

УДК 577.2

Профилирование рибосом *Mycoplasma gallisepticum*

Г. Ю. Фисунов*, Д. В. Евсютина, А. А. Арзамасов, И. О. Бутенко, В. М. Говорун
 Научно-исследовательский институт физико-химической медицины ФМБА России, 119435,
 Москва, ул. Малая Пироговская, 1а
 *E-mail: herr.romanoff@gmail.com
 Поступила в редакцию 16.06.2015

РЕФЕРАТ Успешное применение высокопроизводительных технологий все чаще приводит к обнаружению случаев низкой корреляции между уровнем мРНК и белков в клетках. Это явление, противоречащее классическим представлениям, обнаружено у ряда бактерий, таких, как *Escherichia coli*, *Desulfovibrio vulgaris* и *Lactococcus lactis*. Поэтому важной представляется разработка технологий исследования механизмов регуляции экспрессии генов на уровне трансляции, в том числе высокопроизводительными методами. Проведено протеомное профилирование рибосом *Mycoplasma gallisepticum*, обнаружен ряд неканонических белков, связанных с рибосомами в большом количестве. Показано, что количество мРНК, связанной с рибосомами, определяется, в основном, двумя параметрами: уровнем транскрипции гена этой мРНК и эффективностью комплементарных взаимодействий между 3'-концом 16S рРНК и сайтом связывания рибосомы в 5'-нетранслируемой области мРНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА микоплазма, рибосома, профилирование рибосом.

ВВЕДЕНИЕ

Проведение системных исследований с использованием «омиксных технологий» все чаще выявляет неожиданные явления и новые регулируемые события, которые просто невозможно определить, используя одну омиксную технологию или традиционные методы анализа. Вместе с тем, совместный анализ данных, полученных при количественных определениях содержания РНК или белков и пептидов, неизбежно генерирует значительное количество артефактов вследствие погрешностей каждого из используемых технологических приемов. Это требует тщательного перекрестного анализа, а также дополнительного подтверждения получаемых данных с использованием альтернативных или ортогональных технологических приемов. Поэтому простейшие микроорганизмы неслучайно служат объектами для отработки общей методологии анализа совместного поведения макромолекул в живых системах и их взаимного влияния друг на друга.

Европейское молекулярно-биологическое сообщество сформулировало проект, посвященный изучению возбудителя респираторных заболеваний человека, представителя класса Mollicutes – *Mycoplasma pneumoniae* [1, 2]. Затем наша группа выбрала другого представителя этого класса – *M. gallisepticum* – для проведения аналогичных работ. Вскоре после этого американские исследователи смогли по-

строить компьютерную модель метаболизма и адаптивных реакций у наименьшей самореплицирующейся бактерии – *M. genitalium* [3]. Несмотря на эти успехи, неизученными остаются большое количество вопросов, которые требуют привлечения дополнительных методов, необходимых для измерения динамических процессов при реализации минимального набора генетической информации, закодированной в геноме микоплазм.

Молликуты, к которым относится *M. gallisepticum*, характеризуются существенной редукцией генома. Средний размер генома микоплазм составляет 0.8–1 млн п.н. (1 млн у *M. gallisepticum*) [4]. В связи с редукцией генома у микоплазм утрачены известные системы регуляции экспрессии генов [5].

Как показано нами ранее, *M. gallisepticum* отвечают на стрессовые воздействия на уровне транскрипции [6]. В то же время эти изменения в целом слабо отражаются на уровне трансляции [6]. У этого явления могут быть две причины: скорость трансляции у *M. gallisepticum* слишком мала для того, чтобы изменения на уровне белка стали видимыми за время эксперимента (30 мин); мРНК селективно связывается с рибосомами во время стрессового ответа. Механизм селективного связывания мРНК с рибосомами может быть реализован через взаимодействие с антисмысловыми РНК, блокирующими сайт связывания рибосомы [7]. Кроме того, даже в пределах од-

ной клетки рибосомы могут отличаться друг от друга как по нуклеотидной последовательности рРНК [8], так и своему белковому составу. Например, рибосомы *Escherichia coli*, не имеющие в своем составе белка S1, транслируют преимущественно безлидерные транскрипты [9]. С рибосомами могут быть ассоциированы регуляторные белки, модулирующие процесс трансляции отдельных транскриптов [10]. В комплексе с рибосомой могут находиться «неканонические» белки, основная функция которых не имеет ничего общего с процессом трансляции. Например, гликогенсинтаза *Saccharomyces cerevisiae* может влиять на трансляцию ряда РНК [11].

