

УДК 577.322.9

СБОРКА КОМПЛЕКСА 30S СУБЪЕДИНИЦЫ РИБОСОМЫ И ФАКТОРА RbfA *S. aureus in vitro* ДЛЯ СТРУКТУРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ*

© 2020 А.Г. Бикмуллин^{1**}, Л.И. Нуруллина¹, Н.С. Гараева¹, Э.А. Ключкова¹,
Д.С. Блохин¹, А.А. Голубев^{1,2}, Ш.З. Валидов¹,
И.Ш. Хусаинов^{1,2,3}, К.С. Усачев^{1**}, М.М. Юсупов^{1,2**}

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008 Казань, Россия;
электронная почта: aydar.bikmullin@gmail.com; konstantin.usachev@kpfu.ru; marat@igbmc.fr

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

³ Институт биофизики им. Макса Планка, 60438 Франкфурт-на-Майне, Германия

Поступила в редакцию 05.12.2019

После доработки 17.02.2020

Принята к публикации 14.03.2020

Связывающий рибосому фактор RbfA из золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*) является белком холодовой адаптации и требуется для роста патогенных клеток при пониженных температурах (10–15 °С). RbfA участвует в процессинге 16S рРНК, а также в сборке и стабилизации малой 30S субъединицы рибосомы. Изучение структуры и функции RbfA, структуры комплекса фактора с малой субъединицей, а также механизма их связывания поможет лучше разобраться в деталях такого сложного и фундаментального процесса, как сборка 30S субъединицы рибосомы, определяющего и контролирующего общий уровень биосинтеза белка в целом. В работе описаны протоколы получения фактора RbfA и малых субъединиц рибосом *S. aureus*, а также оптимизированный протокол сборки и очистки комплекса 30S субъединицы и фактора RbfA для дальнейших структурных исследований методом криоэлектронной микроскопии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *Staphylococcus aureus*, рибосома, криоэлектронная микроскопия, RbfA, фактор трансляции, сборка 30S субъединицы рибосомы.

DOI: 10.31857/S0320972520050036

ВВЕДЕНИЕ

Золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) в настоящее время является одним из самых распространенных и опасных патогенных микроорганизмов. Эти грамположительные бактерии вызывают множество больничных и внебольничных заболеваний дыхательных путей и кожных покровов человека. Основным методом борьбы с патогеном является антибиотикотерапия, однако ее эффективность постоянно снижается за счет прогрессирующей резистентности стафилококка к используемым против него антибиотикам. Существуют штаммы *S. aureus*, такие как, например, метициллин-устойчивый золотистый стафилококк (methicillin-

resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA), имеющие множественную устойчивость к антибиотикам последних классов [1–5].

Ключевым элементом абсолютно любой живой клетки, контролирующим общий уровень её жизнедеятельности, является рибосома. Количество рибосом и их функциональная активность определяют общий уровень синтеза белка на каждом этапе нормального развития клетки и в стрессовых условиях [6].

Рибосома – это макромолекулярный РНК-белковый комплекс, сборка которого является сложным процессом, включающим в себя сопряженные этапы биосинтеза рРНК и белков большой и малой субъединиц, их модификаций, корректного сворачивания и связывания друг с другом. Процесс этот строго консервативен и жестко регулируется на уровне синтеза молекул рРНК, а также зависит от доступности этих молекул в клетке. Образование рибосомальных субъединиц также зависит от скорости роста клеток. Ошибки на этапах сборки снижают об-

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM19-314, 27.04.2020.

** Адресат для корреспонденции.

ший уровень метаболизма и могут быть даже фатальными для микроорганизмов [7]. Сборка рибосомы и ее работа на различных этапах жизнедеятельности регулируется специальными белковыми факторами, нарушая работу которых возможно управлять биосинтезом белка, включать или выключать его. Некоторые факторы работают постоянно, ряд факторов активизируется только в условиях стресса [8]. Одним из таких факторов является связывающий рибосому фактор RbfA (ribosome-binding factor A) – белок холодовой адаптации, необходимый для роста клеток при низкой температуре (10–15 °С). RbfA имеет сродство к 30S субъединице рибосомы и необходим для её «созревания» – фактор требуется для эффективного процессинга 16S рРНК (способствует корректной конформации спирали h1). Также предполагается, что фактор участвует в стабилизации малой субъединицы и после созревания 16S рРНК, взаимодействуя с её 5'-концом. В *Arbfa* штаммах *Escherichia coli* наблюдается уменьшение активных 70S рибосом (увеличение количества отдельных субъединиц), а также увеличение количества молекул 17S рРНК – предшественников 16S рРНК. Белки семейства RbfA встречаются у большинства эу- и археобактерий, а также в хлоропластах растений и митохондриях высших организмов, в том числе и человека. RbfA *S. aureus* – это небольшой белок, состоящий из 115 аминокислотных остатков, с молекулярной массой ~14 кДа [9–13].

Биосинтез рибосомы является одним из самых фундаментальных процессов во всем живом. Исследование частных деталей процесса сборки рибосомы и их субъединиц в патогенных для человека золотистых стафилококках позволит получить больше информации об этом сложном процессе в целом, а также позволит узнать больше о том, как функционирует сама рибосома. Изучение структуры комплекса малой субъединицы рибосомы и связывающего рибосому фактора RbfA *S. aureus* позволит определить локализацию фактора на субъединице и описать механизм их связывания, т.е. лучше понять этап созревания малой субъединицы и образование инициаторного комплекса трансляции.

Криоэлектронная микроскопия сегодня, наряду со спектроскопией ядерного магнитного резонанса и рентгеноструктурным анализом, является одним из наиболее информативных методов в молекулярной и структурной биологии. С ее помощью возможно получать разрешение выше 2 Å. Главной особенностью этого типа микроскопии является то, что макромолекулы фиксируются в нативном состоянии за счет мо-

ментального замораживания в жидком этане или смеси этана и пропана [14–17].

