

УДК 577.322.5

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА БЕЛКА hPF  
ИЗ *Staphylococcus aureus* И АНАЛИЗ ЕГО СТРУКТУРЫ  
МЕТОДОМ СПЕКТРОСКОПИИ ЯМР**

Р.Х. Аюпов<sup>1</sup>, К.С. Усачев<sup>1</sup>, И.Ш. Хусаинов<sup>1,2</sup>, Б. Киффер<sup>2</sup>, М.М. Юсупов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

<sup>2</sup>Институт генетики, молекулярной и клеточной биологии (IGBMC),  
г. Илькирш-Граффенштаден, 67400, Франция

**Аннотация**

Исследуемый белок SaHPF (*Staphylococcus aureus* hibernation-promoting factor) с молекулярным весом 22.2 кДа является трансляционным фактором, который в условиях стресса (например, при аминокислотном голодании или под давлением антибиотика), связываясь с рибосомой, инактивирует ее, тем самым позволяя клетке выживать в неблагоприятных условиях. Процесс получения кристаллов данного белка сопровождается большими трудностями, поэтому определение его структуры методом спектроскопии ЯМР представляет большой интерес. В работе описаны получение белка в минимальной синтетической среде, меченного по изотопам <sup>13</sup>C и <sup>15</sup>N, и результаты ЯМР-экспериментов, которые показали, что белок присутствует в растворе в виде димера. При этом для полного белка в спектрах ЯМР наблюдаются два типа сигналов: 1) с низкой интенсивностью, но хорошей дисперсией от остатков N-концевого домена и 2) с высокой интенсивностью, но плохой дисперсией от остатков, соответствующих подвижной петле между доменами. Сигналов от остатков C-концевого домена белка в спектрах ЯМР не наблюдалось, что свидетельствует о возможном их участии в процессах димеризации белка. Наличие белка в димерной форме было подтверждено методом электрофореза в нативных условиях.

**Ключевые слова:** SaHPF, *Staphylococcus aureus*, ЯМР, рибосома, антибиотик, трансляционный фактор

**Введение**

Золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*), резистентный к метициллину (MRSA), является одной из главных проблем в клинической медицине во всем мире. Устойчивость золотистого стафилококка к большинству антибиотиков обеспечивается за счет специфической мутации в рибосоме, что предотвращает возможность связывания молекулы антибиотика с рибосомой. С точки зрения трансляции устойчивость как результат реакции на стресс сопровождается изменениями в рибосомном профиле клеток, в частности образованием неактивных димеров. Данный процесс происходит при связывании с рибосомой специального регуляторного белка – фактора регуляции трансляции. Когда бактерии оказываются в благоприятных условиях, данный фактор диссоциирует и выжившие рибосомы вновь начинают участвовать в процессе трансляции.

Такой защитный механизм обеспечивает быструю реакцию на изменения условий окружающей среды. Подобный механизм описан и хорошо изучен на примере *E. coli* [1, 2], где в процессе образования димеров рибосомы принимает участие два белка: HPF (Hibernation-Promoting Factor) с молекулярным весом 10.75 кДа и RMF (Ribosome Modulation Factor) с молекулярным весом 6.5 кДа [3]. Для *S. aureus* было показано наличие одного более длинного белка (22.2 кДа), участвующего в образовании димеров рибосомы [4]. Структура данного белка была предсказана нами ранее с помощью биоинформатических методов [5, 6], а структура рибосомы *S. aureus* была определена методом криоэлектронной микроскопии [7].

Целью настоящего исследования являлось получение рекомбинантного белка, меченного по изотопам  $^{13}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}$ , и первичный анализ структуры фактора регуляции трансляции патогенной бактерии *Staphylococcus aureus* SaHPF в растворе методом спектроскопии ЯМР,

### Материалы и методы исследования

Белок SaHPF был клонирован в вектор pGS21A с tag 6-His на С-конце (190 аминокислотных остатков, 22.2 кДа). Вектор был трансформирован в клетки *E. coli* типа BL21star(DE3). Для роста клеток использовалась минимальная синтетическая среда M9, содержащая обогащенную по изотопу  $^{13}\text{C}$  глюкозу и обогащенный по изотопу  $^{15}\text{N}$  сульфат аммония. Культура клеток росла до достижения оптической плотности среды  $A_{595} = 0.7$  о.е., затем в среду добавляли ИПТГ для индуцирования экспрессии белка до конечной концентрации 0.5 мМ. После добавления ИПТГ клетки продолжали расти в течение 20 ч. Очистка белка производилась в два этапа: методом аффинной хроматографии на заполняемой колонке со смолой Ni-NTA Superflow (QIAGEN) и методом эксклюзионной хроматографии на колонке Superdex 75 10/300 [8]. Электрофоретический анализ образца проводился в полиакриламидном геле в камере Mini-Protean Tetra. Полученный образец для ЯМР-исследований содержал 0.05–0.3 мМ меченого по изотопам  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  белка в различных буферах, содержащей 250–500 мМ соли  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (рН раствора 7.6).

