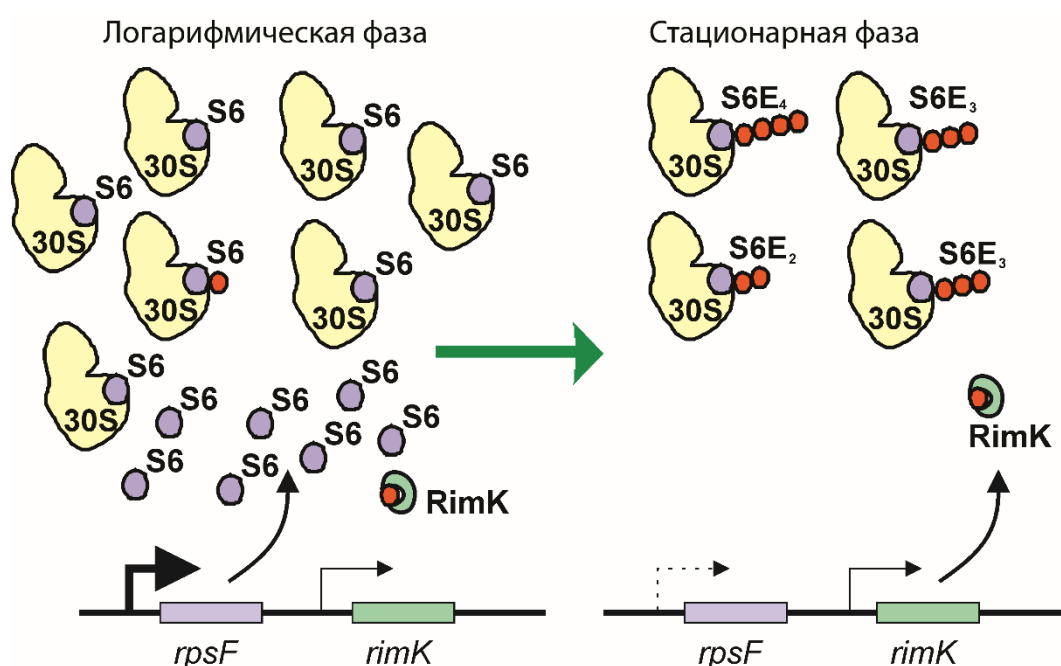


Рисунок 38. Модель регуляции олигоглутамилирования рибосомного белка S6. Левая часть рисунка соответствует логарифмической фазе, в которой происходит активная сборка рибосом и синтез S6. При этом, количество RimK ничтожно мало по отношению к активно синтезируемому S6. Правая часть рисунка соответствует стационарной фазе, когда сборка рибосом и синтез S6 подавляются строгим ответом, таким образом, даже небольшое количество RimK способно осуществлять полную модификацию S6.

Поскольку предыдущие данные, полученные в нашей лаборатории, свидетельствуют о том, что в клетках отсутствует механизм удаления дополнительных остатков глутаминовой кислоты с С-конца белка S6, единственным источником немодифицированного белка является биосинтез S6 в новом цикле логарифмического роста. Как отмечалось ранее, отсутствие какого-либо характерного фенотипа штамма $\Delta rimK$ согласуется с другими работами, посвященными изучению факторов гибернации рибосом. Можно предположить,

что подобно «губернаторам» функциональная роль олигоглутамилирования S6 может дублироваться дополнительными механизмами, что не позволяет установить функцию данной модификации в лабораторных условиях.

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

σ^{70} является ключевым регулятором транскрипции *E. coli*, так что не удивительно, что мутации в консервативных регионах σ -фактора, в частности тех, которые напрямую участвуют во взаимодействии с ДНК и минимальным ферментом РНКП могут приводить к значительным изменениям в способности узнавать промоторы и регуляции экспрессии генов [36, 51]. В то же время, функциональная роль неконсервативного региона 1.1 σ^{70} *E. coli* и других главных σ -факторов остается не ясна. Ранее было показано, что мутации в этом регионе могут влиять на стабильность и конформацию свободного σ -фактора, что приводит к нарушению распознавания целевых промоторов холоферментом РНКП *in vitro* [17, 18, 46, 50, 118, 146]. Однако, их влияние на регуляцию транскрипции *in vivo* так и не было изучено. Мы продемонстрировали, что даже одиночная аминокислотная замена в регионе 1.1 может значительно нарушать активность РНКП и приводить к глобальным изменениям в регуляции экспрессии генов и клеточной адаптации к стрессу.

Наши эксперименты свидетельствуют о том, что мутация I48S увеличивает активность РНКП на промоторе *rrnB* P1, контролирующем транскрипцию одного из рибосомных оперонов *E. coli*. Промоторы генов, кодирующих рРНК, образуют нестабильные комплексы с РНКП, что делает их высоко чувствительными к действию факторов строгого ответа DksA и ppGpp [49, 107]. Тем не менее, оказалось, что исследуемая мутация дестабилизирует уже нестабильные промоторные комплексы РНКП-*rrnB* P1, не только не снижая их активность, но и

дополнительно увеличивая ее. Схожим образом, мутации G52A и D61A в регионе 1.1 приводят к снижению стабильности промоторных комплексов, однако, активность таких мутантных РНКП не проверялась на промоторе *rrnB P1* [18]. При этом, необходимо отметить, что делеция региона 1.1 приводит к значительному увеличению стабильности промоторных комплексов [118]. Поскольку промоторные комплексы, образуемые РНКП I48S, особенно чувствительны к конкуренции с ДНК, имитирующей транскрипционную вилку можно предположить, что мутация нарушает взаимодействие РНКП с ДНК, находящейся после точки начала транскрипции [118].

Мутантная РНКП сохраняла более высокую активность на промоторе *rrnB P1* в присутствии DksA, а также имела сниженную аффинность к этому фактору. Полученные результаты не являются ожидаемыми, так как известно, что промоторные комплексы с низкой стабильностью имеют большую аффинность к DksA [97]. Можно предположить, что замена I48S нарушает конформацию и положение региона 1.1 в промоторном комплексе, образованном холоферментом РНКП. Подобное изменение в структуре может приводить к изменению характера связывания DksA во вторичном канале РНКП, приводящему к снижению чувствительности к действию DksA. В частности, мутация I48S может предотвращать DksA-зависимое изменение в конформации некоторых доменов субъединиц β' и β , которое считается необходимым для нарушения взаимодействия РНКП с ДНК, находящейся после точки начала транскрипции [97].

Недавно было опубликовано исследование, показавшее, что регион 1.1 влияет на регуляцию транскрипции фактором TraR, который также как и DksA связывается во вторичном канале РНКП [27]. При этом, его связывание мимикрирует под совместное действие DksA и ppGpp. Авторы работы предположили, что связывание TraR дестабилизирует взаимодействие между регионом 1.1 и ДНК-связывающим каналом РНК-полимеразы, что облегчает вытеснение домена $\sigma^{70}_{1.1}$ во время связывания промоторной ДНК. TraR (и по аналогии DksA/ppGpp) может снижать кинетический барьер между открытым и

закрытым ініціаторнымі комплексамі, прыводзя к зніжэнню стабільнасці прамоторнага комплексу. В случае если для конкретного промотора этот барьер является лимитирующей стадией инициации, подобное снижение стабильности может приводить к активации транскрипции [27]. Структурные изменения в регионе 1.1, вызванные мутацией I48S, также могут влиять на кинетику образования открытого комплекса, что может объяснять повышенную активность РНКП I48S на промоторе *rrnB* P1 и сниженную чувствительность к действию DksA и ppGpp.

Мы продемонстрировали, что мутация I48S нарушает структуру свободной σ^{70} и усиливает ее взаимодействие с промоторной ДНК *in vitro*. Схожим образом, ранее изученные делеции [21, 32, 124] и точечные замены аминокислот (включая близкую к I48 A59G [46]) в регионе 1.1 влияли на взаимодействие между σ^{70} и промоторной ДНК. Остаток I48, находящийся в одной из α спиралей региона 1.1, достаточно слабо консервативен в основных σ -факторах, однако, чаще всего, на данной позиции располагаются похожие гидрофобные аминокислоты, например, лейцин и валин. Таким образом, замена гидрофобного изолейцина на серин может разрушать нативную конформацию региона 1.1 и его взаимодействие с другими регионами σ^{70} . В обычных условиях, участки связывания ДНК в свободной σ^{70} скрыты регионом 1.1, однако, было показано, что свободные сигма-факторы σ^A и σ^B *B. subtilis* способны распознавать промоторную ДНК и, возможно, это их свойство может влиять на регуляцию транскрипции [71, 150]. Однако, еще предстоит понять, насколько демаскировка ДНК-связывающего участка свободной σ^{70} может приводить к более эффективному распознаванию промоторов РНК-полимеразой I48S.

Ранее было предположено, что расположение в составе РНКП и функциональная роль региона 1.1 может быть различной, в зависимости от природы промотора и взаимодействия РНКП с ДНК, расположенной после точки начала транскрипции [118]. Таким образом, мутации в этом регионе могут по-разному влиять на промоторную активность на полногеномном уровне. В

частности, некоторые транскрипционные факторы, такие как белок *gr2* фага T7, используют это свойство региона 1.1 для дифференциальной регуляции активности промоторов или ингибирования РНКП [11]. И действительно, полнотранскриптомный анализ показал значительное нарушение регуляции экспрессии генов в логарифмической фазе культуры клеток I48S.

Как было отмечено выше, штамм I48S проявляет некоторое сходство со штаммом *ΔdksA* даже в логарифмической фазе роста, а именно, повышенную экспрессию генов определенных метаболических путей и увеличенное время пребывания в лаг фазе, что указывает на нарушение регуляции адаптации к новым условиям окружающей среды [42, 116]. Несмотря на то, что *DksA* обычно описывается как регулятор строгого ответа, концентрация *DksA*, в отличие от *ppGpp*, сохраняется на постоянном уровне как в логарифмической, так и в стационарной фазе [33]. Более того, опубликованные данные свидетельствуют о том, что *DksA* может выступать в роли глобального транскрипционного фактора [89] и позволяет избегать конфликтов между репликацией и транскрипцией в логарифмической фазе [135]. В одной из работ показали, что *DksA* регулирует транскрипцию гена *fis* (экспрессия *fis* повышена в 6 раз для штамма I48S в логарифмической фазе), который кодирует ключевой регулятор транскрипции генов, необходимых для активного роста *Fis* даже в логарифмической фазе. Что интересно, в отсутствие *DksA*, экспрессия *fis* значительно повышалась не только при переходе к стационарной фазе, но и во время лаг и логарифмической фаз [2, 89]. Подобные результаты являются ожидаемыми, поскольку промотор *fis* подвержен ингибированию за счет строгого ответа в той же степени, что и рибосомный промотор *rrnB P1*. Эти данные также подтверждаются транскриптомным анализом штамма *ΔdksA*: экспрессия *fis* была повышена в 4 раза. Другими примерами метаболических путей, проявляющих схожий паттерн дифференциальной экспрессии являются гены, кодирующие рРНК, рибосомные белки, компоненты флагеллы, систему хемотаксиса, ферменты биосинтеза жирных кислот и множество генов, необходимых для ответа на стресс. Можно предположить, что показанная нами

сниженная чувствительность мутантной РНКП к действию DksA *in vitro*, частично имитирует отсутствие фактора DksA в штамме $\Delta dksA$. Таким образом, повышение экспрессии генов метаболических путей, контролируемых строгим ответом, в штамме I48S может частично объясняться снижением чувствительности РНКП I48S к действию DksA. Тем не менее, важно отметить, что между штаммами $\Delta dksA$ и I48S наблюдались и существенные различия. Например, экспрессия генов, кодирующих компоненты системы биосинтеза аминокислот была значительно повышена в транскриптоме штамма I48S, хотя DksA является ключевым активатором их транскрипции. Более того, в отличие от штамма I48S, клетки $\Delta dksA$ не способны расти на минимальной среде без добавления определенного набора аминокислот [141], что дополнительно указывает на то, что свойства этих двух штаммов не являются идентичными.