С развитием криоэлектронной микроскопии значительно расширился спектр рибосомальных комплексов для структурных исследований, в том числе и рибосом бактерий [18–21]. Эти исследования показали, что, несмотря на структурную гомологию рибосом различных бактерий, их оптимум ионных условий и концентрации ионов Mg^{2+} для поддержания правильной конформации *in vitro* отличаются. Особенно это касается отдельных изолированных рибосомальных субъединиц, которые в отсутствие стабилизирующих контактов между субъединицами (т.н. межсубъединичных мостиков, intersubunit bridges) наиболее подвержены структурным искажениям, особенно в области интерфейса. При этом малая субъединица наиболее хрупкая и зачастую деформируется в области шейки – элемента, поддерживающего ориентацию головки относительно тела 30S частицы. Подобная подвижность субъединицы вносит не только искажения в конечную структуру, но и значительно увеличивает гетерогенность образца. Таким образом, подбор оптимальных условий очистки и стабилизации 30S субъединиц и комплекса 30S–RbfA является необходимым и важным условием пробоподготовки для дальнейшего структурного анализа.

В данной статье мы представляем оптимизированный метод сборки и очистки комплекса фактора RbfA и малой рибосомальной субъединицы *S. aureus* для дальнейшего анализа методом криоэлектронной микроскопии. Были получены образцы фактора RbfA и 30S субъединиц *S. aureus* высокой степени чистоты, затем проводили их связывание и дополнительную аффинную очистку для увеличения в конечном образце доли 30S субъединиц, связанных с фактором. В дальнейшем данная методика может быть применена к множеству белков, связывающихся с малой субъединицей рибосомы *S. aureus*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В работе были использованы реактивы: ИПТГ, спермидин, канамицин, хлорамфеникол («Euromidex», Франция); LB, LB agar («Invitrogen», США); коктейль ингибиторов эндогенных протеаз («Roche», Швейцария); NiNTA-сорбент Superflow («QIAGEN», Германия) и БСА («Helicon», Россия). Остальные реактивы были классифицированы как ЧДА, ХЧ и Ос.Ч.

Получение фактора RbfA *S. aureus*. Ген фактора RbfA *S. aureus* был амплифицирован из хро-

мосомной ДНК с введением рестрикционных сайтов NdeI и HindIII. Были использованы следующие специфичные прямой (5'-TTTTTTC-ATATGAGCAGTATGAGCAGAGCG-3') и обратный (5'-TTTTTTAAGCTTATCTATCTTG-TTTGTGTAATCTTGAATCA-3') праймеры («Евроген», Россия). Температурный режим полимеразной цепной реакции (ПЦР), а также состав реакционной смеси подбирали в соответствии с температурой отжига праймеров (59 °C) и по протоколу коммерческого фермента для ПЦР Phusion Green High-Fidelity DNA Polymerase («Thermo Scientific», США).

Обработка ПЦР фрагментов и плазмиды pET28a соответствующими рестриктазами, очистка ДНК-компонентов и их лигирование проводили согласно протоколам коммерческих ферментов NdeI, HindIII и наборов GeneJet Gel Extraction Kit, T4 DNA Ligase Kit. Затем проводили трансформацию лигазной смеси в штамм *E. coli* DH5 α и выделение вектора с помощью коммерческого набора GenJet Plasmid MiniPrep. В результате нами был получен вектор RbfA_Sa::pET28a, несущий ген фактора RbfA с 6 гистидинами на N-конце (гис-таг) под контролем LacI^q промотора. На всех этапах клонирования использовали ферменты и коммерческие наборы производства «Thermo Fisher Scientific», США.

Экспрессию фактора проводили в штамме *E. coli* BL21 (DE3, pLysS) на селективной богатой питательной среде LB, содержащей канамицин и хлорамфеникол. Рост клеток осуществляли при температуре 37 °C и скорости качания 180 об./мин на шейкере-инкубаторе «Inforce HT» («Inforce», Германия). При достижении поглощения OD₆₀₀ = 0,6 производили индукцию экспрессии фактора RbfA путем добавления ИПТГ (изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид) до конечной концентрации 1 мМ. Экспрессию проводили в течение 6 ч при температуре 30 °C и скорости качания 180 об./мин. Затем клетки осаждали центрифугированием («Beckman», США), замораживали и хранили при температуре –20 °C.

После разморозки разрушение клеток осуществляли за счет эндогенного T7 лизоцима (pLysS) на ультразвуковом гомогенизаторе HD2070 («Bandelin», Германия) в присутствии ингибиторов эндогенных протеаз, в том числе и металлопротеаз, в базовом буфере 1 для NiNTA-хроматографии (состав см. далее). Осаждение нерастворимой фазы клеточного лизата производили последовательно методом центрифугирования при 25 000 g в течение 30 мин и 100 000 g в течение 45 мин на центрифугах «Beckman» (США) – Avanti JXN-26 (ротор JA-25.50) и Optima XPN (ротор 45Ti) соответственно.

Очистка RbfA. Очистку RbfA из супернатанта лизата производили последовательно методами металл-хелатной аффинной хроматографии и гель-фильтрации. Аффинную хроматографию на NiNTA-сорбенте проводили в буфере 1 (20 мМ Tris-HCl, pH 7,6; 0,5 М NH₄Cl; 1 мМ ДТТ) с промежуточной отмывкой буфером 2 (20 мМ Tris-HCl, pH 7,6; 1 М NH₄Cl; 1 мМ ДТТ), буфером 3 (20 мМ Tris-HCl, pH 7,6; 0,5 М NH₄Cl; 20 мМ имидазол; 1 мМ ДТТ) и элюцией буфером 4 (20 мМ Tris-HCl, pH 7,6; 0,5 М NH₄Cl; 0,3 М имидазол; 1 мМ ДТТ). Затем проводили осаждение белка сульфатом аммония (80%, w/v) [22].

Гель-фильтрацию проводили с помощью хроматографической системы NGC Discover («BioRad», США) на колонке Enrich Sec70 («BioRad», США) в буфере следующего состава: 50 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 6,8; 0,25 М NH₄Cl. Чистоту полученного образца оценивали с помощью денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в Tris-глициновом буферном растворе, pH 8,3 (25 мМ Tris-буфер; 250 мМ глицин; 0,1% додецилсульфат натрия), при температуре 20 °C и рабочем напряжении 140 V.