Эксперименты ЯМР проводились на спектрометре Avance III HDТМ фирмы Bruker с частотой 700 МГц по протонам, оснащенным криодатчиком QCI ( $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{31}\text{P}$ ). Отнесение сигналов ядер  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , и  $^{15}\text{N}$  проводилось на основе многомерных экспериментов ЯМР (CBCANH, CBCA(CO)NH, HNCA, HN(CO)CA, HN(CA)CO, HNCO, для атомов основной цепи и C(CO)NH, H(CCO)NH для боковых цепей). Спектры записывались с использованием фазочувствительной методики для 2048 точек F3-координаты, 48 точек F2-координаты и 128 точек F1-координаты. Подавление сигнала растворителя проводилось с помощью последовательности Watergate. Отсчет химических сдвигов ядер  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  проводился относительно внутреннего стандарта 2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфоната натрия (ДСС).

### Результаты и их обсуждение

Из 1 л культуры клеток в среде M9 в среднем получали по 3.5 г клеток. В ходе аффинной хроматографии получали чистые фракции белков, буферы в которых меняли в ходе эксклюзионной хроматографии. Для ЯМР-экспериментов образцы белков были получены в следующих буферах: трис-буферы с различной концентрацией соли – 0.15–0.5 М  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1 мМ ДТТ, 20 мМ трис- $\text{HCl}$ , pH 7.6; RE-буфер – 50 мМ RE, 0.5 М  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1 мМ ДТТ [9]; chaps-буфер – 7 мМ CHAPS, 0.25 М  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1 мМ ДТТ, 20 мМ трис- $\text{HCl}$ , pH 7.6 [10]; poly-(U)-буфер – 220 нг/мкл poly-(U), 0.25 М  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1 мМ ДТТ, 20 мМ трис- $\text{HCl}$ , pH 7.6 [11]; фосфатный буфер – 50 мМ фосфатный буфер, pH 6.8, 0.25 М  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1 мМ ДТТ. Концентрация белка варьировалась от 0.05 до 0.3 мМ.

Первоначально с помощью спектроскопии ЯМР анализировался образец белка в фосфатном буфере с концентрацией соли  $\text{NH}_4\text{Cl}$  250 мМ при температуре 298 К. В спектре эксперимента  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC наблюдалось наличие двух типов сигналов с высокой и низкой интенсивностью, что может являться свидетельством о наличии подвижной части белка (рис. 1). Из анализа дисперсии сигналов можно сделать вывод о том, что часть белка упорядочена и имеет вторичную структуру, но также имеется и подвижная неупорядоченная часть, предположительно линкер между двумя доменами белка. Исходя из количества аминокислотных остатков в последовательности белка, ожидалось наличие порядка 190 сигналов от амидных групп в спектре  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC, однако в эксперименте наблюдалось только около 130 сигналов. Далее на основе 3D-экспериментов ЯМР (HNCA, HNCO, HNCACB, CBCA(CO)NH, CC(CO)NH) было проведено отнесение сигналов в спектрах ЯМР для пяти участков в аминокислотной последовательности белка (остатки: 36–42, 49–54, 73–80, 107–114, 117–138). Полное отнесение оказалось невозможным из-за отсутствия сигналов от порядка 30% аминокислотных остатков и сильного перекрытия сигналов. Сигналы остатков 107–114 и 117–138 были намного более интенсивными и с меньшей дисперсией, чем все остальные, что соответствует подвижной и неупорядоченной петле между доменами, предсказанной методами биоинформатики ранее [5, 6].

Наиболее интересной с научной точки зрения является структура С-концевого домена белка SaHPF, так как по аминокислотной последовательности он имеет наименьшую гомологию с белком RMF из *E. coli*, который отвечает за димеризацию рибосомы, и, предположительно, их положения относительно рибосомы могут существенно отличаться. Однако сигналов от С-концевых остатков белка в спектрах ЯМР не наблюдалось. Одним из объяснений этого может быть участие данных остатков в комплексообразовании или олигомеризации. Для поиска решения данной проблемы анализировались спектры ЯМР для образцов белка SaHPF в разных буферных условиях (трис-буфер; буфер, содержащий смесь аминокислот Arg и Glu (RE)); при разных концентрациях соли  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (150, 250, 500 мМ); при разных уровнях pH (4.0, 7.6, 8.3) и при разных температурах (от 15 °С до 35 °С) (рис. 2).

