

2
НОМЕР

БОИЦ

ISSN 2304-9081

ЭЛЕКТРОННЫЙ ЖУРНАЛ

<http://www.elmag.uran.ru>

БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН

Оренбургская область
Гора Змеиная
Вельмовский П.В.



2023

УЧРЕДИТЕЛЬ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ОРЕНБУРГСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

© Коллектив авторов, 2023

УДК. 57.052.4

А.К. Мифтахов^{1,2}, Е.М. Губанова², Д.М. Афордоаны¹, Ш.З. Валидов¹

ВЛИЯНИЕ КОНСТИТУТИВНОЙ ЭКСПРЕССИИ ФАКТОРОВ ГИБЕРНАЦИИ РИБОСОМЫ НА РОСТ *PSEUDOMONAS PUTIDA* PCL1760

¹ Федеральный исследовательский центр КазНЦ РАН, Казань, Россия

² Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, ИФМиБ, Казань, Россия

Цель. Определить влияние факторов гибернации рибосомы HPF (ribosome hibernation promoting factor), RMF (ribosome modulation factor), RsfS (ribosome silencing factor) и YfiA (ribosomal subunit interface protein) на рост культуры *Pseudomonas putida* PCL1760.

Материалы и методы. Для работы использовали культуры бактерии *P. putida* PCL1760, несущие плазмидный вектор pJEM2 для индуцируемой экспрессии генов *hpf*, *rmf*, *rsfS* или *yfiA*, кодирующих соответствующие факторы гибернации. Влияние факторов на рост штамма PCL1760 оценивали по оптической плотности ночных культур при длине волны $\lambda=600$ нм (ОП₆₀₀) под действием индуктора и без него.

Результаты. Факторы RsfS, YfiA и RMF (в порядке убывания), проявляют наибольшую ингибиторную активность в присутствии индуктора. Наименьшее влияние на рост культур оказала экспрессия фактора HPF. В отсутствие индуктора конструкции для экспрессии YfiA и RMF не вызывало замедление роста штамма PCL1760 в отличие от RsfS.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о том, что конститутивная экспрессия факторов гибернации в той или иной степени замедляет рост бактерии *P. putida* PCL1760, причем активность факторов убывает в ряду RsfS > YfiA > RMF > HPF.

Ключевые слова: *Pseudomonas putida*, факторы гибернации, конститутивная экспрессия.

А.К. Miftakhov¹, Е.М. Gubanova², D.M. Afordoanyi¹, S.Z. Validov¹

INFLUENCE OF CONSTITUTIVE EXPRESSION OF HYBERNATION FACTORS ON THE GROWTH OF *PSEUDOMONAS PUTIDA* STRAIN PCL1760

¹ Federal Research Center KazSc RAS, Kazan, Russia

² Kazan Federal University, IFMB, Kazan, Russia

Aim. To compare the activities of the hibernation factors HPF (ribosome hibernation promoting factor), RMF (ribosome modulation factor), RsfS (ribosome silencing factor) and YfiA (ribosomal subunit interface protein) obtained from *Pseudomonas putida* PCL1760 in a homologous environment relative to each other.

Materials and methods. The study material was cultures of *P. putida* PCL1760 bacteria carrying the pJEM2 plasmid vector for the constitutive expression of the *hpf*, *rmf*, *rsfS*, or *yfiA* genes encoding the corresponding hibernation factors. The effect of the hibernation factors on the growth of PCL1760 strain was assessed based on the optical density (OD) of overnight cultures with and without the inducer.

Results. Factors RsfS, YfiA and RMF (in descending order) show the highest inhibitory activity in the presence of the inducer. The expression of the HPF had the least effect on the growth of cultures. In the absence of the inducer, the constructs for the expression of YfiA and RMF did not slow down the growth of the PCL1760 strain, unlike RsfS.

Conclusion. The results obtained indicate that the constitutive expression of hibernation factors to some extent slows down the growth of the bacterium *P. putida* PCL1760, and the activity of the factors decreases in the series RsfS > YfiA > RMF > HPF.