Получение 70S рибосом *S. aureus*. 70S рибосомы *S. aureus* были получены согласно протоколу, разработанному в Институте генетики, молекулярной и клеточной биологии (Страсбург, Франция) [23]. 30S субъединицы были получены путем диссоциации 70S рибосом в градиенте сахарозы (0–30%) в буфере D (30 мМ NH₄Cl; 1 мМ MgOAc; 10 мМ Hepes-K, pH 7,5; 1 мМ ДТТ) на ультрацентрифуге Optima XPN-80 («Beckman Coulter», США) на роторе SW28 при скорости 20 550 об./мин в течение 16 ч при температуре 4 °C. Фракции градиента, содержащие малые субъединицы рибосом, были объединены и сконцентрированы на спин-центриконах Amicon Ultra («Merck Millipore», Ирландия) (размер пор 100 кДа) с заменой буфера градиента на буфер G (10 мМ NH₄Cl; 10 мМ MgOAc; 10 мМ Hepes-K, pH 7,5; 50 мМ KCl; 1 мМ ДТТ; 2,5 мМ спермидина). Чистоту рибосом и субъединиц также оценивали с помощью денатурирующего электрофореза в ПААГ (условия аналогичны анализу проб после гель-фильтрации) и электрофореза в агарозном геле с бромистым этидием (0,8% агарозный гель; буфер TBE, pH 8,0 (89 мМ Tris-буфер; 89 мМ борная кислота; 2 мМ EDTA); 0,5 мкг/мл бромистый этидий; 20 °C; рабочее напряжение 180 V).

Получение и очистка комплекса 30S—RbfA. К 90 мкл смеси 30S субъединиц в буфере G были добавлены 10 мкл фактора RbfA разной концентрации в фосфатном буфере так, чтобы соотно-

шение 30S : RbfA было равно 1 : 1, 1 : 5 и 1 : 10. Реакционную смесь для сборки комплекса инкубировали в течение 40 мин при температуре 37 °С.

Очистку комплекса от не связавшихся с белком 30S субъединиц производили при помощи NiNTA-сорбента в буферных условиях сборки. Объем сорбента был равен объему реакционной смеси (100 мкл). После нанесения смеси NiNTA-сорбент был промыт буфером G объемом в десять раз превышающим объем сорбента. Элюцию проводили последовательно элюирующими буферами, содержащими 100, 150 и 200 мМ имидазола в объеме, превышающем объем сорбента в 3 раза. В качестве контроля на сорбент также наносили свободные 30S субъединицы без фактора RbfA, их отмывку и элюцию проводили аналогично опыту с комплексом.

Для дальнейшего анализа были отобраны первые 5, 10-я и 20-я фракции отмывки и первые 6 фракций элюции. Объем фракции составлял 50 мкл. Анализировали оптическое поглощение отобранных фракций при длинах волн 260 нм и 280 нм (максимумы поглощения нуклеиновых кислот и белков соответственно). Также эти фракции были исследованы методами белкового ПААГ-электрофореза в денатурирующих условиях и электрофореза нуклеиновых кислот в агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Условия электрофоретических исследований были аналогичны описанным ранее при анализе белковых проб после гель-фильтрации и субъединиц после диссоциации рибосом.

Фракции, содержащие комплекс, сразу замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80 °С. Транспортировку образцов осуществляли при низких температурах в сухом льду. Разморозку образцов проводили непосредственно перед криомикроскопическими исследованиями.

Вестерн-блот. Для дополнительной качественной идентификации фактора RbfA в полученном образце комплекса после NiNTA-очистки был проведен вестерн-блот фракции элюции с максимальным значением оптического поглощения с коммерческим набором вторичных хемилюминесцентных антител к гис-тагу «HisProbe™-HRP» («Thermo Scientific», США). В набор антител также входили растворы реагента и субстрата для хемилюминесцентной ферментативной реакции. Вестерн-блот проводили по протоколу коммерческого набора при комнатной температуре. Сначала был проведен ПААГ-электрофорез в денатурирующих условиях фракции элюции, а также свободных 30S субъединиц и очищенного RbfA в качестве

контролей. Условия электрофореза были аналогичны проведенным ранее. Перенос белков с 15%-го ПААГ на мембрану из поливинилиденфторида (ПВДФ, 0,45 мкм, «BioRad», США) производили в трансфер буфере (25 мМ Tris-HCl, pH 8,3; 190 мМ глицина; 20% метанола (v/v)) на блот-системе полусухого переноса Trans-Blot SEMI-DRY («BioRad», США) при напряжении 17 V в течение 40 мин. Блокирование неспецифического связывания проводили в 20% растворе бычьего сывороточного альбумина (БСА) в ТБСТ буфере (25 мМ Tris-HCl, pH 7,2; 150 мМ NaCl; 0,05% (w/v) Tween 20) при качании в течение 1 ч. После двукратной отмывки буфером ТБСТ следовала инкубация с антителами при качании в течение 1 ч. После промывки буфером ТБСТ следовала активация антител, связавшихся с белком, в смеси коммерческих растворов субстрата и реагента хемилюминесцентной ферментативной реакции (1 : 1). Обнаружение свечения антител, связавшихся с гис-тагом рекомбинантного фактора RbfA, производили при помощи системы гель-документирования ChemiDoc MP («BioRad», США).

Оценка качества полученного образца комплекса 30S–RbfA. Оценку качества полученного образца комплекса малой субъединицы рибосомы и фактора RbfA производили на электронном микроскопе Titan Krios («Thermo Fisher», США) в Институте генетики, молекулярной и клеточной биологии (Страсбург, Франция). После разморозки на льду образец наносили на покрытые углеродом подложки с помощью прибора Vitrobot («FEI company/Thermo Fisher», США) при температуре 4 °С и относительной влажности 100%. После «вымачивания» в течение 30 с подложки замораживали в жидком этане. Визуализацию проводили с использованием детектора Falcon 3 («FEI company/Thermo Fisher», США) при увеличении 75 000 раз (соответствующее физическому размеру пикселя 0,85 Å/pix), дефокусе – 3 мкм и общей дозе 60 e/Å².