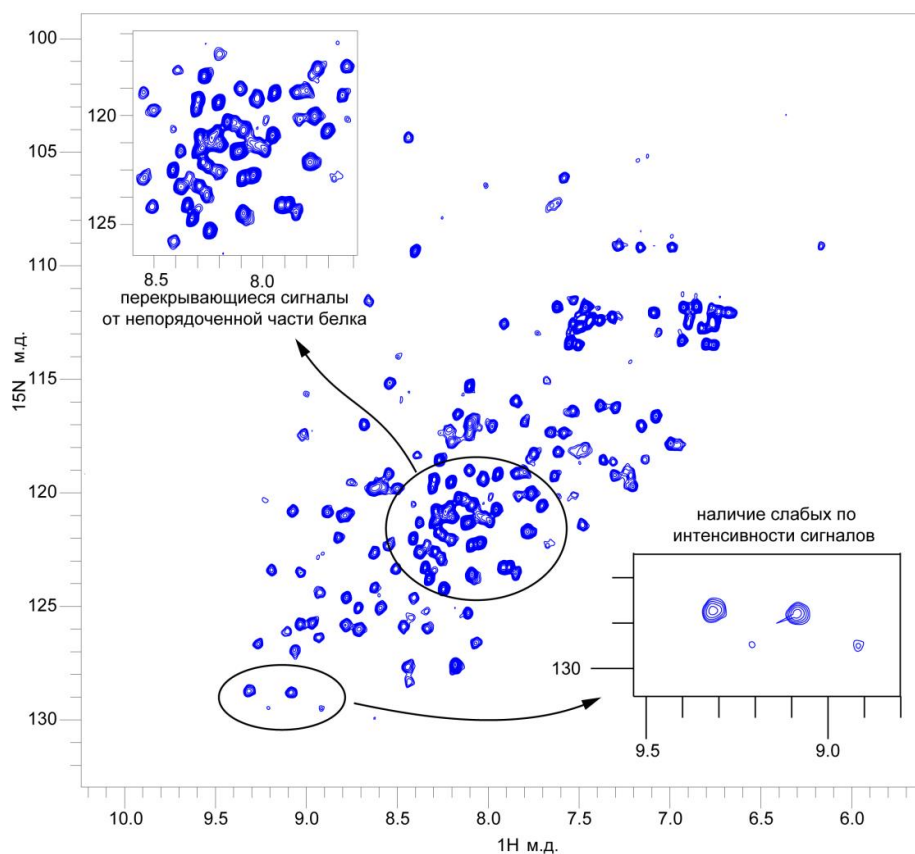


Рис. 1.  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC-спектр (700 МГц) белка SaHPF, меченного по изотопам  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ , (0.1 мМ) в фосфатном буфере с 250 мМ  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $T = 298 \text{ K}$

Наиболее оптимальными оказались следующие буферные условия: 50 мМ RE-буфер (содержащий смесь аминокислот Arg и Glu) при pH 7.6, концентрация соли  $\text{NH}_4\text{Cl}$  500 мМ и температура 35 °C (рис. 3). Для образца в этих буферных условиях наблюдался меньший разброс в интенсивностях сигналов от разных NH-групп белка, однако по-прежнему в спектрах отсутствовали сигналы от аминокислот из С-концевого домена белка. Таким образом, дальнейшее определение структуры данного белка в растворе методом ЯМР оказалось невозможным.

Ранее нами было проведено моделирование трехмерной структуры белка SaHPF с помощью биоинформатических методов [5, 6] на основе поиска гомологичных последовательностей белков в программе ROSETTA [12]. Результаты моделирования показали, что исследуемый нами фактор регуляции трансляции состоит из двух доменов, соединенных петлей. Первые 100 аминокислотных остатков исследуемого белка имеют структурную гомологию с белком из *E. coli* НРФ, выполняющим сходную функцию, а последние 60 остатков (остатки 130–190) имеют гомологию по последовательности с белком Y (PSrp-1) из *Clostridium acetobutylicum* (pdb 3KA5) [13]. Участок белка с 110-го по 130-й остаток соответствует неупорядоченному линкеру между двумя доменами (рис. 4).