Описанные выше наблюдения подчеркивают невероятно сложные эффекты, которые мутация I48S оказывает на бактериальную транскрипцию и физиологию. Подобные эффекты можно объяснить по крайней мере двумя независимыми механизмами, а именно, сниженной чувствительностью РНКП I48S к действию DksA, а также аномальным изменением в относительной стабильности и активности промоторных комплексов, образованных РНКП I48S, независимо от DksA. Как было показано профессором Галбуртом [41], снижение кинетического барьера между закрытым и открытым инициаторными комплексами может приводить к одновременной активации как стабильных, так и нестабильных комплексов, что хорошо объясняет эффекты, наблюдаемые в штамме I48S. Подобное изменение позволяет объяснить одновременное повышение транскрипционной активации путей, для которых известно активирующее действие DksA (таких как биосинтез аминокислот), так и тех путей, для которых известно ингибирующее действие DksA (таких как биосинтез рибосомы и флагеллы). В то же время, значительное изменение экспрессии ключевых регуляторов транскрипции и, что более важно, сигма-факторов заметно осложняет анализ полученных данных и делает практически невозможным разделение

первичных и вторичных эффектов, оказываемых мутацией I48S на регуляцию транскрипции. Стоит отметить, что нельзя отрицать того, что многие изменения в профиле экспрессируемых РНК опосредованы снижением их стабильности за счет вторичных эффектов, оказываемых мутацией I48S.

В отличие от логарифмической, в стационарной фазе роста изменения транскриптома были значительно менее выраженными, что может объясняться множеством причин. Во-первых, несмотря на то, что активность РНКП на рибосомном промоторе *rrnB* P1 была выше для РНКП I48S, чем для РНКП дикого типа даже при одновременном присутствии ppGpp и DksA, их совместное действие ингибировало активность РНКП I48S значительно сильнее, чем действие только DksA, а уровень экспрессии генов строго ответа (*relA*, *spoT*, *dksA*) практически не изменялся в мутантном штамме. Что интересно, в отличие от DksA, ppGpp снижал относительную активность обеих полимераз в равной степени, при этом остаточная активность РНКП I48S все же оставалась выше, чем таковая для РНКП дикого типа. Следует напомнить, что DksA присутствует во всех фазах роста, а появления ppGpp происходит только при переходе к стационарной фазе и стрессе. Внутриклеточная концентрация ppGpp в стационарной фазе может достигать 1-2 мМ [139], так что мы можем предположить, что резкое повышение концентрации ppGpp в стационарной фазе способно оказывать ингибирующее воздействие на мутантную РНКП в той же степени, что и на РНКП дикого типа. Что более важно, в стационарной фазе существуют способы ингибирования активности σ^{70} , независимые от DksA и ppGpp, а именно 6S РНК и анти-сигма-фактор Rsd. При этом, обе РНКП проявляли одинаковую чувствительность к действию 6S РНК (данные не показаны). Однако, необходимо отметить, что уровень 6S РНК был понижен в штамме I48S во всех фазах роста. Несмотря на описанные выше факторы, в стационарной фазе все же происходило значимое изменение экспрессии некоторых генов. Стоит отметить тот факт, что среди генов с пониженной экспрессией наблюдалось некоторое обогащение генов, участвующих в ответе на стресс. Особый интерес представляет снижение экспрессии генов, которые

отвечают за ингибирование синтеза белка (*rmf*, *raiA* и, вероятно, *sra*), что хорошо коррелирует с повышенной активностью биосинтеза белка клеток I48S в стационарной фазе.

Недавно группа профессора Палсонна предложила модель регуляции бактериальной транскрипции за счет конкуренции так называемых модулонов (названных так по аналогии с регулонами) «Жадности» и «Страха» [123]. Модулон “жадности” обогащен генами, необходимыми для активного роста, а модулон «Страха» представляет собой набор генов, отвечающих за выживание и ответ на стресс (то есть регулон σ^{38}). Несомненно, клетки I48S проявляют выраженный фенотип сниженного «страха», описываемый пониженной активностью регулона σ^{38} и повышенной экспрессией генов, отвечающих за рост в логарифмической фазе. Этот фенотип также характеризуется нарушением регуляции правильного распределения ресурсов при выходе из стационарной фазы и приводит к задержке роста после разбавления культуры клеток свежей средой. Действительно, результаты проточной цитофлуориметрии клеток с репортером FastFT демонстрируют, что клетки I48S активируют метаболизм почти сразу после разбавления.

Характерный сдвиг профиля экспрессии от генов стрессового ответа к генам, отвечающим за активный рост клеток, приводит к снижению титра «спящих» клеток, что делает штамм I48S значительно более чувствительным к стрессу, например, обработке антибиотиками. Несмотря на то, что ожидаемым эффектом продленной лаг фазы является увеличение устойчивости к антибиотикам (фенотип известный как «толерантность за счет задержки» или «tolerance by lag» [39]) мы показали противоположный эффект. Полученные результаты можно объяснить тем, что аномальная метаболическая активность клеток I48S отличается от общепринятого определения метаболизма в лаг фазе. В лаг фазе культуры дикого типа уровень синтетической активности остается на достаточно низком уровне, в то время как клетки I48S описываются практически моментальной активацией метаболизма. Подобная активация приводит к нарушению регуляции правильного

распределения ресурсов, продлению лаг фазы и делает клетки более чувствительными к антибиотикам. Одной из возможных причин наблюдаемой задержки в росте является повышение активной транскрипции рибосомных оперонов и трансляции, что снижает доступные ресурсы, необходимые для транскрипции других генов, необходимых для адаптации к новым условиям и ответу на стресс. Действительно, ранее было показано, что штаммы *E. coli* со сниженным уровнем синтеза рРНК (мутанты, полученные за счет делеции от 1 до 6 из 7 оперонов рибосомных РНК) проявляют повышенную выживаемость и скорость роста при обработке культуры клеток антибиотиками, вызывающими повреждение ДНК (ципрофлоксацином и налидиксовой кислотой) [13].

Подводя итог, наши результаты свидетельствуют о том, что мутация I48S может ремоделировать клеточную транскрипцию за счет изменения силы взаимодействия РНКП с промоторами и изменения чувствительности РНКП к действию факторов строгого ответа, что позволяет сделать предположение о наличии ранее неизвестной функции региона 1.1 в регуляции транскрипции и ответа на стресс. Характерные нарушения в экспрессии регулонов σ -факторов в клетках I48S может объясняться тем, что регион 1.1 может быть необходимым для поддержания баланса в регуляции конкуренции между основным и минорными σ -факторами в разных фазах роста. Полученные нами результаты, совместно с литературными данными, свидетельствуют о возможности существования дополнительной функции DksA, необходимой для регуляции транскрипции в логарифмической фазе, независимо от строгого ответа. Более глубокое понимание сложных взаимодействий между σ -факторами и регуляторами транскрипции, действующими на РНКП, может помочь создать новые антибактериальные соединения, нарушающие эти взаимодействия, что поможет увеличить чувствительность бактериальных клеток к действию классических антибиотиков.

Выводы

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

Список литературы

1. Плетнёв Ф.И. [и др.]. Правила выживания: *Escherichia coli* в стационарной фазе // Acta Naturae (русскоязычная версия). 2015. № 4 (7). С. 55–67.
2. Aberg A. [и др.]. Similar and Divergent Effects of ppGpp and DksA Deficiencies on Transcription in *Escherichia coli* // Journal of Bacteriology. 2009. № 10 (191). С. 3226–3236.
3. Akerlund T., Nordström K., Bernander R. Analysis of cell size and DNA content in exponentially growing and stationary-phase batch cultures of *Escherichia coli*. // Journal of Bacteriology. 1995. № 23 (177). С. 6791–6797.
4. Almirón M. [и др.]. A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. // Genes & Development. 1992. № 12b (6). С. 2646–2654.
5. Amitai S. [и др.]. *Escherichia coli* MazF Leads to the Simultaneous Selective Synthesis of Both “Death Proteins” and “Survival Proteins” // PLoS Genet. 2009. № 3 (5). С. e1000390.
6. Arifuzzaman M. [и др.]. Characterization of HscC (Hsc62), homologue of Hsp70 in *Escherichia coli*: over-expression of HscC modulates the activity of house keeping sigma factor sigma70 // Genes to Cells. 2002. № 6 (7). С. 553–566.
7. Arifuzzaman M., Oshima T., Mori H. The ATPase domain of HscC (DnaK homolog) is essential for interfering σ 70 activity in *E. coli* // FEMS Microbiology Letters. 2004. № 1 (230). С. 99–104.
8. Arnosti D. N., Chamberlin M. J. Secondary sigma factor controls transcription of flagellar and chemotaxis genes in *Escherichia coli* // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1989. № 3 (86). С. 830–834.
9. Azam T. A. [и др.]. Growth Phase-Dependent Variation in Protein Composition of the *Escherichia coli* Nucleoid // Journal of Bacteriology. 1999. № 20 (181). С. 6361–6370.
10. Baba T. [и др.]. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection // Molecular Systems Biology. 2006. (2). С. 2006.0008.
11. Bae B. [и др.]. Structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme open promoter complex // eLife. 2015. (4).
12. Boël G. [и др.]. The ABC-F protein EttA gates ribosome entry into the translation elongation cycle // Nature Structural & Molecular Biology. 2014. № 2 (21). С. 143–151.
13. Bollenbach T. [и др.]. Nonoptimal microbial response to antibiotics underlies suppressive drug interactions // Cell. 2009. № 4 (139). С. 707–718.
14. Borek E., Rockenbach J., Ryan A. STUDIES ON A MUTANT OF *ESCHERICHIA COLI* WITH UNBALANCED RIBONUCLEIC ACID SYNTHESIS // Journal of Bacteriology. 1956. № 3 (71). С. 318–323.
15. Bougdour A., Wickner S., Gottesman S. Modulating RssB activity: IraP, a novel regulator of σ S stability in *Escherichia coli* // Genes & Development. 2006. № 7 (20). С. 884–897.
16. Boutte C. C., Crosson S. Bacterial lifestyle shapes stringent response activation // Trends in Microbiology. 2013. № 4 (21). С. 174–180.

17. Bowers C. W. A mutation in region 1.1 of sigma 70 affects promoter DNA binding by Escherichia coli RNA polymerase holoenzyme // *The EMBO Journal*. 1999. № 3 (18). C. 709–716.
18. Bowers C. W., McCracken A., Dombroski A. J. Effects of amino acid substitutions at conserved and acidic residues within region 1.1 of Escherichia coli sigma(70) // *Journal of Bacteriology*. 2000. № 1 (182). C. 221–224.
19. Brescia C. C., Kaw M. K., Sledjeski D. D. The DNA Binding Protein H-NS Binds to and Alters the Stability of RNA in vitro and in vivo // *Journal of Molecular Biology*. 2004. № 3 (339). C. 505–514.
20. Burenina O. Y. [и др.]. Small Noncoding 6S RNAs of Bacteria // *Biochemistry. Biokhimiia*. 2015. № 11 (80). C. 1429–1446.
21. Callaci S., Heyduk E., Heyduk T. Conformational changes of Escherichia coli RNA polymerase sigma70 factor induced by binding to the core enzyme // *The Journal of Biological Chemistry*. 1998. № 49 (273). C. 32995–33001.
22. Calvo J. M., Matthews R. G. The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in Escherichia coli. // *Microbiological Reviews*. 1994. № 3 (58). C. 466–490.
23. Cashel M., Kalbacher B. The Control of Ribonucleic Acid Synthesis in Escherichia coli V. CHARACTERIZATION OF A NUCLEOTIDE ASSOCIATED WITH THE STRINGENT RESPONSE // *Journal of Biological Chemistry*. 1970. № 9 (245). C. 2309–2318.
24. Cavanagh A. T., Wassarman K. M. 6S RNA, a global regulator of transcription in Escherichia coli, Bacillus subtilis, and beyond // *Annual Review of Microbiology*. 2014. (68). C. 45–60.
25. Chadani Y. [и др.]. Ribosome rescue by Escherichia coli ArfA (YhdL) in the absence of translation system // *Molecular Microbiology*. 2010. № 4 (78). C. 796–808.
26. Chen B. [и др.]. EttA regulates translation by binding the ribosomal E site and restricting ribosome-tRNA dynamics // *Nature Structural & Molecular Biology*. 2014. № 2 (21). C. 152–159.
27. Chen J. [и др.]. E. coli TraR allosterically regulates transcription initiation by altering RNA polymerase conformation // *eLife*. 2019. (8). C. e49375.
28. Cosgriff S. [и др.]. Dimerization and DNA-dependent aggregation of the Escherichia coli nucleoid protein and chaperone CbpA // *Molecular Microbiology*. 2010. № 5 (77). C. 1289–1300.
29. Craig N. L., Nash H. A. E. coli integration host factor binds to specific sites in DNA // *Cell*. 1984. № 3 (39). C. 707–716.
30. Cuning C., Brown L., Elliott T. Promoter Substitution and Deletion Analysis of Upstream Region Required for rpoS Translational Regulation // *Journal of Bacteriology*. 1998. № 17 (180). C. 4564–4570.
31. Datsenko K. A., Wanner B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000. № 12 (97). C. 6640–6645.
32. Dombroski A. J. [и др.]. Polypeptides containing highly conserved regions of transcription initiation factor sigma 70 exhibit specificity of binding to promoter DNA // *Cell*. 1992. № 3 (70). C. 501–512.

