

**БЕЛОК LерА НЕ СПАСАЕТ *ESCHERICHIA COLI* ОТ АНТИБИОТИКОВ****Е.М. Максимова<sup>1</sup>, И.А. Остерман<sup>2</sup>, Е.А. Столбоушкина<sup>1</sup>**<sup>1</sup> ФГБУН Институт белка РАН, Пуццино, Россия<sup>2</sup> МГУ имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия**Введение**

LерА — это высококонсервативная рибосома-зависимая GTP-аза, присутствующая у бактерий, архей и в органеллах эукариот (митохондриях и хлоропластах). Хотя LерА широко распространён, он не является жизненно необходимым белком. Делеция гена *lepA* у *Escherichia coli* приводила к замедленному росту клеток только в условиях стресса (высокая концентрация ионов Mg<sup>2+</sup>, низкая температура и низкий pH среды) (Peach et al., 2011). Кроме того, нокаут *lepA* индуцировал повышенную чувствительность хеликобактера к кислоте, гиперпродукцию антибиотика у стрептомицетов, устойчивость микобактерий к действию рифампицина, повышенную термочувствительность и подавление дыхания у дрожжей, нарушение фотосинтеза у растений и мужское бесплодие у мышей (Bijlsma et al., 2000; Bauerschmitt et al., 2008; Badu-Nkansah et al., 2010; Ji et al., 2012; Gao et al., 2016; Wang et al., 2020). Такой широкий спектр фенотипов, вероятно, указывает на многообразие функций белка LерА в клетке.

Были выдвинуты три гипотезы: 1) LерА действует как обратная транслоказа, помогая корректировать рибосомы, которые ошибочно совершили транслокацию во время трансляции; 2) LерА устраняет «застывание» рибосом или наоборот, способствует их секвестрации, тем самым поддерживая трансляционную стабильность в стрессовых условиях; 3) LерА участвует в биогенезе рибосом.

Структурное сходство LерА с фактором транслокации EF-G и отсутствие у него IV домена EF-G, предотвращающего обратное кодон-антикодонное движение позволило предположить, что LерА действует как обратная транслоказа (Qin et al., 2006). Однако данная гипотеза экспериментально не подтвердилась (Liu et al., 2010; 2011; Balakrishnan et al., 2014).

В экспериментах *in vitro*, добавление LерА индуцировало смещение 3' - конца тРНК (в А-сайте) от пептидилтрансферазного центра рибосомы (Gagnon et al., 2014; Gagnon et al., 2016; Kumar et al., 2016; Zhang et al., 2016). В чем биологический смысл такого смещения? Предполагается, что при связывании LерА происходит вращательное движение рибосомы по часовой стрелке, в результате которого А-сайтовая тРНК смещается, а уникальный С-концевой домен LерА получает возможность провзаимодействовать с Р-сайтовой тРНК и защитить прикрепленную аминокислоту от гидролиза (Heller et al., 2017). Такой промежуточный продукт вероятно приводит к остановке трансляции, секвестрируя рибосому временно или направляя ее к последующему этапу. Альтернативная точка зрения – LерА способствует движению тРНК для разрешения остановившейся рибосомы. «Вытягивание» акцепторного стебля А-сайтовой тРНК вероятно создает обратное движение пептидной цепи вдоль полипептидного туннеля, что ведет к разворачиванию неправильно свернутого белка (Heller et al., 2017). Это дает белку второй шанс для правильного фолдинга. Такое предположение хорошо согласуется с наблюдением, что LерА увеличивает активную фракцию синтезируемого белка (Qin et al., 2006).

Установлено, что в клетках, лишенных LерА, накапливаются незрелые 30S субчастицы, содержащие 17S рРНК с пониженным количеством рибосомных белков — S3, S10, S14 и S21, которые участвуют на более поздних этапах биогенеза 30S субчастицы (Gibbs et al., 2017). Вероятно, LерА способствует формированию головного домена 30S субчастицы.