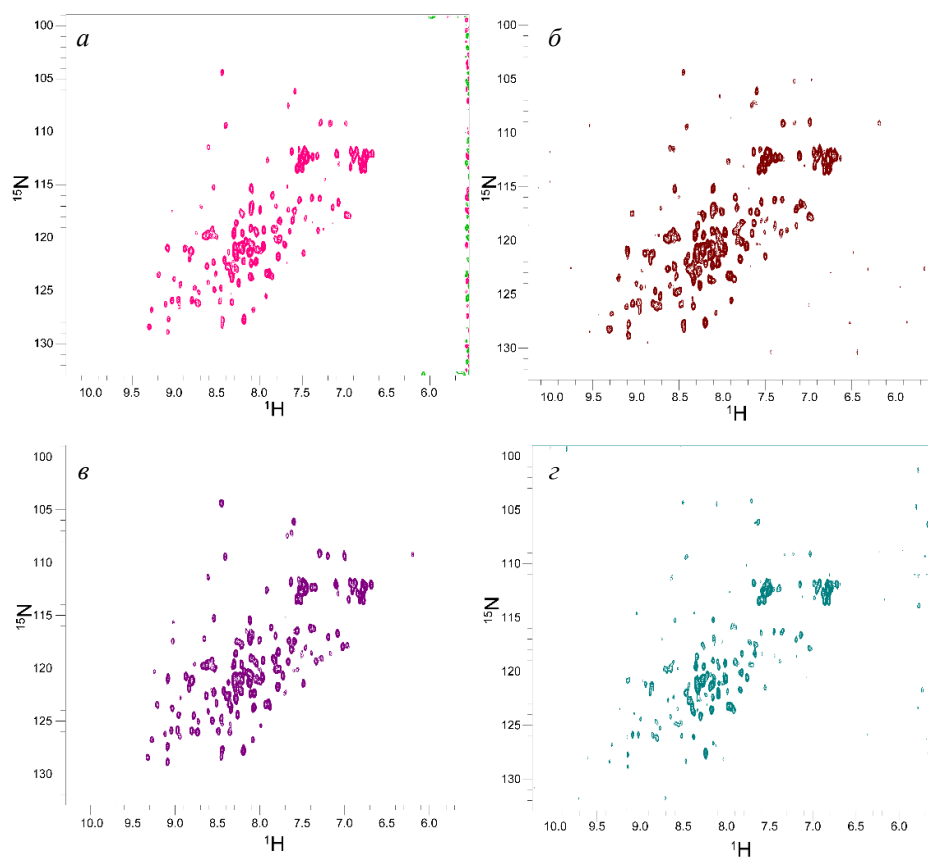


Рис. 2.  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC-спектры (700 МГц) белка SaHPF, меченного по изотопам  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ , (0.1 мМ) в трис-буфере с различной концентрацией соли  $\text{NH}_4\text{Cl}$ : а) 250 мМ; б) 150 мМ; в) 500 мМ; з) 250 мМ с 7 мМ детергента CHAPS,  $T = 298 \text{ K}$

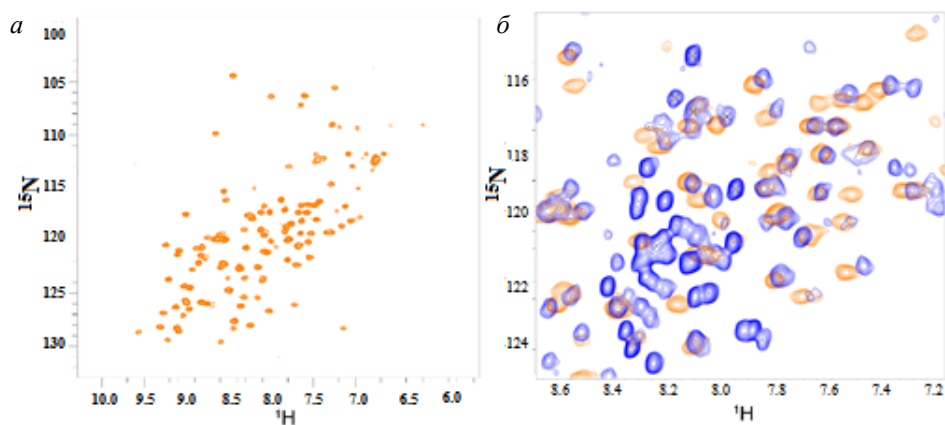


Рис. 3.  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC спектры (700 МГц) белка SaHPF, меченного по изотопам  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ , в RE (а) и трис-буферах (б) с концентрацией соли  $\text{NH}_4\text{Cl}$  500 мМ,  $T = 308 \text{ K}$ . Слева показано увеличение интенсивностей слабых сигналов от остатков соответствующих N-концевому домену белка