Развитие высокопроизводительных технологий привело к накоплению большого объема данных, характеризующих процессы транскрипции и трансляции в масштабе целой клетки. Согласно классическим представлениям, уровень белка в целом определяется уровнем соответствующей мРНК, однако, в ряде случаев это не так. Высокопроизводительные технологии значительно увеличили количество случаев, когда уровень белка не коррелирует с уровнем мРНК. Такие данные получены для различных бактерий, включая *E. coli* [12], *Desulfovibrio vulgaris* [13] и *Lactococcus lactis* [14]. Коэффициент корреляции Пирсона между уровнем мРНК и уровнем белка, согласно опубликованным данным, может варьировать от 0.53 до 0.19 в зависимости от вида и состояния бактерии. Значительный прогресс в изучении регуляции экспрессии генов на уровне трансляции достигнут при использовании технологии профилирования рибосом [15], позволяющей наблюдать процесс трансляции почти в реальном времени. Таким образом, этап связывания мРНК с рибосомой и ее трансляции является чрезвычайно важным звеном регуляции экспрессии генов у бактерий. Поскольку для молликут в целом и *M. gallisepticum* в частности характерна сильная редукция регуляторных механизмов, работающих на уровне транскрипции, регуляция экспрессии генов на уровне трансляции может быть едва ли не самым важным звеном, определяющим представленность белков в клетке.

В настоящей работе проведены высокопроизводительное протеомное профилирование рибосом *M. gallisepticum* для определения их состава и транскрипционное профилирование мРНК, связанной с рибосомами, методом ПЦР в реальном времени.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование клеток *M. gallisepticum* S6

Культуру клеток *M. gallisepticum* S6 культивировали в жидкой среде (Триптоза 20 г/л, NaCl 5 г/л, KCl

1.3 г/л, Трис 3 г/л, дрожжевой диализат 5%, сыворотка крови лошади 10% («Биолот»), глюкоза 1%, рН 7.4) до середины логарифмической фазы как описано в [16].

Выделение рибосом

К 12 мл культуры клеток *M. gallisepticum* добавляли хлорамфеникол до конечной концентрации 100 мкг/мл, тщательно перемешивали и инкубировали в течение 5 мин на льду. Затем клетки осаждали центрифугированием при 4500 g (20 мин при 4°C). Супернатант отбирали и суммарный осадок клеток, полученный с 50 мл культуры, ресуспендировали в 500 мкл буфера для лизиса (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 6 mM MgCl₂, 2 mM спермидина, 100 мкг/мл хлорамфеникола, 5 мкл ингибитора протеаз (GE Healthcare), 200 ед. ингибитора РНКаз (Thermo Scientific), рН 7.5). После ресуспендирования к буферу добавляли 15 мкл NP-40 и тщательно перемешивали. Клеточный лизат замораживали при -75°C не менее 1 ч. Затем клеточный лизат осветляли центрифугированием при 20000 g в течение 20 мин при 4°C. Супернатант отбирали и фракционировали с помощью центрифугирования в ступенчатом градиенте сахарозы.

Ступенчатый градиент сахарозы создавали в 5-мл поликарбонатной пробирке путем послойного нанесения раствора сахарозы разной плотности с помощью пипетки. Объем каждого слоя – 750 мкл, шаг ступени – 10%. В настоящей работе использовали градиент 10–50% сахарозы (всего пять ступеней). Раствор сахарозы готовили на таком же буфере, как для лизиса клеток (без добавления NP-40, хлорамфеникола, ингибиторов протеаз и РНКаз) при 50000 об/мин (среднее ускорение 200620 g) в течение 1 ч при 4°C, центрифуга Optima (Beckman Coulter), бакет-ротатор MLS 50 (Beckman Coulter). Фракции объемом 200 мкл отбирали с помощью пипетки.