В 2018 году ученые из Китая обнаружили, что в отсутствие LерА клетки *E. coli* становятся менее восприимчивы к воздействию тетрациклина и растут несколько быстрее, чем клетки штамма «дикого типа» (Liu and Chen, 2018). *In trans* комплементация с плазмиды, несущей ген *lepA* восстанавливала рост  $\Delta lepA$  штамма до уровня клеток «дикого типа» и ингибировала трансляцию на этапах элонгации во время стресса, вызванном тетрациклином (Liu and Chen, 2018). Однако при проведении повторных экспериментов с разными штаммами оказалось, что устойчивость  $\Delta lepA$  клеток к тетрациклину штамм-специфична, устойчивый штамм был получен из Кейо коллекции (Baba et al., 2006). В дополнение, сравнение  $\Delta lepA$  штаммов Кейо коллекции из разных лабораторий на чувствительность к тетрациклину показало расхождение результатов (Liu and Chen, 2019). Это в свою очередь побудило нас проанализировать наш  $\Delta lepA$  штамм, полученный также из Кейо коллекции на устойчивость к тетрациклину, а также к ряду других антибиотиков, действующих на рибосому.

Цель работы – проверить штамм *ΔlepA E. coli* из Кейо коллекции (JW2553) на чувствительность к тетрациклину, стрептомицину, канамицину, хлорамфениколу, пурамицину, азитромицину, фузидовой кислоте, спирамицину, спектиномицину, олеандомицину и генетицину. Такое разнообразие мишеней позволит всесторонне оценить влияние делеции *lepA* на чувствительность *E. coli* к антибиотикам с разными механизмами ингибирования трансляции.

### Материалы и методы

Компетентные клетки штаммов *E. coli* MG1655 «дикого типа» (Blattner et al., 1997) и с делецией гена *lepA*, JW2553 (Baba et al., 2006) трансформировали плазмидой pDualrep2 (Osterman et al., 2012). Ночные культуры этих клеток разбавляли до оптической плотности  $OD_{590} = 0,1$  ое/мл и равномерно распределяли на чашках с твердой средой LB, содержащей 100 мкг/мл ампицилина. Плазмида pDualrep2 имеет ген ампициллин-резистентности. Далее на чашки добавляли по 1 мкл 5 мг/мл норфлоксацина (Nrf), 5 мг/мл хлорамфеникола (Cm), 5 мг/мл канамицина (Km), 1 мг/мл тетрациклина (Tet), 26 мг/мл фузидовой кислоты (FA), 24 мг/мл стрептомицина (Str), 20 мг/мл спектиномицина (Spc), 7,7 мг/мл спирамицина (Spr), 9,3 мг/мл азитромицина (Azr), 27 мг/мл олеандомицина (Oln), 100 мг/мл генетицина (G418) или 50 мг/мл пурамицина и инкубировали при 37°C в течение ночи. Флуоресценцию детектировали с помощью гель-документирующей системы ChemiDoc MP (Bio-Rad).

### Результаты и их обсуждение

Для проверки штамма *E. coli* JW2553 (*ΔlepA*) к действию антибиотиков мы использовали двойную репортерную систему на плазмиде pDualrep2 (Osterman et al., 2012). Данная система обнаружения ингибиторов синтеза белка основана на особенностях регуляции аттенюатора триптофанового оперона *E. coli*. Структурные гены, кодирующие субъединицы триптофансинтетазы необходимого для биосинтеза триптофана расположены за аттенюатором. Аттенюаторная область представляет собой последовательность из четырех обращенных повторов способных образовать три варианта шпилек, одна из которых является терминатором транскрипции. Если концентрация триптофана высока, то рибосома синтезирует лидерный пептид, нуклеотидная последовательность которого расположена сразу после оператора. В этом случае первые две области обращенных повторов аттенюатора перекрываются рибосомой, а оставшиеся свободными третий и четвертый повторы формируют терминаторную шпильку, и транскрипция нижележащей последовательности ДНК останавливается. Таким образом, в условиях избытка триптофана фермент, необходимый для его синтеза, не образуются. В случае недостатка триптофана рибосома начинает «зависать» на триптофановых кодонах последовательности лидерного пептида, закрывая только первый обращенный повтор аттенюатора, а вторичная структура синтезируемой полицистронной мРНК с тремя последующими повторами делает возможной транскрипцию структурных генов биосинтеза триптофана.