33. Edwards A. N. [и др.]. Circuitry linking the Csr and stringent response global regulatory systems: Csr and stringent response systems // *Molecular Microbiology*. 2011. № 6 (80). С. 1561–1580.
34. English B. P. [и др.]. Single-molecule investigations of the stringent response machinery in living bacterial cells // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011. № 31 (108). С. E365–E373.
35. Enz S., Braun V., Crosa J. H. Transcription of the region encoding the ferric dicitrate-transport system in *Escherichia coli*: similarity between promoters for *fecA* and for extracytoplasmic function sigma factors // *Gene*. 1995. № 1 (163). С. 13–18.
36. Feklistov A. [и др.]. Bacterial Sigma Factors: A Historical, Structural, and Genomic Perspective // *Annual Review of Microbiology*. 2014. № 1 (68). С. 357–376.
37. Finkel S. E. Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype // *Nature Reviews Microbiology*. 2006. № 2 (4). С. 113–120.
38. Fischer N. [и др.]. Structure of the *E. coli* ribosome-EF-Tu complex at $<3 \text{ \AA}$ resolution by Cs-corrected cryo-EM // *Nature*. 2015. № 7548 (520). С. 567–570.
39. Fridman O. [и др.]. Optimization of lag time underlies antibiotic tolerance in evolved bacterial populations // *Nature*. 2014. № 7518 (513). С. 418–421.
40. Gaal T. [и др.]. Promoter recognition and discrimination by σ^S RNA polymerase // *Molecular Microbiology*. 2001. № 4 (42). С. 939–954.
41. Galburt E. A. The calculation of transcript flux ratios reveals single regulatory mechanisms capable of activation and repression // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018. № 50 (115). С. E11604–E11613.
42. Gamba P., James K., Zenkin N. A link between transcription fidelity and pausing *in vivo* // *Transcription*. 2017. № 2 (8). С. 99–105.
43. Ge W. [и др.]. Oxygenase-catalyzed ribosome hydroxylation occurs in prokaryotes and humans // *Nature Chemical Biology*. 2012. № 12 (8). С. 960–962.
44. Gentry D. R. [и др.]. Synthesis of the stationary-phase sigma factor sigma s is positively regulated by ppGpp. // *Journal of Bacteriology*. 1993. № 24 (175). С. 7982–7989.
45. Gildehaus N. [и др.]. Studies on the function of the riboregulator 6S RNA from *E. coli*: RNA polymerase binding, inhibition of *in vitro* transcription and synthesis of RNA-directed *de novo* transcripts // *Nucleic Acids Research*. 2007. № 6 (35). С. 1885–1896.
46. Gopal V., Chatterji D. Mutations in the 1.1 Subdomain of *Escherichia coli* Sigma Factor sigma70 and Disruption of its Overall Structure // *European Journal of Biochemistry*. 1997. № 2 (244). С. 613–618.
47. Gordiyenko Y. [и др.]. Acetylation of L12 Increases Interactions in the *Escherichia coli* Ribosomal Stalk Complex // *Journal of Molecular Biology*. 2008. № 2 (380). С. 404–414.
48. Gottesman S. Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria // *Trends in Genetics*. 2005. № 7 (21). С. 399–404.

49. Gourse R. L. [и др.]. Transcriptional Responses to ppGpp and DksA // *Annual Review of Microbiology*. 2018. (72). С. 163–184.
50. Gruber T. M. [и др.]. Binding of the Initiation Factor $\sigma 70$ to Core RNA Polymerase Is a Multistep Process // *Molecular Cell*. 2001. № 1 (8). С. 21–31.
51. Gruber T. M., Gross C. A. Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space // *Annual Review of Microbiology*. 2003. (57). С. 441–466.
52. Gummesson B., Lovmar M., Nyström T. A Proximal Promoter Element Required for Positive Transcriptional Control by Guanosine Tetraphosphate and DksA Protein during the Stringent Response // *Journal of Biological Chemistry*. 2013. № 29 (288). С. 21055–21064.
53. Guo F., Adhya S. Spiral structure of Escherichia coli HU provides foundation for DNA supercoiling // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007. № 11 (104). С. 4309–4314.
54. Gyaneshwar P. [и др.]. Lessons from Escherichia coli genes similarly regulated in response to nitrogen and sulfur limitation // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005. № 9 (102). С. 3453–3458.
55. Haurlyuk V. [и др.]. Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology // *Nature Reviews Microbiology*. 2015. № 5 (13). С. 298–309.
56. Häuser R. [и др.]. RsfA (YbeB) Proteins Are Conserved Ribosomal Silencing Factors // *PLoS Genetics*. 2012. № 7 (8). С. e1002815.
57. Hayes C. S., Low D. A. Signals of growth regulation in bacteria // *Current Opinion in Microbiology*. 2009. № 6 (12). С. 667–673.
58. Huang D. W., Sherman B. T., Lempicki R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources // *Nature Protocols*. 2009. № 1 (4). С. 44–57.
59. Hunt T. P., Magasanik B. Transcription of glnA by purified Escherichia coli components: core RNA polymerase and the products of glnF, glnG, and glnL // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1985. № 24 (82). С. 8453–8457.
60. Ilari A. [и др.]. Iron Incorporation into Escherichia coli Dps Gives Rise to a Ferritin-like Microcrystalline Core // *Journal of Biological Chemistry*. 2002. № 40 (277). С. 37619–37623.
61. Ishihama A. Functional Modulation of Escherichia Coli RNA Polymerase // *Annual Review of Microbiology*. 2000. № 1 (54). С. 499–518.
62. Izutsu K. [и др.]. Escherichia coli Ribosome-Associated Protein SRA, Whose Copy Number Increases during Stationary Phase // *Journal of Bacteriology*. 2001. № 9 (183). С. 2765–2773.
63. Jishage M. [и др.]. Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in Escherichia coli: intracellular levels of four species of sigma subunit under various growth conditions. // *Journal of Bacteriology*. 1996. № 18 (178). С. 5447–5451.
64. Jishage M. [и др.]. Regulation of ζ factor competition by the alarmone ppGpp // *Genes & Development*. 2002. № 10 (16). С. 1260–1270.

65. Jishage M., Ishihama A. A stationary phase protein in *Escherichia coli* with binding activity to the major subunit of RNA polymerase // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998. № 9 (95). C. 4953–4958.
66. Johansen J. [и др.]. Conserved Small Non-coding RNAs that belong to the σ^E Regulon: Role in Down-regulation of Outer Membrane Proteins // *Journal of Molecular Biology*. 2006. № 1 (364). C. 1–8.
67. Kahramanoglou C. [и др.]. Genomics of DNA cytosine methylation in *Escherichia coli* reveals its role in stationary phase transcription // *Nature Communications*. 2012. (3). C. 886.
68. Keren I. [и др.]. Persister cells and tolerance to antimicrobials // *FEMS Microbiology Letters*. 2004. № 1 (230). C. 13–18.
69. Keseler I. M. [и др.]. The EcoCyc database: reflecting new knowledge about *Escherichia coli* K-12 // *Nucleic Acids Research*. 2017. № D1 (45). C. D543–D550.
70. Kimura S. [и др.]. Biogenesis and iron-dependency of ribosomal RNA hydroxylation // *Nucleic Acids Research*. 2017. № 22 (45). C. 12974–12986.
71. Кuo H.-H. [и др.]. The core-independent promoter-specific binding of *Bacillus subtilis* σ^B // *FEBS Journal*. 2015. № 7 (282). C. 1307–1318.
72. Lam H. [и др.]. D-Amino Acids Govern Stationary Phase Cell Wall Remodeling in Bacteria // *Science*. 2009. № 5947 (325). C. 1552–1555.
73. Lang B. [и др.]. High-affinity DNA binding sites for H-NS provide a molecular basis for selective silencing within proteobacterial genomes // *Nucleic Acids Research*. 2007. № 18 (35). C. 6330–6337.
74. Lange R., Hengge-Aronis R. The cellular concentration of the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation, and protein stability. // *Genes & Development*. 1994. № 13 (8). C. 1600–1612.
75. Lease R. A., Belfort M. A trans-acting RNA as a control switch in *Escherichia coli*: DsrA modulates function by forming alternative structures // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000. № 18 (97). C. 9919–9924.
76. Lemke J. J. [и др.]. Direct regulation of *Escherichia coli* ribosomal protein promoters by the transcription factors ppGpp and DksA // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011. № 14 (108). C. 5712–5717.
77. Lemke J. J., Durfee T., Gourse R. L. DksA and ppGpp directly regulate transcription of the *Escherichia coli* flagellar cascade: Regulation of the flagellar cascade by DksA/ppGpp // *Molecular Microbiology*. 2009. № 6 (74). C. 1368–1379.
78. Levin B. R., Rozen D. E. Non-inherited antibiotic resistance // *Nature Reviews Microbiology*. 2006. № 7 (4). C. 556–562.
79. Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease // *Nature Reviews Microbiology*. 2007. № 1 (5). C. 48–56.
80. Li W. [и др.]. Effects of amino acid starvation on RelA diffusive behavior in live *Escherichia coli* // *Molecular Microbiology*. 2016. № 3 (99). C. 571–585.

81. Little R. H. [и др.]. Adaptive Remodeling of the Bacterial Proteome by Specific Ribosomal Modification Regulates *Pseudomonas* Infection and Niche Colonisation // *PLOS Genetics*. 2016. № 2 (12). С. e1005837.
82. Llorens J. M. N., Tormo A., Martínez-García E. Stationary phase in gram-negative bacteria // *FEMS Microbiology Reviews*. 2010. № 4 (34). С. 476–495.
83. Luijsterburg M. S. [и др.]. The architectural role of nucleoid-associated proteins in the organization of bacterial chromatin: A molecular perspective // *Journal of Structural Biology*. 2006. № 2 (156). С. 262–272.
84. Maciąg A. [и др.]. In vitro transcription profiling of the σ^S subunit of bacterial RNA polymerase: re-definition of the σ^S regulon and identification of σ^S -specific promoter sequence elements // *Nucleic Acids Research*. 2011. № 13 (39). С. 5338–5355.
85. Madan R., Kolter R., Mahadevan S. Mutations that activate the silent *bgl* operon of *Escherichia coli* confer a growth advantage in stationary phase // *Journal of Bacteriology*. 2005. № 23 (187). С. 7912–7917.
86. Maeda H. Competition among seven *Escherichia coli* sigma subunits: relative binding affinities to the core RNA polymerase // *Nucleic Acids Research*. 2000. № 18 (28). С. 3497–3503.
87. Majdalani N. [и др.]. DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanism, independent of its action as an antisilencer of transcription // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998. № 21 (95). С. 12462–12467.
88. Majdalani N., Hernandez D., Gottesman S. Regulation and mode of action of the second small RNA activator of RpoS translation, RprA // *Molecular Microbiology*. 2002. № 3 (46). С. 813–826.
89. Mallik P. [и др.]. DksA Is Required for Growth Phase-Dependent Regulation, Growth Rate-Dependent Control, and Stringent Control of *fis* Expression in *Escherichia coli* // *Journal of Bacteriology*. 2006. № 16 (188). С. 5775–5782.
90. Mayford M., Weisblum B. *ermC* leader peptide // *Journal of Molecular Biology*. 1989. № 1 (206). С. 69–79.
91. Mechold U. [и др.]. Differential regulation by ppGpp versus pppGpp in *Escherichia coli* // *Nucleic Acids Research*. 2013. № 12 (41). С. 6175–6189.
92. Mekler V. [и др.]. Structural organization of bacterial RNA polymerase holoenzyme and the RNA polymerase-promoter open complex // *Cell*. 2002. № 5 (108). С. 599–614.
93. Mika F., Hengge R. A two-component phosphotransfer network involving ArcB, ArcA, and RssB coordinates synthesis and proteolysis of σ^S (RpoS) in *E. coli* // *Genes & Development*. 2005. № 22 (19). С. 2770–2781.
94. Mitchell J. E. [и др.]. The *Escherichia coli* Regulator of Sigma 70 Protein, Rsd, Can Up-Regulate Some Stress-Dependent Promoters by Sequestering Sigma 70 // *Journal of Bacteriology*. 2007. № 9 (189). С. 3489–3495.
95. Moll I., Engelberg-Kulka H. Selective translation during stress in *Escherichia coli* // *Trends in Biochemical Sciences*. 2012. № 11 (37). С. 493–498.

96. Molodtsov V. [и др.]. X-ray crystal structures of the Escherichia coli RNA polymerase in complex with benzoxazinorifamycins // *Journal of Medicinal Chemistry*. 2013. № 11 (56). С. 4758–4763.
97. Molodtsov V. [и др.]. Allosteric Effector ppGpp Potentiates the Inhibition of Transcript Initiation by DksA // *Molecular Cell*. 2018. № 5 (69). С. 828–839.e5.
98. Muffler A., Fischer D., Hengge-Aronis R. The RNA-binding protein HF-I, known as a host factor for phage Qbeta RNA replication, is essential for rpoS translation in Escherichia coli. // *Genes & Development*. 1996. № 9 (10). С. 1143–1151.
99. Mukhopadhyay S. [и др.]. Transcriptional induction of the conserved alternative sigma factor RpoS in Escherichia coli is dependent on BarA, a probable two-component regulator // *Molecular Microbiology*. 2000. № 2 (37). С. 371–381.
100. Murray D. K., Bremer H. Control of spoT-dependent ppGpp Synthesis and Degradation in Escherichia coli // *Journal of Molecular Biology*. 1996. № 1 (259). С. 41–57.
101. My L. [и др.]. Transcription of the Escherichia coli Fatty Acid Synthesis Operon fabHGD Is Directly Activated by FadR and Inhibited by ppGpp // *Journal of Bacteriology*. 2013. № 16 (195). С. 3784–3795.
102. Nair S., Finkel S. E. Dps Protects Cells against Multiple Stresses during Stationary Phase // *Journal of Bacteriology*. 2004. № 13 (186). С. 4192–4198.
103. Nesterchuk M. V., Sergiev P. V., Dontsova O. A. Posttranslational Modifications of Ribosomal Proteins in Escherichia coli // *Acta Naturae*. 2011. № 2 (3). С. 22–33.
104. Neubauer C. [и др.]. Decoding in the Absence of a Codon by tmRNA and SmpB in the Ribosome // *Science*. 2012. № 6074 (335). С. 1366–1369.
105. Nyström T. Stationary-Phase Physiology // *Annual Review of Microbiology*. 2004. № 1 (58). С. 161–181.
106. Patikoglou G. A. [и др.]. Crystal Structure of the Escherichia coli Regulator of σ_{70} , Rsd, in Complex with σ_{70} Domain 4 // *Journal of Molecular Biology*. 2007. № 3 (372). С. 649–659.
107. Paul B. J. [и др.]. DksA: a critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP // *Cell*. 2004. № 3 (118). С. 311–322.
108. Paul B. J., Berkmen M. B., Gourse R. L. DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005. № 22 (102). С. 7823–7828.
109. Pin C., Baranyi J. Single-Cell and Population Lag Times as a Function of Cell Age // *Applied and Environmental Microbiology*. 2008. № 8 (74). С. 2534–2536.
110. Piper S. E. [и др.]. A global view of Escherichia coli Rsd protein and its interactions // *Molecular BioSystems*. 2009. № 12 (5). С. 1943.
111. Pletnev P. I. [и др.]. Survival guide: Escherichia coli in the stationary phase // *Acta Naturae*. 2015. № 4 (7). С. 22–33.

112. Polikanov Y. S., Blaha G. M., Steitz T. A. How Hibernation Factors RMF, HPF, and YfiA Turn Off Protein Synthesis // *Science*. 2012. № 6083 (336). С. 915–918.
113. Reeve C. A., Bockman A. T., Matin A. Role of protein degradation in the survival of carbon-starved *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. // *Journal of Bacteriology*. 1984. № 3 (157). С. 758–763.
114. Reznikoff W. S. [и др.]. The Regulation of Transcription Initiation in Bacteria // *Annual Review of Genetics*. 1985. № 1 (19). С. 355–387.
115. Rhodius V. A. [и др.]. Conserved and Variable Functions of the σ E Stress Response in Related Genomes // *PLoS Biol.* 2005. № 1 (4). С. e2.
116. Rolfe M. D. [и др.]. Lag Phase Is a Distinct Growth Phase That Prepares Bacteria for Exponential Growth and Involves Transient Metal Accumulation // *Journal of Bacteriology*. 2012. № 3 (194). С. 686–701.
117. Roostalu J. [и др.]. Cell division in *Escherichia coli* cultures monitored at single cell resolution // *BMC Microbiology*. 2008. № 1 (8). С. 68.
118. Ruff E. F. [и др.]. *E. coli* RNA Polymerase Determinants of Open Complex Lifetime and Structure // *Journal of Molecular Biology*. 2015. № 15 (427). С. 2435–2450.
119. Sanchez-Vazquez P. [и др.]. Genome-wide effects on *Escherichia coli* transcription from ppGpp binding to its two sites on RNA polymerase // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019. № 17 (116). С. 8310–8319.
120. Santos J. M. [и др.]. The gene *bolA* regulates *dacA* (PBP5), *dacC* (PBP6) and *ampC* (AmpC), promoting normal morphology in *Escherichia coli* // *Molecular Microbiology*. 2002. № 6 (45). С. 1729–1740.
121. Santos J. M. [и др.]. Poly(A)-polymerase I links transcription with mRNA degradation via σ S proteolysis // *Molecular Microbiology*. 2006. № 1 (60). С. 177–188.
122. Santos-Zavaleta A. [и др.]. RegulonDB v 10.5: tackling challenges to unify classic and high throughput knowledge of gene regulation in *E. coli* K-12 // *Nucleic Acids Research*. 2019. № D1 (47). С. D212–D220.
123. Sastry A. V. [и др.]. The *Escherichia coli* transcriptome mostly consists of independently regulated modules // *Nature Communications*. 2019. № 1 (10). С. 5536.
124. Schwartz E. C. [и др.]. A full-length group 1 bacterial sigma factor adopts a compact structure incompatible with DNA binding // *Chemistry & Biology*. 2008. № 10 (15). С. 1091–1103.
125. Schweder T. [и др.]. Regulation of *Escherichia coli* starvation sigma factor (σ s) by ClpXP protease. // *Journal of Bacteriology*. 1996. № 2 (178). С. 470–476.
126. Sergiev P. V. [и др.]. Modifications of ribosomal RNA: From enzymes to function под ред. M. V. Rodnina, W. Wintermeyer, R. Green, Vienna: Springer Vienna, 2011. С. 97–110.
127. Shao Y., Feldman-Cohen L. S., Osuna R. Functional Characterization of the *Escherichia coli* Fis–DNA Binding Sequence // *Journal of Molecular Biology*. 2008. № 3 (376). С. 771–785.

128. Sharma U. K., Chatterji D. Differential Mechanisms of Binding of Anti-Sigma Factors Escherichia coli Rsd and Bacteriophage T4 AsiA to E. coli RNA Polymerase Lead to Diverse Physiological Consequences // *Journal of Bacteriology*. 2008. № 10 (190). С. 3434–3443.
129. Starosta A. L. [и др.]. The bacterial translation stress response // *FEMS Microbiology Reviews*. 2014. № 6 (38). С. 1172–1201.
130. Straus D. B., Walter W. A., Gross C. A. The heat shock response of E. coli is regulated by changes in the concentration of σ_{32} // *Nature*. 1987. № 6137 (329). С. 348–351.
131. Subach F. V. [и др.]. Monomeric fluorescent timers that change color from blue to red report on cellular trafficking // *Nature Chemical Biology*. 2009. № 2 (5). С. 118–126.
132. Swinger K. K. Flexible DNA bending in HU-DNA cocystal structures // *The EMBO Journal*. 2003. № 14 (22). С. 3749–3760.
133. Szklarczyk D. [и др.]. STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets // *Nucleic Acids Research*. 2019. № D1 (47). С. D607–D613.
134. Tani T. H. [и др.]. Adaptation to famine: A family of stationary-phase genes revealed by microarray analysis // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002. № 21 (99). С. 13471–13476.
135. Tehranchi A. K. [и др.]. The Transcription Factor DksA Prevents Conflicts between DNA Replication and Transcription Machinery // *Cell*. 2010. № 4 (141). С. 595–605.
136. Trotochaud A. E., Wassarman K. M. 6S RNA Function Enhances Long-Term Cell Survival // *Journal of Bacteriology*. 2004. № 15 (186). С. 4978–4985.
137. Typas A. [и др.]. Stationary phase reorganisation of the Escherichia coli transcription machinery by Crl protein, a fine-tuner of σ_s activity and levels // *The EMBO Journal*. 2007. № 6 (26). С. 1569–1578.
138. Typas A., Hengge R. Role of the spacer between the –35 and –10 regions in σ_s promoter selectivity in Escherichia coli // *Molecular Microbiology*. 2006. № 3 (59). С. 1037–1051.
139. Varik V. [и др.]. HPLC-based quantification of bacterial housekeeping nucleotides and alarmone messengers ppGpp and pppGpp // *Scientific Reports*. 2017. № 1 (7). С. 11022.
140. Verma S. C., Qian Z., Adhya S. L. Architecture of the Escherichia coli nucleoid // *PLoS genetics*. 2019. № 12 (15). С. e1008456.
141. Vinella D. [и др.]. Effects on Growth by Changes of the Balance between GreA, GreB, and DksA Suggest Mutual Competition and Functional Redundancy in Escherichia coli // *Journal of Bacteriology*. 2012. № 2 (194). С. 261–273.
142. Vuthoori S. [и др.]. Domain 1.1 of the σ_{70} Subunit of Escherichia coli RNA Polymerase Modulates the Formation of Stable Polymerase/Promoter Complexes // *Journal of Molecular Biology*. 2001. № 3 (309). С. 561–572.
143. Wada A. Analysis of Escherichia coli Ribosomal Proteins by an Improved Two Dimensional Gel Electrophoresis. II. Characterization of Four New Proteins // *The Journal of Biochemistry*. 1986. № 6 (100). С. 1595–1605.

144. Wassarman K. M., Storz G. 6S RNA Regulates E. coli RNA Polymerase Activity // *Cell*. 2000. № 6 (101). С. 613–623.
145. Weber H. [и др.]. Genome-Wide Analysis of the General Stress Response Network in Escherichia coli: σ S-Dependent Genes, Promoters, and Sigma Factor Selectivity // *Journal of Bacteriology*. 2005. № 5 (187). С. 1591–1603.
146. Wilson C., Dombroski A. J. Region 1 of sigma70 is required for efficient isomerization and initiation of transcription by Escherichia coli RNA polymerase // *Journal of Molecular Biology*. 1997. № 1 (267). С. 60–74.
147. Winther K. S., Roghanian M., Gerdes K. Activation of the Stringent Response by Loading of RelA-tRNA Complexes at the Ribosomal A-Site // *Molecular Cell*. 2018. № 1 (70). С. 95-105.e4.
148. Wolf S. G. [и др.]. DNA protection by stress-induced biocrystallization // *Nature*. 1999. № 6739 (400). С. 83–85.
149. Wurm R., Neusser T., Wagner R. 6S RNA-dependent inhibition of RNA polymerase is released by RNA-dependent synthesis of small de novo products // *Biological Chemistry*. 2010. № 2–3 (391). С. 187–196.
150. Yeh H.-Y. [и др.]. The core-independent promoter-specific interaction of primary sigma factor // *Nucleic Acids Research*. 2011. № 3 (39). С. 913–925.
151. Yoshida H. [и др.]. YqjD is an inner membrane protein associated with stationary-phase ribosomes in Escherichia coli // *Journal of Bacteriology*. 2012. № 16 (194). С. 4178–4183.
152. Yuan A. H. [и др.]. Rsd family proteins make simultaneous interactions with regions 2 and 4 of the primary sigma factor // *Molecular Microbiology*. 2008. № 5 (70). С. 1136–1151.
153. Zgurskaya H. I., Keyhan M., Matin A. The σ S level in starving Escherichia coli cells increases solely as a result of its increased stability, despite decreased synthesis // *Molecular Microbiology*. 1997. № 3 (24). С. 643–651.
154. Zhang A. [и др.]. The OxyS regulatory RNA represses rpoS translation and binds the Hfq (HF-I) protein // *The EMBO Journal*. 1998. № 20 (17). С. 6061–6068.
155. Zhang J., Zhang Y., Inouye M. Characterization of the Interactions within the mazEF Addiction Module of Escherichia coli // *Journal of Biological Chemistry*. 2003. № 34 (278). С. 32300–32306.
156. Zhou Y., Gottesman S. Modes of Regulation of RpoS by H-NS // *Journal of Bacteriology*. 2006. № 19 (188). С. 7022–7025.
157. Zinser E. R. [и др.]. Bacterial evolution through the selective loss of beneficial Genes. Trade-offs in expression involving two loci // *Genetics*. 2003. № 4 (164). С. 1271–1277.
158. Zinser E. R., Kolter R. Mutations enhancing amino acid catabolism confer a growth advantage in stationary phase // *Journal of Bacteriology*. 1999. № 18 (181). С. 5800–5807.
159. Zinser E. R., Kolter R. Prolonged Stationary-Phase Incubation Selects for lrp Mutations in Escherichia coli K-12 // *Journal of Bacteriology*. 2000. № 15 (182). С. 4361–4365.

Приложения

Таблица 2. Список генов с дифференциальной экспрессией в логарифмической фазе роста

Ген	P-значение	Кратность изменения (I48S/WT)	log2KI
motA	0	709,46	9,47
cheA	0	153,99	7,27
cheY	0	101,77	6,67
pdeH	0	84,85	6,41
cheB	0	79,12	6,31
motB	0	75,68	6,24
fliA	0	74,33	6,22
tap	0	73,67	6,20
fliN	0	70,29	6,14
yjcZ	0	69,95	6,13
intG	0	67,58	6,08
tar	0	65,96	6,04
cheW	0	65,02	6,02
insD-1	0,027363386	59,39	5,89
insD-2	0,027363386	59,39	5,89
insD-3	0,027363386	59,39	5,89
insD-4	0,027363386	59,39	5,89
insD-5	0,027363386	59,39	5,89
insD-6	0,027363386	59,39	5,89
flgI	0	57,67	5,85
fliE	0	56,01	5,81
cheR	0	50,50	5,66
cheZ	0	50,41	5,66
flgK	0	49,51	5,63
fliK	0	43,92	5,46
fliT	0	42,60	5,41
fliI	0	42,33	5,40
flhB	0	41,39	5,37
fliD	0	41,27	5,37
fliS	0	37,87	5,24
fliL	0	37,37	5,22
fliF	0	37,10	5,21
flgH	0	35,73	5,16
flgD	0	35,35	5,14
flgG	0	33,34	5,06
flgB	0	32,95	5,04
flgJ	0	30,54	4,93
aer	0	29,89	4,90
fimC	0	29,77	4,90
flgE	0	29,62	4,89
fliO	0	29,30	4,87
fliG	0	28,94	4,85
flhA	0	28,19	4,82

tsr	0	27,30	4,77
fliH	0	27,07	4,76
fliQ	0	24,60	4,62
flgL	0	24,48	4,61
flxA	0	23,70	4,57
fliR	0	23,62	4,56
flgC	0	23,05	4,53
fliP	0	21,11	4,40
fliJ	3,33067E-16	20,11	4,33
yedN	0	19,88	4,31
fimA	0	18,58	4,22
fliC	0	18,23	4,19
fliM	0	17,64	4,14
fimI	0	17,23	4,11
flgN	0	16,87	4,08
ycgR	0	16,69	4,06
flgM	0	16,08	4,01
fimF	8,88178E-16	15,26	3,93
flgF	0	14,80	3,89
yecR	0	13,84	3,79
flgA	0	13,43	3,75
uhpB	0	12,21	3,61
fimD	0	11,98	3,58
yecT	0	11,03	3,46
ndk	0	10,68	3,42
flhE	0	10,45	3,39
fliZ	0	10,44	3,38
malK	9,70796E-07	10,17	3,35
ves	0	10,11	3,34
rzoD	2,49174E-10	8,94	3,16
lamB	0	8,68	3,12
ybhC	0	8,53	3,09
malE	0	8,19	3,03
pheP	0	8,01	3,00
emtA	0	7,91	2,98
sdaC	0	7,54	2,92
sdaB	0	7,27	2,86
apt	0	7,15	2,84
yciH	2,42134E-05	6,92	2,79
ymdA	1,98819E-11	6,89	2,79
ynjH	3,73007E-07	6,54	2,71
malM	0	6,49	2,70
stpA	4,04121E-14	6,31	2,66
purK	5,91941E-05	6,28	2,65
crfC	0	6,05	2,60
fis	0	6,02	2,59
malF	2,79937E-05	5,95	2,57

flhD	2,42082E-06	5,72	2,52
yeiP	0	5,64	2,49
nudG	1,74094E-12	5,63	2,49
fimH	0	5,42	2,44
plaP	0,000431917	5,40	2,43
flhC	0	5,36	2,42
thrA	2,23687E-06	5,36	2,42
thiP	0,035113672	5,35	2,42
modC	0	5,30	2,41
uhpA	3,74201E-12	5,19	2,38
trg	7,31738E-05	5,12	2,36
cysM	0,000129448	5,12	2,36
hsdM	0	5,10	2,35
pdeI	9,50463E-07	4,95	2,31
folA	0	4,86	2,28
mdtI	0	4,69	2,23
dadA	0,001592531	4,69	2,23
ydeO	0,004130024	4,63	2,21
malG	0,000155003	4,55	2,19
yhdU	0,027511862	4,45	2,15
murJ	0	4,40	2,14
modB	4,29147E-11	4,39	2,13
putP	2,03707E-07	4,33	2,11
yqgC	0	4,21	2,07
fabA	0	4,21	2,07
yedE	6,98137E-09	4,16	2,06
yidC	0	4,07	2,03
xynR	9,90319E-14	4,07	2,02
metA	1,97022E-08	4,01	2,00
ygdD	0,005885461	3,99	2,00
tyrP	1,11022E-16	3,82	1,93
dusB	0	3,82	1,93
rnb	0	3,81	1,93
rsxD	0,000647748	3,76	1,91
cstA	0,000325727	3,76	1,91
mrdA	0	3,69	1,88
adk	0	3,68	1,88
ydiJ	0	3,65	1,87
uhpT	0	3,64	1,86
mnaT	2,17424E-07	3,60	1,85
holE	0	3,57	1,83
ilvG	0	3,56	1,83
folK	0,004701989	3,56	1,83
dtpA	0	3,56	1,83
opgB	0	3,52	1,82
gpt	2,66454E-15	3,50	1,81
thiB	0,013012012	3,48	1,80

yjeI	0	3,48	1,80
abgR	1,27035E-09	3,47	1,80
aceF	0	3,44	1,78
rzpD	0	3,42	1,78
ycaM	0,024843577	3,39	1,76
yihI	2,00941E-06	3,39	1,76
dadX	0,007458507	3,38	1,76
mdtJ	3,38618E-14	3,36	1,75
hcaE	0,000402297	3,35	1,74
yidD	0,000349561	3,34	1,74
thrC	1,61533E-11	3,34	1,74
btsS	5,69256E-08	3,29	1,72
mrdB	3,90799E-14	3,27	1,71
hoID	5,39236E-07	3,24	1,69
modA	0	3,21	1,68
rimO	2,40084E-08	3,19	1,67
borD	0	3,18	1,67
ymdB	0,018016803	3,17	1,66
mhpD	0,020912486	3,16	1,66
aroA	2,01809E-08	3,15	1,66
yfdX	0,004982667	3,14	1,65
dctA	7,76259E-05	3,13	1,65
ycgN	1,09805E-10	3,13	1,65
ompF	0	3,13	1,65
priB	0	3,12	1,64
accB	0	3,06	1,62
frlB	0,046896622	3,06	1,61
queD	2,17017E-10	3,05	1,61
yciA	0	3,05	1,61
fucO	0,014973133	3,03	1,60
yfcD	0	3,03	1,60
lysO	1,37572E-06	3,02	1,60
yhgF	0	3,01	1,59
yhjG	1,72085E-14	3,00	1,59
yedJ	0,037372078	2,99	1,58
yciU	0	2,96	1,57
lpxH	0	2,95	1,56
ybeX	0	2,95	1,56
ygfF	0,020474363	2,95	1,56
aceE	4,09761E-12	2,94	1,56
atpB	0	2,92	1,55
mokB	8,31742E-11	2,92	1,54
dapD	0	2,91	1,54
tdk	4,79727E-13	2,91	1,54
nfeR	2,55449E-05	2,89	1,53
gdhA	2,33147E-14	2,86	1,52
hisG	0,04056424	2,85	1,51

aroB	0	2,85	1,51
hisD	0,000886399	2,85	1,51
yagB	2,01342E-08	2,80	1,49
nmnG	0	2,80	1,48
metK	7,22143E-09	2,79	1,48
serC	1,28235E-08	2,75	1,46
lpxT	1,31182E-05	2,75	1,46
thrB	2,43282E-06	2,74	1,45
ampH	5,60187E-05	2,73	1,45
accA	0	2,73	1,45
mreB	0	2,73	1,45
fxsA	1,15013E-07	2,71	1,44
ampG	0	2,71	1,44
rpsR	0	2,71	1,44
rdgC	7,19629E-07	2,70	1,43
yafK	1,79978E-12	2,68	1,42
potC	1,58866E-07	2,67	1,42
topA	0	2,67	1,42
proB	2,99665E-10	2,66	1,41
mreC	3,41525E-06	2,63	1,39
ybjG	2,10209E-08	2,63	1,39
eptC	0	2,62	1,39
sdhB	0,00010363	2,61	1,39
rluC	6,76026E-12	2,61	1,38
yfjV	5,87855E-07	2,61	1,38
yjjU	4,24542E-06	2,60	1,38
amyA	3,1128E-09	2,58	1,37
rpsF	0	2,58	1,37
thrL	0,003848107	2,58	1,37
hokB	1,47857E-09	2,57	1,36
glgA	1,98787E-08	2,57	1,36
fadD	1,0941E-07	2,55	1,35
ssrS	9,9267E-07	0,32	-1,64
ltaE	0,001413425	2,55	1,35
xthA	7,4927E-09	2,54	1,34
atpH	0	2,53	1,34
cyaY	0	2,53	1,34
sixA	0	2,50	1,32
yqeG	1,46083E-12	2,50	1,32
moaE	0,001885303	2,49	1,32
yegQ	2,02667E-06	2,49	1,32
yddW	0,000892867	2,47	1,30
yjeH	0,040255415	2,47	1,30
rplY	0	2,47	1,30
serA	0	2,45	1,29
mdh	0	2,45	1,29
sdhA	0,001249981	2,45	1,29

atpF	0	2,44	1,29
rstA	0	2,44	1,28
accC	0	2,43	1,28
rlmH	1,24859E-07	2,43	1,28
waaA	5,10703E-15	2,42	1,28
maoP	0	2,42	1,27
prfB	1,7053E-12	2,41	1,27
yjgM	7,47997E-08	2,41	1,27
potB	5,80151E-07	2,38	1,25
trml	9,93849E-06	2,38	1,25
pcnB	1,94994E-06	2,38	1,25
fkIB	0	2,38	1,25
lepA	0	2,38	1,25
aroC	1,07598E-05	2,37	1,25
aroG	0	2,37	1,24
yobB	7,49942E-07	2,37	1,24
nrdA	6,90878E-06	2,36	1,24
yfiF	0	2,34	1,23
lpd	0	2,34	1,23
mepM	1,68459E-07	2,34	1,23
nusG	5,94302E-13	2,34	1,23
prfC	7,76992E-06	2,34	1,22
ybhK	8,86402E-10	2,32	1,22
can	4,89729E-07	2,31	1,21
emrD	5,60846E-10	2,31	1,20
ybjS	8,19967E-06	2,30	1,20
setB	0,000146505	2,29	1,20
fabH	0	2,28	1,19
argS	0	2,28	1,19
yoaE	0	2,27	1,18
yfcA	0,002550677	2,27	1,18
emrA	0,009864738	2,26	1,18
speA	1,15685E-13	2,25	1,17
glpR	0,008120585	2,24	1,17
malX	0,000692417	2,24	1,16
secE	3,20854E-14	2,23	1,16
ybiT	4,58593E-10	2,23	1,16
ygdG	0,046059879	2,22	1,15
dacA	5,97666E-12	2,22	1,15
cdsA	1,35229E-05	2,21	1,15
atpE	0	2,21	1,15
flk	0,029679893	2,21	1,14
rapA	0,001455806	2,21	1,14
murA	1,54687E-06	2,19	1,13
tolQ	0,000635973	2,19	1,13
adeP	0,000186861	2,18	1,13
ygiQ	9,66153E-05	2,18	1,13

ilvB	4,44644E-13	2,18	1,12
rsmC	5,75736E-05	2,15	1,10
mltA	2,34776E-08	2,14	1,10
tolA	4,79992E-11	2,12	1,08
amiC	4,21883E-10	2,12	1,08
rstB	0	2,11	1,08
ispU	6,99441E-15	2,10	1,07
yciT	0	2,10	1,07
tatE	0	2,10	1,07
yajG	0,00711219	2,10	1,07
yafD	0,000595857	2,09	1,07
yddG	1,4768E-05	2,09	1,07
gltB	6,60144E-09	2,09	1,07
Int	1,091E-09	2,09	1,06
dgcl	0,000293371	2,08	1,06
aroH	0,000796534	2,08	1,06
ompW	0,031804478	2,08	1,06
holC	0,027477474	2,08	1,06
oppD	3,4861E-14	2,08	1,05
eda	3,93356E-10	2,07	1,05
panD	5,83458E-09	2,07	1,05
proQ	1,73266E-11	2,05	1,04
metG	6,61447E-09	2,05	1,03
rpoD	6,86174E-06	2,04	1,03
rffT	2,27208E-05	2,04	1,03
dnaX	1,22615E-09	2,04	1,03
dapE	4,13816E-09	2,04	1,03
rlmN	0,000134735	2,04	1,03
rbsC	0,000151463	2,03	1,02
parC	6,93834E-06	2,03	1,02
bcr	0,001537081	2,03	1,02
tgt	1,33397E-07	2,02	1,01
radA	0,011207207	2,02	1,01
rpsH	2,10942E-15	2,01	1,00
alaE	7,48629E-09	2,00	1,00
rpsK	1,11022E-16	2,00	1,00
miaA	0	2,00	1,00
ptsH	0	1,99	1,00
tyrA	0,003615757	1,99	0,99
trmD	0	1,99	0,99
Irp	0	1,98	0,99
rng	2,76906E-06	1,97	0,98
ydcL	1,81787E-05	1,96	0,97
damX	1,33227E-15	1,96	0,97
wzzB	2,75365E-10	1,96	0,97
oppC	1,41288E-10	1,95	0,97
rpsN	1,44465E-08	1,95	0,97

yfcL	2,09537E-07	1,95	0,96
ybjX	6,08371E-05	1,94	0,96
dbpA	0,048063033	1,93	0,95
aroK	4,76685E-12	1,93	0,95
tcyJ	2,00445E-05	1,93	0,95
oppB	1,11022E-16	1,92	0,94
pyrH	4,95796E-10	1,92	0,94
ylaC	6,55513E-05	1,91	0,93
recF	0,000751896	1,90	0,93
era	6,30249E-05	1,89	0,92
upp	7,94698E-13	1,89	0,92
rbsA	0,043905961	1,89	0,92
rplQ	0	1,89	0,92
dnaJ	1,15738E-07	1,89	0,92
yicH	0,001898862	1,88	0,91
rseP	8,12905E-13	1,87	0,90
rluB	4,11593E-10	1,86	0,90
rpoA	0	1,86	0,90
yhdE	0,040019609	1,86	0,90
lepB	2,2605E-09	1,86	0,90
aldA	4,42316E-05	1,86	0,89
chaA	0,025624733	1,86	0,89
marB	0,007043596	1,85	0,89
trpS	0	1,84	0,88
kup	7,04E-07	1,84	0,88
rbsD	9,13996E-05	1,84	0,88
fabB	0	1,84	0,88
gloC	3,41552E-06	1,84	0,88
ptsG	4,41968E-08	1,83	0,88
lpxA	3,43447E-12	1,83	0,87
metQ	7,73786E-06	1,83	0,87
corA	1,32964E-06	1,83	0,87
gltP	0,000114468	1,82	0,87
htpX	5,86911E-09	1,82	0,86
lplT	0,001338433	1,80	0,85
yidR	0,032494231	1,79	0,84
dksA	2,82187E-09	1,79	0,84
ppsA	0,003133248	1,79	0,84
ycbK	0,002488838	1,78	0,83
nlpD	0	1,78	0,83
tolB	4,58457E-09	1,78	0,83
rplU	0,023464984	1,78	0,83
opgD	2,99041E-10	1,78	0,83
rpsD	0	1,77	0,83
hscA	0,008537395	1,77	0,82
rpsB	0	1,77	0,82
yejM	3,46367E-08	1,77	0,82

rpsA	1,11022E-16	1,76	0,81
rplC	3,74686E-10	1,76	0,81
ppiA	0,03186301	1,75	0,81
yhhJ	0,034856538	1,75	0,81
rplD	7,46804E-10	1,75	0,81
rimM	0	1,74	0,80
prs	2,83224E-06	1,74	0,80
der	0,000616005	1,73	0,79
rpsP	0	1,73	0,79
miaB	9,68901E-05	1,73	0,79
yhbE	0,022117605	1,73	0,79
pdeN	1,12835E-05	1,73	0,79
potA	0,019309565	1,72	0,79
proA	2,20688E-11	1,72	0,78
speB	0,001537654	1,72	0,78
rlpA	0,000109965	1,71	0,78
rnpA	1,94139E-05	1,71	0,77
wecB	0,001237249	1,70	0,77
pitA	1,35632E-07	1,70	0,77
accD	0	1,70	0,77
pntA	1,66533E-15	1,69	0,76
oppF	7,98965E-05	1,69	0,76
yfgD	3,4166E-05	1,68	0,75
rplI	1,54321E-14	1,68	0,75
lpxD	0	1,67	0,74
pntB	0	1,67	0,74
arfA	0,004039605	1,66	0,73
prc	1,11022E-16	1,66	0,73
rplF	1,95958E-06	1,66	0,73
glmU	8,1371E-09	1,65	0,72
lptD	1,58729E-05	1,64	0,72
dnaG	0,014593431	1,64	0,71
ypjA	0,015050656	1,64	0,71
ileS	4,89507E-07	1,63	0,71
spoT	4,69065E-07	1,63	0,70
glgB	0,000160401	1,63	0,70
bamA	1,88738E-15	1,62	0,69
crl	0	1,61	0,69
cydB	0,023122256	1,61	0,69
ybeD	0,000126666	1,61	0,68
surA	8,11369E-11	1,61	0,68
lysS	8,63493E-08	1,58	0,66
igaA	0,009607765	1,58	0,66
rpsU	4,96123E-11	1,57	0,65
ptsI	3,33326E-11	1,56	0,64
yejL	0,003917394	1,55	0,63
rffM	0,041017944	1,55	0,63

secD	0	1,54	0,63
ydfG	8,73758E-10	1,54	0,62
gltA	0,008473583	1,54	0,62
infC	0	1,54	0,62
hupB	0,031599119	1,54	0,62
atpI	0,00486789	1,54	0,62
mscM	0,000898984	1,53	0,62
infA	0,002437217	1,53	0,62
galF	0,013913062	1,53	0,61
slyX	0,000945214	1,53	0,61
coaA	0,014844462	1,53	0,61
msrC	4,46049E-05	1,52	0,61
argR	9,06096E-07	1,52	0,60
atpA	0,012278733	1,52	0,60
rplT	0,000140761	1,51	0,59
rplW	0,008764548	1,50	0,59
fabF	3,65844E-06	1,50	0,59
yeeX	0,00550008	0,66	-0,59
rpmE	2,39324E-11	0,66	-0,59
mazG	0,046836168	0,66	-0,60
yfeD	0,000315451	0,66	-0,60
yqfA	0,00011092	0,66	-0,60
nplI	0	0,66	-0,60
ompX	3,66374E-15	0,66	-0,60
yjhU	0,016282939	0,65	-0,61
yccX	0,008700906	0,65	-0,61
nanR	0,000177983	0,65	-0,61
yhbT	0,002130612	0,65	-0,62
ygjR	0,000219746	0,65	-0,62
exuR	0,000385497	0,64	-0,63
gatD	3,14777E-10	0,64	-0,64
grpE	0,00206144	0,64	-0,64
dcuR	0,01210169	0,64	-0,65
pck	0	0,64	-0,65
yhbS	0,000253705	0,63	-0,66
intF	3,25229E-12	0,63	-0,66
yjaG	2,09657E-05	0,63	-0,66
rpoE	1,41512E-05	0,63	-0,66
csdA	0,017207125	0,63	-0,66
yrdD	0,000189302	0,63	-0,67
rfbA	0,000459335	0,63	-0,67
yieH	0,000286844	0,63	-0,68
yejO	3,85899E-05	0,62	-0,68
pldB	0,00020723	0,62	-0,68
djlA	0,040550957	0,62	-0,69
mtfA	0,040151782	0,62	-0,70
opgG	0,031434263	0,61	-0,70

yniA	0,002738359	0,61	-0,70
rnr	9,94782E-12	0,61	-0,70
fbaA	4,1153E-09	0,61	-0,70
helD	4,71839E-05	0,61	-0,71
ychS	0,013534225	0,61	-0,72
rseA	2,46739E-08	0,61	-0,72
cyaA	4,86944E-13	0,61	-0,72
fur	0	0,60	-0,73
gatB	0	0,60	-0,73
hupA	0	0,60	-0,73
epd	5,45816E-07	0,60	-0,73
ppnN	3,76886E-06	0,60	-0,73
smg	0,001253941	0,60	-0,73
lysU	0	0,60	-0,73
hipA	0,044122228	0,60	-0,74
ydfH	0,003300934	0,60	-0,75
yfeX	0,008644455	0,60	-0,75
clpA	2,06181E-09	0,59	-0,75
tpiA	3,50742E-11	0,59	-0,75
waaL	3,93336E-05	0,59	-0,76
yceF	0,008757769	0,59	-0,76
tamA	6,5776E-06	0,59	-0,76
yhjD	0,001924093	0,58	-0,77
tatA	0,000691746	0,58	-0,77
yccF	0,047541624	0,58	-0,77
qorA	0,033521544	0,58	-0,78
groS	5,95579E-05	0,58	-0,78
yfaH	0,000531335	0,58	-0,78
gyrA	4,31877E-14	0,58	-0,79
hybC	0,000628114	0,58	-0,79
ecnA	0,048633051	0,58	-0,79
amiA	5,2249E-08	0,58	-0,79
crcB	0,000224791	0,57	-0,80
htpG	0,004930264	0,57	-0,81
zitB	0,012637537	0,57	-0,81
ndh	1,28774E-05	0,57	-0,81
ymfl	8,84191E-05	0,57	-0,81
uidR	5,18302E-09	0,57	-0,81
yrbG	0,001351754	0,57	-0,82
mtlR	1,36546E-12	0,57	-0,82
yadI	0,000152971	0,57	-0,82
smrB	0,027211908	0,57	-0,82
narL	7,33873E-06	0,57	-0,82
rob	3,64872E-09	0,57	-0,82
rfbC	0,00010312	0,57	-0,82
yqaB	0,0001107	0,57	-0,82
zur	8,95547E-07	0,56	-0,83

rlmD	3,78578E-05	0,56	-0,83
lit	1,99373E-05	0,56	-0,83
selA	0,014464527	0,56	-0,83
wbbL	1,26809E-05	0,56	-0,84
pyrC	2,36068E-05	0,56	-0,84
manA	0,002539419	0,56	-0,84
rnlB	4,82224E-10	0,56	-0,84
mazF	0,038451782	0,56	-0,85
rhsD	0,009960492	0,56	-0,85
yfcH	1,88223E-06	0,56	-0,85
pspA	3,01092E-13	0,55	-0,85
msrB	0,001454046	0,55	-0,85
yfhM	6,21725E-15	0,55	-0,86
luxS	1,33058E-06	0,55	-0,86
yoaC	6,59643E-06	0,55	-0,86
suhB	0,000826597	0,55	-0,87
recN	4,60187E-06	0,55	-0,87
cas3	0,003597839	0,54	-0,88
frdD	0,001694412	0,54	-0,88
lpxP	1,21918E-08	0,54	-0,88
cfa	1,11022E-16	0,54	-0,89
uvrA	1,96989E-09	0,54	-0,89
hpf	0,011643123	0,54	-0,90
ymfJ	3,94809E-05	0,54	-0,90
dicA	0	0,53	-0,90
lgoR	0,000405625	0,53	-0,91
yhaV	0	0,53	-0,91
acrR	1,0441E-05	0,53	-0,91
hha	2,43597E-05	0,53	-0,91
rfbX	0	0,53	-0,92
sulA	3,33067E-16	0,53	-0,92
intA	4,5846E-09	0,53	-0,92
ecnB	0,002557087	0,53	-0,92
lpp	0,000361981	0,53	-0,92
yejF	5,67932E-07	0,53	-0,93
rbsR	2,39463E-07	0,52	-0,93
nsrR	0	0,52	-0,93
ybaP	0,045807482	0,52	-0,93
yqgE	4,76413E-06	0,52	-0,93
chiA	0,000509225	0,52	-0,94
yacC	0,000216022	0,52	-0,94
matP	0	0,52	-0,95
sdhE	1,67988E-09	0,52	-0,95
yagK	0,000240093	0,52	-0,95
yfiR	0	0,52	-0,95
yhhI	0,033031208	0,51	-0,97
ycfH	9,40855E-09	0,51	-0,97

purH	0,047397448	0,51	-0,97
wbbJ	0	0,51	-0,97
pgk	0	0,51	-0,98
bamE	0	0,51	-0,98
rppH	4,29708E-09	0,51	-0,98
yafC	0,029168033	0,50	-0,99
caiA	0,001403993	0,50	-1,00
ygfB	1,59716E-06	0,50	-1,00
ybeL	0,01229089	0,50	-1,00
aspA	0,000247557	0,50	-1,00
yehS	0	0,50	-1,00
yfgG	0	0,50	-1,00
yhgH	0,000799197	0,50	-1,00
yccM	0,002236541	0,50	-1,00
ybaA	0,001350051	0,50	-1,01
gdx	7,39131E-12	0,50	-1,01
ldtA	3,49244E-11	0,50	-1,01
ybiV	0,002941232	0,50	-1,01
glnA	2,04201E-11	0,49	-1,02
frdA	1,3427E-05	0,49	-1,02
hlyE	0,001508507	0,49	-1,02
minE	0,002924894	0,49	-1,02
ytfK	3,36298E-12	0,49	-1,02
insK	0,026068027	0,49	-1,02
adiY	0,00050191	0,49	-1,02
fumD	0,001686563	0,49	-1,03
secB	0	0,49	-1,04
ytfB	4,0196E-07	0,49	-1,04
viaA	0,001909225	0,48	-1,05
intD	3,33067E-16	0,48	-1,05
mqsA	1,57446E-10	0,48	-1,05
sfsA	0	0,48	-1,05
glpF	0,000128862	0,48	-1,05
grxB	5,55112E-16	0,48	-1,07
yrhA	3,07538E-05	0,48	-1,07
cspF	3,75685E-06	0,48	-1,07
yccJ	0,00233278	0,48	-1,07
wbbl	0	0,47	-1,07
ihfA	0	0,47	-1,08
ftnB	3,66374E-15	0,47	-1,08
waaS	0	0,47	-1,09
ydfT	0,000646042	0,47	-1,09
mgtS	2,64271E-07	0,47	-1,10
gntT	9,39387E-05	0,47	-1,10
waaB	0	0,47	-1,10
gnsA	0	0,46	-1,11
edd	0,000763669	0,46	-1,11

yahO	0,017209961	0,46	-1,11
yqaE	0,007009224	0,46	-1,11
yafQ	1,36372E-11	0,46	-1,11
uxaC	0,000772684	0,46	-1,12
murl	0	0,46	-1,12
pepT	1,15515E-07	0,46	-1,13
uspA	2,88658E-15	0,46	-1,13
ycgB	6,43563E-08	0,46	-1,13
ytfL	8,29705E-10	0,46	-1,14
pphA	7,18842E-06	0,45	-1,14
ykgA	0,001768086	0,45	-1,14
def	0	0,45	-1,15
iraP	6,7479E-11	0,45	-1,15
yaiA	1,10272E-10	0,45	-1,16
yeeN	9,38138E-14	0,45	-1,16
ynhF	7,98888E-08	0,44	-1,17
dgcT	1,33227E-15	0,44	-1,17
feoC	0,016091769	0,44	-1,17
ybcY	0,019304079	0,44	-1,17
gldA	0,000180037	0,44	-1,17
racR	0	0,44	-1,18
yafS	7,82785E-11	0,44	-1,19
leuO	1,25224E-07	0,44	-1,19
insJ	1,54891E-06	0,44	-1,19
tyrR	6,10623E-15	0,44	-1,20
mgsA	7,76451E-08	0,43	-1,20
glf	0	0,43	-1,21
wrbA	1,77636E-15	0,43	-1,21
mcrB	1,48761E-06	0,43	-1,21
yhcN	0	0,43	-1,21
ygaM	5,43232E-06	0,43	-1,22
yzgL	0,008759972	0,43	-1,22
rpoH	0	0,43	-1,23
ychJ	6,47572E-08	0,43	-1,23
rho	0	0,42	-1,24
yqiG	5,60159E-10	0,42	-1,24
ibsE	0,003501948	0,42	-1,24
yhcF	0,046349297	0,42	-1,24
ubiK	8,43769E-15	0,42	-1,25
ychH	1,15742E-09	0,42	-1,25
elyC	4,12462E-05	0,42	-1,25
yfbS	1,39888E-14	0,42	-1,25
kbp	0,016503705	0,42	-1,25
hfq	0	0,42	-1,25
yiaG	2,95088E-11	0,42	-1,25
gmhB	6,91225E-13	0,42	-1,26
waaY	0	0,42	-1,26

frdC	7,52986E-10	0,42	-1,26
trxA	0	0,42	-1,26
rraA	0	0,42	-1,27
ygiN	1,83774E-07	0,42	-1,27
ravA	0	0,42	-1,27
cutC	9,62439E-10	0,42	-1,27
tsx	9,03259E-06	0,41	-1,27
mscL	1,17906E-12	0,41	-1,27
gmk	0	0,41	-1,27
ycgJ	5,76617E-12	0,41	-1,28
nmpC	8,88178E-16	0,41	-1,28
ydiV	8,01264E-09	0,41	-1,28
casC	0,005860231	0,41	-1,28
waaZ	0	0,41	-1,28
nrfC	0,021284441	0,41	-1,28
yqfB	5,52395E-09	0,41	-1,28
osmE	0,006912026	0,41	-1,28
bluF	3,17791E-07	0,41	-1,29
yfbR	1,52137E-09	0,41	-1,29
sthA	0	0,41	-1,29
waaO	0	0,41	-1,29
yfjH	2,53712E-09	0,41	-1,30
dinI	2,22045E-16	0,41	-1,30
wbbH	0	0,41	-1,30
polA	9,99201E-16	0,40	-1,31
ydck	2,68784E-07	0,40	-1,31
slyA	0	0,40	-1,31
bcsE	0	0,40	-1,31
mtlA	6,01741E-14	0,40	-1,31
yiiS	4,73566E-12	0,40	-1,32
yjgX	1,11847E-10	0,40	-1,32
sseA	8,93149E-07	0,40	-1,33
yoeF	3,26354E-11	0,40	-1,33
ybhL	0	0,40	-1,33
dmsA	5,82534E-07	0,40	-1,33
ycfP	0	0,39	-1,34
kch	0	0,39	-1,35
yneG	6,54334E-10	0,39	-1,35
purC	8,4782E-07	0,39	-1,36
csrA	3,33067E-16	0,39	-1,36
waaU	0	0,39	-1,37
trmJ	0	0,39	-1,37
cbl	1,08691E-13	0,39	-1,37
tsgA	0,002193648	0,39	-1,37
dsrB	0	0,39	-1,38
aslB	0,001343265	0,38	-1,38
glpB	1,26505E-07	0,38	-1,39

trxC	1,98351E-11	0,38	-1,39
yfjW	7,115E-05	0,38	-1,39
nrfA	0,000437017	0,38	-1,40
ysaA	2,67434E-10	0,38	-1,40
wbbK	0	0,38	-1,40
hybO	6,58362E-14	0,38	-1,40
waaJ	0	0,38	-1,41
abrB	5,0914E-05	0,37	-1,42
uspD	0	0,37	-1,42
ybfA	0	0,37	-1,42
yhhN	3,70045E-08	0,37	-1,42
zapA	0	0,37	-1,43
ymcE	0	0,37	-1,43
yghD	0,000958048	0,37	-1,44
ygdR	2,47025E-07	0,37	-1,44
yihF	2,7904E-05	0,36	-1,46
yqeI	1,56471E-08	0,36	-1,46
ykgG	1,72494E-08	0,36	-1,46
yehR	3,88578E-15	0,36	-1,46
pfkA	0	0,36	-1,47
ykgE	5,43767E-05	0,36	-1,47
pliG	6,38627E-09	0,36	-1,48
fecA	1,94723E-05	0,36	-1,48
frdB	3,20188E-13	0,36	-1,48
tomB	0	0,36	-1,48
yjbD	5,27813E-10	0,36	-1,49
glpA	4,23491E-05	0,36	-1,49
uspE	2,34072E-11	0,35	-1,50
glpD	4,39388E-07	0,35	-1,50
glpC	7,62254E-09	0,35	-1,51
cspA	0	0,35	-1,52
recA	0	0,35	-1,53
dpiA	0,000935564	0,35	-1,53
cdaR	0	0,35	-1,53
clpS	4,20145E-11	0,34	-1,54
fetA	0,014497836	0,34	-1,54
cadB	0,044493762	0,34	-1,55
galT	3,41677E-09	0,34	-1,55
nirB	5,84166E-11	0,34	-1,55
yieP	0	0,34	-1,55
ebgR	1,601E-07	0,34	-1,56
argI	0	0,33	-1,58
yibT	0	0,33	-1,58
yaaJ	0	0,33	-1,58
udp	3,19744E-14	0,33	-1,58
ymfE	1,84547E-05	0,33	-1,59
yacL	1,49913E-05	0,33	-1,59

yodD	2,02115E-06	0,33	-1,59
nirC	3,67888E-09	0,33	-1,59
ppnP	1,08319E-10	0,33	-1,60
htrL	0	0,33	-1,60
cadC	0	0,33	-1,60
blr	6,36047E-12	0,33	-1,61
ydcY	0	0,33	-1,61
yhhA	0,032638525	0,33	-1,62
galR	5,25756E-07	0,32	-1,62
rhoL	0	0,32	-1,63
gadE	3,83862E-07	0,32	-1,64
yejG	8,86539E-08	0,32	-1,64
rraB	0	0,32	-1,64
uspG	2,37588E-14	0,32	-1,64
gpmM	5,71765E-14	0,32	-1,65
yaeH	1,00333E-08	0,32	-1,65
ypdI	2,23414E-08	0,32	-1,66
yciN	0	0,31	-1,68
yceB	1,08745E-10	0,31	-1,68
hsrA	0	0,31	-1,68
deoC	9,48847E-07	0,31	-1,68
yhiJ	0,000164625	0,31	-1,69
ynfS	6,49609E-11	0,31	-1,70
caiF	4,33774E-10	0,31	-1,71
zapB	0	0,30	-1,73
fau	0	0,30	-1,73
cnu	2,0667E-05	0,30	-1,73
nirD	7,87759E-05	0,30	-1,74
nrfB	1,47135E-07	0,30	-1,75
yjdJ	3,13746E-08	0,30	-1,75
yjdl	5,88718E-12	0,29	-1,76
yagJ	0	0,29	-1,78
yfhL	0	0,29	-1,78
ygeV	2,93057E-09	0,29	-1,78
yjgL	0	0,29	-1,79
dps	1,32114E-10	0,29	-1,80
ydhl	4,5848E-08	0,29	-1,80
rimL	0	0,29	-1,80
bolA	0	0,29	-1,80
yehD	0,000316011	0,29	-1,81
tnaC	0,003304833	0,28	-1,82
acrZ	0	0,28	-1,82
xdhC	0,00015572	0,28	-1,82
ymfD	7,77156E-16	0,28	-1,83
yqgA	4,75577E-05	0,28	-1,83
dnaXa	0	0,28	-1,84
yghW	0,002150529	0,28	-1,84

uspB	1,9984E-15	0,27	-1,86
yagF	0,007411992	0,27	-1,87
yebG	0	0,27	-1,87
ytfI	1,42919E-10	0,27	-1,89
ydhR	0	0,27	-1,89
csiE	7,36089E-12	0,27	-1,90
yjI	3,1593E-05	0,27	-1,91
gcvA	0	0,26	-1,92
ycbJ	4,44089E-16	0,26	-1,92
arpA	3,36849E-06	0,26	-1,92
ydhS	0	0,26	-1,92
yieE	0,001683692	0,26	-1,93
pdeG	3,08675E-12	0,26	-1,94
pagP	2,82394E-10	0,26	-1,94
aroF	0	0,26	-1,94
ansB	4,64442E-08	0,26	-1,96
ompT	9,76574E-12	0,26	-1,96
frmR	2,20084E-10	0,26	-1,97
glgS	5,55977E-11	0,25	-1,99
ygeQ	0	0,25	-1,99
ghoS	5,26883E-09	0,25	-2,00
yraH	0	0,24	-2,03
yqiJ	0	0,24	-2,04
dinD	0	0,24	-2,08
insA-2	0,000455371	0,24	-2,09
insA-3	0,000455371	0,24	-2,09
znuC	0	0,23	-2,09
yfdY	0	0,23	-2,11
nupG	0	0,23	-2,11
gntK	1,44886E-08	0,23	-2,12
uspF	0	0,23	-2,14
yohK	3,10862E-15	0,23	-2,14
yggM	0	0,23	-2,15
dcuC	1,02879E-08	0,22	-2,15
yfcZ	0	0,22	-2,15
bssR	0	0,22	-2,19
cspH	0	0,22	-2,20
tdcA	4,04562E-05	0,22	-2,21
galE	1,93179E-14	0,21	-2,25
mocA	0	0,21	-2,26
ydhY	0,002037284	0,21	-2,26
yqiD	2,58828E-10	0,20	-2,29
sbp	2,22045E-16	0,20	-2,30
dhaM	0,036657363	0,20	-2,31
bhsA	0	0,20	-2,32
hokA	5,53126E-07	0,20	-2,33
ykgH	0,008037142	0,20	-2,35

ykgF	1,36702E-08	0,20	-2,36
bssS	0	0,19	-2,38
galP	0	0,19	-2,40
gadW	0	0,18	-2,49
raiA	1,03639E-12	0,18	-2,50
ghoT	2,09561E-05	0,17	-2,51
uxaB	2,33147E-14	0,17	-2,52
cdd	6,00301E-06	0,17	-2,57
queG	0	0,17	-2,58
cspG	0	0,17	-2,59
tdcB	0,000168954	0,16	-2,60
ymcF	0	0,15	-2,69
cspB	0	0,15	-2,70
ynaM	0	0,15	-2,74
yohJ	0	0,14	-2,79
rrrQ	0,009298216	0,14	-2,85
tdcC	0	0,13	-2,92
yjfN	0	0,13	-2,96
ynaE	0	0,12	-3,01
yagM	2,522E-06	0,12	-3,09
tdcD	3,04397E-08	0,12	-3,09
garK	0,001778422	0,11	-3,18
ypfM	0	0,11	-3,20
pinQ	1,54321E-14	0,11	-3,20
yhaB	4,44089E-16	0,10	-3,27
appY	7,08178E-12	0,10	-3,32
garD	0	0,10	-3,34
gadX	0	0,09	-3,40
ynfT	0	0,09	-3,44
ynfN	2,14273E-14	0,09	-3,47
cspI	0	0,09	-3,50
garR	0	0,08	-3,58
dhaL	0,009292623	0,08	-3,58
ydcH	0	0,08	-3,62
bsmA	0	0,08	-3,70
ydfK	0	0,08	-3,73
pinR	0	0,07	-3,84
ynfR	9,69091E-12	0,06	-3,95
ynfQ	0	0,06	-3,95
gudP	3,1824E-06	0,06	-4,00
essQ	0,004329217	0,04	-4,49
garL	0	0,04	-4,62
garP	0	0,03	-4,86
insH-5	0,022217037	0,03	-5,03
rzoQ	0,0432427	0,02	-5,39

Таблица 3. Список генов с дифференциальной экспрессией в стационарной фазе роста

Ген	P-значение	Кратность изменения (I48S/WT)	log2КИ
htrL	0	0,12	-3,04
cspB	0	0,12	-3,02
ftsI	6,02243E-10	0,13	-3,00
ymfE	0	0,24	-2,08
cspG	1,31973E-07	0,25	-2,01
yjcF	0	0,25	-1,99
ymfD	0	0,25	-1,99
ybfL	0	0,25	-1,98
ybfD	0,002218612	0,27	-1,88
cspA	0	0,28	-1,85
ymgF	1,36367E-05	0,29	-1,80
yibA	0	0,29	-1,78
ymdF	1,75859E-12	0,30	-1,74
ecpR	2,35494E-10	0,31	-1,71
yiaU	0	0,31	-1,69
yibG	6,40467E-07	0,32	-1,66
racR	8,94475E-10	0,32	-1,66
erpA	0	0,33	-1,62
glf	1,37303E-09	0,33	-1,62
ycgH	0	0,33	-1,60
ygeF	3,71331E-08	0,33	-1,60
rpsT	1,44711E-11	0,33	-1,60
cspE	0	0,34	-1,55
ygcW	0,001176447	0,35	-1,52
ygeG	0	0,35	-1,51
waaY	0	0,35	-1,50
sra	2,68691E-07	0,36	-1,49
ybfQ	2,05502E-13	0,36	-1,46
rmf	0	0,37	-1,44
rhoL	0,047782516	0,38	-1,40
rpmJ	0,027031536	0,38	-1,38
yfjW	9,99201E-16	0,39	-1,37
ygeH	0	0,39	-1,35
yjhU	2,76477E-10	0,39	-1,34
yncl	1,29468E-07	0,40	-1,34
cpdA	1,1668E-05	0,40	-1,33
ygeI	0,001085619	0,40	-1,33
yhaB	3,33067E-16	0,40	-1,33
pinQ	0	0,40	-1,33
cspC	3,10917E-07	0,40	-1,31
bluF	0	0,40	-1,31
aspA	0,00010058	0,40	-1,30
yjjZ	0	0,41	-1,30
relB	4,06342E-14	0,41	-1,29

yidL	0,020327663	0,41	-1,29
yjbJ	0	0,41	-1,29
iraM	2,32135E-09	0,41	-1,29
htrE	1,94016E-11	0,41	-1,28
rbsD	1,05471E-13	0,41	-1,28
phoP	1,00267E-09	0,41	-1,27
gabD	0,023221828	0,42	-1,26
yedN	2,02651E-05	0,42	-1,26
yhaC	0	0,42	-1,26
gpmA	0	0,42	-1,25
ydhR	0,005866437	0,42	-1,25
mocA	2,71294E-05	0,42	-1,24
yhiL	0	0,43	-1,22
yeeN	4,79248E-07	0,43	-1,21
ynaE	0,002329466	0,44	-1,18
ydeM	2,74017E-05	0,44	-1,17
waal	1,14885E-05	0,45	-1,16
yqeK	1,19408E-07	0,45	-1,14
yhhH	1,12935E-11	0,45	-1,14
aceB	0	0,46	-1,12
ygaQ	1,04732E-06	0,46	-1,12
entF	1,33915E-10	0,46	-1,12
nlpD	3,82748E-06	0,47	-1,09
yjhB	0,000363235	0,47	-1,08
wbbK	1,34337E-14	0,47	-1,07
yigF	2,31652E-10	0,48	-1,07
ymgC	1,29079E-08	0,48	-1,06
waaS	1,10875E-06	0,48	-1,05
ydfK	3,13155E-08	0,48	-1,05
proC	0,004527027	0,49	-1,04
yhiJ	1,126E-07	0,50	-1,01
waaL	1,9889E-10	0,50	-1,00
yciE	1,6286E-07	0,50	-0,99
bhsA	9,0153E-07	0,51	-0,98
yhiS	0	0,51	-0,97
appY	1,9984E-15	0,51	-0,97
mcrC	0	0,52	-0,95
sdiA	6,59571E-08	0,52	-0,95
cdgI	0	0,52	-0,94
yafQ	0	0,52	-0,94
rpsO	0,000999871	0,53	-0,93
ygaZ	0,035320224	0,53	-0,92
yibJ	0,037550408	0,54	-0,90
pdeG	2,32803E-12	0,54	-0,89
gapC	5,30862E-08	0,54	-0,89
lpp	0	0,54	-0,89
yqiJ	5,84648E-06	0,54	-0,88

yagL	0	0,55	-0,85
aceK	0,00035174	0,55	-0,85
trkG	1,69066E-08	0,55	-0,85
opgG	0	0,56	-0,84
yhhZ	0,000134186	0,56	-0,84
yeeX	9,08972E-05	0,57	-0,82
ssrS	1,848E-07	0,58	-0,79
ypjB	0,000293846	0,58	-0,78
hrpA	0,000637303	0,58	-0,78
ycgX	0,001800708	0,59	-0,77
yrhA	0,000225201	0,59	-0,75
yihF	0,000102444	0,60	-0,74
yjhC	0,000510585	0,60	-0,73
yebV	0,010346225	0,62	-0,69
sxy	0,00222427	0,63	-0,67
rspB	0,000247547	0,63	-0,67
wbbL	0,000772498	0,63	-0,67
yidX	0,041854548	0,63	-0,67
yfgG	0,002553677	0,63	-0,67
yahO	0,012004228	0,64	-0,64
ymfK	2,79771E-08	0,65	-0,62
yaG	0,000130375	0,65	-0,62
raiA	0,000624406	0,65	-0,62
fadE	1,74359E-07	1,56	0,64
fkpA	0,004999538	1,58	0,66
ihfA	6,34554E-06	1,62	0,70
gspO	0,026631839	1,63	0,70
fumC	9,44448E-08	1,70	0,77
lpd	0	1,71	0,77
recA	1,14856E-05	1,75	0,81
yajO	8,92948E-05	1,75	0,81
yhil	0,002889464	1,80	0,85
exuR	0,000541276	1,84	0,88
bssR	1,18905E-11	1,85	0,89
pepA	1,95858E-05	1,87	0,91
phoH	0	1,92	0,94
ydhJ	0,00026237	1,92	0,94
yncJ	0,001709553	1,93	0,95
yoaL	0,01283631	1,93	0,95
pepN	0,000563295	1,95	0,97
mngB	1,79426E-06	2,07	1,05
hmp	0	2,19	1,13
mdtF	0,000133083	2,26	1,18
patA	6,37E-11	2,38	1,25
mtlD	2,10634E-07	2,58	1,37
gadE	1,19959E-10	2,60	1,38
glrR	1,64726E-11	2,69	1,43

yddM	0,000463742	2,76	1,47
yehH	0	2,83	1,50
ptrB	0	2,87	1,52
argH	0,037841144	3,10	1,63
rlhA	0	3,19	1,67
cra	0,019581578	3,38	1,76
lysC	1,91208E-06	3,48	1,80
yoaE	3,94418E-12	3,62	1,86
sutR	0,000130455	3,68	1,88
gabP	7,42902E-05	4,86	2,28
insH-6	0,042859261	5,44	2,44
glsA	2,21071E-05	5,63	2,49