Выделение РНК из фракций

К каждой фракции добавляли 400 мкл реагента Trizol LS (Life Technologies). Смесь тщательно перемешивали и добавляли 200 мкл хлороформа, еще раз перемешивали и центрифугировали в течение 10 мин при 16000 g и 4°C. Супернатант отбирали, добавляли равный объем изопропанола. Препарат инкубировали при -20°C не менее 1 ч. РНК осаждали центрифугированием при 16000 g (20 мин, 4°C). Осадок промывали 80% (об./об.) этанолом. Препарат РНК растворяли в 10 мкл воды (Panreac). Представленность РНК во фракциях измеряли с помощью количественной ОТ-ПЦР в реальном времени. Эксперимент проводили в трех биологических повторностях.

Выделение белка из фракций и трипсинолиз

Для осаждения белков фракцию разводили в 10 раз в деионизованной воде и добавляли трихлоруксусную кислоту (Sigma-Aldrich) до конечной концентрации 10% (об./об.), выдерживали при 4°C в течение ночи с последующим центрифугированием (15 мин при 16000 g). Полученные осадки промывали 2 раза 1 мл холодного ацетона (Pancreas) для удаления остатков трихлоруксусной кислоты.

Белковые осадки перерастворяли в 25–35 мкл 50 мМ раствора гидрокарбоната аммония (Pancreas), содержащего 0.5% RapiGest SF (Waters) и 1 мкл смеси нуклеаз (GE Healthcare), после чего выдерживали в течение 30 мин при 4°C, инкубировали в течение 5 мин при 100°C и центрифугировали (10 мин при 16000 g). Супернатант отбирали и определяли концентрацию белка в каждом образце с использованием бицинхониновой кислоты (Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit, Sigma-Aldrich). Для восстановления дисульфидных мостиков к растворам белков добавляли дитиотреитол (Bio-Rad) до конечной концентрации 10 мМ, реакцию проводили в течение 30 мин при 60°C на шейкере (600 об/мин). Последующее алкилирование остатков цистеина йодацетамидом (конечная концентрация 30 мМ) (Bio-Rad) проводили в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте. Затем к образцам белков добавляли трипсин (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega) в соотношении масса трипсина/масса белка 1 : 50. Трипсинолиз проводили в течение 16 ч при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 10% трифторуксусной кислоты (Sigma-Aldrich) до pH 2.0, после чего продукты инкубировали в течение 45 мин при 37°C и центрифугировали (15 мин при 16000 g) для удаления RapiGest SF. Смеси триптических пептидов дополнительно очищали путем твердофазной экстракции с использованием мини-колонок Discovery DSC-18 (Supelco) согласно рекомендациям производителя. Для дальнейшего масс-спектрометрического анализа элюаты высушивали на вакуумном концентраторе CentriVar (Labconco) и растворяли в 10 мкл 3% раствора ацетонитрила, содержащего 0.1% муравьиную кислоту.

Выделение РНК из культуры клеток

РНК из культуры клеток выделяли согласно [16]. К аликвоте клеточной культуры добавляли тройной объем реагента Trizol LS (Thermo Scientific). Разделение фаз проводили, добавляя хлороформ из расчета 80 мкл на 100 мкл культуры. Образцы центрифугировали при 16000 g в течение 15 мин при 4°C. Далее РНК переосаждали изопропанолом в объемном соотношении 1 : 1.

Синтез κДНК и κПЦР

Синтез κДНК и ПЦР в реальном времени проводили как описано в [16]. РНК обрабатывали ДНКазой I (Thermo Scientific). Затем κДНК синтезировали с помощью обратной транскриптазы H-minus Reverse Transcriptase (Thermo Scientific) и случайных гексамеров. Для увеличения стабильности РНК использовали ингибитор РНКазы RiboLock (Thermo Scientific).

Количественную ПЦР в реальном времени (κПЦР) проводили на амплификаторе C1000 Touch (Bio-Rad) с оптическим модулем CFX96 (Bio-Rad). Для проведения ПЦР использовали ×10 ПЦР-буфер («Литех») (конечное разведение ×1.5) и ×10 раствор dNTP («Литех»), Taq-полимеразу («Литех»), краситель SYBR Green I (Life Technologies), по 5 пмоль праймеров, 2% формамида. Данные нормировали по средней представленности мРНК 21 гена домашнего хозяйства (*eno*, *gaphd*, *tpiA*, *tuf*, *tsf*, *acoA*, *acoB*, *aceF*, *ldh*, *ackA*, *pgk*, *fba*, *pgi*, *pfkA*, *gpmI*, *pykF*, *tktA1*, *rpiB*, *eutD*, *prsA*, *lpd*). Использовали те же праймеры для κПЦР, что и ранее [6].

Идентификация белков

Хроматомасс-спектрометрический анализ пептидных экстрактов проводили с помощью масс-спектрометра Q-Exactive HF (Thermo Fisher Scientific), сопряженного с хроматографической системой Ultimate 3000 RSLCnano (Dionex) через источник ионов Nanospray Flex (Thermo Fisher Scientific).

Пептиды разделяли с помощью обращенно-фазовой хроматографии с использованием предколонок Acclaim PepMap (сорбент – C18, длина – 2 см, внутренний диаметр – 75 мкм, размер частиц – 3 мкм, диаметр пор – 100 Å, Dionex) и колонки Zorbax (сорбент – Zorbax 300SB-C18, длина – 15 см, внутренний диаметр – 75 мкм, размер частиц – 3.5 мкм, диаметр пор – 100 Å, Agilent Technologies). Каждую пробу наносили на предколонку в воде для ВЭЖХ с 0.1% муравьиной кислоты (об./об.) со скоростью потока 2 мкл/мин в течение 5 мин, после чего предколонку включали в линию перед колонкой. Пептиды элюировали смесью растворителей А (вода для ВЭЖХ с 0.1% муравьиной кислоты (об./об.)) и Б (79.9% ацетонитрила для ВЭЖХ (об./об.), 20% воды для ВЭЖХ и 0.1% муравьиной кислоты (об./об.)), линейно повышая содержание растворителя Б от 5 до 40% (об./об.) в течение 120 мин при скорости потока 300 нл/мин, после чего систему промывали в течение 10 мин смесью с 99% (об./об.) растворителя Б, а затем в течение 10 мин смесью с 5% растворителя Б.

Напряжение источника 2000 В, а температура капилляра 200°C. Масс-спектрометр работал в режиме данных-зависимого анализа: в каждом цикле снима-

ли обзорный масс-спектр, 20 наиболее интенсивных в обзорном масс-спектре ионов поочередно отбирали для фрагментации и записи масс-спектра дочерних ионов, после чего исключали из рассмотрения на 10 с. Обзорный масс-спектр снимали при разрешении 70000 в диапазоне отношений массы к заряду от 400 до 1200 m/z с параметром автоматической регулировки усиления (AGC) 106 и ограничением по времени заполнения в 50 мс. Спектры дочерних ионов снимали при разрешении 17500 и AGC – 105 с ограничением по времени заполнения в 100 мс. Параметр энергии столкновений был равен 30, ширина полосы пропускания – 2.

На основе полученных масс-хроматограмм (формата.raw) с помощью утилиты MSConvert пакета ProteoWizard (версия 3.0.7.414, 64 бита) составляли список спектров фрагментации в центроидном виде в формате Mascot Generic Format, которые затем интерпретировали с помощью поисковой машины Mascot (Matrix Science Inc.). Идентификацию проводили по базе белковых последовательностей *M. gallisepticum* S6 CP006916.2 с добавленными к ней последовательностями часто встречающихся белковых контаминантов. Использовали следующие параметры идентификации – триптические пептиды с не более чем одним пропущенным сайтом расщепления трипсином, заряд прекурсоров – +2 или +3, допустимая ошибка масс родительских ионов – 10 ppm, допустимая ошибка масс фрагментов – 0.5 Да, инструмент – ESI-TRAP, постоянные модификации – нет, переменные модификации – карбамидометилирование цистеина и окисление метионина.

Список статистически значимых идентификаций определяли как список белков, для которых идентифицировано два или более пептида со значимостью выше 0.05 согласно рангу.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Распределение РНК в выделенных фракциях

После фракционирования цитоплазмы *M. gallisepticum* распределение РНК во фракциях измеряли с помощью ОТ-кПЦР (см. «Экспериментальную часть»). Результаты представлены на рис. 1, на котором видно, что малые субъединицы и полноразмерные рибосомы образуют пики в соответствующих фракциях (7 и 11). Для *M. gallisepticum* характерен примерно четырехкратный избыток 16S рРНК по сравнению с 23S рРНК [16], что согласуется с наблюдаемой картиной. Во фракциях после 12–22 наблюдается эквимолярное соотношение 16S и 23S рРНК. Относительно высокое содержание мРНК выявлено только в полисомах (фракции 15 и больше).

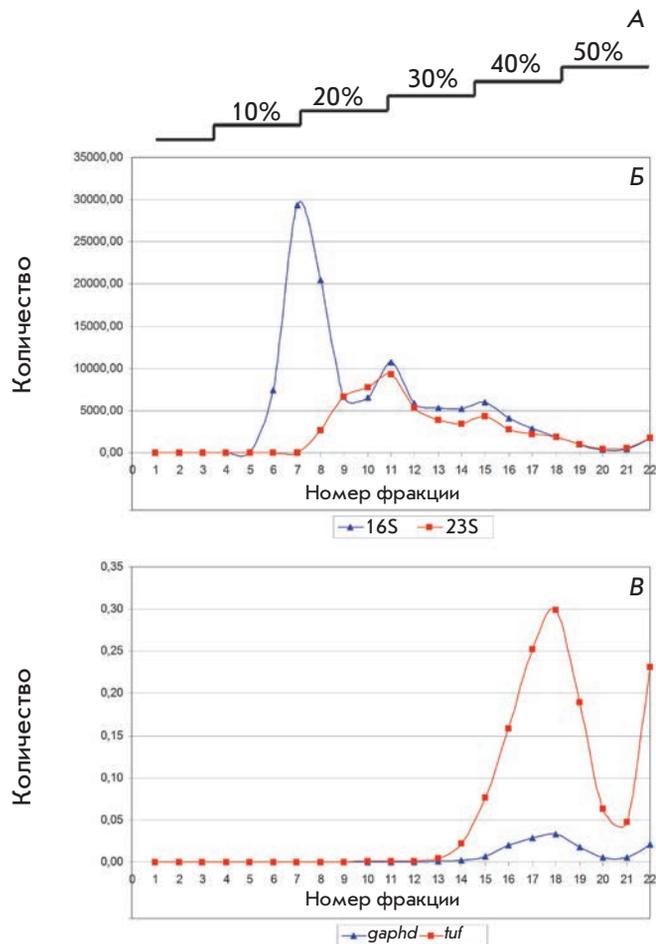


Рис. 1. Фракционирование цитоплазматической фракции *M. gallisepticum* в градиенте сахарозы. Измеряли распределение во фракциях – 16S рРНК, 23S рРНК, мРНК глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (*gapdh*) и фактора трансляции EF-Tu (*tuf*). Все результаты (для рРНК и мРНК) нормированы на количество 16S рРНК во фракции номер 1. А – профиль ступенчатого градиента в масштабе относительно полученных фракций; Б – распределение рРНК по фракциям; В – распределение мРНК по фракциям

Наибольшим было количество мРНК во фракциях 17 и 18, где оно составляло примерно 1 мкг. Это делает соответствующие фракции наиболее удобными для последующего анализа, особенно методами высокопроизводительного секвенирования.

Пригодность методики для количественного анализа представленности транскриптов, связанных с рибосомами, проверяли на фракции номер 18. Было проведено транскрипционное профилирование методом кПЦР 67 генов в трех биологических повторах. Воспроизводимость полученных данных оценили ме-

Корреляция по Спирману между биологическими повторами выделения мРНК, связанной с рибосомами, фракция номер 18. Представленность РНК измеряли методом ПЦР в реальном времени

	Повтор 1	Повтор 2	Повтор 3
Повтор 1	1	0.87	0.92
Повтор 2	0.87	1	0.90
Повтор 3	0.92	0.90	1

тодом корреляции по Спирману (таблица). Во всех парах образцов корреляция составила 0.87–0.92, что говорит о хорошей воспроизводимости методики. Корреляция между представленностью транскриптов во фракции, связанной с рибосомами мРНК, и в суммарной цитоплазматической фракции мРНК составила 0.78.