Прохождению РНК-полимеразы через аттенюаторную область также способствует остановка рибосомы с помощью антибиотиков. Поэтому на плазмиде pDualrep2 ген репортерного красного флуоресцентного белка *Katushka2S* был помещен под управление аттенюатора триптофанового оперона. Для предотвращения зависимости от триптофана последовательность аттенюатора была модифицирована, триптофановые кодоны были заменены на эффективно прочитываемые аланиновые, при этом чувствительность к остановке рибосомы сохранялась. Антибиотики, воздействующие на рибосому, индуцировали активность *Katushka2S*. Экспрессию сигнального белка визуализировали по образованию вокруг зоны ингибирования кольца, флуоресцирующего красным на фоне «газона» клеток репортерного штамма на агаризованной LB-среде. Второй сигнальный ген репортерной системы pDualrep2 – оранжевый флуоресцентный белок TurboRFP был клонирован под промотор *sulA*, реагирующего на индукцию SOS-ответа. В качестве индукторов SOS-ответа выступают антимикробные соединения, нарушающие биосинтез ДНК. Поскольку нас интересовали антибиотики, которые воздействуют только на рибосому, TurboRFP репортер мы решили использовать в качестве контроля. В своих экспериментах для индукции TurboRFP мы использовали антибиотик – норфлоксацин. Норфлоксацин ингибирует ДНК-гиразу, отвечающую за спирализацию бактериальной ДНК и соответственно вызывает SOS-ответ.

Штаммы *E. coli* MG1655 «дикого типа» и *ΔlepA* JW2553 были протестированы на одиннадцати антибиотиках, нацеленных на рибосому и ингибирующих синтез белка посредством различных механизмов: стрептомицин препятствует связыванию тРНК с Р-сайтом 30S субчастицы; тетрациклин и канамицин взаимодействуют с А-сайтом 30S субчастицы, а хлорамфеникол и пурамицин – с А-сайтом 50S субчастицы, соответственно они ингибируют связывание аминоацил-тРНК

с рибосомой; азитромицин угнетает пептидил-трансферазный центр рибосомы; фузидовая кислота, спирамицин, спектиномицин, олеандомицин – транслокацию, а генетомидин блокирует элонгацию трансляции. Клетки *E. coli* штаммов MG1655 «дикого типа» и  $\Delta lepA$  JW2553 трансформировали репортерной плазмидой pDualrep2, затем нанесли «газоном» на чашки Петри с питательной селективной LB-средой. После высушивания чашек, антибиотики капали на агаризованную LB-среду с «газоном» и инкубировали ночь. Чашки Петри фотографировали цифровой камерой при УФ-освещении. Для удобства восприятия сигнал TurboRFP оставляли оранжевым, а сигнал Katushka2S заменяли на зеленый. Результаты скрининга штаммов *E. coli* MG1655-pDualrep2 и JW2553-pDualrep2 на чувствительность к антибиотикам приведены на рисунке 1.

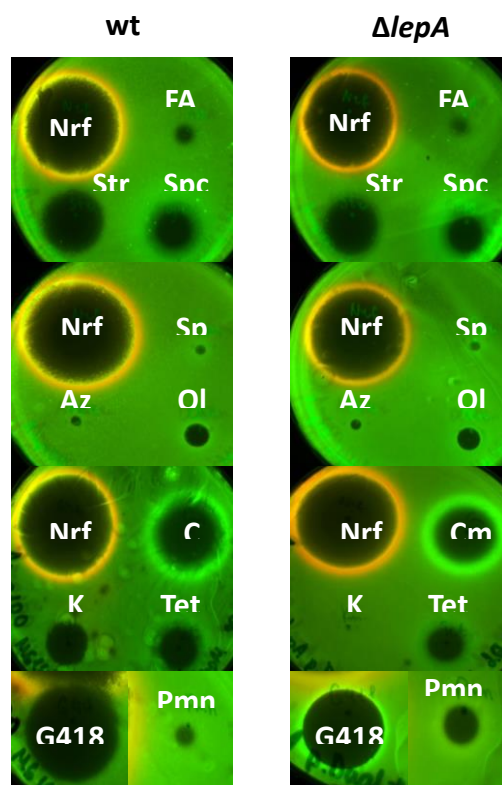


Рисунок 1. Индукция экспрессии белков TurboRFP норфлоксацином (Nrf) и Katushka2S фузидовой кислотой (FA), стрептомицином (Str), спектиномицином (Spc), спирамицином (Spr), азитромицином (Azr), олеандомицином (Oln), хлорамфениколом (Cm), канамицином (Km), тетрациклином (Tet), генетомидином (G418), пурамицином (Pmn) на бактериальных «газонах» штаммов *E. coli* MG1655-pDualrep2 (wt) и JW2553-pDualrep2 ( $\Delta lepA$ ). Зона ингибирования роста клеток канамицином в  $\Delta lepA$  штамме JW2553 минимальна, поскольку данный штамм несет на хромосоме ген канамицин-резистентности, полученный в результате делеции гена *lepA*.

Как видно из рисунка 1, норфлоксацин, использованный в экспериментах в качестве положительного контроля, индуцировал TurboRFP с одинаковой эффективностью как в штамме *E. coli* MG1655 «дикого типа», так и в  $\Delta lepA$  JW2553. В случае антибиотиков, подавляющих трансляцию, наблюдалась вариабельность сигнала Katushka2S в зависимости химической природы ингибитора. Заметное увеличение экспрессии гена белка Katushka2S вызывал хлорамфеникол. Вероятно, различия в уровне экспрессии связаны с тем, что разные антибиотики останавливают рибосому на различных позициях относительно стартового кодона, что приводит к неодинаковой эффективности трансляции сигнального белка. В целом, при сравнении результатов скрининга штаммов *E. coli* MG1655 «дикого типа» и  $\Delta lepA$  JW2553 видимых различий не выявлено: интенсивность сигнала Katushka2S и площадь зон ингибирования роста клеток для каждого антибиотика были схожими. Небольшое различие в размере зон ингибирования отмечено только для пурамицина. При этом активность пурамицина оказалась сопоставимой при сравнении штамма  $\Delta lepA$  JW2553 с другим «диким типом» — *E. coli* K12 (Bachmann, 1972), в этом случае размеры зон ингибирования роста клеток у обоих штаммов были примерно одинаковыми (данные не представлены).

Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод, что делеция гена *lepA* не изменяет чувствительность *E. coli* к трансляционно-ингибирующим антибиотикам, таким как тетрациклин, стрептомицин, канамицин, хлорамфеникол, пурамицин, азитромицин, фузидовая кислота, спирамицин, спектиномицин, олеандомицин и генетицин. По-видимому, белок LepA не принимает участия в механизмах, связанных с приобретением устойчивости микроорганизмов к антибиотикам.

**Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 24-24-00396).**

#### Литература

1. Baba T., Ara T., Hasegawa M. et al. Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection // *Molecular Systems Biology*. 2006. Vol. 2. 2006.0008. doi: 10.1038/msb4100050
2. Bachmann B.J. Pedigrees of some mutant strains of Escherichia coli K-12 // *Bacteriological Reviews*. 1972. Vol. 36. № 4. P. 525–557.
3. Badu-Nkansah A., Sello J.K. Deletion of the elongation factor 4 gene (*lepA*) in *Streptomyces coelicolor* enhances the production of the calcium-dependent antibiotic // *FEMS Microbiology Letters*. 2010. Vol. 311. № 2. P. 147–151.
4. Balakrishnan R., Oman K., Shoji S. et al. The conserved GTPase LepA contributes mainly to translation initiation in Escherichia coli // *Nucleic Acids Research*. 2014. Vol. 42. № 21. P. 13370–13383.
5. Bauerschmitt H., Funes S., Herrmann J.M. The membrane-bound GTPase Guf1 promotes mitochondrial protein synthesis under suboptimal conditions // *Journal of Biological Chemistry*. 2008. Vol. 283. № 25. P. 17139–17146.
6. Bijlsma J.J., Lie-A-Ling M., Nootenboom I.C. et al. Identification of loci essential for the growth of *Helicobacter pylori* under acidic conditions // *Journal of Infectious Diseases*. 2000. Vol. 182. № 5. P. 1566–1569.
7. Blattner F.R., Plunkett G., Bloch C.A. et al. The complete genome sequence of Escherichia coli K-12 // *Science*. 1997. Vol. 277. № 5331. P. 1453–1462.
8. Gagnon M.G., Lin J., Bulkley D., Steitz T.A. Ribosome structure. Crystal structure of elongation factor 4 bound to a clockwise-ratcheted ribosome // *Science*. 2014. Vol. 345. № 6197. P. 684–687.
9. Gagnon M.G., Lin J., Steitz T.A. Elongation factor 4 remodels the A-site tRNA on the ribosome // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016. Vol. 113. № 18. P. 4994–4999.
10. Gao Y., Bai X., Zhang D. et al. Mammalian elongation factor 4 regulates mitochondrial translation essential for spermatogenesis // *Nature Structural & Molecular Biology*. 2016. Vol. 23. № 5. P. 441–449.
11. Gibbs M.R., Moon K.M., Chen M. et al. Conserved GTPase LepA (Elongation Factor 4) functions in biogenesis of the 30S subunit of the 70S ribosome // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017. Vol. 114. № 5. P. 980–985
12. Heller J.L.E., Kamalampeta R., Wieden H. Taking a Step Back from Back-Translocation: an Integrative View of LepA/EF4's Cellular Function // *Molecular and Cellular Biology*. 2017. Vol. 37. № 12. e00653-16.
13. Ji D.L., Lin H., Chi W., Zhang L.X. CpLEPA is critical for chloroplast protein synthesis under suboptimal conditions in *Arabidopsis thaliana* // *PLoS One*. 2012. Vol. 7. № 11. e49746.
14. Kumar V., Ero R., Ahmed T. et al. Structure of the GTP Form of Elongation Factor 4 (EF4) Bound to the Ribosome // *Journal of Biological Chemistry*. 2016. Vol. 291. № 25. P. 12943–12950.
15. Liu B., Chen C. Translation Elongation Factor 4 (LepA) Contributes to Tetracycline Susceptibility by Stalling Elongating Ribosomes // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2018. Vol. 62. № 8. e02356-17
16. Liu H., Chen C., Zhang H. et al. The conserved protein EF4 (LepA) modulates the elongation cycle of protein synthesis // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011. Vol. 108. № 39. P. 16223–16228.
17. Liu H., Pan D., Pech M., Cooperman B.S. Interrupted catalysis: the EF4 (LepA) effect on back-translocation // *Journal of Molecular Biology*. 2011. Vol. 396. № 4. P. 1043–1052.
18. Osterman I.A., Prokhorova I.V., Sysoev V.O. et al. Attenuation-based dual-fluorescent-protein reporter for screening translation inhibitors // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2012. Vol. 56. № 4. P. 1774–1783.
19. Pech M., Karim Z., Yamamoto H. et al. Elongation factor 4 (EF4/LepA) accelerates protein synthesis at increased Mg<sup>2+</sup> concentrations // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011. Vol. 108. № 8. P. 3199–3203
20. Qin Y., Polacek N., Vesper O. et al. The highly conserved LepA is a ribosomal elongation factor that back-translocates the ribosome // *Cell*. 2006. Vol. 127. № 4. P. 721–733.
21. Wang B., Zhu J., Javid B. Clinically relevant mutations in mycobacterial LepA cause rifampicin-specific phenotypic resistance // *Scientific Reports*. 2020. Vol. 10. 8402.
22. Zhang D., Yan K., Liu G. et al. EF4 disengages the peptidyl-tRNA CCA end and facilitates back-translocation on the 70S ribosome // *Nature Structural & Molecular Biology*. 2016. Vol. 23. № 2. P. 125–131.