Связывание RbfA с большой субъединицей рибосомы. Также для подтверждения специфичности связывания фактора RbfA с малой субъединицей рибосомы был проведен эксперимент по связыванию RbfA с большой субъединицей. Условия связывания фактора с 50S субъединицей (50S : RbfA = 1 : 10), а также анализ проб после NiNTA-очистки были аналогичны связыванию его с 30S. Элюцию проводили при концентрации имидазола 100 мМ. В качестве контроля параллельно проводили эксперимент по нанесению на NiNTA-сорбент свободных 50S субъединиц без фактора RbfA. Их отмывку и элюцию проводили аналогично опыту с комплексом. Полученные после элюции образцы анализируют

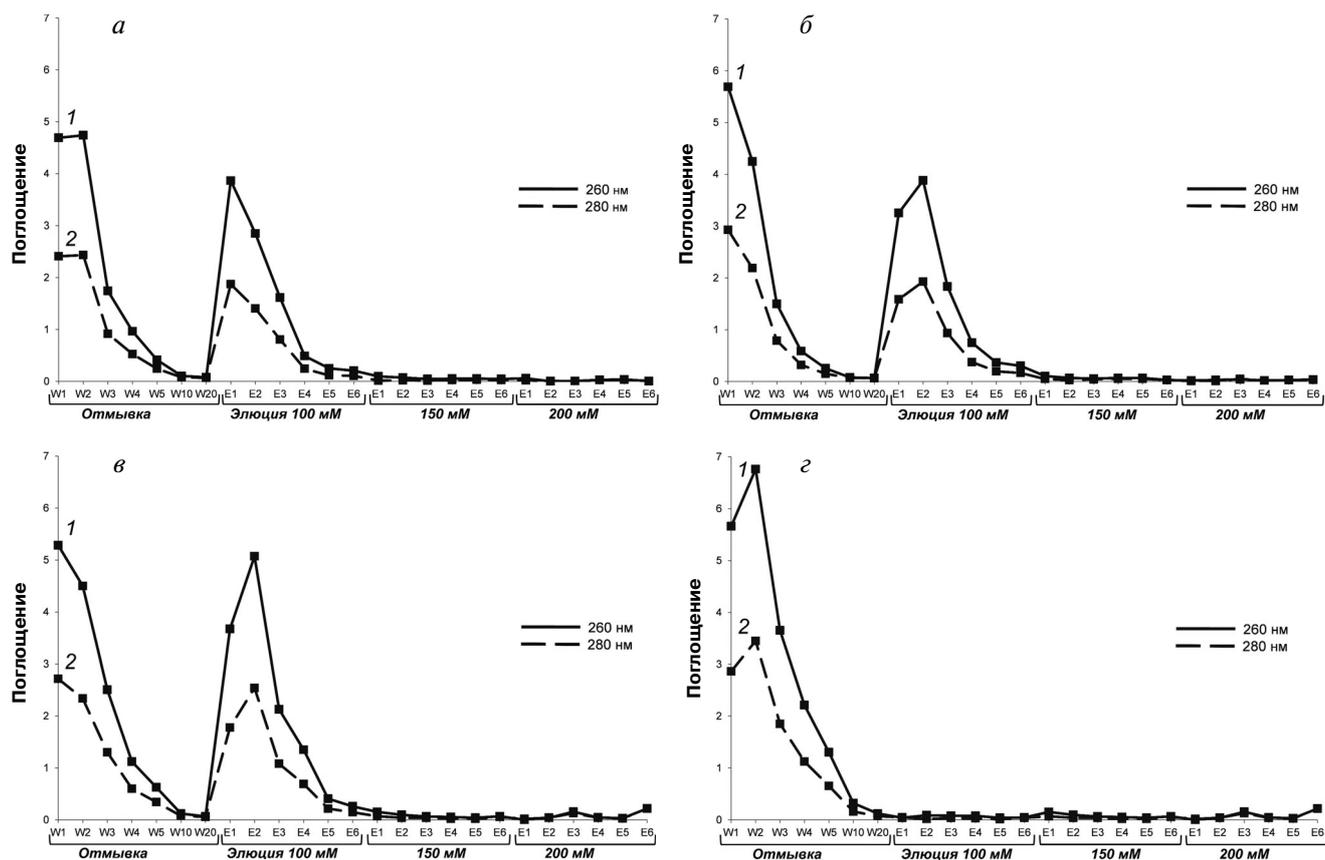


Рис. 1. Оптическое поглощение при 260 нм (1) и 280 нм (2) фракций NiNTA-очистки комплекса 30S–RbfA при соотношении 30S : RbfA = 1 : 1 (а), 1 : 5 (б), 1 : 10 (в) и свободных 30S субъединиц рибосом (г). W1–W20 – фракции отмывки, E1–E6 – фракции элюции при 100 мМ, 150 мМ и 200 мМ имидазола

вали с помощью ПААГ-электрофореза в денатурирующих условиях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения комплекса малой субъединицы рибосомы и фактора RbfA была выбрана следующая стратегия: *in vitro* инкубировали малые субъединицы рибосомы и молекулы фактора RbfA при физиологически нормальной для *S. aureus* температуре 37 °С в буферном растворе G, имеющем наиболее оптимальный для рибосом состав, при молярном соотношении субъединиц и молекул фактора: 1 : 1, 1 : 5 и 1 : 10.

Общий объем реакционной смеси составил 100 мкл. Стабильность малой субъединицы рибосомы сильно зависит от буферных условий, а именно от концентрации ионов Mg^{2+} в растворе. При добавлении фактора RbfA в фосфатном буфере к 30S субъединицам происходит разведение буфера G, в котором они находятся, соответственно концентрация ионов Mg^{2+} в объеме уменьшается. Разведение итогового объема ре-

акционной смеси на 10% и менее не критично для стабильности субъединицы рибосомы [24]. Поэтому к 90 мкл 30S субъединиц в буфере G мы добавляли 10 мкл раствора фактора RbfA в фосфатном буфере.

По литературным данным [9], RbfA связывается с 30S субъединицей в области декодирующего центра, при этом C-терминальный конец белковой молекулы связывается с кором субъединицы. Связывающийся с NiNTA-сорбентом гис-таг находится на N-конце фактора. Таким образом, теоретически RbfA должен своим N-концом связаться с NiNTA-сорбентом, удерживая при этом C-концом субъединицу рибосомы. Эти факты делают возможной очистку полученного образца комплекса 30S–RbfA от не связавшихся с фактором субъединиц с помощью NiNTA-сорбента.

В качестве контрольного эксперимента на сорбент наносили свободные 30S субъединицы без фактора RbfA, их отмывку и элюцию проводили аналогично опыту с комплексом.

Первые 5, 10-я и 20-я фракции отмывки, а также первые 6 фракций каждой элюции были

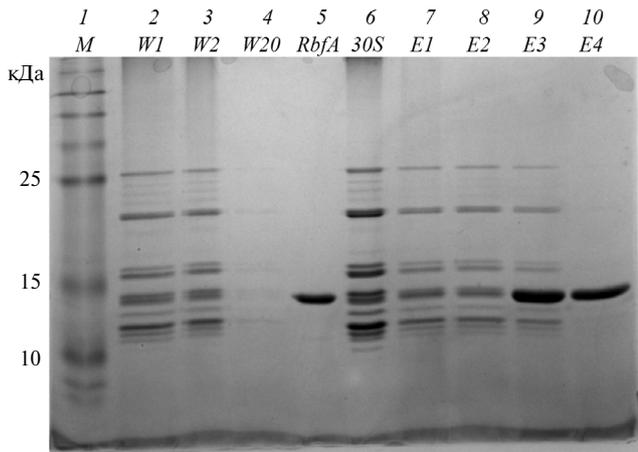


Рис. 2. Электрофоретический анализ в ПААГ при денатурирующих условиях фракций после очистки комплекса 30S–RbfA (30S : RbfA = 1 : 5). Дорожки: 1 – белковый маркер, 2–4 – фракции отмывки W1, W2, W20, 5 – контроль RbfA, 6 – контроль 30S, 7–10 – фракции элюции при 100 мМ имидазола E1–E4

отобраны для измерения их поглощения при длинах волн 260 нм и 280 нм (рис. 1). Факт сборки комплекса и наличие его или отдельных компонентов во фракциях определяли качественно: поглощение при 260 нм и 280 нм свидетельствовало о наличии 16S рРНК и белкового фактора; наличие рибосомальных белков и фактора RbfA также подтверждали с помощью денатурирующего ПААГ-электрофореза, наличие малой субъединицы, а именно 16S рРНК – с помощью агарозного электрофореза с бромистым этидием (рис. 2 и 3). В качестве контролей на гели электрофорезов наносили очищенный RbfA и свободные малые субъединицы рибосом.

На рисунке 1, а–в видно, что более половины малых субъединиц рибосом не связались с белком и сошли (W1–W20). Возможно, не все нативные субъединицы способны связываться с фактором, или эти субъединицы разрушились и потеряли способность к связыванию. Свободные 30S субъединицы без фактора также не связались с колонкой в контрольном эксперименте (рис. 1, г). Таким образом, очистка комплекса 30S–RbfA методом металл-хелатной хроматографии позволила нам очистить образец от не связавшихся с фактором 30S субъединиц и тем самым значительно повысить гомогенность образца перед анализом методом криоэлектронной микроскопии.

Было установлено, что концентрация имидазола 100 мМ является достаточной для элюции комплекса. Использование минимально достаточной концентрации имидазола позволяет сохранять образец в условиях, приближенных к оптимальным, а также снизить риск появле-

ния дополнительных артефактов и шумов на электронных микрографиях [25]. Наибольшее количество комплекса наблюдается во фракции элюции E2 при десятикратном избытке фактора RbfA по отношению к 30S субъединицам (30S : RbfA = 1 : 10). Именно это соотношение было взято нами для дальнейших структурных исследований. При других проверенных нами соотношениях общий выход комплекса был меньше на ~20%. Больше количество фактора относительно 30S не исследовалось.

Для анализа с помощью методов электрофореза были взяты фракции сборки комплекса при молярном соотношении 30S субъединиц к фактору RbfA, равном 1 : 5. Электрофореграммы представлены на рис. 2 и 3, и данные этих рисунков соотносятся с данными, представленными на рис. 1, и подтверждают факт сборки комплекса. На гели были нанесены некоторые фракции отмывки W, элюции E, а также отдельно 30S субъединицы и очищенный фактор RbfA в качестве контроля.

В первых фракциях отмывки мы видим наличие рибосомальных белков на ПААГ и 16S рРНК на агарозном геле (расположение окрашенных белковых пятен и свечения в ультрафиолетовом свете совпадают с контролями 30S и RbfA). Последняя фракция отмывки не содержит белков и рРНК. В первых фракциях элюции мы снова наблюдаем наличие рибосомальных белков, фактора RbfA на ПААГ и 16S рРНК на агарозном

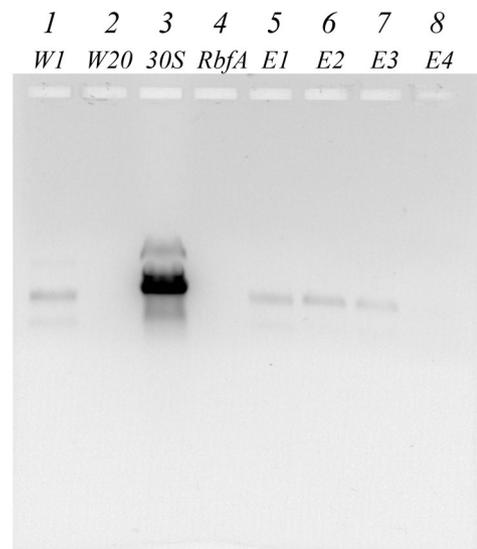


Рис. 3. Электрофоретический анализ в агарозном геле в присутствии бромистого этидия фракций после очистки комплекса 30S–RbfA (30S : RbfA = 1 : 5). Дорожки: 1–2 – фракции отмывки W1, W20; 3 – контроль 30S; 4 – контроль RbfA; 5–8 – фракции элюции при 100 мМ имидазола E1–E4

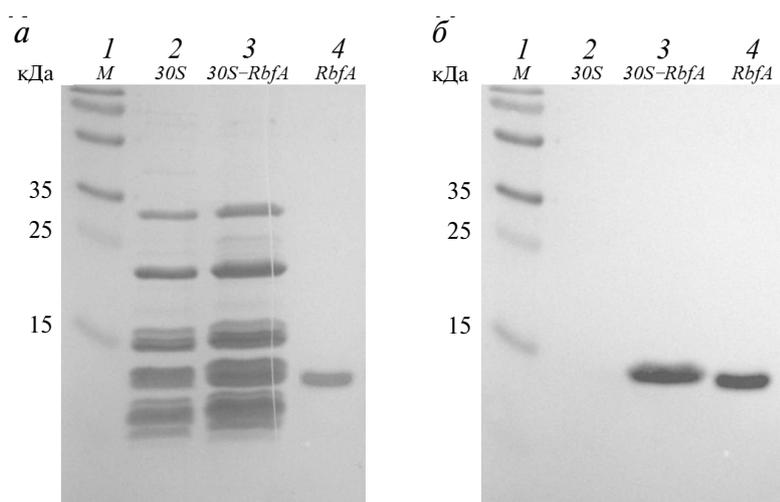


Рис. 4. Вестерн-блот анализ комплекса 30S–RbfA после очистки: *a* – полиакриламидный гель; *б* – ПВДФ-мембрана после связывания с антителами и их активации. Дорожки: 1 – белковый маркер, 2 – контроль 30S, 3 – комплекс 30S–RbfA (фракция элюции E2), 4 – контроль RbfA

геле, что говорит о том, что комплекс фактора и 30S субъединицы был связан с NiNTA-сорбентом. Основное количество комплекса содержится в первых двух фракциях элюции. Во фракции E4 на ПААГ (рис. 2) наблюдается присутствие только белка RbfA, который был в избытке по сравнению с субъединицами рибосом.

Для дополнительной идентификации фактора RbfA в составе полученного комплекса 30S–RbfA был проведен вестерн-блот фракции элюции E2 с наибольшей концентрацией образца. В работе были использованы коммерческие вторичные хемилюминесцентные антитела специфичные к гистидиновому тагу. Единственным компонентом нашей системы, имеющим гис-таг, является рекомбинантный белковый фактор RbfA. На рисунке 4, *a* представлены результаты ПААГ-электрофореза в денатурирующих условиях фракции E2 и контрольных образцов – свободных 30S субъединиц и фактора RbfA (окраску геля производили уже после переноса белка на мембрану при вестерн-блоте с помощью красителя Кумасси по протоколу Лэммли [26]).

Во фракции элюции E2 мы видим наличие рибосомальных белков – профиль идентичен контрольному образцу свободных малых субъединиц. С этого геля был проведен перенос белков на ПВДФ-мембрану. Визуализация мембраны показала наличие свечения, что говорит о связывании антитела с белком RbfA, несущим гис-таг. На рисунке 4, *б* мы видим наличие белка в контрольном образце RbfA и в образце комплекса, тогда как в контроле 30S ничего нет. Молекулярные массы RbfA в контроле и комплексе совпадают. Можно сделать заключение о присутствии белка RbfA в комплексе.

Можно предположить, что связывание RbfA с 30S субъединицей вызвано неспецифическим взаимодействием белка RbfA с рРНК. Для подтверждения специфичности связывания RbfA с малой субъединицей был воспроизведен описанный выше эксперимент по сборке и очистке комплекса, но вместо 30S субъединиц с фактором RbfA инкубировали 50S субъединицы (50S : RbfA = 1 : 10). Элюцию с NiNTA-сорбента проводили при концентрации имидазола 100 мМ. В качестве контроля для этого эксперимента в аналогичных условиях наносили на NiNTA-сорбент и элюировали свободные 50S субъединицы.

Были определены значения поглощения при длинах волн 260 нм и 280 нм фракций отмывки W1–W20 и фракций элюции E1–E6. Фракции отмывки W1, W3, W5 и W20, а также фракции элюции с наибольшей концентрацией образца E1–E3 были исследованы с помощью денатурирующего ПААГ-электрофореза (рис. 5, *a*). После нанесения свободных 50S субъединиц на NiNTA-сорбент с помощью электрофореза анализировали те же фракции отмывки и элюции, что и в смеси с RbfA (рис. 5, *б*).

На гелях на рисунках 5, *a* и *б*, мы видим отсутствие белков 50S субъединиц во фракциях элюции E1–E3 и в эксперименте с фактором RbfA, и в эксперименте со свободными субъединицами. В эксперименте с фактором видно, что RbfA связывается с сорбентом и смывается с него при элюции. 50S субъединицы обнаруживаются только во фракциях отмывки W. Можно сделать заключение, что 50S субъединицы не связываются ни с NiNTA-сорбентом, ни с фактором RbfA, т.е. фактор RbfA имеет сродство к 30S

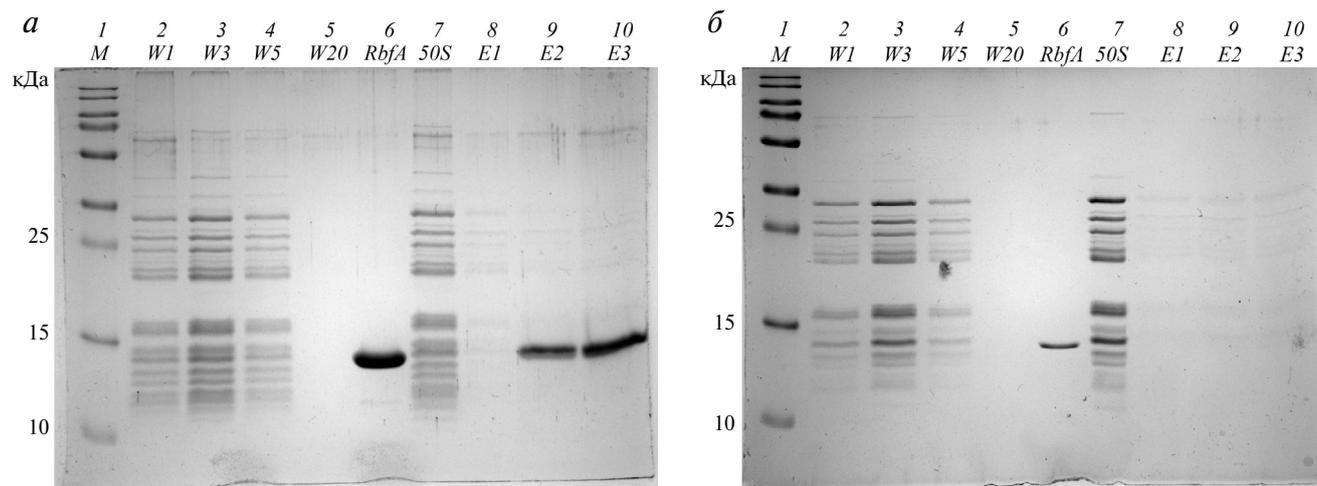


Рис. 5. Электрофоретический анализ в ПААГ при денатурирующих условиях фракций после очистки смеси 50S и RbfA (а) и свободных 50S (б). Дорожки: 1 — белковый маркер, 2–5 — фракции отмывки W1, W3, W5, W20, 6 — контроль RbfA, 7 — контроль 50S, 8–10 — фракции элюции при 100 мМ имидазола E1–E3

субъединице. Фактор специфически связывается с компонентами малой субъединицы.

На рисунке 6 изображена микрофотография образца комплекса 30S–RbfA после очистки на NiNTA-сорбенте, полученная с помощью электронного микроскопа. В основном можно заметить отдельные 30S субъединицы продолговатой формы. Также есть некоторое количество агрегатов субъединиц. Гомогенность образца позволяет проводить дальнейший сбор данных. Размер субъединиц совпадает с представленными в литературе данными [27] и составляет около 15 × 20 нм. Наличие фактора RbfA на 30S субъединице, его структуру и локализацию, а также общую долю связавшихся с белком субъединиц будет возможно определить только после обработки и систематизации набора данных.

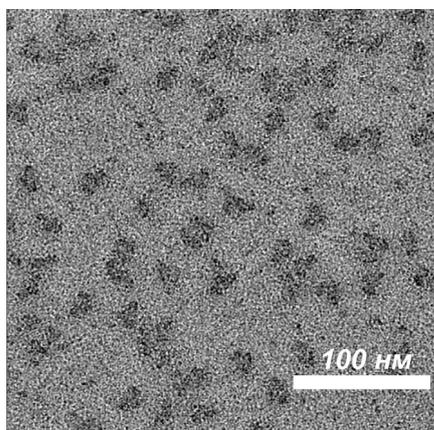


Рис. 6. Микрофотография образца комплекса 30S–RbfA, полученная на электронном микроскопе

Результаты, представленные выше, позволяют сделать вывод о том, что был получен и очищен комплекс фактора RbfA и 30S субъединицы рибосомы для дальнейших структурных исследований методом криоэлектронной микроскопии.

Последовательно были получены очищенные препараты связывающего рибосому фактора RbfA и 30S малых субъединиц рибосом *S. aureus*. Далее была произведена сборка макромолекулярного комплекса 30S–RbfA, оптимизация условий его дополнительной очистки, непосредственно очистка, характеристика и корректная для дальнейших исследований заморозка образца. Также была проведена предварительная визуальная микроскопическая оценка качества полученного образца. В результате был получен образец комплекса RbfA и 30S субъединицы *S. aureus* для структурных исследований с помощью метода криоэлектронной микроскопии.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-34-00375).

