

ГИБЕРНАЦИЯ – СТАДИЯ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ РИБОСОМ

Обзор

© 2020 К.С. Усачев¹, М.М. Юсупов^{1,2*}, Ш.З. Валидов¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008 Казань, Россия;
электронная почта: marat@igbmc.fr

² Институт генетики, молекулярной и клеточной биологии (IGBMC),
67400 Илькириш-Граффенштаден, Франция

Поступила в редакцию 30.07.2020

После доработки 28.08.2020

Принята к публикации 28.08.2020

Эубактерии в ответ на стрессовые условия снижают уровень синтеза белка: разбирают рибосомы на 30S и 50S субъединицы или превращают их в трансляционно неактивные 70S и 100S комплексы. При этом решаются две принципиально важные для клетки задачи: 1) снижение расходов на биосинтез белка в неблагоприятных условиях и 2) консервация функциональных рибосом для быстрого возобновления синтеза белка при восстановлении внешних благоприятных условий. Все известные гены белков сайленсинга или гибернации рибосом располагаются в оперонах, связанных с ответом на голодание, как одним из стрессов, что очевидно помогает координировать замедление синтеза белка и общий ответ на стрессы. Вероятно, системы гибернации могут работать как регуляторы, которые позволяют привести скорость синтеза белка в соответствие с энергетическим состоянием клетки. Учитывая лимитированное количество питательных веществ в естественных условиях и постоянное действие других стрессов на бактериальную клетку, бактериальная рибосома должна проводить большую часть времени в комплексе с белками сайленсинга/гибернации. Таким образом, между стадией рециркуляции и стадией инициации трансляции существует дополнительная стадия, в которой рибосома поддерживается в «консервированном» состоянии в виде субъединиц, нетранслирующих 70S частиц или 100S димеров. Механизм гибернации рибосом консервативен, прошел долгий эволюционный путь и необходим для поддержания энергозатратного и ресурсоемкого процесса биосинтеза белка в организмах, обреченных на жизнь в меняющихся условиях окружающей среды в условиях стресса.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рибосома, трансляция, гибернация, сайленсинг.

DOI: 10.31857/S0320972520110111

СТРЕСС ЯВЛЯЕТСЯ ПОСТОЯННЫМ СПУТНИКОМ ЖИВЫХ КЛЕТОК

Неблагоприятные или стрессовые условия, такие как экстремальные значения температуры и pH, дефицит влаги, гипоксигенация и голодание приводят к замедлению роста микроорганизмов, поскольку в этих условиях ограничено количество питательных веществ и/или количе-

ство доступных доноров и акцепторов электронов, что затрудняет извлечение энергии из субстратов [1]. Вероятно, в природе микроорганизмы постоянно находятся под воздействием тех или иных стрессовых условий, что препятствует их интенсивному размножению, например такому, которое наблюдается в лабораторных средах, где условия близки к идеальным. Однако даже в этих почти идеальных условиях классическое представление о росте культуры микроорганизмов выделяет 6 фаз: логарифмическая фаза, фаза ускорения роста, экспоненциальная фаза, фаза замедления роста, стационарная фаза и фаза отмирания клеток [2]. Стационарная фаза характеризуется остановкой роста культуры и, как и в случае фазы замедления роста, связана, прежде всего, с истощением питательных веществ в среде, то есть с голоданием клеток. В природе большинство микроорганизмов находятся в стадии остановленного роста, что близко к состоянию клеток в фазе замедле-

Принятые сокращения: EF-G – фактор элонгации; HPF – фактор гибернации рибосом, hibernation promoting factor; RaiA – ассоциированный с рибосомами ингибитор A, ribosome associated inhibitor A; RbfA – связывающий рибосому фактор A, ribosome binding factor A; RBS – сайт связывания рибосомы, ribosome binding site; RimM – фактор созревания рибосомы M, ribosome maturation factor M; RimP – фактор созревания рибосомы P, ribosome maturation factor P; RMF – фактор, модулирующий рибосому, ribosome modulating factor; RRF – фактор рециркуляции рибосомы; RsfS – рибосомный сайленсинг-фактор.

* Адресат для корреспонденции.

ния роста и в стационарной фазе и нуждается в значительном энерго- и ресурсосбережении, которое реализуется как общее замедление метаболизма живой клетки [1]. При этом снижается интенсивность всех основных ресурсозатратных и энергоемких процессов – репликация ДНК с остановкой деления клеток [3], снижается уровень транскрипции и изменяется спектр транскрибируемых генов [4], кроме того, значительно снижается интенсивность трансляции и далее поддерживается на низком уровне синтез белка [5]. Хотя данное замедление метаболизма временное и предполагает в будущем возобновление активности клетки при наступлении благоприятных условий, отдельные работы указывают на возможные длительные сроки нахождения в стадии остановленного роста без гибели клеток [6].

Наряду со стрессовыми условиями, которые созданы окружающей средой, существует такое физиологическое состояние бактериальных культур, как биопленка, где снижение интенсивности биологических процессов необходимо для поддержания жизнеспособных клеток при гипоксигенации и меньшей доступности питательных веществ внутри матрикса биопленок [7]. Клетки со сниженной интенсивностью метаболизма, или покоящиеся клетки, часто обнаруживают у патогенных микроорганизмов, находящихся внутри организма хозяина [8]. Вероятно, снижение интенсивности метаболизма необходимо на отдельных стадиях паразитирования, поскольку покоящиеся клетки могут быть незаметны для иммунной системы организма хозяина и даже могут переживать повышение температуры или воздействие антибиотиков, как это показано для золотистого стафилококка, *Staphylococcus aureus* [9]. Необходимость систем голодания показана также для паразитирования в тканях растений: мутанты *Erwinia amylovora* по генам *rpoN* (сигма фактор голодания σ^{54}) и *yhbH* (*hpf*, фактор гибернации рибосом) были неспособны к размножению внутри плодов груши [10]. Таким образом, замедление метаболизма используется клетками бактерий для выживания в окружающей среде и для эффективного паразитирования и заключается в значительном угнетении репликации ДНК, изменениях на уровне транскрипции и снижении трансляционной активности, обеспечивая только небольшой уровень синтеза белка в покоящейся клетке.