Протеомное профилирование рибосом

M. gallisepticum

С целью валидации методики выделения рибосом из клеток *M. gallisepticum* проведено протеомное профилирование фракций 7 (30S субъединицы), 17 и 18 (70S рибосомы, связанные с мРНК), и получена полуколичественная оценка представленности белков с помощью индекса emPAI.

Во фракции 7 обнаружено 18 из 20 белков малой субъединицы рибосомы и только 8 из 33 белков большой субъединицы, что согласуется с данными о распределении рРНК во фракциях. Таким образом, во фракции 7 преимущественно содержатся малые субъединицы рибосомы. Необходимо отметить, что фракция 7 содержит значительное количество примеси других клеточных белков.

Во фракциях 17 и 18, как и ожидалось, наиболее представлены рибосомные белки. Всего обнаружено 47 рибосомных белков из 53 (19 из 20 белков 30S субъединицы и 28 из 33 50S субъединицы). Все не найденные белки имеют небольшой размер (менее 100 аминокислотных остатков), что, вероятно, и стало причиной отсутствия их идентификации. Представленность рибосомных белков в данной фракции можно оценить как эквивалентную. Белки малой и большой субъединиц набирают одинаковые индексы emPAI. Кроме того, во фракции 18 обнаружено высокое содержание белков, ассоциированных с рибосомами (факторы трансляции EF-Tu и EF-Ts, шапероны Tig и DnaK), а также белка HU. Известно, что этот белок, бактериальный аналог гистонов,

способен связывать как ДНК, так и РНК [17]. Не исключено, что он также способен связывать мРНК или рРНК в составе рибосом.

Во фракции 18 нами выявлен белок GCW_03230 с высоким индексом emPAI. Это консервативный белок с неизвестной функцией, встречающийся у многих микоплазм. Его особенностью является экстремальное значение pI 11.0 при небольшой длине (74 аминокислотных остатка), что делает его похожим на рибосомные белки. Возможно, GCW_03230 – новый рибосомный белок. Во фракции 18 также обнаружено некоторое количество белков с достаточно высоким индексом представленности emPAI, не имеющих прямого отношения к процессу трансляции. Например, это триозофосфатизомераза, тиоредоксин, ряд белков с неизвестной функцией. Их присутствие, с одной стороны, можно объяснить неспецифическим взаимодействием с рибосомами после лизиса клетки. С другой стороны, за последнее время показано, что такие белки могут модулировать активность рибосомы *in vivo* [11].

Влияние вторичных структур и сайта связывания рибосомы на представленность мРНК в пуле, связанном с рибосомами

Наши результаты показывают, что представленность мРНК во фракции, связанной с рибосомами, в целом, соответствует представленности мРНК во фракции суммарной РНК. Однако ряд мРНК содержится в этой фракции в значимо большем или меньшем количестве. Эффективность связывания мРНК с рибосомой определяется в том числе комплементарными взаимодействиями между 3'-концом 16S рРНК и сайтом связывания рибосомы в 5'-нетранслируемой области мРНК, а также наличием вторичных структур в этой области, способствующих или препятствующих связыванию рибосомы.

С помощью программы RNAduplex мы провели *in silico* моделирование взаимодействия между 3'-концевой последовательностью 16S рРНК (UUACCUCUUUCU, подчеркнут канонический сайт связывания рибосомы в *E. coli*) и 25-нуклеотидной последовательностью перед старт-кодоном каждого гена. В результате получены оценки силы связывания 16S рРНК с 5'-нетранслируемой областью соответствующих мРНК. Корреляция (по Спирману) между нашей оценкой силы сайта связывания рибосомы и представленностью соответствующей мРНК во фракции РНК, связанной с рибосомами, составила 0.39 ($p < 0.01$). Мы выбрали мРНК более чем в 2 раза перепредставленные (19) и недопредставленные (25) во фракции, связанной с рибосомами, по сравнению с суммарной мРНК. Энергия образования дуплекса с 3'-концевой областью 16S рРНК у 5'-нетранс-

лируемой области перепредставленных мРНК была в среднем в 2 раза меньше, чем у недопредставленных ($dG = -4.96$ и -2.52 ккал/моль соответственно).