Благодарности. Выражается благодарность Германской службе академических обменов (DAAD).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lowy, F. D. (1998) Medical progress – *Staphylococcus aureus* infections, *N. Engl. J. Med.*, **339**, 520-532, doi: 10.1056/NEJM199808203390806.
- Kluytmans, J., and Verbrugh, H. (1997) Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks, *Clin. Microbiol. Rev.*, **10**, 505-520, doi: 10.1128/CMR.10.3.505.
- Le Loir, Y., Baron, F., and Gautier, M. (2003) *Staphylococcus aureus* and food poisoning, *Genet. Mol. Res.*, **2**, 63-76.
- Cimolai, N. (2008) MRSA and the environment: Implications for comprehensive control measures, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **27**, 481-493, doi: 10.1007/s10096-008-0471-0.
- Wilson, D. N. (2014) Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance, *Nat. Rev. Microbiol.*, **12**, 35-48, doi: 10.1038/nrmicro3155.
- Kaczanowska, M., and Rydén-Aulin, M. (2007) Ribosome biogenesis and the translation process in *Escherichia coli*, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **71**, 477-94.
- Shajani, Z., Sykes, M. T., and Williamson, J. R. (2011) Assembly of bacterial ribosomes, *Annu. Rev. Biochem.*, **80**, 521-526, doi: 10.1146/annurev-biochem-062608-160432.
- Starosta, A. L., Lassak, J., Jung, K., and Wilson, D. N. (2014) The bacterial translation stress response, *FEMS*, **38**, 1172-1201, doi: 10.1111/1574-6976.12083.
- Datta, P. P., Wilson, D. N., Kawazoe, M., Swami, N. K., Kaminishi, T., Sharma, M. R., Booth, T. M., Takemoto, C., Fucini, P., Yokoyama, S., and Agrawal, R. K. (2007) Structural aspects of RbfA action during small ribosomal subunit assembly, *Mol. Cell*, **9**, 434-445, doi: 10.1016/j.molcel.2007.08.026.
- Xia, B., Ke, H., Shinde, U., and Inouye, M. (2003) The role of RbfA in 16S rRNA processing and cell growth at low temperature in *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.*, **19**, 332, 575-584, doi: 10.1016/S0022-2836(03)00953-7.
- 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.*, **21**, 327, 521-536, doi: 10.1016/S0022-2836(03)00061-5.
- 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. Genomics*, **4**, 235-243, doi: 10.1023/b:jsfg.0000016127.57320.82.
- Blokhin, D. S., Bikmullin, A. G., Nurullina, L. I., Garaeva, N. S., Validov, Sh. Z., Klochkov, V. V., Aganov, A. V., Khusainov, I. Sh., Yusupov, M. M., and Usachev, K. S. (2018) Backbone and side chain NMR assignments for the ribosome binding factor A (RbfA) from *Staphylococcus aureus*, *Biomol. NMR Assign.*, **13**, 27-30, doi: 10.1007/s12104-018-9845-0.
- Merino, F., and Raunser, S. (2016) Cryo-EM as a tool for structure-based drug development, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, doi: 10.1002/anie.201608432.
- Cheng, Y., Grigorieff, N., Penczek, P. A., and Walz, T. (2015) A primer to single-particle cryo-electron microscopy, *Cell*, **161**, 438-449, doi: 10.1016/j.cell.2015.03.050.
- Binshtein, E., and Ohi, M. D. (2015) Cryo-electron microscopy and the amazing race to atomic resolution, *Biochemistry*, **54**, 3133-3141, doi: 10.1021/acs.biochem.5b00114.
- Vonk, J., and Mills, D. J. (2017) Advances in high-resolution cryo-EM of oligomeric enzymes, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **46**, 48-54, doi: 10.1016/j.sbi.2017.05.016.
- Shimokava-Chiba, N., Muller, C., Fujiwara, K., Beckert, B., Koreaki, I., Wilson, D. N., and Chiba, S. (2019) Release factor-dependent ribosome rescue by BrfA in the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*, *Nat. Commun.*, **10**, 5397, doi: 10.1038/s41467-019-13408-7.
- Khusainov, I., Vicens, Q., Ayupov, R., Usachev, K., Myasnikov, A., Simonetti, A., Validov, Sh., Kieffer, B., Yusupova, G., Yusupov, M., and Hashem, Y. (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.
- Li, X., Sun, Q., Jiang, C., Yang, K., Hung, L., Zhang, J., and Sacchettini, J. C. (2015) Structure of ribosomal silencing factor bound to *Mycobacterium tuberculosis* ribosome, *Structure*, **23**, 1858-1865, doi: 10.1016/j.str.2015.07.014.
- Mishra, S., Ahmed, T., Tyagi, A., Shi, J., and Bhushan, S. (2018) Structures of *Mycobacterium smegmatis* 70S ribosomes in complex with HPF, tmRNA, and P-tRNA, *Sci. Rep.*, **8**, 13587, doi: 10.1038/s41598-018-31850-3.
- Ayupov, R. Kh., Khusainov, I. Sh., Validov, S. Z., Yusupova, G. Z., and Yusupov, M. M. (2016) Isolation and purification of *Staphylococcus aureus* hibernation-promoting factor inactivating of the ribosome, *Int. J. Pharm. Technol.*, **8**, 14392-14398.
- Khusainov, I., Vicens, Q., Bochler, A., Grosse, F., Myasnikov, A., Ménétret, J. F., Chicher, J., Marzi, S., Romby, P., Yusupova, G., Yusupov, M., and Hashem, Y. (2016) Structure of the 70S ribosome from human pathogen *Staphylococcus aureus*, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 10491-10504, doi: 10.1093/nar/gkw933.
- Weiss, R. L., Kimes, B. W., and Morris, D. R. (1973) Cations and ribosome structure. III. Effects on the 30S and 50S subunits of replacing bound Mg²⁺ by inorganic cations, *Biochemistry*, **12**, 450-456.
- Guo, F., and Jiang, W. (2014) Single particle cryo-electron microscopy and 3-D reconstruction of viruses, *Methods Mol. Biol.*, **1117**, 401-443, doi: 10.1007/978-1-62703-776-1_19.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685.
- Vasiliev, V. D. (1974) Morphology of the ribosomal 30S subparticle according to electron microscopic data, *Acta Biol. Med. Ger.*, **33**, 779-793.

***In vitro* RECONSTITUTION OF THE *S. aureus* 30S RIBOSOMAL SUBUNIT
AND RbfA FACTOR COMPLEX FOR STRUCTURAL STUDIES***

A. G. Bikmullin^{1}, L. I. Nurullina¹, N. S. Garaeva¹, E. A. Klochkova¹, D. S. Blokhin¹,
A. A. Golubev^{1,2}, Sh. Z. Validov¹, I. Sh. Khusainov^{1,2,3}, K. S. Usachev^{1**}, and M. M. Yusupov^{1,2**}**

¹ Kazan Federal University, 420008 Kazan, Russia; E-mail: aydar.bikmullin@gmail.com,
konstantin.usachev@kpfu.ru, marat@igbmc.fr

² Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology (IGBMC), 67400 Illkirch-Graffenstaden, France

³ Max Planck Institute for Biophysics, 60438 Frankfurt-am-Main, Germany

Received December 5, 2019

Revised February 17, 2020

Accepted March 14, 2020

Ribosome-binding factor A (RbfA) from *Staphylococcus aureus* is a cold adaptation protein that is required for the growth of pathogenic cells at low temperatures (10–15°C). RbfA is involved in the processing of 16S rRNA, as well as in the assembly and stabilization of the small 30S ribosomal subunit. Structural studies of the 30S–RbfA complex will help to better understand their interaction, the mechanism of such complexes, and the fundamental process such as 30S subunit assembly that determines and controls the overall level of protein biosynthesis. This article describes protocols for preparation of RbfA and the small 30S ribosome subunits and reconstitution and optimization of the 30S–RbfA complex to obtain samples suitable for cryo-electron microscopy studies.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, ribosome, cryo-electron microscopy, RbfA, translation factor, 30S subunit assembly