СТАДИИ РАБОТЫ РИБОСОМЫ И СИНТЕЗ БЕЛКА

Трансляция – важнейший процесс, являющийся основой жизнедеятельности клетки, во

время которого осуществляется биосинтез белка рибосомой, согласно прочтению генетического кода матричной РНК (мРНК) [11]. Рибосома является крупнейшим рибонуклеопротеиновым комплексом в клетке, который составляет 70S у прокариот [12] и 80S у эукариот [13] и состоит из двух субъединиц: большой (50S – у прокариот и 60S – у эукариот) и малой (30S – у прокариот и 40S – у эукариот). Малая субъединица отвечает за правильное прочтение кода мРНК и кодон/антикодонное взаимодействие с тРНК. Функция большой субъединицы заключается в проведении пептидилтрансферазной реакции (образование пептидной связи в растущей цепи белка). Основными этапами трансляции являются: инициация [14], элонгация [15], терминация [16] и рециркуляция [17] (рис. 1). На стадии инициации происходит ассоциация субъединиц рибосомы на мРНК с позиционированием на старт-кодоне формил-метионил-тРНК в Р-сайте рибосомы. Этому процессу способствуют факторы инициации IF1, IF2 и IF3 [18]. На этапе элонгации с помощью фактора элонгации EF-G и EF-Tu [19] происходит удлинение полипептидной цепи путем связывания amino-ацилированной тРНК (aa-тРНК) в А-сайте рибосомы, согласно коду мРНК [11]. На стадии элонгации функционирует еще один фактор – EF-P, отвечающий за облегчение синтеза полипролиновых мотивов [20]. Делеция гена *efp* не является летальной для большинства эубактерий, однако эукариотический аналог этого белка – eIF5 α , абсолютно необходим для жизнеспособности эукариотической клетки [21]. Когда трансляционный комплекс доходит до стоп-кодона мРНК, наступает этап терминации трансляции, в результате которого с помощью релиз-факторов первого (RF1, RF2) и второго (RF3) классов происходит высвобождение полипептида [16]. Следующая за этим рециркуляция заключается в диссоциации пост-терминационного комплекса (70S, мРНК, тРНК) на субъединицы при совместном воздействии фактора рециркуляции рибосомы (RRF) и EF-G [22]. Считается, что фактор инициации IF3, который связывается с 30S субъединицей, препятствует ассоциации субъединиц рибосомы до следующего этапа инициации [23]. Очевидно, часть 30S и 50S субъединиц могут реассоциировать и образовать вакантную 70S рибосому, которая, впрочем, может связываться с безлидерными РНК и осуществлять синтез белка, минуя стадию инициации [24]. Таким образом, в бактериальной клетке после диссоциации пост-терминационного комплекса рибосомы есть стадия, где присутствуют 30S и 50S субъединицы и может образо-

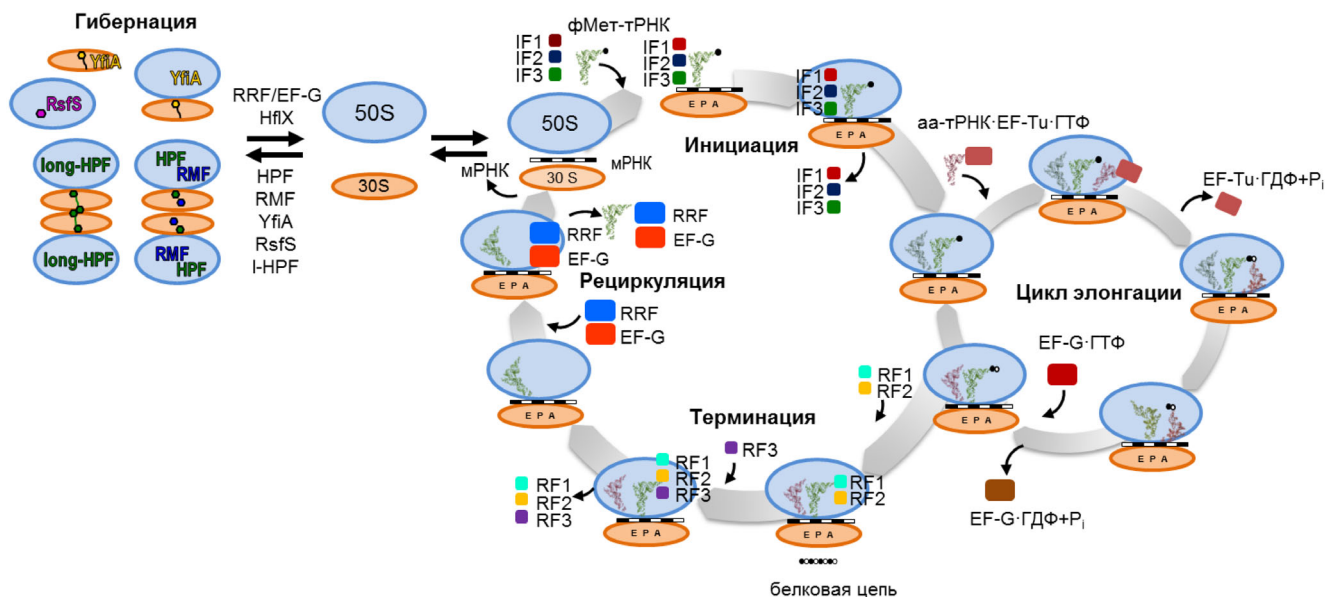


Рис. 1. Биосинтез белка бактерий. (С цветными вариантами рис. 1–3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>.)

ваться вакантная нетранслирующая 70S рибосома, способная взаимодействовать с факторами гибернации.

ФАКТОРЫ ГИБЕРНАЦИИ КАК ОТВЕТ НА СТРЕСС

Голодание клеток, снижение уровня энергетических молекул, которые могут быть вызваны внешними стрессами, требуют также замедления синтеза белка производится специальными факторами, которые блокируют работу рибосомы, непосредственно связываясь с ней [25] (рис. 2). Внимание к системам гибернации было стимулировано фактом обнаружения димеров рибосом в 1960 году. На тот момент было высказано предположение, что димеры являются неактивными комплексами полностью собранных рибосом, которые могут быть использованы в трансляции, что подтверждало появление димеров рибосом в стационарной фазе и их быстрое исчезновение при возобновлении активного роста [26].

RMF (ribosome modulating factor) фактор, модулирующий рибосому. RMF был исторически первым белком, на который обратили внимание, поскольку он производил димеризацию рибосом в клетках *Escherichia coli*, а для регистрации димеров рибосом инструментарий существовал уже начиная с 1960 года [26]. RMF практически отсутствует в логарифмической и значительно накапливается в стационарной фазе рос-

та [32], что и объясняет одновременное появление димеров рибосом.

RMF обнаружен только у представителей γ -протеобактерий, и, возможно, является частью уникальной системы гибернации рибосом, которая сохранила основные принципы действия гибернационных систем, но реализовала это в виде белка, который изменяет конформацию самой рибосомы и стимулирует ее димеризацию. Две молекулы RMF присоединяются к двум свободным 70S частицам, подготавливая их к димеризации, после чего происходит образование 90S димеров. Далее в данный комплекс встраиваются две молекулы фактора гибернации рибосом (HPF), завершая образование 100S рибосомного комплекса, состоящего из двух 70S рибосом (рис. 2, а).

На экспрессию гена *rmf* оказывает влияние CRP (белок-рецептор цАМФ): в его отсутствие синтез RMF значительно снижен [33]. Очевидно, на экспрессию *rmf* также влияет другой алармон — (p)ppGpp [34, 35].

Структурные исследования в гетерологичной системе показали, что RMF (*E. coli*) является небольшим белком размером 55 а.о. (рис. 3), и при реконструкции димеров рибосом *in vitro* он связывается с малой субъединицей 70S рибосомы *Thermus thermophilus* вблизи 3'-конца 16S рРНК в области анти-RBS (Ribosome Binding Site, сайт связывания рибосомы) и стерически препятствует взаимодействию с RBS мРНК [30]. Эти данные были уточнены анализом 100S димеров рибосом, выделенных из клеток *E. coli* в стационарной фазе. Сайт связывания RMF рас-

полагается в полости, образованной белками uS2, uS7, uS9 и bS21, при этом α 1-спираль RMF располагается между спиральями h28 и h37/h40 16S рРНК. Взаимодействию с сахаро-фосфатным остовом 16S рРНК способствует наличие положительно заряженных а.о. (Arg3, Lys5, Arg8, Arg11 и Arg15). Также наблюдается взаимодействие *N*-концевой и *C*-концевой α -спиралей RMF с белком uS7 [27]. RMF облегчает стабилизацию компактной конформации bS1, совместное действие белков препятствует взаимодействию мРНК с анти-RBS, что предотвращает инициацию трансляции. Кроме того, в интерфейсе димеризации *C*-концевой домен uS2 закрывает тоннель входа мРНК, препятствуя ее связыванию [27]. Можно утверждать, что RMF не препятствует инициации непосредственно, поскольку нет сообщений о взаимодействии RMF с отдельными малыми 30S субъединицами рибосомы и их димеризации. Поддержание 70S рибосом в комплексе, возможно, и является препятствием для инициации. Закрывание тоннеля для мРНК может являться инструментом для предотвращения трансляции безлидерных мРНК, которые всё же могут происходить на вакантных 70S рибосомах [24].

HPF и YfiA. Три гибернационных белка – короткий и длинный HPF, а также YfiA – сход-

ны по аминокислотным последовательностям и проявляют значительную структурную гомологию, что может объясняться общностью происхождения (рис. 3). Короткий HPF (95–100 а.о.) встречается у γ -протеобактерий и участвует в образовании 100S димеров вместе с RMF [36]. Длинный вариант HPF (l-HPF, 160–190 а.о.) намного более распространен и встречается у эволюционно далёких видов эубактерий [28, 37, 38] и даже сохранился у пластид в растениях [39]. *N*-концевой домен длинного HPF гомологичен таковому у короткого HPF γ -протеобактерий, а *C*-концевой домен ответственен за димеризацию [40]. *N*-концевой домен YfiA также гомологичен короткому HPF, однако YfiA содержит еще и неструктурированную часть, которая составляет 14–30 а.о. (рис. 3). У γ -протеобактерий присутствуют как короткий HPF, так и YfiA, оба этих белка участвуют в гибернации рибосомы.

Короткий HPF (YhbN). Структура короткого варианта белка HPF представлена двумя α -спиральями и β -листом, состоящим из четырех β -тяжей (рис 3). Встраивание HPF в 90S димер, который был образован присоединением RMF, приводит к образованию 100S димеров рибосом [41] (рис. 2, а). Короткая форма HPF не способна димеризовать рибосому, дополняя функ-

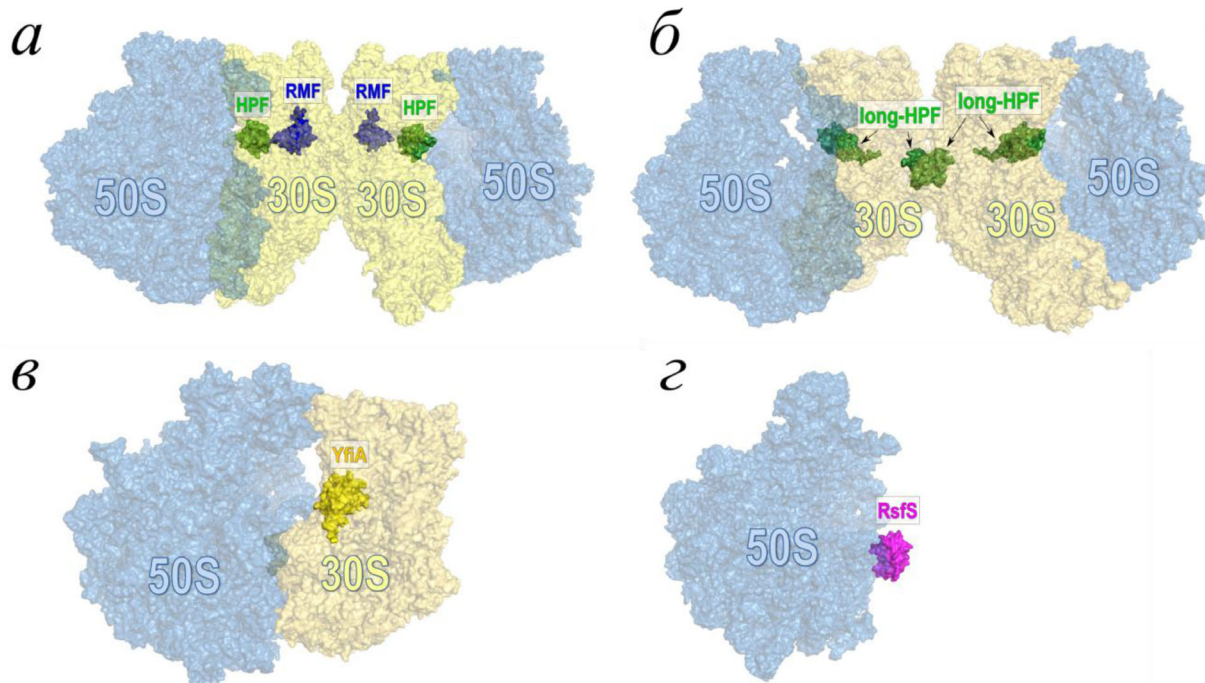


Рис. 2. Структуры комплексов рибосом с факторами гибернации/сайленсинга. а – 100S димер рибосом со связанными факторами RMF и коротким вариантом белка HPF (*Escherichia coli*) [27], б – 100S димер рибосом с длинным вариантом HPF (*S. aureus*) [28, 29], в – комплекс 70S рибосомы с фактором YfiA (*E. coli*) [30], г – комплекс 50S рибосомной субчастицы с фактором RsfS (*S. aureus*) [31]

леотидами антикодоновой петли тРНК, находящейся в Е-сайте. Авторы предполагают, что наличие незагруженной тРНК в Е-сайте рибосомы (что происходит в случае голодания) может стимулировать образование димеров рибосом [27].

Длинный НРФ (I-NRF). Длинный вариант НРФ, в отличие от всех других родственных белков, состоит из двух структурированных доменов (рис. 3). N-концевой домен занимает А- и Р-сайты рибосомы, тогда как С-концевой домен отвечает за димеризацию (рис. 2, б). Два домена связаны между собой небольшим неструктурированным фрагментом размером 30–35 а.о. По своей структуре и функциям N-концевой домен является аналогом короткого НРФ, за счет взаимодействия этого домена I-NRF удерживается в рибосоме, что было доказано в многочисленных экспериментах по реконструкции димеров рибосом в *S. aureus* [28, 29], *Bacillus subtilis* [42], *Lactococcus lactis* [43] и *T. thermophilus* [38]. Как было показано Khusainov et al. [28] N-концевой домен располагается в А- и Р-сайтах рибосомы, перекрывая места связывания гигромицина В, тетрациклина, эдеина, пактамицина и касугомицина и, возможно, защищает рибосому от взаимодействия с этими антибиотиками, что, вероятно, объясняет повышенную устойчивость покоящихся клеток зубактерий к ряду антибиотиков [9, 44]. Также было показано участие С-концевого домена белка I-NRF в димеризации [28, 29, 38, 42, 43] и выдвинуто предположение, что остаток фенилаланина в положении 160 играет ключевую роль в образовании димера белка НРФ [42]. Более детальное исследование строения димера и вклада отдельных а.о. было проведено на изолированном С-концевом домене НРФ *S. aureus*. Было показано, что для димеризации рибосом *in vitro* важны по крайней мере пять гидрофобных а.о.: Phe160, Val162, Ile173, Tyr175 и Leu185 [40].

Ассоциированный с рибосомой ингибитор YfiA (RaiA). Впервые нерибосомный белок (spot Y), расположенный в интерфейсе между субъединицами рибосомы, был обнаружен в 1986 году [45]. Первое сообщение о белке YfiA приводится в работе Link et al. [46], где он упомянут как белок, ассоциированный с рибосомой. Позднее этот же белок был локализован между субъединицами рибосомы и обозначен рУ [47]. Добавление рУ в бесклеточную систему ингибировало синтез белка, что и послужило причиной переименования данного белка в RaiA (ассоциированный с рибосомами ингибитор А, ribosome associated inhibitor А) [48]. Ввиду значительного сходства очень часто при аннотации геномов название RaiA также используется для короткого НРФ и I-NRF, YfiA состоит из N-концевого

домена, который, так же как и короткий НРФ, и N-концевой домен I-NRF, занимает в рибосоме область А- и Р-сайтов, тогда как С-концевая неструктурированная часть, очевидно, располагается на поверхности 30S субъединицы, препятствуя взаимодействию рибосомы с RMF [30] (рис. 2, в, и рис. 3). В системе *E. coli* было показано, что YfiA может взаимодействовать как с 70S рибосомой, так и с малой (30S) субъединицей. Это взаимодействие препятствует инициации трансляции и способствует формированию гибернирующей 70S рибосомы [49].

Рибосомный сайленсинг-фактор RsfS (RsfA, YbeB). В отличие от белков НРФ/RaiA и RMF рибосомный сайленсинг-фактор RsfS широко распространен у зубактерий [50] и даже обнаружен в геномах митохондрий [51]. RsfS является белком стационарной фазы и связывается с белком uL14 на большой (50S) субъединице рибосомы, препятствуя ассоциации субъединиц с формированием 70S инициаторного комплекса, что подавляет синтез белка в стрессовых условиях [52]. Делеционные мутанты *E. coli* по гену *rsfS* демонстрируют снижение адаптации при переходе с богатой среды на бедную и отличаются сниженной жизнеспособностью в стационарной фазе [50]. Детальную модель взаимодействия выявили последние исследования RsfS из *S. aureus* (рис. 2, г, и рис. 3). Поскольку структура uL14 в рибосоме при взаимодействии RsfS с 50S субъединицей, а также в изолированном гетеродимере uL14/RsfS не отличались, то данный гетеродимер был использован для изучения детального взаимодействия белков. В результате была определена структура с разрешением 2,3 Å, что позволило выявить взаимодействующие а.о. белков RsfS и uL14. На основе данных рентгеноструктурного анализа показано, что связывание двух белков опосредуется серией контактов как электростатических, так и гидрофобных. Примечательно, что взаимодействие между аминокислотами, такими как Arg97, Arg107, Lys113 из uL14 и Glu70, Asp81, Tyr98 из RsfS, сохраняется у RsfS из разных бактерий [31].

ЗНАЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ГИБЕРНАЦИИ ДЛЯ ВЫЖИВАНИЯ КЛЕТОК БАКТЕРИЙ

Делеция генов гибернации рибосом не является летальной для бактериальной клетки и практически не влияет на параметры роста культуры в логарифмической фазе. Делеционные мутанты по генам сайленсинга/гибернации уступают дикому типу в жизнеспособности в стационарной фазе, а также при хранении или воздействии стресс-факторов [25]. Снижение

жизнеспособности и более длительная логарифмическая фаза у делеционных мутантов объясняются расходами энергии клетки на биосинтез белка, который не был снижен своевременно, как это происходит в норме при функционировании систем сайленсинга/гибернации.

Долгое время оставалась неясной роль димеризации рибосом, поскольку даже в отсутствие димеризирующей активности 1-HPF эффективно останавливает трансляцию. Недостающие данные были получены при исследовании мутантов *B. subtilis*, где было показано, что делеция гена *hpf* или нарушение механизма димеризации удлиненного варианта HPF приводит к потере белков uS2 и uS3 малой субъединицы рибосомы, которые располагаются в интерфейсе 100S димера [53]. Данные белки наиболее подвержены диссоциации, поскольку включаются в структуру рибосомы на конечной стадии созревания [54, 55], и их потеря приводит к деградации рРНК в рибосомах, не участвующих в трансляции.

Для компенсации данного процесса происходит экспрессия факторов созревания рибосомы RimM, RimP и RbfA, которые связываются с малой субъединицей в А- и Р-сайтах и, так же как и HPF, играют роль шаперонов в сворачивании рРНК, участвуют в формировании и стабилизации центрального псевдоузла 16S рРНК [56–59]. Показано, что у 30S субъединиц рибосом, выделенных из штаммов *E. coli* с делецией генов *rimM* и *rbfA*, наблюдалась потеря белков uS2, uS3 и bS21, это означает, что процесс созревания *in vivo* остановился до того, как данные белки могут связаться с пре-30S субчастицей [58]. Таким образом, повреждение рибосом в делеционных мутантах может быть отчасти компенсировано белками биогенеза рибосомы RimM, RimP и RbfA.