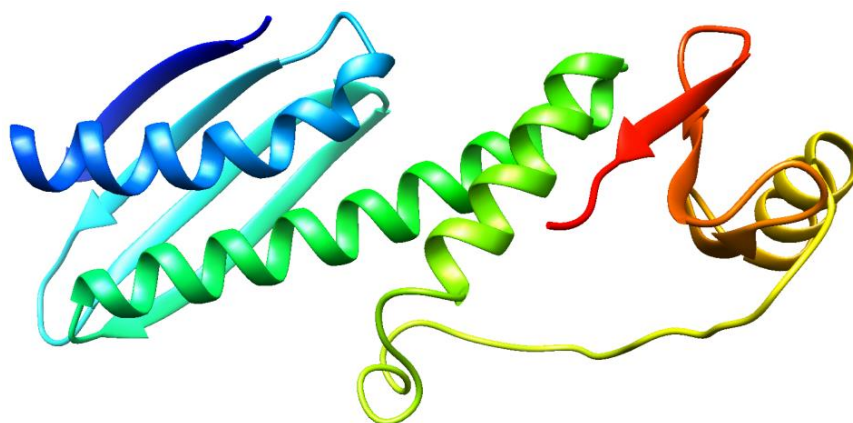


Рис. 4. Структура белка SaHPF, предсказанная с помощью программы ROSETTA, в ленточном представлении. Изменение цвета соответствует росту номера аминокислотного остатка (синим цветом отмечено начало последовательности, красным – конец)

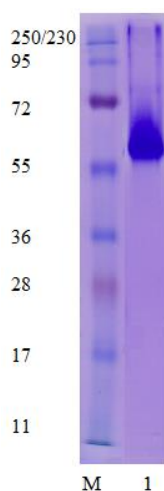


Рис. 5. Электрофорез белка SaHPF в нативных условиях: М – маркер, 1 – SaHPF

Структура белка Y (PSrp-1) из *Clostridium acetobutylicum*, гомологичная С-концевому домену белка SaHPF, была определена методом рентгеноструктурного анализа и является гомодимером [13]. На основе полученных данных можно предположить, что белок SaHPF в растворе также образует димер за счет взаимодействия двух С-концевых доменов, что приводит к отсутствию сигналов от амидных групп данной части белка в спектрах ЯМР. Для подтверждения этого предположения были проведены эксперименты по электрофорезу в нативных условиях белка SaHPF, который подтвердил наличие белка в димерной форме (рис. 5).

Полученные результаты объясняют также трудности в процессе кристаллизации полного белка SaHPF. В качестве решения проблемы определения структуры белка SaHPF мы предлагаем на основе полученного протокола выделения и очистки провести аналогичные эксперименты для N-концевого (остатки 1–110) и С-концевого (остатки 130–190) доменов по отдельности и определить их

структуры независимо методом спектроскопии ЯМР высокого разрешения или рентгеноструктурного анализа.

### Заключение

На основе полученных данных методами ЯМР, электрофореза в нативных условиях и гель-фильтрационной хроматографии было показано, что белок SaHPF в растворе присутствует в димерной форме, структура которого может образовываться за счет взаимодействия двух С-концевых доменов. Димеризация белка объясняет отсутствие части сигналов в спектрах ЯМР и трудности с кристаллизацией белка. Согласно установленному протоколу выделения и очистки данных возможно дальнейшее определение структуры белка SaHPF путем разделения его на отдельные домены (N-концевой домен: остатки 1–110; и С-концевой домен: остатки 130–190) и изучения их методами ЯМР или рентгеноструктурного анализа.

**Благодарности.** Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров и при финансовой поддержке РФФИ (проект № 16-34-60001\_мол\_а\_дк).

### Литература

1. Wada M., Yamazaki Y., Fujita N., Ishihama A. Structure and probable genetic location of a “ribosome modulation factor” associated with 100S ribosomes in stationary-phase *Escherichia coli* cells // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1990. – V. 87, No 7. – P. 2657–2661.
2. Ueta M., Yoshida H., Wada C., Baba T., Mori H., Wada A. Ribosome binding proteins YhbH and YfiA have opposite functions during 100S formation in the stationary phase of *Escherichia coli* // Genes Cells. – 2005. – V. 10, No 12. – P. 1103–1112. – doi: 10.1111/j.1365-2443.2005.00903.x.
3. Polikanov Yu.S., Blaha G.M., Steitz T.A. How hibernation factors RMF, HPF, and YfiA turn off protein synthesis // Science. – 2012. – V. 336, No 6083. – P. 915–918. – doi: 10.1126/science.1218538.
4. Ueta M., Wada Ch., Wada A. