

УДК 577.2

Правила выживания: *Escherichia coli* в стационарной фазе

Ф. И. Плетнёв^{1*}, И. А. Остерман¹, А. А. Богданов^{1,2}, О. А. Донцова^{1,2}, П. В. Сергиев¹¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73

*E-mail: philippletnev@gmail.com

Поступила в редакцию 13.07.2015

РЕФЕРАТ В представленном обзоре рассмотрены основные процессы, характерные для стационарной фазы роста бактериальной культуры, а также регуляторные механизмы, позволяющие бактериям выживать в условиях стресса, вызванного наступлением стационарной фазы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА выживаемость, голод, стационарная фаза, стресс, *Escherichia coli*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ GASP – фенотип преимущественного роста в стационарной фазе; НТО – нетранслируемая область; TLD – тРНК-подобный домен; MLD – мРНК-подобный домен; тмРНК – транспортно-матричная РНК; ПКГ – программируемая гибель клеток; ТА – токсин-антитоксин; QS – бактериальная система межклеточной коммуникации; VBNC – живые, но некультивируемые бактерии.

ВВЕДЕНИЕ

В природе бактериальная популяция редко находится в благоприятных условиях, сходных с лабораторными условиями культивирования в богатой среде при оптимальной температуре. Влияние неблагоприятных факторов окружающей среды, накопление токсичных отходов метаболизма при голоде, антибиотиков – все это угрожает выживанию *Escherichia coli* и других бактерий. Для защиты от агрессивного влияния окружающей среды бактериальная культура способна переходить в состояние стационарной фазы, в которой происходит активация внутренних систем защиты от стресса. Чтобы выжить в неблагоприятных условиях бактериальная культура способна кардинально изменять свою организацию как на молекулярном уровне, так и на уровне клетки.

Понимание процессов, происходящих в стационарной фазе, необходимо не только с фундаментальной, но и с практической точки зрения. В стационарной фазе клетки становятся на порядки более устойчивыми к воздействию антибактериальных препаратов, приобретают способность выживать даже в невероятно агрессивных условиях. Данный обзор посвящен основным процессам, характерным для стационарной фазы.

СТАДИИ РОСТА БАКТЕРИАЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ

Рост бактериальной культуры представляет собой процесс последовательного деления клеток, состав-

ляющих эту культуру, с образованием двух идентичных дочерних клеток.

Изучение выживаемости клеток *E. coli* при культивировании в течение нескольких дней выявило характерную форму кривой роста, которую можно разделить на пять фаз. Несмотря на различия в условиях культивирования, измерения и даже видовых особенностей, общая форма этой кривой, за исключением некоторых параметров, всегда остается неизменной (рис. 1) [1].

В момент, когда клетки попадают в питательную среду после пребывания в стационарной фазе, можно наблюдать то, что принято называть лаг-фазой. Особенность этой фазы состоит в практическом отсутствии роста бактериальной культуры в течение некоторого времени, что можно объяснить необходимостью в адаптации клеточного метаболизма к новым условиям окружающей среды. Длительность этой фазы определяется не только видом бактерии, но и тем, насколько долго культура находилась в условиях голода [2].

После адаптации метаболизма к новым условиям культивирования клетки начинают активное деление и входят в так называемую логарифмическую фазу роста. Так как бактериальные клетки размножаются бинарным делением, увеличение количества клеток в среде за единицу времени хорошо аппроксимируется экспоненциальной функцией. Характеристикой роста культуры в логарифмической фазе является

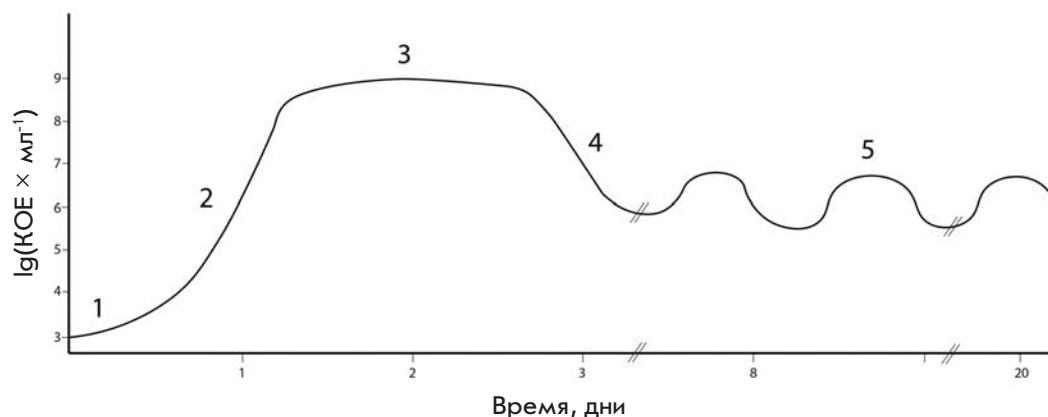


Рис. 1. Кривая роста бактериальной культуры. Отмечены фазы роста 1 – лаг-фаза, 2 – логарифмическая фаза, 3 – стационарная фаза, 4 – фаза смерти, 5 – долговременная стационарная фаза

ся время удвоения количества клеток. Стоит отметить, что этот параметр напрямую зависит от среды культивации и сильно увеличивается при переходе от богатой среды к более бедной. Для стандартного лабораторного штамма *E. coli* MG1655 K-12 время удвоения при 37°C составляет около 30 мин.

После исчерпания питательных веществ в окружающей среде бактериальная культура переходит в стационарную фазу, которая характеризуется равновесием между количеством делящихся и гибнущих клеток и выглядит как плато на кривой роста. Стоит отметить, что термин стационарная фаза относится именно к участку на кривой роста, который характеризуется равновесием между делящимися и гибнущими клетками, а не к механизму защиты при голоде. Стационарная фаза наступает в популяции клеток не только из-за обеднения внешней среды, но и из-за различных стрессов. Со временем в окружающей среде культуры, находящейся в стационарной фазе, начинают накапливаться токсичные продукты катаболизма, что приводит к уменьшению количества клеток. Этот этап роста бактериальной культуры принято называть фазой смерти. В основе этого процесса могут лежать процессы программируемой и случайной гибели клеток.

Конец фазы смерти наступает после того, как большая часть популяции клеток погибает, и остатки питательных веществ из мертвых клеток попадают в окружающую среду. Уцелевшие клетки могут использовать эти вещества для своего выживания, что приводит бактериальную культуру в состояние долговременной стационарной фазы, которая может поддерживаться в течение нескольких недель и даже месяцев. Одна из характерных особенностей долговременной стационарной фазы – циклическое увеличение и снижение титра жизнеспособных клеток в популяции. Этот феномен, названный GASP-фенотипом (Growth Advantage in Stationary Phase), объясняется появлением мутантных клеток, более

приспособленных к росту в данных условиях, чем родительский штамм [3].

ИЗМЕНЕНИЯ В СТРУКТУРЕ И ТОПОЛОГИИ ДНК

Геномная ДНК *E. coli* представлена одной кольцевой хромосомой, которая образует в цитоплазме бактерии структуру, называемую нуклеоидом. В состав нуклеоида входят также белки (регуляторные и структурные) и РНК [4].

За поддержание структуры нуклеоида отвечает множество белков, экспрессия которых зависит от фазы роста бактериальной культуры. Наиболее значимыми структурными белками нуклеоида считаются IHF, HU, Dps, Fis и H-NS.

Активная форма H-NS представляет собой димер, для которого характерно наличие двух противоположно направленных ДНК-связывающих доменов, что позволяет белку служить «мостиком» между двумя дуплексами ДНК. H-NS не обладает специфичностью к определенным нуклеотидным последовательностям, но проявляет большее сродство к изогнутой, нежели к линейной ДНК [4]. В логарифмической фазе роста в клетке на 1 молекулу H-NS приходится 1400 п.н. ДНК [5].

Клеточный фактор интеграции (IHF) представляет собой гетеродимерный белок, проявляющий специфичность к консенсусным участкам ДНК длиной примерно 30 п.н. Связывание IHF с ДНК приводит к ее изгибу, который стабилизируется взаимодействием отрицательно заряженного остова ДНК и преимущественно положительно заряженной поверхностью белка. Показано, что связывание IHF может приводить к снижению длины ДНК на 30% [4]. Экспрессия IHF максимальна в стационарной фазе, когда на 1 молекулу белка приходится 335 п.н. геномной ДНК [5]. Вероятно, IHF отвечает за организацию структуры нуклеоида в ранней стационарной фазе.

Гистон-подобный гомодимерный белок HU состоит либо из двух субъединиц HU α , либо из двух

HU β . HU проявляет высокое (40%) структурное сходство с белком IHF. HU неспецифично связывает ДНК, но при этом имеет предпочтение к суперскрученным и неупорядоченным формам ДНК. Похоже, что HU способен вызывать и стабилизировать изгиб двойной спирали ДНК с самыми разнообразными углами поворота. Случайное связывание HU приводит к большому числу «подвижных» изгибов ДНК (с углами изгиба до 180°), что, в конечном счете, способствует уменьшению длины линейной ДНК на 50% [4]. Содержание HU наиболее велико в клетке во время логарифмической фазы, где оно составляет примерно 1 молекулу белка на 550 п.н. ДНК [5].

Фактор стимуляции инверсии (Fis) представляет собой гомодимерный ДНК-связывающий белок, способный распознавать определенные консенсусные последовательности длиной 15 п.н., однако может эффективно связывать ДНК и в случайных участках. Связывание Fis приводит к изгибанию ДНК на 50–90°. Многие сайты связывания Fis находятся в промоторных участках оперонов, связывание белка в которых играет регуляторную роль. Предполагается, что Fis служит «сенсором» суперскрученности ДНК. В зависимости от топологии ДНК Fis проявляет способность к ингибированию экспрессии гена ДНК-гиразы [4]. Fis – один из наиболее представленных в логарифмической фазе структурных белков нуклеоида, содержание которого достигает 1 молекулы на 450 п.н. ДНК [5].

В стационарной фазе нуклеоид становится более конденсированным, что позволяет защищать ДНК от повреждений. Этот механизм реализуется при помощи белка Dps (ДНК-связывающий белок из голодающих клеток), который способен неспецифично связывать ДНК и активен именно в периоды голода [6]. При окислительном стрессе в логарифмической фазе экспрессия гена, кодирующего этот белок, находится под контролем σ^{70} -субъединицы РНК-полимеразы и белка OxyR, в периоды голода – регулируется σ^{38} -субъединицей [7]. После индукции синтеза в стационарной фазе Dps становится наиболее представленным белком в клетках *E. coli* [7]. Мономеры Dps способны образовывать додекамеры в форме колец, которые связываются с ДНК в присутствии ионов магния и способствуют образованию высокоупорядоченного и стабильного нуклеопротеидного комплекса, названного «биокристалл» [8]. Именно образование этого комплекса приводит к конденсации нуклеоида. Похоже, что глобальная защитная роль Dps в отношении различных стрессов (голод, окислительный стресс, УФ-излучение и радиоактивность, тепловой стресс и экстремальные значения pH) осуществляется за счет комбинации нескольких его свойств – способности конденсировать ДНК, хелатировать ионы железа и проявлять ферроксидазную активность, а также за счет способности регулировать экспрессию генов [6, 9].

Еще один белок, способствующий защите ДНК от повреждений в стационарной фазе, – SbrA

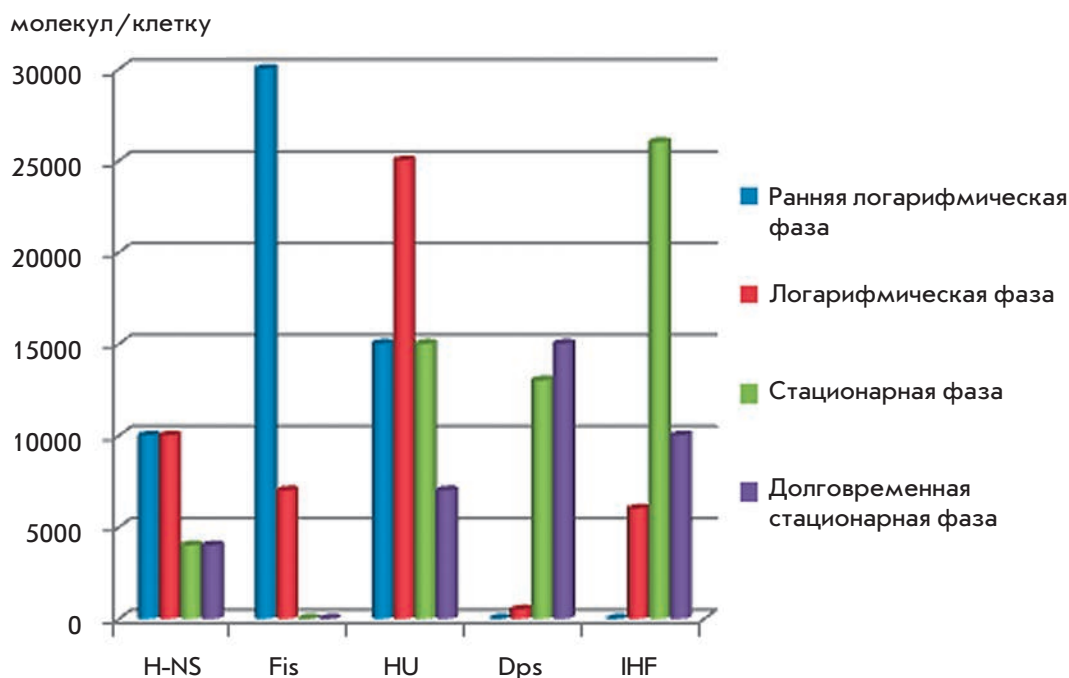


Рис. 2. Нормированные (H-NS, Fis, HU, IHF – димеры, Dps – додекамер) количества структурных белков нуклеоида в зависимости от фазы роста. Построено на основе данных работы [5]

(Curved DNA binding protein). В логарифмической фазе CbpA отсутствует в клетках, однако при наступлении стационарной фазы его количество возрастает до 10000 копий на одну клетку. Транскрипция гена *cbrA* также зависит от σ^{38} -субъединицы РНК-полимеразы [5].

CbpA связывает ДНК в форме димера, что приводит к ее компактизации. В комплексе с этим белком ДНК защищена от деградации эндонуклеазными *in vitro* [10].

Структурные белки нуклеоида прямо влияют не только на структуру бактериальной хромосомы, они активно участвуют в регуляции экспрессии генов. Стоит отметить, что эти белки выполняют сходные функции по компактизации и защите ДНК от повреждений, и преобладание каждого из них в клетке зависит от фазы роста (рис. 2). Однако за счет различий в механизмах и способах компактизации использование того или иного структурного белка нуклеоида позволяет клетке адаптироваться, облегчая доступ к ДНК в благоприятных условиях и максимально защищая генетический материал при стрессе.

Недавно было показано, что метилирование остатков цитозина в бактериальной ДНК может влиять на регуляцию синтеза белков в стационарной фазе. При изучении штамма с нокаутом гена ДНК-метилтрансферазы Dcm установлено, что в нем заметно повышен синтез белков стационарной фазы и, в частности, белка σ^{38} -субъединицы РНК-полимеразы [11].

РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ В СТАЦИОНАРНОЙ ФАЗЕ

σ^{38} – сигма-фактор стационарной фазы

Транскрипция – один из центральных и жизненно необходимых процессов, в ходе которого на ДНК-матрице происходит синтез РНК. Эта реакция катализируется РНК-полимеразой.

У бактерий инициацию транскрипции осуществляет холофермент РНК-полимеразы, в состав которого входит кор из субъединиц $\alpha, \beta, \beta', \omega$, содержащий активный центр и выполняющий функцию синтеза РНК, и фактор инициации – σ -субъединица, или σ -фактор. Для образования активного холофермента, способного синтезировать РНК, к РНК-полимеразе должна присоединиться σ -субъединица, которая отвечает за распознавание промотора [12]. Известно, что геном *E. coli* кодирует семь различных σ -факторов (таблица), каждый из которых способен распознавать лишь определенную группу промоторов. Именно σ -субъединица является главным клеточным регулятором транскрипции. Использование различных σ -факторов позволяет клетке кардиналь-

Список σ -факторов *E. coli*

Сигма-фактор	Функция	Источник
RpoD (σ^{70})	Экспрессия генов домашнего хозяйства	[13]
RpoS (σ^{38})	Инициация стационарной фазы и стрессовый ответ	[14]
RpoF (σ^{28})	Синтез флагеллы и хемотаксис	[15]
RpoN (σ^{54})	Активация метаболизма азота	[16]
RpoH (σ^{32})	Ответ на тепловой шок	[17]
RpoE (σ^{24})	Ответ на стресс, связанный с повреждением мембраны	[18]
FecI (σ^{19})	Экспрессия генов транспорта цитрата	[19]

но изменить свой транскриптом в ответ на различные сигналы.

В условиях стационарной фазы бактериальная клетка оказывается перед необходимостью регулировать транскрипцию таким образом, чтобы активировать экспрессию генов, требующихся для выживания в условиях стресса и голода, и подавить транскрипцию «лишних» генов. С этой целью в клетках *E. coli* используется σ^{38} (σ^S)-фактор, кодируемый геном *rpoS*, который выступает в роли главного регулятора транскрипции в ответ на различные стрессы. Полногеномный анализ экспрессии генов, зависимых от σ^{38} -фактора, показал, что σ^{38} прямо или косвенно регулирует транскрипцию примерно 10% генов *E. coli* [20].

σ^S -фактор отвечает за транскрипцию генов, участвующих в стрессовом ответе и вторичном метаболизме. Большая часть генов, регулируемых σ^{38} -субъединицей, подвержена дополнительной регуляции. Именно этот фактор необходим для перехода бактериальной культуры в стационарную фазу. Известны некоторые σ^{38} -зависимые гены, экспрессия которых максимальна в момент перехода культуры из экспоненциальной в стационарную фазу роста [14].

σ^S -фактор является гомологом основного клеточного сигма-фактора – σ^{70} , который отвечает за транскрипцию генов домашнего хозяйства и обладает наибольшим сродством к РНК-полимеразе. Показано, что σ^{38} -субъединица способна узнавать те же консенсусные последовательности, что и σ^{70} , самые значимые из которых – элементы -10 и -35. Предполагается, что различие между промоторами, которые узнаются этими сигма-факторами, состоит в одиночных заменах оснований в районе консенсусных гексамеров, т.е. специфичность σ^{38} может

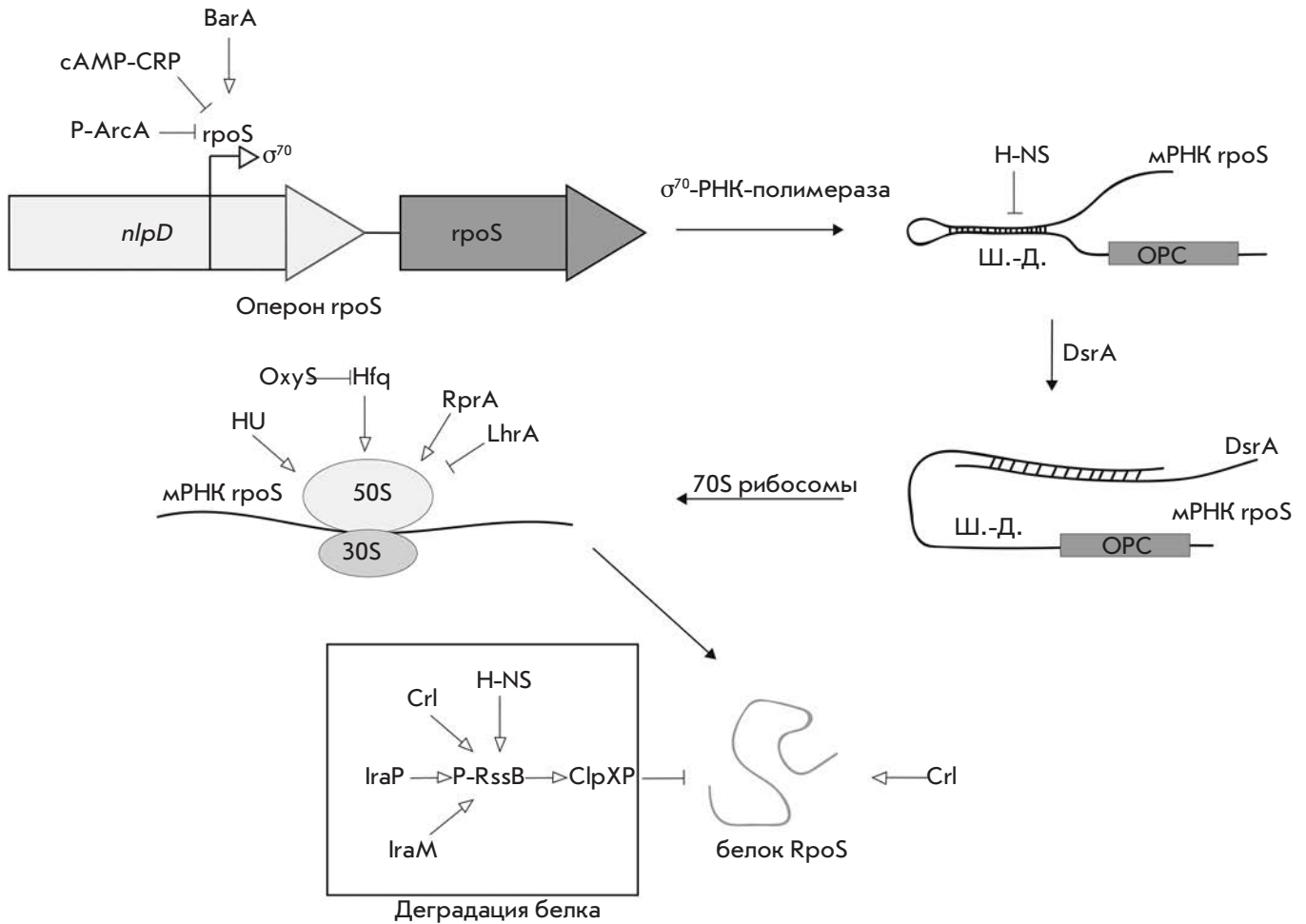


Рис. 3. Схема регуляции экспрессии и активности σ^{38} . В верхней левой части рисунка показана схема регуляции транскрипции гена σ^{38} , *rpoS*. Влияние на транскрипцию белков-регуляторов показано с помощью стрелок. В правой части рисунка иллюстрируется влияние белка H-NS и малой РНК DsrA на вторичную структуру мРНК *rpoS*. В центре показаны белки, влияющие на трансляцию мРНК *rpoS*, а в нижней части рисунка – белки, влияющие на стабильность синтезированного σ^{38} . Последовательность Шайна-Дальгарно обозначена «Ш.-Д.», «ОПС» – открытая рамка считывания

определяться именно незначительным отклонением последовательности гексамера от консенсусной [21]. Сообщается также о предпочтении σ^{38} -РНК-полимеразой промоторов с неоптимальными для σ^{70} последовательностями в области между элементами -10 и -35 [22]. Основываясь на известных последовательностях промоторов, показали, что узнавание промотора σ^{38} -РНК-полимеразой улучшается в присутствии АТ-богатого участка в положениях -10...+1 от точки начала транскрипции [14].

Экспрессия σ^{38} -субъединицы подвержена сложной регуляции на всех уровнях (транскрипции, трансляции, активности фактора, стабильности самого σ^{38} и его мРНК), что, очевидно, позволяет усилить чувствительность ответа клетки на самые разнообразные стрессовые сигналы (рис. 3).

Транскрипция *rpoS* репрессируется фосфорилированной формой регулятора ArcA [23], комплекс сAMP-CRP также репрессирует транскрипцию [24]. Белок BarA необходим для индукции экспрессии в логарифмической фазе роста [25]. Сигнальная молекула ppGpp позитивно влияет на базальный уровень синтеза σ^S [26]. При переходе из логарифмической в стационарную фазу экспрессия *rpoS* увеличивается на порядок [24].

Показано, что на вторичную структуру, стабильность и способность мРНК *rpoS* к трансляции влияет множество факторов. мРНК гена *rpoS* содержит длинную 5'-НТО [27], которая играет важную роль в регуляции трансляции и стабильности этой мРНК. Регулятор H-NS связывается с мРНК и способствует ее деградации [28]. В свою очередь, малая

РНК DsrA стабилизирует ее и способствует инициации трансляции за счет разворачивания вторичной структуры мРНК в районе сайта посадки рибосомы [29]. Белок Hfq необходим для трансляции мРНК *rpoS* [30], а малая РНК OxyS репрессирует трансляцию σ^S -субъединицы, скорее всего, за счет изменения активности Hfq [31]. Малая РНК RprA и белок HU стимулируют трансляцию σ^{38} -субъединицы. При недостатке фосфора наблюдается аккумуляция σ^S вследствие увеличения количества мРНК *rpoS*. Белок LrhA совместно с Hfq способен репрессировать трансляцию мРНК *rpoS* [32].

Известно, что 6S РНК активирует транскрипцию с некоторых σ^S -зависимых промоторов, никак не влияя на уровень экспрессии *rpoS* [33]. Сигнальная молекула ppGpp усиливает способность σ^S вытеснить σ^{70} из минимального фермента РНК-полимеразы [34]. Показано, что белок Rsd выполняет сходную функцию [35]. Нехватка азота приводит к экспрессии генов, регулируемых σ^S , однако, уровень экспрессии самой субъединицы возрастает при этом лишь в 2 раза, т.е., по-видимому, азотный голод влияет скорее на активность самого сигма-фактора, а не на его экспрессию [36]. Фактор сборки РНК-полимеразы CrI увеличивает активность σ^S , влияя на его способность к связыванию с РНК-полимеразой [37].

В логарифмической фазе роста действует система деградации σ^S -субъединицы, основанная на энергезависимой протеазе ClpXP, которая моментально расщепляет фактор σ^S при избытке энергии в клетке [38]. В качестве фактора-помощника ClpXP выступает белок RssB, необходимый для быстрого протеолиза σ^S . RssB отводится роль узнавания σ^S -фактора. Поли(А)-полимераза, белки IraP, IraM, H-NS и CrI усиливают эффект RssB [37, 39–41]. Транскрипция *rssB* находится под контролем σ^S . Нехватка источников углерода приводит к накоплению сигма-фактора из-за увеличения его стабильности. Молекулярный механизм этого процесса не исследован [42].

Подводя итог, следует отметить, что активная экспрессия *rpoS* наблюдается в ответ на резкие неблагоприятные изменения условий окружающей среды. При этом сложная система регуляции экспрессии этого гена и моментальная деградация σ^S в оптимальных условиях роста позволяют клетке оперативно изменить транскрипционный профиль в ответ на стресс и быстро вернуться к использованию σ^{70} по окончании неблагоприятных условий.

Некоторые регуляторы транскрипции в стационарной фазе

Регуляция транскрипции в стационарной фазе не ограничивается сменой сигма-фактора. Для изменения экспрессии отдельных генов в бактериальной

клетке существует большое количество регуляторов, специфичных для стационарной фазы.

Один из таких регуляторов – высококонсервативный бактериальный белок Lrp (leucine-responsive regulatory protein), который может действовать и как репрессор, и как активатор транскрипции. Этот белок является одним из главных регуляторов стационарной фазы, воздействующим более чем на 400 генов *E. coli*, причем около 75% этих генов активны именно в стационарной фазе роста. Среди них встречаются гены, продукты которых ответственны за биосинтез аминокислот, катаболизм, систему транспорта питательных веществ, синтез пилей, использование различных источников углерода [43]. Основная задача Lrp – адаптация клеточного метаболизма к условиям окружающей среды. Интересно, что Lrp увеличивает уровень анаболизма аминокислот, снижая, вместе с тем, уровень их катаболизма [44].

Экспрессия гена *lrp* позитивно регулируется при помощи сигнальной молекулы ppGpp. Связывание лейцина также может влиять на его активность. Lrp способен активировать экспрессию генов, необходимых во время голода, и репрессировать гены, активные в логарифмической фазе роста. Предполагается, что механизм чувствительности к голоданию основан на связывании молекул лейцина, снижение внутриклеточной концентрации которого может быть признаком этого состояния [45].

Мутации, нарушающие функцию ДНК-связывающего домена Lrp, усиливают эффект GASP-фенотипа, в частности из-за того, что клетки с подобной мутацией способны более эффективно усваивать некоторые аминокислоты [3].

Не только белковые регуляторы, но и малые РНК влияют на экспрессию генов в стационарной фазе. Подобные РНК способны стимулировать трансляцию и влиять на стабильность специфичных мРНК. В геноме *E. coli* обнаружено более 60 генов малых РНК, часть из которых отвечает за регуляцию стрессового ответа. Бактериальные малые РНК представляют собой короткие РНК размером 80–100 нуклеотидов. Для активности многих из них требуется связывание с шапероном Hfq [46], способным образовывать комплекс с AU-богатыми участками РНК, за счет чего он может стабилизировать мРНК или, наоборот, ускорять ее гидролиз и ингибировать трансляцию. Малые РНК DsrA и RprA стимулируют трансляцию σ^S -фактора. В оптимальных условиях роста 5'-НТО мРНК *rpoS* обладает вторичной структурой, блокирующей сайт посадки рибосом. Малые РНК DsrA и RprA способны взаимодействовать с 5'-НТО мРНК *rpoS* за счет комплементарных участков, что приводит к изменению вторичной структуры мРНК и открытию сайта посадки рибосом [47].

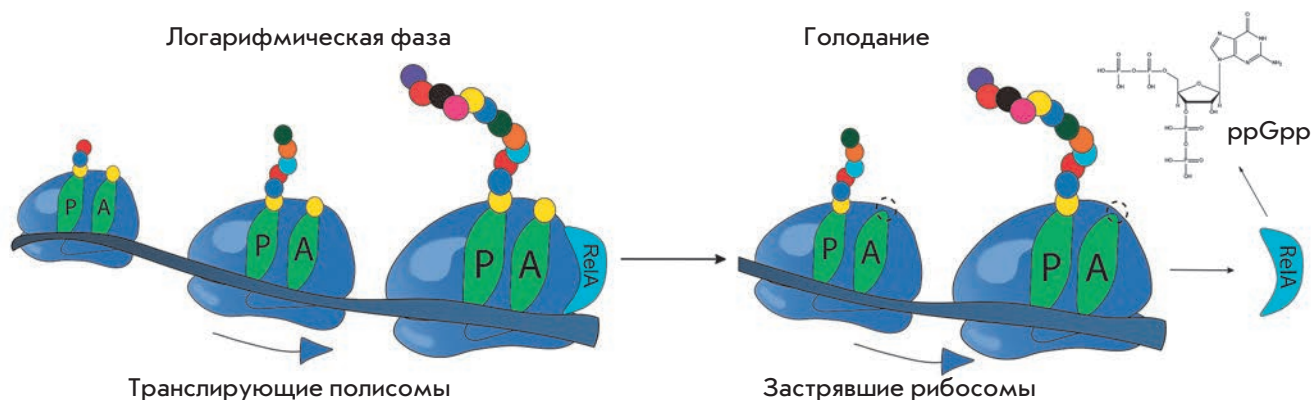


Рис. 4. Схема синтеза ppGpp под действием RelA при аминокислотном голоде

Другая малая РНК, ОхуS, появляется при окислительном стрессе и репрессирует трансляцию RpoS за счет конкурентного связывания РНК-шаперона Hfq [31]. Из других малых РНК, активных в стационарной фазе, можно упомянуть MicA и RybB, которые вовлечены в регуляцию проницаемости внешней мембраны. Именно внешняя мембрана служит первой линией обороны при контакте с окружающей средой. Для защиты клетки от повреждений изменяется состав мембран, что позволяет клетке переживать периоды стресса. Предполагается, что MicA и RybB вместе с Hfq являются компонентами системы антисмыслового ингибирования трансляции. РНК RybB контролирует экспрессию двух белков, компонентов внешней мембраны – OmpC и OmpW. В свою очередь, малая РНК MicA вызывает деградацию мРНК белка внешней мембраны OmpA [48].

СТРОГИЙ ОТВЕТ

Одним из первых механизмов регуляции экспрессии генов у бактерий, описанных на молекулярном уровне, стало ингибирование синтеза рРНК при аминокислотном голодании. Генетический анализ позволил обнаружить мутацию, приводящую к отсутствию снижения синтеза рРНК в ответ на аминокислотное голодание. Эту мутацию охарактеризовали как «ослабляющую строгость» влияния количества аминокислот на биосинтез РНК [49]. Позже было показано, что эта мутация инактивирует ген *relA*, кодирующий (p)ppGpp-синтазу [50]. В дальнейшем показали, что синтез этого нуклеотидного регулятора является ответом клетки на стресс. Эта регуляторная система контролирует репликацию, трансляцию, транскрипцию и активность ферментов стрессового ответа [51].

Синтез ppGpp осуществляется двумя белками со сходными функциями – RelA и SpoT. RelA, или ppGpp-синтаза I, выполняет лишь функцию синтеза гуанозинтетрафосфата, тогда как SpoT про-

являет двойную каталитическую активность – способность синтезировать ppGpp (ppGpp-синтаза II) и деградировать его (ppGpp-гидролаза). Активность RelA и SpoT регулируется различными механизмами. RelA отвечает за передачу сигнала о нехватке одной или нескольких аминокислот, а SpoT распознает нехватку источников углерода, фосфора, железа или жирных кислот [3].

При обилии питательных веществ RelA находится в ассоциированной с 70S рибосомами форме. В случае аминокислотного голодания в клетке накапливается деацилированная тРНК. Такая тРНК, находясь в избытке, может попасть в А-сайт рибосомы, тогда рибосомы останавливаются, что приводит к диссоциации комплекса RelA с рибосомой. В свободном виде RelA способен катализировать перенос пирофосфата от АТФ к GTP или GDP [52]. Одна из особенностей подобного механизма состоит в том, что RelA реагирует на недостаток одной аминокислоты, даже если другие аминокислоты присутствуют в достаточных количествах [50].

Известно, что одна бактериальная клетка содержит очень мало молекул RelA, что долго не соотносилось с экспериментально наблюдаемой скоростью аккумуляции ppGpp при аминокислотном голоде. Был предложен механизм, согласно которому при появлении «застрявших» рибосом, RelA теряет с ними связь. Единичный акт диссоциации сопровождается синтезом одной молекулы ppGpp. После этого свободный RelA способен «перепрыгнуть» на соседнюю рибосому, транслирующую мРНК. Если она также не способна вести синтез из-за деацилированной тРНК в А-сайте, то цикл повторяется, если же она активна, то RelA остается связанным на этой рибосоме в неактивной форме (рис. 4) [52].

В благоприятных условиях роста SpoT обладает лишь гидролитической активностью по отношению к ppGpp, что приводит к отсутствию в клетке гуа-

нозинтетрафосфата. Гидролитическая активность SpoT репрессируется при связывании с деацелированными тРНК. Из-за подобного механизма активации SpoT обладает достаточной активностью лишь при недостатке большого числа различных аминокислот. SpoT, как полагают, ассоциирован с ацилпереносящим белком, что позволяет ему контролировать количество жирных кислот в клетке. Вероятно, этот механизм позволяет ему «чувствовать» и углеродный голод [53]. При понижении концентрации жирных кислот происходит индукция синтеза ppGpp. При помощи белка-партнера DksA ppGpp способен связываться с β -субъединицей РНК-полимеразы, непосредственно влияя на сродство к различным промоторам, чем изменяет уровень экспрессии более 80 генов. Особенно важно подавление экспрессии всех компонентов системы биосинтеза белка: рРНК, рибосомных белков и факторов трансляции [54].

ppGpp вместе с антисигма-фактором Rsd помогает σ^{38} -субъединице конкурировать за ферментативную основу РНК-полимеразы за счет снижения сродства к ней σ^{70} . Когда условия окружающей среды становятся благоприятными, восстанавливается гидролитическая активность SpoT, уровень ppGpp снижается, что означает окончание строгого ответа [34].

ПРОЦЕСС ТРАНСЛЯЦИИ В СТАЦИОНАРНОЙ ФАЗЕ РОСТА *E. coli*

Один из важнейших процессов в клетке – синтез белков, ключевым участником которого является рибосома, сложный нуклеопротеидный комплекс, способный синтезировать белок согласно информации, закодированной в мРНК. В стационарной фазе бактериальной культуры происходит сильное снижение уровня синтеза белка, что не вызывает удивления, поскольку трансляция считается наиболее энергозатратным процессом в клетке, и в условиях нехватки аминокислот и других ресурсов бактериальной клетке нужно подавить трансляцию. Необходимо отметить, что процессы, влияющие на трансляцию в стационарной фазе, сильно зависят от длительности и глубины состояния голода. В ответ на голод активируются самые разные механизмы спасения отдельной клетки, а позже и всей бактериальной популяции.

Механизмы защиты при незначительном голоде

При исчерпании питательных веществ в клетке накапливаются деацелированные тРНК и укороченные мРНК. На подобных мРНК рибосомы могут «застревать», поскольку в процессе синтеза рибосома доходит до конца мРНК и не находит стоп-кодона. Такая рибосома остается связанной с мРНК и не может освободиться из-за того, что механизм терми-

нации трансляции зависит от наличия стоп-кодона. Подобные рибосомы могут быть «спасены» при помощи механизма транс-трансляции.

Транс-трансляция осуществляется комплексом необычной тмРНК (транспортно-матричной РНК) с небольшим белком SmpB. тмРНК состоит из двух доменов: тРНК-подобного домена (TLD) и мРНК-подобного домена (MLD). Сходство TLD-домена и тРНК не только структурное, но и функциональное. Этот домен узнается аланин-тРНК-синтетазой, и 3'-конец тмРНК «заряжается» остатком аланина [55].

В случае появления «застрявших» рибосом совместная работа тмРНК, SmpB и фактора элонгации EF-Tu позволяет распознать их [56], после чего комплекс SmpB и тмРНК попадает в А-сайт рибосомы, где SmpB принимает форму, мимикрирующую под структуру антикодона аланиновой тРНК. Затем за счет гидролиза молекулы GTP происходит перенос пептида с тРНК в Р-сайте на остаток аланина тмРНК в А-сайте, и трансляция возобновляется на матрице MLD-домена тмРНК [56]. В MLD закодирован С-концевой пептид, сигнализирующий о необходимости деградации данной полипептидной цепи. В результате транс-трансляции освобождается «застрявшая» рибосома, и потенциально вредный полипептид деградирует под действием протеаз [57].

Другой путь спасения рибосом, дошедших до 3'-конца мРНК и не встретивших стоп-кодон, – использование белков ArfA и ArfB. Ген *arfA* кодирует короткий полипептид, состоящий из 72 аминокислотных остатков. Функциональная форма этого белка состоит из 55 аминокислот и транслируется с укороченного рибонуклеазой III фрагмента мРНК. Из-за отсутствия стоп-кодона появление такого полипептида возможно лишь в случае нарушения механизма транс-трансляции. ArfA способен связываться с «застрявшей» рибосомой и рекрутировать к ней фактор терминации RF2, что приводит к отщеплению полипептидной цепи с пептидил-тРНК и высвобождению рибосом [58]. Сходным образом действует и фактор ArfB, который способен связываться с пустым А-сайтом рибосом и катализировать гидролиз пептидил-тРНК независимо от факторов терминации трансляции [59].

Гибернация рибосом как ответ на усиливающийся голод

Синтез рибосом относится к чрезвычайно энергетически и ресурсозатратным процессам. Именно поэтому должны существовать механизмы, позволяющие подавить трансляцию, непосильную для голодающих клеток, но сохранить при этом имеющиеся рибосомы до лучших времен.

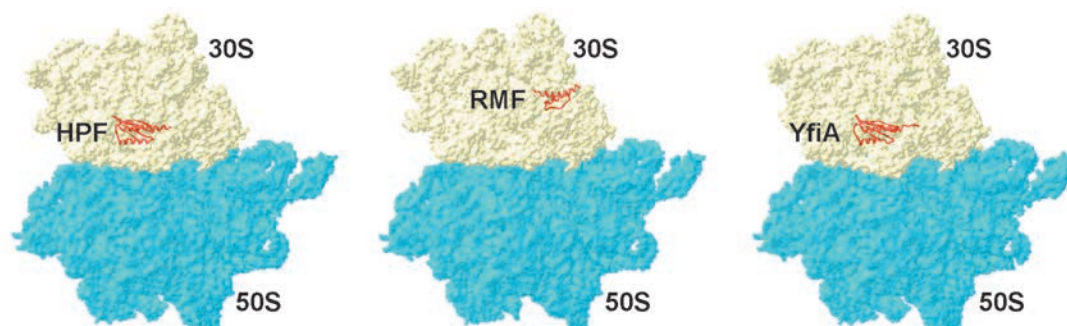


Рис. 5. Сайты связывания гибриационных факторов RMF (PDB: 4V8G), HPF (PDB: 4V8H) и YfiA (PDB: 4V8I)

Оказалось, что механизм хранения неактивных рибосом действительно существует и представляет собой временное «выключение» рибосом. Этот процесс, названный гибернацией рибосом, реализуется в рамках строгого ответа, когда при нехватке аминокислот в клетке накапливаются деацелированные тРНК, что служит сигналом к синтезу молекулы ppGpp при помощи ассоциированного с рибосомами фермента RelA [52]. Именно ppGpp регулирует экспрессию генов, кодирующих белки гибернации рибосомы.

Основной путь гибернации состоит в образовании из активных 70S рибосом «спящих» 100S димеров и неактивных 70S мономеров, а к основным гибернационным белкам *E. coli* относятся HPF, RMF и YfiA (рис. 5).

Первые два белка отвечают за образование неактивных 100S димеров. На первой стадии белок RMF связывается с областью 16S рРНК, которая взаимодействует с последовательностью Шайна-Дальгарно мРНК. Именно этот участок критически важен для инициации трансляции в клетках прокариот, и само связывание этого белка ингибирует трансляцию. Особенно важно то, что RMF не может связываться с транслирующими рибосомами, что предотвращает образование недосинтезированных белков, которые могут быть токсичными для клетки. Связывание гибернационного фактора в этом районе приводит к повороту головы малой субчастицы. Подобное изменение конформации способствует образованию рибосомных димеров 90S. После димеризации двух рибосом и образования 90S димера происходит связывание гибернационного фактора HPF, который дополнительно стабилизирует данную структуру и закрывает доступ тРНК в А- и Р-сайты рибосом. Образовавшийся комплекс двух 70S рибосом вместе с белками HPF и RMF имеет коэффициент седиментации 100S. Димеризация рибосом обратима. Когда клетка попадает в богатую питательными веществами среду, комплекс факторов гибернации и рибосом диссоциирует с образованием двух активных 70S рибосом [55, 60].

Другой путь гибернации рибосом – связывание 70S рибосомами белка Y (YfiA), что приводит к образованию неактивных мономеров 70S. N-Концевая часть белка Y сходна с белком HPF, она также связывается в районе сайта посадки тРНК. При этом С-конец белка препятствует посадке белка RMF в районе последовательности анти-Шайна-Дальгарно на 16S рРНК. Связавшись с рибосомой, YfiA ингибирует ее активность и препятствует диссоциации на отдельные субчастицы. Когда клетка попадает в благоприятные условия, белок Y покидает рибосому, и трансляция возобновляется [60].

Литературные данные свидетельствуют о комплексном влиянии строгого ответа на биосинтез белка в бактериальной клетке. Под действием ppGpp не только подавляется экспрессия аппарата биосинтеза, но через гибернационные факторы ингибируется сама трансляция.

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

Когда в окружающей среде практически полностью исчезают питательные вещества и накапливаются критические количества токсичных отходов метаболизма, активируется система программируемой клеточной гибели (ПКГ), цель которой состоит в уничтожении большей части популяции при сохранении небольшого количества живых клеток. Таким «самопожертвованием» популяция снижает нагрузку на оставшиеся бактерии, которые при появлении новых ресурсов смогут продолжить свой род.

Именно система трансляции особенно чувствительна к усиливающемуся голоданию. Как уже сказано, при помощи компонентов аппарата трансляции, в частности, рибосом, сигнал о голоде передается всем компонентам бактериальной клетки [55]. Механизм ПКГ основан на системе токсин-анти-токсин (ТА), суть которого заключается в наличии двух генов, кодирующих белок, токсичный для клетки, и белок, позволяющий нейтрализовать действие токсина. Деградация антитоксина и выключение его

экспрессии приводят к накоплению активной формы токсина и гибели клетки.

Наиболее изученный и важный модуль ТА – система *mazEF*, выявленная у множества прокариот. Этот модуль состоит из двух генов, находящихся в одном опероне – *mazF* и *mazE*. Первый ген кодирует стабильный цитотоксический белок, а второй – лабильный белок-антитоксин, легко разрушаемый АТР-зависимой протеазой ClpAP. В нормальных условиях экспрессируются гены обоих белков, что не позволяет токсину влиять на клетку из-за образования комплекса токсин-антитоксин. В условиях голода активируется синтез ppGpp, который ингибирует транскрипцию оперона *mazEF*. После этого происходит быстрая деградация *mazE* и высвобождение *mazF*. Токсичность *mazF* обуславливается его эндорибонуклеазной активностью, специфичной к последовательности АСА в мРНК, а также 3'-концевой части 16S рРНК [61]. Отщепление 3'-конца 16S рРНК приводит к «потере» рибосомами последовательности анти-Шайна-Дальгарно, необходимой для трансляции канонических мРНК. Ранее было показано, что подобные рибосомы проявляют высокую селективность к синтезу малых белков, среди которых оказались как белки «смерти», убивающие клетку, так и белки, необходимые для сохранения малой популяции клеток. Предполагается, что таким образом система *mazEF* осуществляет программируемую клеточную гибель, статистически уничтожая большую часть клеток в культуре, сохраняя при этом нетронутой малую популяцию [62].

Позже показали, что эта система ПКГ регулируется при помощи сигнального пептида, названного EDF (Extracellular Death Factor) и имеющего последовательность NNWNN. Этот пептид входит в систему межклеточной связи в культуре, названной Quorum Sensing (QS). При критической плотности популяции в бактериальной культуре появляется пептид EDF, способный легко проникать в клетки. Этот пептид значительно повышает активность *mazE*, снижая при этом способность *mazF* ингибировать токсин. Таким образом, во всех клетках, в которые попал EDF, активируется путь программируемой клеточной гибели, и лишь малая популяция клеток остается нетронутой и способной к дальнейшему выживанию [63].

Структурные особенности клеток в стационарной фазе роста

Переход в стационарную фазу роста, как сказано выше, сопровождается накоплением фактора σ^{38} . Переход к σ^{38} влияет не только на метаболические и регуляторные пути, но и кардинально изменяет физиологию бактериальной клетки. Показано, что гены,

экспрессия которых контролируется σ^{38} , участвуют в изменении морфологии клетки, стрессовом ответе, адаптации метаболизма к голоданию и выживаемости в долговременной стационарной фазе.

Бактерии в стационарной фазе подвергаются критически важной для выживания адаптации морфологии. Клетки становятся меньше, как следствие двух процессов, редукционного деления и образования карликовых клеток [64].

Редукционное деление вызывается тем, что процессы репликации ДНК и деления клеток инициируются в момент перехода клеток в стационарную фазу, когда из-за нехватки ресурсов дальнейший рост клетки заблокирован на всех уровнях регуляции. В стационарной фазе клетки не могут делиться, и из-за возможной случайной инициации репликации ДНК появляются клетки с удвоенным количеством хромосом. В результате, бактериальная культура в стационарной фазе становится чрезвычайно гетерогенной по своему хромосомному составу. Бактериальные клетки могут содержать даже больше двух хромосом [65]. Причиной гетерогенности клеток по содержанию хромосом может быть то, что в некоторых клетках в ходе роста не было достигнуто необходимое расстояние между нуклеоидами, что не позволило произвести деление клетки. Другой причиной может быть то, что в стационарной фазе роста в клетках нарушены процессы терминации репликации или декатенации ДНК [65]. При рассмотрении выживаемости клеток, частоты мутаций и стабильности генома необходимо учитывать, что клетки в стационарной фазе содержат различное число хромосом. Клетки, образованные в результате редукционного деления, имеют форму кокков. Эта морфологическая особенность может объясняться влиянием гена *bolA*, который активно экспрессируется в стационарной фазе под контролем RpoS.

Наиболее вероятно, что влияние *BolA* на морфологию клеток обусловлено регуляцией транскрипции генов *dacA* (ген, кодирующий пенициллинсвязывающий белок 5, РВР5), *dacC* (ген, кодирующий пенициллинсвязывающий белок 6, РВР6) и *atrC* (ген, кодирующий β -лактамазу). Эти белки обладают *D,D*-карбоксипептидазной активностью и участвуют в процессе образования предшественников пептидогликанового слоя мембраны, влияя на степень сшивания пептидогликанов клеточной оболочки за счет регуляции количества доступных для сшивок компонентов [66]. Редукционное деление – это форма адаптации клеток к агрессивным внешним условиям. Редукционное деление позволяет клеткам получать преимущества в условиях голодания из-за увеличения соотношения поверхности к объему клетки. Стоит отметить, что редукционное деление не инду-

цируется голоданием, а обусловлено наступлением голода в момент активного деления клеток.

Образование карликовых клеток, в отличие от редукционного деления, активируется голоданием. Этот процесс характеризуется постоянным уменьшением размера клеток вследствие деградации не только эндогенных ресурсов, но и клеточной оболочки, особенно цитоплазматической мембраны и клеточной стенки. У некоторых грамотрицательных бактерий, например *E. coli*, в стационарной фазе наружная мембрана не деградирует и не сжимается, подобно внутренней, что приводит к увеличению области периплазмы [67].

Отличительная особенность адаптации к стационарной фазе – образование клеточной оболочки, способной эффективно противостоять агрессивной внешней среде. Образование подобного усиленного барьера включает в себя обширные изменения на всех уровнях структуры бактериальной оболочки: внутренней и внешней мембран, периплазмы и пептидогликанов. Во внешней мембране увеличивается концентрация липосахаридов, снижается количество белков, а также увеличивается количество молекулярных сшивок между липопотеидами внешней мембраны и слоем пептидогликанов. В периплазме накапливаются олигосахариды, например трегалоза, которые выполняют функцию осмопротекторов. Слой пептидогликанов (пептидогликаны – класс прочных и эластичных полимеров, которые служат неким «амортизатором» стрессового воздействия на клеточную оболочку) ушивается. Недавно было показано, что в стационарной фазе происходит синтез *D*-аминокислот, способных модифицировать слой пептидогликанов за счет включения в состав полимера. В структуре внутренней мембраны происходит ряд значительных изменений. Снижается количество мононенасыщенных жирных кислот с сопутствующим увеличением доли полиненасыщенных жирных кислот. Ненасыщенные жирные кислоты также превращаются в циклопропильные производные, увеличивается отношение количества фосфолипидов к количеству фосфоэтаноламина при переходе клетки к стационарной фазе роста. Следствием всех этих изменений является образование жесткой структуры внутренней мембраны и уменьшение ее текучести [64].

Микроэволюция бактерий в стационарной фазе

Бактериальная популяция может адаптироваться к неблагоприятным условиям самыми неожиданными способами. Во время наблюдения за выживаемостью клеток в стационарной фазе обнаружили, что при достаточно длительной инкубации культуры без смены питательной среды на кривой роста появляется ха-

рактерное циклическое увеличение и уменьшение количества жизнеспособных клеток. Этот феномен был назван GASP-фенотипом, что можно перевести как «фенотип преимущества роста в стационарной фазе». Подобное поведение культуры объясняется появлением в популяции мутантных клеток, более приспособленных к таким условиям, нежели родительский штамм [1].

GASP-фенотип опосредуется несколькими ключевыми мутациями, которые получают преимущество в стационарной фазе. Одна из таких мутаций приводит к снижению активности σ^{38} , при этом штамм с делецией гена *rpoS* не имеет характерного фенотипа. Предполагается, что преимущества, которые дает эта мутация, обусловлены ее плеiotропными эффектами. Возможно, этот эффект обусловлен нарушением равновесия в конкуренции сигма-факторов за РНК-полимеразу [3].

Другая мутация, а точнее группа мутаций, приводящих к GASP-фенотипу, – мутации в генах *lrp* и *sgaC*, а также геномная перестройка, инактивирующая ген *cstA* и активирующая оперон *ybeJ-gltJKL*. Подобные мутанты проявляют повышенную способность использовать аминокислоты, поступающие в окружающую среду из погибших клеток. Геномная перестройка приводит к деактивации гена, кодирующего пермеазу олигопептидов, и активации оперона, кодирующего аннотированные белки-транспортеры глутаминовой и аспарагиновой кислот. Таким образом, за счет потери способности деградировать олигопептиды клетка получает повышенную способность использовать мономерные аминокислоты, поступающие в среду из мертвых клеток. После дополнительной инкубации в клетках с мутацией в гене *rpoS* активируется оперон *bgl*, что приводит к появлению популяции, способной использовать в качестве ресурса арил- β -гликозиды салицин и арбутин [3].

Интересно, что в стационарной фазе появляется популяция клеток, способных к выживанию, но не поддающихся культивированию в лабораторных условиях (VBNC-фенотип). Этот фенотип проявляется как ответ на самые разнообразные стрессы и встречается у многих бактерий. Молекулярная природа механизма VBNC-фенотипа не установлена, однако ясно, что за ним стоит не одиночный регуляторный путь, а глобальная смена метаболизма клетки. Особенностью VBNC-фенотипа являются колоссальное снижение метаболизма и изменение морфологии клеток. Вероятно, таким образом клетка пытается пережить стресс, перейдя в состояния «гибернации» и отгородившись от неблагоприятной среды непроницаемым барьером. Мало известно и о механизме выхода из этого состояния [68].

Устойчивость к антибиотикам в стационарной фазе

Вслед за стремительным ростом частоты использования антибиотиков при бактериальных инфекциях столь же стремительно появляются штаммы бактерий, устойчивых к антибиотикам. Поэтому одной из важнейших проблем современной медицины стала «гонка вооружений» с бактериями. Необходимо находить все больше новых антибиотиков, способных на время преодолеть проблему резистентности. Одно из направлений этой «гонки» предполагает изучение клеточных механизмов, приводящих к резистентности, вместо поиска новых антибиотиков, поскольку ингибируя эти механизмы, можно преодолеть проблему устойчивости бактерий к антибиотикам.

Давно замечено, что устойчивость бактериальной популяции к воздействию различных классов антибиотиков значительно увеличивается при голодании. В стационарной фазе, как уже сказано, происходит ингибирование клеточного цикла и всех этапов реализации генетической информации. Исходя из этого, основным объяснением антибиотикорезистентности стало отсутствие роста бактерий в условиях голодания [69].

Относительно недавно установили молекулярный механизм резистентности бактерий к различным классам антибиотиков именно в стационарной фазе роста, когда происходит задержка клеточного цикла. Показано, что при деактивации генов *relA* и *spoT* (что приводит к невозможности формирования строгого ответа) значительно снижается резистентность бактерий к воздействию антибиотиков и увеличивается внутриклеточная концентрация гидроксильных радикалов. Поскольку известно, что летальное действие практически всех классов антибактериальных препаратов обусловлено, в конечном итоге, накоплением в клетке активных форм кислорода [70], авторы данного исследования решили проверить уровень каталазной активности в клетках, которая оказалась заметно снижена. Таким образом, показано, что не отсутствие роста, а именно активный клеточ-

ный ответ на стресс важен для возникновения устойчивости к антибиотикам в стационарной фазе [71].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Клетка подходит к решению вопроса выживания в неблагоприятных условиях с самых разных сторон. Для защиты от механических повреждений и воздействия факторов стресса укрепляется и перестраивается клеточная оболочка, изменяется сама форма клеток. В свою очередь, нуклеоид подвергается конденсации и включается в состав нуклеопротеидного комплекса, защищающего его от повреждений.

Для экономии ресурсов происходит ингибирование процесса трансляции, в частности, через выключение экспрессии генов, кодирующих компоненты аппарата биосинтеза белка. Особенно интересно разнообразие регуляторных путей, через которое происходит ингибирование трансляции. Именно трансляционный аппарат, как наиболее энергозатратный процесс, является ключевым участником передачи сигнала о стрессе другим компонентам клетки. В зависимости от степени голода клетка проходит путь от снижения экспрессии рибосомных оперонов до полного подавления трансляции и деградации рибосом.

Важна также способность клетки использовать альтернативный сигма-фактор для регуляции экспрессии генов стрессового ответа. Сложная система регуляции синтеза и стабильности сигма-фактора позволяет незамедлительно реагировать на возникновение стресса и также быстро возвращаться к нормальному росту.

Становится ясным, что переход к стационарной фазе роста является естественным механизмом защиты бактериальной культуры от стресса и голода. В этих условиях происходит изменение структуры клетки на всех уровнях организации, направленное на выживание не только отдельных клеток, но и популяции в целом. ●

*Исследование выполнено за счет гранта
Российского научного фонда (№ 14-14-00072).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Finkel S.E. // Nat. Rev. Microbiol. 2006. V. 4. № 2. P. 113–120.
2. Pin C., Baranyi J. // Appl. Environ. Microbiol. 2008. V. 74. № 8. P. 2534–2536.
3. Llorens J.M.N., Tormo A., Martínez-García E. // FEMS Microbiology Rev. 2010. V. 34. № 4. P. 476–495.
4. Luijsterburg M.S., Noom M.C., Wuite G.J.L., Dame R.T. // J. Structural Biol. 2006. V. 156. № 2. P. 262–272.
5. Azam T.A., Iwata A., Nishimura A., Ueda S., Ishihama A. // J. Bacteriol. 1999. V. 181. № 20. P. 6361–6370.
6. Nair S., Finkel S.E. // J. Bacteriol. 2004. V. 186. № 13. P. 4192–4198.
7. Almirón M., Link A.J., Furlong D., Kolter R. // Genes Dev. 1992. V. 6. № 12b. P. 2646–2654.
8. Wolf S.G., Frenkiel D., Arad T., Finkel S.E., Kolter R., Minsky A. // Nature. 1999. V. 400. № 6739. P. 83–85.
9. Ilari A., Ceci P., Ferrari D., Rossi G.L., Chiancone E. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. № 40. P. 37619–37623.
10. Cosgriff S., Chintakayala K., Chim Y.T.A., Chen X., Allen S., Lovering A.L., Grainger D.C. // Mol. Microbiol. 2010. V. 77. № 5. P. 1289–1300.

11. Kahramanoglou C., Prieto A.I., Khedkar S., Haase B., Gupta A., Benes V., Fraser G.M., Luscombe N.M., Seshasayee A.S.N. // *Nat. Commun.* 2012. V. 3. P. 886.
12. Ishihama A. // *Annu. Rev. Microbiol.* 2000. V. 54. № 1. P. 499–518.
13. Reznikoff W.S., Siegele D.A., Cowing D.W., Gross C.A. // *Annu. Rev. Genet.* 1985. V. 19. № 1. P. 355–387.
14. Maciag A., Peano C., Pietrelli A., Egli T., Bellis G.D., Landini P. // *Nucl. Acids Res.* 2011. V. 39. № 13. P. 5338–5355.
15. Arnosti D.N., Chamberlin M.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989. V. 86. № 3. P. 830–834.
16. Hunt T.P., Magasanik B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985. V. 82. № 24. P. 8453–8457.
17. Straus D.B., Walter W.A., Gross C.A. // *Nature.* 1987. V. 329. № 6137. P. 348–351.
18. Rhodius V.A., Suh W.C., Nonaka G., West J., Gross C.A. // *PLoS Biol.* 2005. V. 4. № 1. P. e2.
19. Enz S., Braun V., Crosa J.H. // *Gene.* 1995. V. 163. № 1. P. 13–18.
20. Weber H., Polen T., Heuveling J., Wendisch V.F., Hengge R. // *J. Bacteriol.* 2005. V. 187. № 5. P. 1591–1603.
21. Gaal T., Ross W., Estrem S.T., Nguyen L.H., Burgess R.R., Gourse R.L. // *Mol. Microbiol.* 2001. V. 42. № 4. P. 939–954.
22. Typas A., Hengge R. // *Mol. Microbiol.* 2006. V. 59. № 3. P. 1037–1051.
23. Mika F., Hengge R. // *Genes Dev.* 2005. V. 19. № 22. P. 2770–2781.
24. Lange R., Hengge-Aronis R. // *Genes Dev.* 1994. V. 8. № 13. P. 1600–1612.
25. Mukhopadhyay S., Audia J.P., Roy R.N., Schellhorn H.E. // *Mol. Microbiol.* 2000. V. 37. № 2. P. 371–381.
26. Gentry D.R., Hernandez V.J., Nguyen L.H., Jensen D.B., Cashel M. // *J. Bacteriol.* 1993. V. 175. № 24. P. 7982–7989.
27. Cuning C., Brown L., Elliott T. // *J. Bacteriol.* 1998. V. 180. № 17. P. 4564–4570.
28. Brescia C.C., Kaw M.K., Sledjeski D.D. // *J. Mol. Biol.* 2004. V. 339. № 3. P. 505–514.
29. Lease R.A., Belfort M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. № 18. P. 9919–9924.
30. Muffler A., Fischer D., Hengge-Aronis R. // *Genes Dev.* 1996. V. 10. № 9. P. 1143–1151.
31. Zhang A., Altuvia S., Tiwari A., Argaman L., Hengge-Aronis R., Storz G. // *EMBO J.* 1998. V. 17. № 20. P. 6061–6068.
32. Majdalani N., Hernandez D., Gottesman S. // *Mol. Microbiol.* 2002. V. 46. № 3. P. 813–826.
33. Trotochaud A.E., Wassarman K.M. // *J. Bacteriol.* 2004. V. 186. № 15. P. 4978–4985.
34. Jishage M., Kvint K., Shingler V., Nyström T. // *Genes Dev.* 2002. V. 16. № 10. P. 1260–1270.
35. Jishage M., Ishihama A. // *J. Bacteriol.* 1999. V. 181. № 12. P. 3768–3776.
36. Gyaneshwar P., Paliy O., McAuliffe J., Jones A., Jordan M.I., Kustu S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. № 9. P. 3453–3458.
37. Typas A., Barembruch C., Possling A., Hengge R. // *EMBO J.* 2007. V. 26. № 6. P. 1569–1578.
38. Schweder T., Lee K.H., Lomovskaya O., Matin A. // *J. Bacteriol.* 1996. V. 178. № 2. P. 470–476.
39. Santos J.M., Freire P., Mesquita F.S., Mika F., Hengge R., Arraiano C.M. // *Mol. Microbiol.* 2006. V. 60. № 1. P. 177–188.
40. Bougdour A., Wickner S., Gottesman S. // *Genes Dev.* 2006. V. 20. № 7. P. 884–897.
41. Zhou Y., Gottesman S. // *J. Bacteriol.* 2006. V. 188. № 19. P. 7022–7025.
42. Zgurskaya H.I., Keyhan M., Matin A. // *Mol. Microbiol.* 1997. V. 24. № 3. P. 643–651.
43. Tani T.H., Khodursky A., Blumenthal R.M., Brown P.O., Matthews R.G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. № 21. P. 13471–13476.
44. Zinser E.R., Kolter R. // *J. Bacteriol.* 2000. V. 182. № 15. P. 4361–4365.
45. Calvo J.M., Matthews R.G. // *Microbiol. Rev.* 1994. V. 58. № 3. P. 466–490.
46. Gottesman S. // *Trends Genet.* 2005. V. 21. № 7. P. 399–404.
47. Majdalani N., Cuning C., Sledjeski D., Elliott T., Gottesman S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. № 21. P. 12462–12467.
48. Johansen J., Rasmussen A.A., Overgaard M., Valentin-Hansen P. // *J. Mol. Biol.* 2006. V. 364. № 1. P. 1–8.
49. Borek E., Rockenbach J., Ryan A. // *J. Bacteriol.* 1956. V. 71. № 3. P. 318–323.
50. Cashel M., Kalbacher B. // *J. Biol. Chem.* 1970. V. 245. № 9. P. 2309–2318.
51. Boutte C.C., Crosson S. // *Trends Microbiol.* 2013. V. 21. № 4. P. 174–180.
52. English B.P., Hauryliuk V., Sanamrad A., Tankov S., Dekker N.H., Elf J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. № 31. P. E365–E373.
53. Murray D.K., Bremer H. // *J. Mol. Biol.* 1996. V. 259. № 1. P. 41–57.
54. Barker M.M., Gaal T., Josaitis C.A., Gourse R.L. // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 305. № 4. P. 673–688.
55. Starosta A.L., Lassak J., Jung K., Wilson D.N. // *FEMS Microbiol. Rev.* 2014. V. 38. № 6. P. 1172–1201.
56. Zvereva M.I., Ivanov P.V., Teraoka Y., Topilina N.I., Dontsova O.A., Bogdanov A.A., Kalkum M., Nierhaus K.H., Shpanchenko O.V. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 47702–47708.
57. Neubauer C., Gillet R., Kelley A.C., Ramakrishnan V. // *Science.* 2012. V. 335. № 6074. P. 1366–1369.
58. Chadani Y., Ono K., Ozawa S., Takahashi Y., Takai K., Nanamiya H., Tozawa Y., Kutsukake K., Abo T. // *Mol. Microbiol.* 2010. V. 78. № 4. P. 796–808.
59. Chadani Y., Ono K., Kutsukake K., Abo T. // *Mol. Microbiol.* 2011. V. 80. № 3. P. 772–785.
60. Polikanov Y.S., Blaha G.M., Steitz T.A. // *Science.* 2012. V. 336. № 6083. P. 915–918.
61. Zhang J., Zhang Y., Inouye M. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 34. P. 32300–32306.
62. Amitai S., Kolodkin-Gal I., Hananya-Meltabashi M., Sacher A., Engelberg-Kulka H. // *PLoS Genet.* 2009. V. 5. № 3. P. e1000390.
63. Moll I., Engelberg-Kulka H. // *Trends Biochem. Sci.* 2012. V. 37. № 11. P. 493–498.
64. Nyström T. // *Annu. Rev. Microbiol.* 2004. V. 58. № 1. P. 161–181.
65. Akerlund T., Nordström K., Bernander R. // *J. Bacteriol.* 1995. V. 177. № 23. P. 6791–6797.
66. Santos J.M., Lobo M., Matos A.P.A., De Pedro M.A., Arraiano C.M. // *Mol. Microbiol.* 2002. V. 45. № 6. P. 1729–1740.
67. Reeve C.A., Bockman A.T., Matin A. // *J. Bacteriol.* 1984. V. 157. № 3. P. 758–763.
68. Hayes C.S., Low D.A. // *Curr. Opin. Microbiol.* 2009. V. 12. № 6. P. 667–673.
69. Levin B.R., Rozen D.E. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2006. V. 4. № 7. P. 556–562.
70. Kohanski M.A., Dwyer D.J., Hayete B., Lawrence C.A., Collins J.J. // *Cell.* 2007. V. 130. № 5. P. 797–810.
71. Nguyen D., Joshi-Datar A., Lepine F., Bauerle E., Olakanmi O., Beer K., McKay G., Siehnel R., Schafhauser J., Wang Y, et al. // *Science.* 2011. V. 334. P. 982–986.