Key words: *Pseudomonas putida*, hibernation factors, constitutive expression.

Введение

Адаптация бактерий к окружающей среде зависит не только от скорости и качества процессов биосинтеза веществ, но и от своевременного замедления или остановки этих процессов для того, чтобы выжить в стрессовых ситуациях, например, в условиях голодания, высокой или низкой температуры, или же при образовании биопленок, когда поступление питательных веществ в их матрикс сильно ограничено [1, 2]. Так же для патогенных микроорганизмов замедление биосинтеза, вероятно, необходимо, чтобы скрыться от защитных механизмов организма-хозяина [3].

Известно пять основных факторов, обеспечивающих переход бактерий в «режим энергосбережения», так называемые факторы гибернации рибосом: короткий HPF (Ribosome hibernation promoting factor), длинный HPF (l-HPF), RMF (ribosome modulation factor), RsfS (ribosome silencing factor) и YfiA (ribosomal subunit interface protein). Каждый из этих факторов оказывает различное влияние на рибосомы и их субъединицы. У большинства бактерий присутствует l-HPF и RsfS, у γ -протеобактерий система гибернации рибосом состоит из четырех белков: короткий HPF, RMF, YfiA и RsfS [1].

RsfS связывается с L14 белком на 50S субъединице, препятствуя ее ассоциации с инициаторным комплексом с образованием транслирующей 70S рибосомы, тем самым регулируя уровень трансляции белков в клетке [4,5]. Так же была показана важная роль этого фактора для *P. putida* PCL1760 при колонизации корней томата и более эффективной защиты от фузариозной корневой гнили томатов [6].

RMF и HPF образуют единую систему, в результате действия которой рибосомы объединяются в неактивные 100S димеры [7], где RMF выступает в роли агента димеризации двух 70S рибосом [8, 9], а HPF, имея сродство с А и Р сайтами рибосомы, участвует в процессе образования 100S «молчащих» рибосом [7, 10]. Вероятно, объединение двух рибосом с помощью RMF и HPF, так же как и димеризация с помощью длинного HPF у грамположительных бактерий [1], защищает покоящиеся рибосомы от действия клеточных РНКаз, обеспечивая сохранность нуклеопротеиновых комплексов при длительном хранении [11].

YfiA, будучи гомологом HPF, так же блокирует A и P сайты, образуя неактивные 70S рибосомы [12, 13]. Однако, благодаря наличию дополнительного участка на С-конце, он препятствует связыванию фактора RMF для образования димеров рибосом, из-за чего предполагают конкурирующие роли HPF и YfiA [9, 12].

Возможно, четыре белковых фактора гибернации рибосом у γ -протеобактерий действуют в определенном порядке в процессе остановки работы и хранения рибосом, а не являются конкурентами.

В настоящей работе ставилась цель оценить степень влияния факторов HPF, RMF, RsfS и YfiA при их конститутивном синтезе на рост культуры *P. putida* PCL1760.

Материалы и методы

Штаммы, плазмидные векторы и условия культивирования. Все использованные в работе плазмидные векторы, штаммы бактерий и условия их культивирования представлены в таблице 1.

Таблица 1. Штаммы, плазмидные векторы и условия культивирования

Штамм / Вектор	Условия культивирования / Особенности	Назначение
<i>E. coli</i> S-17.1	LB, 37 °C	Аmplификация плазмидных векторов и их конъюгативный перенос в другие штаммы
<i>P. putida</i> PCL1760	King B, 30 °C / устойчив к ампициллину (Amp, 100 мкг/мл)	Ризосферный микроорганизм, активный колонизатор ризосферы, агент биологической защиты растений, действующий по механизму конкуренции за экологические ниши.
pJEM2	Конститутивная экспрессия генов под управлением L-рамнозного оперона, маркер устойчивости к канамицину (Kan, 50 мкг/мл)	Молекулярное клонирование генов и их экспрессия

Клонирование факторов гибернации в векторе pJEM2. Для получения фрагментов, содержащих последовательности исследуемых генов (*hpf*, *rmf*, *rsfS* или *yfiA*), проводили полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с использованием праймеров из таблицы 2. Затем продукты ПЦР и вектор pJEM2 обрабатывали рестриктазами FauNDI, BamHI (для конструкций с геном *hpf*) и HindIII (для *rmf*, *rsfS* и *yfiA*), лигировали по «липким» концам, а далее трансформировали полученные конструкции в *E. coli* S-17.1.

Таблица 2. Праймеры, используемые в ПЦР

Название праймера	Последовательность нуклеотидов (5'-3')	Назначение
<i>hpf</i> -FauNDI-f	TTTTTTCATATGCAAGTCAATATCAGTGGACAG	Получение фрагмента FauNDI- <i>hpf</i> -BamHI
<i>hpf</i> -BamHI-r	TTTTTTGGATCCTCAGCGGGCAGCTGCAC	
<i>rmf</i> -FauNDI-f	TTTTTTCATATGAGAAGACTTAAGCGTGATCCG	Получение фрагмента FauNDI- <i>rmf</i> -HindIII
<i>rmf</i> -HindIII-r	TTTTTTAAGCTTCAGCCAACGGCGTGATTTTCG	
<i>rsfS</i> -FauNDI-f	TTTTTTCATATGACCAAGCAGAAAATTTACGGCG	Получение фрагмента FauNDI- <i>rsfS</i> -HindIII
<i>rsfS</i> -HindIII-r	TTTTTTCATATGACCAAGCAGAAAATTTACGGCG	
<i>yfiA</i> -FauNDI-f	TTTTTTCATATGCAAATCCAGGTCAACAGCAG	Получение фрагмента FauNDI- <i>yfiA</i> -HindIII
<i>yfiA</i> -HindIII-r	TTTTTTAAGCTTCAGGCGTCCGGGTCACTC	
test-pJEM2-f	GTCGTCAACACGGCGAAATAGTAATCAC	Универсальные праймеры для анализа вставки
test-pJEM2-r	CTCTGGGAGGCAGAATAAATGATCATATCG	

Трансконъюгация. Для конъюгативного переноса плазмидного вектора равные объемы (100 мкл) культур клеток *E. coli* S-17.1, несущего плазмиду, и *P. putida* PCL1760 вносили в питательную среду LB (без антибиотиков) объемом 5 мл и инкубировали ночь при 30 °С. Смесь культур пересеивали на агаризованную среду LB_{Амп,Кан} для селекции *P. putida* PCL1760 с требуемой плазмидой.

Экспрессия в присутствии L-рамнозы. Полученными после трансконъюгации колониями *P. putida* PCL1760 каждого штамма инокулировали 5 мл жидкой среды LB_{Амп,Кан} и инкубировали 16 часов при 30 °С и 180 об/мин. Затем снова инокулировали 5 мл жидкой среды LB_{Амп,Кан} до ОП₆₀₀=0,1. Образцы делили на две группы: контроль (Rha-) и опыт (Rha+). В опытные образцы перед инкубированием добавляли L-рамнозу в конечной концентрации 0,2 % (масса/объем) для индукции синтеза. После инкубации на основании данных оптической плотности каждой культуры строили графики, отображающие степень влияния конститутивной экспрессии гибернационных факторов на рост бактерий по снижению оптической плотности культур относительно оптической плотности такой же культуры без добавления индуктора для конститутивной экспрессии. Штамм *P. putida* PCL1760/pJEM2:*gfp* использовали в качестве контроля, поскольку белок GFP не обладает ингибирующим действием на трансляцию.

Различия между выборками определяли с помощью U-критерия Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение

Были получены 4 конструкции (рис. 1) на основе вектора pJEM2 для конститутивной экспрессии факторов HPF, RMF, RsfS и YfiA. Результаты подтверждались электрофоретическим анализом продуктов ПЦР (рис. 2) с использованием универсальных праймеров (табл. 2).