Некоторые мРНК, такие, как *GCW_02495* и *putA*, несмотря на низкую расчетную эффективность связывания с рибосомой ($dG > 0$), лучше представлены во фракции, связанной с рибосомами, чем в суммарной РНК. В случае *GCW_02495* этот парадокс можно объяснить тем, что ген *GCW_02495* экспрессируется в составе полицистронной мРНК вместе с соседним геном *GCW_02490*, который имеет очень эффективный сайт связывания рибосомы ($dG = -11.8$ ккал/моль). Таким образом, соответствующая мРНК, в целом, хорошо связывается с рибосомой.

Ряд мРНК менее представлен в связанной с рибосомами фракции, чем в суммарной РНК, несмотря на предсказанную эффективность связывания с рибосомой. К таким мРНК относятся *GCW_00085*, *glpF*, *gyrA*, *gyrB*, *ruvA*, *potD* и *hrcA*. Подобное поведение можно объяснить присутствием неких вторичных структур в 5'-нетранслируемой области мРНК, препятствующих связыванию рибосомы. С помощью программы quickfold мы рассчитали величины dG образования шпильчатых структур в районе сайта связывания рибосом и старт-кодона с помощью скользящего окна длиной 30 нуклеотидов. В результате обнаружили, что величина dG структуры в районе старт-кодона коррелирует с представленностью мРНК в связанной с рибосомами фракции (рис. 2). Наилучшая корреляция наблюдается в диапазоне $-21...+9$ нуклеотидов от старт-кодона как для представленности мРНК в связанной с рибосомами фракции, так и для относительного обогащения связанной с рибосомами мРНК относительно суммарной РНК. Таким образом, представленность мРНК в связанной с рибосомами фракции *M. gallisepticum* может модулироваться с помощью вторичных структур в районе старт-кодона.

ВЫВОДЫ

Результаты нашей работы позволяют заключить, что количество мРНК, связанной с рибосомами, у *M. gallisepticum* в основном определяется двумя параметрами: уровнем транскрипции соответствующего гена и эффективностью комплементарных взаимодействий между 3'-концом 16S рРНК и сайтом

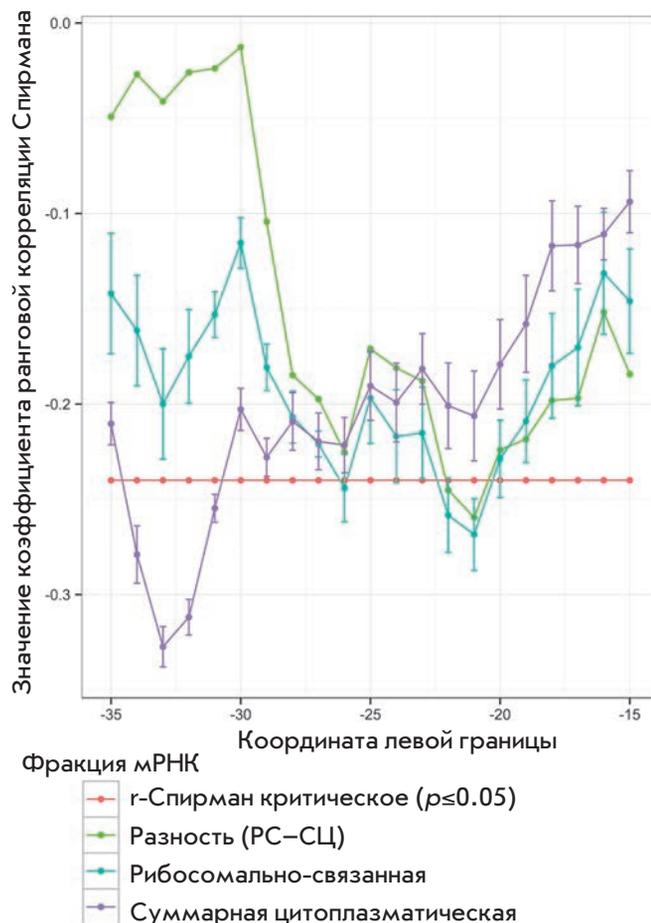


Рис. 2. Корреляция между представленностью мРНК в соответствующей фракции и величиной dG структуры в районе старт-кодона в скользящем окне длиной 30 нуклеотидов. Уровень значимости $p < 0.05$ для значения корреляции > 0.25

связывания рибосомы в 5'-нетранслируемой области мРНК. Нами разработана количественная и воспроизводимая методика получения фракции связанной с рибосомами мРНК *M. gallisepticum*, которая может использоваться для изучения процесса трансляции у этой бактерии. ●

Работа финансировалась грантом РНФ (№ 14-24-00159).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Güell M., van Noort V., Yus E., Chen W.-H., Leigh-Bell J., Michalodimitrakis K., Yamada T., Arumugam M., Doerks T., Kühner S., et al. // Science. 2009. V. 326. № 5957. P. 1268–1271.
- Kühner S., van Noort V., Betts M.J., Leo-Macias A., Batisse C.,

- Rode M., Yamada T., Maier T., Bader S., Beltran-Alvarez P., et al. // Science. 2009. V. 326. № 5957. P. 1235–1240.
- Karr J.R., Sanghvi J.C., MacKlin D.N., Gutschow M.V., Jacobs J.M., Bolival B., Assad-Garcia N., Glass J.I., Covert M.W. // Cell. 2012. V. 150. № 2. P. 389–401.

4. Fisunov G., Alexeev D., Bazaleev N., Ladygina V., Galyamina M., Kondratov I., Zhukova N., Serebryakova M., Demina I., Govorun V. // PLoS One. 2011. V. 6. № 7. P. e21964.
5. Moreno-Campuzano S., Janga S.C., Pérez-Rueda E. // BMC Genomics. 2006. V. 7. P. 147.
6. Mazin P.V., Fisunov G.Y., Gorbachev A.Y., Kapitskaya K.Y., Altukhov I.A., Semashko T.A., Alexeev D.G., Govorun V.M. // Nucl. Acids Res. 2014. V. 42. № 21. P. 13254–13268.
7. Faner M.A., Feigh A.L. // Methods. 2013. V. 63. № 2. P. 144–159.
8. Hillebrand A., Wurm R., Menzel A., Wagner R. // Biol. Chem. 2005. V. 386. № 6. P. 523–534.
9. Moll I., Resch A., Bläsi U. // FEBS Lett. 1998. V. 436. № 2. P. 213–217.
10. Shi J., Jin Y., Bian T., Li K., Sun Z., Cheng Z., Jin S., Wu W. // Mol. Microbiol. 2015. doi: 10.1111/mmi.13126.
11. Fuchs G., Diges C., Kohlstaedt L.A., Wehner K.A., Sarnow P. // J. Mol. Biol. 2011. V. 410. № 1. P. 118–130.
12. Lu P., Vogel C., Wang R., Yao X., Marcotte E.M. // Nat. Biotechnol. 2007. V. 25. № 1. P. 117–124.
13. Nie L., Wu G., Zhang W. // Genetics. 2006. V. 174. № 4. P. 2229–2243.
14. Picard F., Milhem H., Loubière P., Laurent B., Coccagn-Bousquet M., Girbal L. // BMC Genomics. 2012. V. 13. P. 528.
15. Ingolia N.T. // Nat. Rev. Genet. 2014. V. 15. № 3. P. 205–213.
16. Gorbachev A.Y., Fisunov G.Y., Izraelson M., Evsyutina D.V., Mazin P.V., Alexeev D.G., Pobeguts O.V., Gorshkova T.N., Kov-alchuk S.I., Kamashev D.E., et al. // BMC Genomics. 2013. V. 14. P. 726.
17. Balandina A., Kamashev D., Rouviere-Yaniv J. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. № 31. P. 27622–27628.