Связывающий рибосому фактор А (RbfA, Ribosome binding factor A) – адаптивный белок холодового шока с молекулярной массой 14,9 кДа, обеспечивающий рост бактерий при низких температурах. Он является представителем большого семейства белков, обозначенного как RBFA, которые встречаются в протеомах большинства архебактерий и эубактерий [60, 61]. Ген *rbfA* необходим для нормального роста клеток при низких температурах (10–20 °С), и его делеция приводит к замедлению роста бактерий. Фактор созревания рибосомы М (RimM, ribosome maturation factor M) – консервативный у большинства эубактерий, отсутствующий у архей и обнаруженный только у четырех видов эукариот белок с молекулярной массой 21 кДа, участвующий в сборке 30S субъединицы рибосомы [62, 63]. Белок состоит из двух доменов с

β-складчатой структурой, соединенных подвижной петлей. По своей структуре N-концевой домен схож с тРНК-связывающим доменом EF-Tu и содержит высоко консервативный мотив GXXG, характерный для белков с КН-доменом и зачастую участвующий во взаимодействии с РНК [64]. С-концевой домен RimM по своей структуре напоминает PRC-бочонок (Photosynthetic reaction center), однако в его составе отсутствует консервативный а.о., отвечающий за регуляцию окислительно-восстановительного процесса во время фотосинтеза [63, 65]. Функция С-концевого домена заключается в обеспечении взаимодействия 3'-домена 16S рРНК с рибосомными белками (в частности uS19) в процессе созревания 30S субъединицы [56, 62, 66]. Фактор созревания рибосомы Р (RimP или YhbC, Ribosome maturation factor P) – высоко консервативный среди прокариот белок с молекулярной массой 41 кДа, участвующий в процессе сборки 30S субъединицы рибосомы и в формировании центрального псевдоузла 16S рРНК. Согласно данным количественного масс-спектрометрического анализа, в *E. coli* фактор RimP способствует связыванию рибосомных белков uS5, uS7 и uS12 с 5'-доменом рРНК *in vitro* [57]. Удаление гена *rimP* приводит к дестабилизации конформации центрального псевдоузла рРНК и накоплению интермедиатов рибосом, у которых отсутствовали белки uS5 и uS12 на стадии созревания [57]. Поскольку в клетках млекопитающих не обнаружен гомолог RimP, данный белок может выступать потенциальной мишенью для разработки антибактериальных препаратов. Интересно, что, согласно последним данным, мутации в гене *rimP* приводят к увеличению восприимчивости к даптомицину метициллин-резистентных штаммов *S. aureus* [67].

ГИБЕРНАЦИЯ И САЙЛЕНСИНГ КАК ОТДЕЛЬНАЯ СТАДИЯ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ РИБОСОМЫ

В условиях стресса клетка снижает уровень синтеза белка до наступления благоприятных условий. В это время избирательно транскрибируются опероны, связанные с голоданием и стресс-ответами вообще [1]. Таким образом, на невысоком уровне, но все же поддерживается синтез белков, в том числе факторов гибернации и сайленсинга, и их относительное количество ко всем остальным белкам может значительно повышаться, так как это показано в стационарной фазе для RMF [32], HPF [68], YfiA [49] и RsfS [50]. Мы предполагаем, что данные

белки связываются с субъединицами или образовавшимися вакантными 70S рибосомами, превращая их в инактивированные комплексы 50S–RsfS [31], 30S–YfiA [49], 70S–YfiA [49] и 100S–HPF или 100S–RMF/HPF [69]. Далее данные комплексы с помощью совместного действия факторов RRF и EF-G или ГТФазы теплового шока HflX могут быть вновь разобраны до 30S и 50S субъединиц [70]. Однако в присутствии белков гибернации RMF, HPF, YfiA и RsfS субъединицы рибосомы, вероятно, вновь образуют неактивные комплексы (рис. 1). Учитывая постоянное состояние голодания и выживания клетки в условиях стрессов [6], стадия гибернации может быть протяженной во времени, возможно, даже превышающей все остальные стадии функционирования рибосом. При устранении давления стрессов профиль транскрипции изменяется, в силу чего количество белков гибернации по сравнению с факторами инициации и элонгации резко снижается, что, вероятно, позволяет рекрутировать большинство субъединиц в инициацию трансляции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Системы гибернации широко представлены среди эубактерий и насчитывают по меньшей мере

ре миллиард лет эволюции, поскольку встречаются также в органеллах эукариотической клетки, что говорит о появлении систем гибернации ещё до симбиотического образования митохондрий и пластид. Длительная инактивация рибосом и их хранение белками гибернации/сайленсинга, вероятно, является самостоятельной стадией функционирования рибосом, обеспечивающей экономию энергии и ресурсов клетки в условиях стрессов, а также сохраняющей синтезирующий белок аппарат для быстрого возобновления синтеза белка при улучшении внешних условий. Без возможности обратимой и контролируемой остановки белок-синтезирующего аппарата поддержание такого энерго- и ресурсоёмкого процесса, как биосинтез белка, было бы невозможно в меняющихся условиях окружающей среды.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-34-70021).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bergkessel, M., Basta, D. W., and Newman, D. K. (2016) The physiology of growth arrest: uniting molecular and environmental microbiology, *Nat. Rev. Microbiol.*, **14**, 549-562, doi: 10.1038/nrmicro.2016.107.
- Monod, J. (1947) Kinetics of bacterial growth, *Nature*, **160**, 105-106.
- Kolter, R., Siegele, D. A., and Tormo, A. (1993) The stationary phase of the bacterial life cycle, *Annu. Rev. Microbiol.*, **47**, 855-874, doi: 10.1146/annurev.mi.47.100193.004231.
- Battesti, A., Majdalani, N., and Gottesman, S. (2011) The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*, *Annu. Rev. Microbiol.*, **65**, 189-213, doi: 10.1146/annurev-micro-090110-102946.
- Gefen, O., Fridman, O., Ronin, I., and Balaban, N. Q. (2014) Direct observation of single stationary-phase bacteria reveals a surprisingly long period of constant protein production activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 556-561, doi: 10.1073/pnas.1314114111.
- Finkel, S. E. (2006) Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype, *Nat. Rev. Microbiol.*, **4**, 113-120, doi: 10.1038/nrmicro1340.
- Williamson, K. S., Richards, L. A., Perez-Osorio, A. C., Pitts, B., McInnerney, K., Stewart, P. S., and Franklin, M. J. (2012) Heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms includes expression of ribosome hibernation factors in the antibiotic-tolerant subpopulation and hypoxia-induced stress response in the metabolically active population, *J. Bacteriol.*, **194**, 2062-2073, doi: 10.1128/JB.00022-12.
- Tan, N. C., Cooksley, C. M., Roscioli, E., Drilling, A. J., Douglas, R., Wormald, P. J., and Vreugde, S. (2014) Small-colony variants and phenotype switching of intracellular *Staphylococcus aureus* in chronic rhinosinusitis, *Allergy*, **69**, 1364-1371, doi: 10.1111/all.12457.
- Tuchscher, L., Medina, E., Hussain, M., Volker, W., Heitmann, V., et al. (2011) *Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection, *EMBO Mol. Med.*, **3**, 129-141, doi: 10.1002/emmm.201000115.
- Ancona, V., Li, W., and Zhao, Y. (2014) Alternative sigma factor RpoN and its modulation protein YhbH are indispensable for *Erwinia amylovora* virulence, *Mol. Plant Pathol.*, **15**, 58-66, doi: 10.1111/mpp.12065.
- Aitken, C. E., Petrov, A., and Puglisi, J. D. (2010) Single ribosome dynamics and the mechanism of translation, *Annu. Rev. Biophys.*, **39**, 491-513, doi: 10.1146/annurev.biophys.093008.131427.
- Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H., and Noller, H. F. (2001) Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution, *Science*, **292**, 883-896, doi: 10.1126/science.1060089.
- Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2011) The

- structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution, *Science*, **334**, 1524-1529, doi: 10.1126/science.1212642.
14. Laursen, B. S., Sorensen, H. P., Mortensen, K. K., and Sperling-Petersen, H. U. (2005) Initiation of protein synthesis in bacteria, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **69**, 101-123, doi: 10.1128/MMBR.69.1.101-123.2005.
 15. Tollerson, R., 2nd, and Ibba, M. (2020) Translational regulation of environmental adaptation in bacteria, *J. Biol. Chem.*, **295**, 10434-10445, doi: 10.1074/jbc.REV120.012742.
 16. Korostelev, A. A. (2011) Structural aspects of translation termination on the ribosome, *RNA*, **17**, 1409-1421, doi: 10.1261/rna.2733411.
 17. Pai, R. D., Zhang, W., Schuwirth, B. S., Hirokawa, G., Kaji, H., Kaji, A., and Cate, J. H. (2008) Structural insights into ribosome recycling factor interactions with the 70S ribosome, *J. Mol. Biol.*, **376**, 1334-1347, doi: 10.1016/j.jmb.2007.12.048.
 18. Simonetti, A., Marzi, S., Jenner, L., Myasnikov, A., Romby, P., Yusupova, G., Klaholz, B. P., and Yusupov, M. (2009) A structural view of translation initiation in bacteria, *Cell. Mol. Life Sci.*, **66**, 423-436.
 19. Nilsson, J., and Nissen, P. (2005) Elongation factors on the ribosome, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **15**, 349-354, doi: 10.1016/j.sbi.2005.05.004.
 20. Huter, P., Arenz, S., Bock, L. V., Graf, M., Frister, J. O., et al. (2017) Structural basis for polyproline-mediated ribosome stalling and rescue by the translation elongation factor EF-P, *Mol. Cell*, **68**, 515-527, doi: 10.1016/j.molcel.2017.10.014.
 21. Golubev, A. A., Validov, S. Z., Usachev, K. S., and Yusupov, M. M. (2019) Elongation factor P: new mechanisms of function and an evolutionary diversity of translation regulation, *Mol. Biol.*, **53**, 501-512, doi: 10.1134/S0026893319040034.
 22. Zhou, D., Tanzawa, T., Lin, J., and Gagnon, M. G. (2020) Structural basis for ribosome recycling by RRF and tRNA, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **27**, 25-32, doi: 10.1038/s41594-019-0350-7.
 23. Seshadri, A., and Varshney, U. (2006) Mechanism of recycling of post-termination ribosomal complexes in eubacteria: a new role of initiation factor 3, *J. Biosciences*, **31**, 281-289, doi: 10.1007/Bf02703921.
 24. Udagawa, T., Shimizu, Y., and Ueda, T. (2004) Evidence for the translation initiation of leaderless mRNAs by the intact 70 S ribosome without its dissociation into subunits in eubacteria, *J. Biol. Chem.*, **279**, 8539-8546, doi: 10.1074/jbc.M308784200.
 25. Prossliner, T., Winther, K. S., Sorensen, M. A., and Gerdes, K. (2018) Ribosome hibernation, *Annu. Rev. Genet.*, **52**, 321-348, doi: 10.1146/annurev-genet-120215-035130.
 26. McCarthy, B. J. (1960) Variation in bacterial ribosomes, *Biochim. Biophys. Acta*, **39**, 563-564.
 27. Beckert, B., Turk, M., Czech, A., Berninghausen, O., Beckmann, R., et al. (2018) Structure of a hibernating 100S ribosome reveals an inactive conformation of the ribosomal protein S1, *Nat. Microbiol.*, **3**, 1115-1121, doi: 10.1038/s41564-018-0237-0.
 28. Khusainov, I., Vicens, Q., Ayupov, R., Usachev, K., Myasnikov, A., et al. (2017) Structures and dynamics of hibernating ribosomes from *Staphylococcus aureus* mediated by intermolecular interactions of HPF, *EMBO J.*, **36**, 2073-2087, doi: 10.15252/embj.201696105.
 29. Matzov, D., Aibara, S., Basu, A., Zimmerman, E., Bashan, A., Yap, M. N. F., Amunts, A., and Yonath, A. E. (2017) The cryo-EM structure of hibernating 100S ribosome dimer from pathogenic *Staphylococcus aureus*, *Nat. Comm.*, **8**, 723, doi: 10.1038/s41467-017-00753-8.
 30. Polikanov, Y. S., Blaha, G. M., and Steitz, T. A. (2012) How hibernation factors RMF, HPF, and YfiA turn off protein synthesis, *Science*, **336**, 915-918, doi: 10.1126/science.1218538.
 31. Khusainov, I., Fatkhullin, B., Pellegrino, S., Bikmullin, A., Liu, W. T., et al. (2020) Mechanism of ribosome shutdown by RsfS in *Staphylococcus aureus* revealed by integrative structural biology approach, *Nat. Commun.*, **11**, 1656, doi: 10.1038/s41467-020-15517-0.
 32. Yamagishi, M., Matsushima, H., Wada, A., Sakagami, M., Fujita, N., and Ishihama, A. (1993) Regulation of the *Escherichia coli* rmf gene encoding the ribosome modulation factor: growth phase- and growth rate-dependent control, *EMBO J.*, **12**, 625-630.
 33. Shimada, T., Yoshida, H., and Ishihama, A. (2013) Involvement of cyclic AMP receptor protein in regulation of the rmf gene encoding the ribosome modulation factor in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **195**, 2212-2219, doi: 10.1128/Jb.02279-12.
 34. Izutsu, K., Wada, A., and Wada, C. (2001) Expression of ribosome modulation factor (RMF) in *Escherichia coli* requires ppGpp, *Genes Cells*, **6**, 665-676, doi: 10.1046/j.1365-2443.2001.00457.x.
 35. Song, S., and Wood, T. K. (2020) ppGpp ribosome dimerization model for bacterial persister formation and resuscitation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **523**, 281-286, doi: 10.1016/j.bbrc.2020.01.102.
 36. Sato, A., Watanabe, T., Maki, Y., Ueta, M., Yoshida, H., Ito, Y., Wada, A., and Mishima, M. (2009) Solution structure of the *E. coli* ribosome hibernation promoting factor HPF: implications for the relationship between structure and function, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **389**, 580-585, doi: 10.1016/j.bbrc.2009.09.022.
 37. Neira, J. L., Giudici, A. M., Hornos, F., Arbe, A., and Rizzuti, B. (2018) The C terminus of the ribosomal-associated protein LrtA is an intrinsically disordered oligomer, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, doi: 10.3390/ijms19123902.
 38. Flygaard, R. K., Boegholm, N., Yusupov, M., and Jenner, L. B. (2018) Cryo-EM structure of the hibernating *Thermus thermophilus* 100S ribosome reveals a protein-mediated dimerization mechanism, *Nat. Commun.*, **9**, 4179, doi: 10.1038/s41467-018-06724-x.
 39. Boerema, A. P., Aibara, S., Paul, B., Tobiasson, V., Kimanius, D., et al. (2018) Structure of the chloroplast ribosome with chl-RRF and hibernation-promoting factor, *Nat. Plants*, **4**, 615-615, doi: 10.1038/s41477-018-0203-0.
 40. Usachev, K. S., Fatkhullin, B. F., Klochkova, E. A., Miftakhov, A. K., Golubev, A. A., et al. (2020) Dimerization of long hibernation promoting factor from *Staphylococcus aureus*: structural analysis and biochemical characterization, *J. Struct. Biol.*, **209**, 107408, doi: 10.1016/j.jmb.2019.107408.
 41. Ueta, M., Yoshida, H., Wada, C., Baba, T., Mori, H., and Wada, A. (2005) Ribosome binding proteins YhbH and YfiA have opposite functions during 100S formation in the stationary phase of *Escherichia coli*, *Genes Cells*, **10**, 1103-1112, doi: 10.1111/j.1365-2443.2005.00903.x.
 42. Beckert, B., Abdelshahid, M., Schafer, H., Steinchen, W., Arenz, S., Berninghausen, O., Beckmann, R., Bange, G., Turgay, K., and Wilson, D. N. (2017) Structure of the *Bacillus subtilis* hibernating 100S ribosome reveals the basis for 70S dimerization, *Embo J.*, **36**, 2061-2072, doi: 10.15252/embj.201696189.