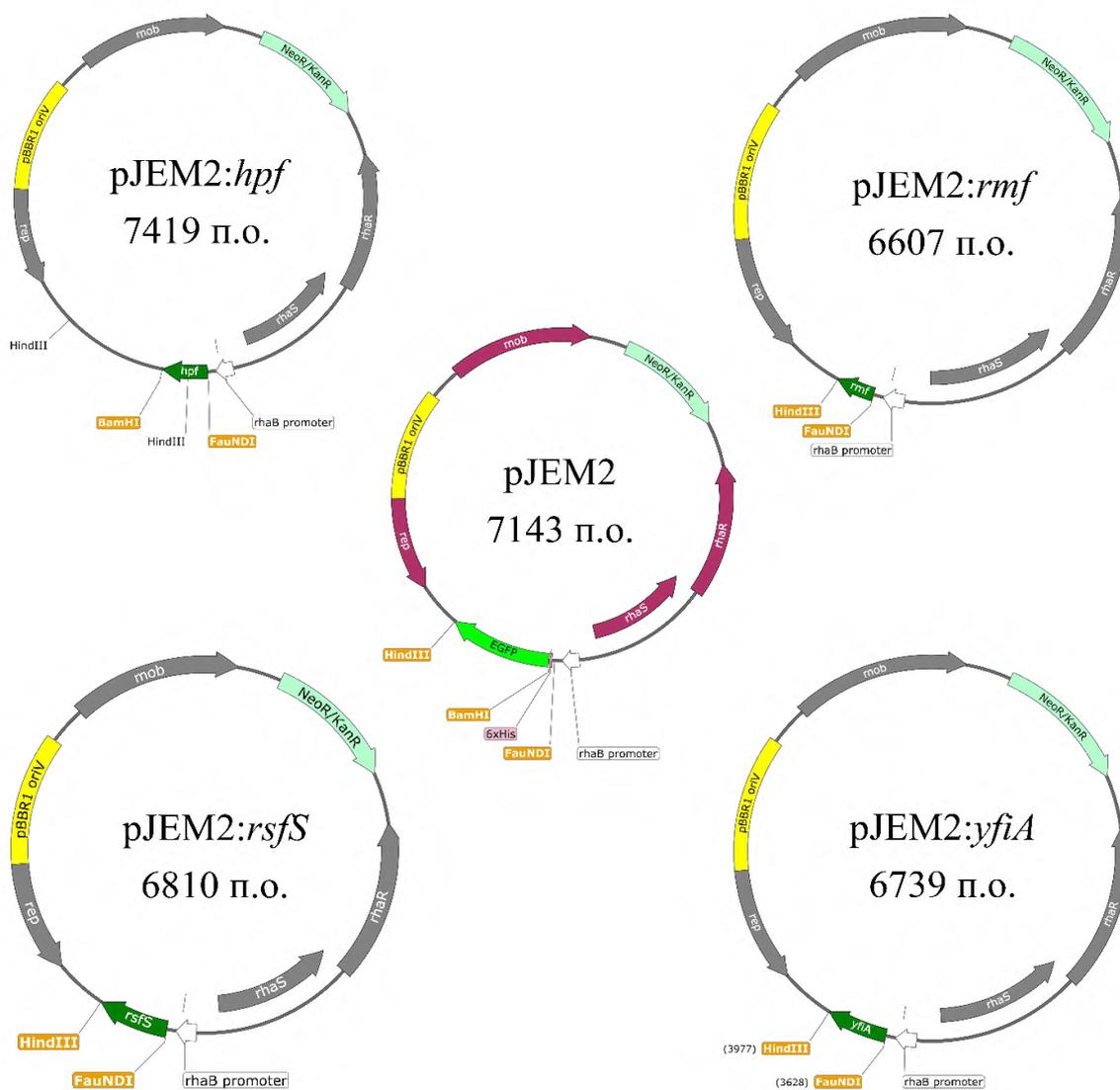


Рис. 1. Карты плазмидного вектора pJEM2 со вставками генов *hpf*, *rmf*, *rsfS* и *yfiA*.

В ходе трансконъюгации были получены следующие штаммы для дальнейшего исследования:

- 1) *P. putida* PCL1760/pJEM2:*gfp*,
- 2) *P. putida* PCL1760/pJEM2:*hpf*,

- 3) *P. putida* PCL1760/pJEM2:*rmf*,
- 4) *P. putida* PCL1760/pJEM2:*rsfs*,
- 5) *P. putida* PCL1760/pJEM2:*yfiA*.

Гомологичная экспрессии факторов гибернации влияет на скорость роста штамма *P. putida* PCL1760, что показано на рисунке 3.

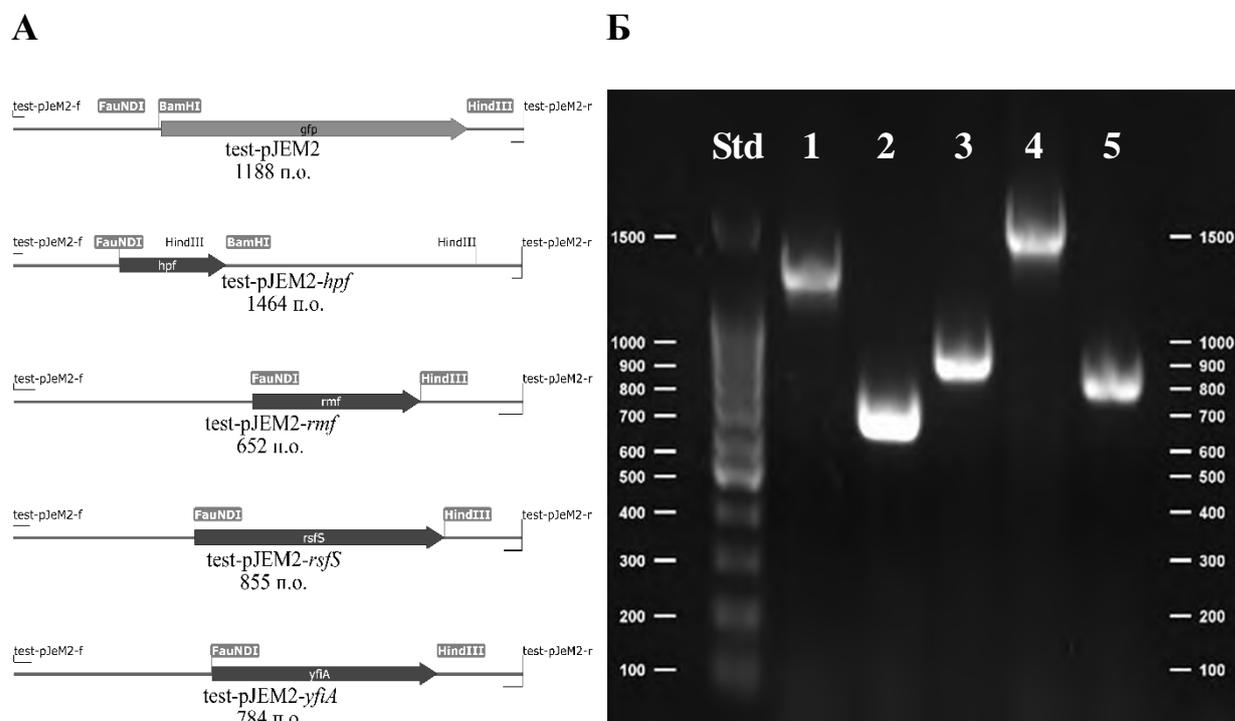


Рис. 2. Анализ конструкций. (А) Схема с указанием генов, сайтов рестрикции и предполагаемых размеров фрагментов, амплифицируемых при ПЦР с использованием универсальных праймеров (табл. 2). (Б) Электрофореграмма фрагментов, полученных в результате ПЦР с использованием универсальных праймеров и конструкций на основе плазмидного вектора pJEM2, содержащих гены (1) *gfp*, (2) *rmf*, (3) *rsfS*, (4) *hpf*, (5) *yfiA*; (Std) маркер длин ДНК.

Как и ожидалось, экспрессия GFP не оказывала значимого влияния на рост культуры штамма PCL1760. Факторы RsfS, YfiA и RMF (в порядке убывания), проявляют наибольшую ингибиторную активность в присутствии индуктора. Интересно, что в образцах без индукции присутствие конструкций pJEM2:*yfiA* и pJEM2:*rmf* не вызывало замедление роста штамма PCL1760 в отличие от pJEM2:*rsfS*. Известно, что в рамнозном опероне, как и во многих других, присутствует эффект «подтекания» [14], однако среди всех исследуемых вариантов, именно конструкция pJEM2:*rsfS* демонстрировала наибольшее ингибирование роста культуры. Вероятно, из представленных именно фактор RsfS является более эффективным ингибитором трансляции.

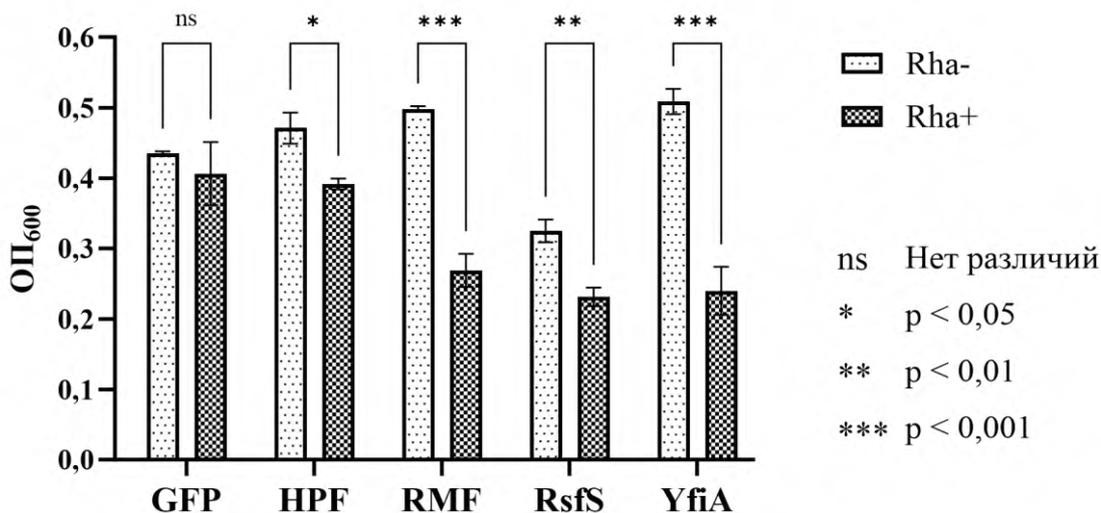


Рис. 3. График оптической плотности ночных культур исследуемых штаммов на среде с добавлением индуктора (Rha+) и без (Rha-). GFP, HPF, RMF, RsfS, YfiA - штаммы *P. putida* PCL1760 с соответствующими генами в составе вектора pJEM2.

Наименьшее влияние на рост культур оказывала экспрессия фактора HPF. Как известно, HPF взаимодействует с 90S димером, уже сформированным под действием фактора RMF [1], поэтому, вероятно, эффективность фактора HPF ограничена концентрацией RMF в клетке.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что конститутивная экспрессия факторов гибернации HPF, RMF, RsfS и YfiA в той или иной степени замедляет рост *P. putida* PCL1760, при этом RsfS, вероятно, является наиболее активный ингибитор трансляции. Можно предположить, что RsfS начинает процесс гибернации рибосомы, к которому затем присоединяются остальные три фактора, отвечающие за сохранность покоящихся рибосом.

(Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках проекта «Генетическая технология конструирования искусственных консорциумов микроорганизмов для создания биопрепаратов в растениеводстве» Соглашение № 075-15-2021-1395 от «25» октября 2021 г (вн. № 15.ИП.21.0020), а также в рамках государственного задания Федерального исследовательского центра КазНЦ РАН).

ЛИТЕРАТУРА

1. Prossliner T, Skovbo Winther K, Askvad Sørensen M. Ribosome Hibernation. Annual Review of Genetics. 2018. 46.
2. Williamson K.S., Richards L.A., Perez-Osorio A.C. 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. Journal of Bacteriology. 2012. 194: 2062–73.

3. Gohara D.W., Yap M.N.F. Survival of the drowsiest: the hibernating 100S ribosome in bacterial stress management. *Current Genetics*. 2018. 64: 753–60.
4. Li X., Sun Q., Jiang C. Structure of Ribosomal Silencing Factor Bound to *Mycobacterium tuberculosis* Ribosome. *Structure*. 2015. 23: 1858–65.
5. Häuser R., Pech M., Kijek J. RsfA (YbeB) Proteins Are Conserved Ribosomal Silencing Factors. *PLoS Genetics*. 2012. 8(7): e1002815. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002815>
6. Miftakhov A.K., Diabankana R.G.C., Frolov M., Yusupov M.M., Validov S.Z., Afordoanyi D.M. Persistence as a Constituent of a Biocontrol Mechanism (Competition for Nutrients and Niches) in *Pseudomonas putida* PCL1760. *Microorganisms*. 2022. 11: 19.
7. Maki Y., Yoshida H., Wada A. Two proteins, YfiA and YhbH, associated with resting ribosomes in stationary phase *Escherichia coli*. *Genes to Cells*. 2000. 5: 965–974.
8. Ueta M., Ohniwa R.L., Yoshida H., Maki Y., Wada C., Wada A. Role of HPF (Hibernation Promoting Factor) in Translational Activity in *Escherichia coli*. *The Journal of Biochemistry*. 2008. 143: 425–33.
9. Ueta M., Yoshida H., Wada C., Baba T., Mori H., Wada A. Ribosome binding proteins YhbH and YfiA have opposite functions during 100S formation in the stationary phase of *Escherichia coli*. *Genes to Cells*. 2005. 10: 1103–1112.
10. Wada A., Igarashi K., Yoshimura S., Aimoto S., Ishihama A. Ribosome Modulation Factor: Stationary Growth Phase-Specific Inhibitor of Ribosome Functions from *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1995. 214: 410–417. DOI: [10.1006/bbrc.1995.2302](https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2302)
11. Prossliner T., Gerdes K., Sørensen M.A., Winther K.S. Hibernation factors directly block ribonucleases from entering the ribosome in response to starvation. *Nucleic Acids Research*. 2021. 49: 2226–2239.
12. Polikanov Y.S., Blaha G.M., Steitz T.A. How hibernation factors RMF, HPF, and YfiA turn off protein synthesis. *Science*. 2012. 336: 915–918.
13. Di Pietro F., Brandi A., Dzeladini N. Role of the ribosome - associated protein PY in the cold - shock response of *Escherichia coli*. *MicrobiologyOpen*. 2013. 2: 293–307.
14. Du F., Liu Y.Q., Xu Y.S. Regulating the T7 RNA polymerase expression in *E. coli* BL21 (DE3) to provide more host options for recombinant protein production. *Microbial Cell Factories*. 2021. 20: 1–10.

Поступила 30 июня 2023 г.

(Контактная информация: **Мифтахов Айну́р Камилевич** – аспирант, младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических и микробиологической методов ФИЦ КазНЦ РАН; адрес: 420064 г. Казань, ул. Оренбургский тракт, 48; E-mail: miftahov_nur@mail.ru)

Образец ссылки на статью:

Мифтахов А.К., Губанова Е.М., Афордоanyi Д.М., Валидов Ш.З. Влияние конститутивной экспрессии факторов гибернации рибосомы на рост *Pseudomonas putida* PCL1760. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2023. 2. 8 с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2023-2/Articles/AKM-2023-2.pdf>). DOI: 10.24411/2304-9081-2023-12006