43. Franken, L. E., Oostergetel, G. T., Pijning, T., Puri, P., Arkhipova, V., Boekema, E. J., Poolman, B., and Guskov, A. (2017) A general mechanism of ribosome dimerization revealed by single-particle cryo-electron microscopy, *Nat. Commun.*, **8**, 722, doi: 10.1038/s41467-017-00718-x.
44. McKay, S. L., and Portnoy, D. A. (2015) Ribosome hibernation facilitates tolerance of stationary-phase bacteria to aminoglycosides, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **59**, 6992-6999, doi: 10.1128/AAC.01532-15.
45. Yusupov, M. M., and Spirin, A. S. (1986) Are there proteins between the ribosomal subunits? Hot tritium bombardment experiments, *FEBS Lett.*, **197**, 229-233, doi: 10.1016/0014-5793(86)80332-5.
46. Link, A. J., Robison, K., and Church, G. M. (1997) Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of *Escherichia coli* K-12, *Electrophoresis*, **18**, 1259-1313, doi: 10.1002/elps.1150180807.
47. Agafonov, D. E., Kolb, V. A., Nazimov, I. V., and Spirin, A. S. (1999) A protein residing at the subunit interface of the bacterial ribosome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 12345-12349, doi: 10.1073/pnas.96.22.12345.
48. Agafonov, D. E., Kolb, V. A., and Spirin, A. S. (2001) Ribosome-associated protein that inhibits translation at the aminoacyl-tRNA binding stage, *EMBO Rep.*, **2**, 399-402, doi: 10.1093/embo-reports/kve091.
49. Di Pietro, F., Brandi, A., Dzeladini, N., Fabbretti, A., Carzaniga, T., Piersimoni, L., Pon, C. L., and Giuliodori, A. M. (2013) Role of the ribosome-associated protein PY in the cold-shock response of *Escherichia coli*, *MicrobiologyOpen*, **2**, 293-307, doi: 10.1002/mbo3.68.
50. Hauser, R., Pech, M., Kijek, J., Yamamoto, H., Titz, B., et al. (2012) RsfA (YbeB) proteins are conserved ribosomal silencing factors, *PLoS Genet.*, **8**, e1002815, doi: 10.1371/journal.pgen.1002815.
51. Wanschers, B. F. J., Szklarczyk, R., Pajak, A., van den Brand, M. A. M., Gloerich, J., et al. (2012) C7orf30 specifically associates with the large subunit of the mitochondrial ribosome and is involved in translation, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 4040-4051, doi: 10.1093/nar/gkr1271.
52. Jiang, M., Sullivan, S. M., Walker, A. K., Strahler, J. R., Andrews, P. C., and Maddock, J. R. (2007) Identification of novel *Escherichia coli* ribosome-associated proteins using isobaric tags and multidimensional protein identification techniques, *J. Bacteriol.*, **189**, 3434-3444, doi: 10.1128/Jb.00090-07.
53. Feaga, H. A., Kopylov, M., Kim, J. K., Jovanovic, M., and Dworkin, J. (2020) Ribosome dimerization protects the small subunit, *J. Bacteriol.*, **202**, e00009-20, doi: 10.1128/JB.00009-20.
54. Traub, P., and Nomura, M. (1968) Structure and function of *E. coli* ribosomes. V. Reconstitution of functionally active 30S ribosomal particles from RNA and proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **59**, 777-784, doi: 10.1073/pnas.59.3.777.
55. Mulder, A. M., Yoshioka, C., Beck, A. H., Bunner, A. E., Milligan, R. A., Potter, C. S., Carragher, B., and Williamson, J. R. (2010) Visualizing ribosome biogenesis: parallel assembly pathways for the 30S subunit, *Science*, **330**, 673-677, doi: 10.1126/science.1193220.
56. Nord, S., Bhatt, M. J., Tukenmez, H., Farabaugh, P. J., and Wikstrom, P. M. (2015) Mutations of ribosomal protein S5 suppress a defect in late-30S ribosomal subunit biogenesis caused by lack of the RbfA biogenesis factor, *RNA*, **21**, 1454-1468, doi: 10.1261/rna.051383.115.
57. Sashital, D. G., Greeman, C. A., Lyumkis, D., Potter, C. S., Carragher, B., and Williamson, J. R. (2014) A combined quantitative mass spectrometry and electron microscopy analysis of ribosomal 30S subunit assembly in *E. coli*, *Elife*, **3**, e04491, doi: 10.7554/eLife.04491.
58. Clatterbuck Soper, S. F., Dator, R. P., Limbach, P. A., and Woodson, S. A. (2013) *In vivo* X-ray footprinting of pre-30S ribosomes reveals chaperone-dependent remodeling of late assembly intermediates, *Mol. Cell*, **52**, 506-516, doi: 10.1016/j.molcel.2013.09.020.
59. Wilson, D. N., and Nierhaus, K. H. (2007) The weird and wonderful world of bacterial ribosome regulation, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **42**, 187-219, doi: 10.1080/10409230701360843.
60. Huang, Y. J., Swapna, G. V., Rajan, P. K., Ke, H., Xia, B., Shukla, K., Inouye, M., and Montelione, G. T. (2003) Solution NMR structure of ribosome-binding factor A (RbfA), a cold-shock adaptation protein from *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.*, **327**, 521-536, doi: 10.1016/s0022-2836(03)00061-5.
61. Rubin, S. M., Pelton, J. G., Yokota, H., Kim, R., and Wemmer, D. E. (2003) Solution structure of a putative ribosome binding protein from *Mycoplasma pneumoniae* and comparison to a distant homolog, *J. Struct. Funct. Genom.*, **4**, 235-243, doi: 10.1023/b:jsfg.0000016127.57320.82.
62. Lovgren, J. M., Bylund, G. O., Srivastava, M. K., Lundberg, L. A., Persson, O. P., Wingsle, G., and Wikstrom, P. M. (2004) The PRC-barrel domain of the ribosome maturation protein RimM mediates binding to ribosomal protein S19 in the 30S ribosomal subunits, *RNA*, **10**, 1798-1812, doi: 10.1261/rna.7720204.
63. Leong, V., Kent, M., Jomaa, A., and Ortega, J. (2013) *Escherichia coli* rimM and yjeQ null strains accumulate immature 30S subunits of similar structure and protein complement, *RNA*, **19**, 789-802, doi: 10.1261/rna.037523.112.
64. Grishin, N. V. (2001) KH domain: one motif, two folds, *Nucleic Acids Res.*, **29**, 638-643, doi: 10.1093/nar/29.3.638.
65. Anantharaman, V., and Aravind, L. (2002) The PRC-barrel: a widespread, conserved domain shared by photosynthetic reaction center subunits and proteins of RNA metabolism, *Genome Biol.*, **3**, RESEARCH0061, doi: 10.1186/gb-2002-3-11-research0061.
66. Guo, Q., Goto, S., Chen, Y., Feng, B., Xu, Y., Muto, A., Himeno, H., Deng, H., Lei, J., and Gao, N. (2013) Dissecting the *in vivo* assembly of the 30S ribosomal subunit reveals the role of RimM and general features of the assembly process, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 2609-2620, doi: 10.1093/nar/gks1256.
67. Berti, A. D., Shukla, N., Rottier, A. D., McCrone, J. S., Turner, H. M., Monk, I. R., Baines, S. L., Howden, B. P., Proctor, R. A., and Rose, W. E. (2018) Daptomycin selects for genetic and phenotypic adaptations leading to antibiotic tolerance in MRSA, *J. Antimicrob. Chemother.*, **73**, 2030-2033, doi: 10.1093/jac/dky148.
68. Yoshida, H., and Wada, A. (2014) The 100S ribosome: ribosomal hibernation induced by stress, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **5**, 723-732, doi: 10.1002/wrna.1242.
69. Ueta, M., Wada, C., Daifuku, T., Sako, Y., Bessho, Y., et al. (2013) Conservation of two distinct types of 100S ribosome in bacteria, *Genes Cells*, **18**, 554-574, doi: 10.1111/gtc.12057.
70. Basu, A., Shields, K. E., and Yap, M. F. (2020) The hibernating 100S complex is a target of ribosome-recycling factor and elongation factor G in *Staphylococcus aureus*, *J. Biol. Chem.*, **295**, 6053-6063, doi: 10.1074/jbc.RA119.012307.

HIBERNATION AS A STAGE OF RIBOSOME FUNCTIONING**Review****K. S. Usachev¹, M. M. Yusupov^{1,2*}, and Sh. Z. Validov¹**¹ *Kazan Federal University, 420008 Kazan, Russia; E-mail: marat@igbmc.fr*² *Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology (IGBMC), 67400 Illkirch-Graffenstaden, France*

Received July 30, 2020

Revised August 28, 2020

Accepted August 28, 2020

In response to stress, eubacteria reduce the level of protein synthesis and either disassemble ribosomes into the 30S and 50S subunits or turn them into translationally inactive 70S and 100S complexes. This helps the cell to solve two principal tasks: (i) to reduce the cost of protein biosynthesis under unfavorable conditions, and (ii) to preserve functional ribosomes for rapid recovery of protein synthesis until favorable conditions are restored. All known genes for ribosome silencing factors and hibernation proteins are located in the operons associated with the response to starvation as one of the stress factors, which helps the cells to coordinate the slowdown of protein synthesis with the overall stress response. It is possible that hibernation systems work as regulators that coordinate the intensity of protein synthesis with the energy state of bacterial cell. Taking into account the limited amount of nutrients in natural conditions and constant pressure of other stress factors, bacterial ribosome should remain most of time in a complex with the silencing/hibernation proteins. Therefore, hibernation is an additional stage between the ribosome recycling and translation initiation, at which the ribosome is maintained in a “preserved” state in the form of separate subunits, non-translating 70S particles, or 100S dimers. The evolution of the ribosome hibernation has occurred within a very long period of time; ribosome hibernation is a conserved mechanism that is essential for maintaining the energy- and resource-consuming process of protein biosynthesis in organisms living in changing environment under stress conditions.

Keywords: ribosome, translation, hibernation, silencing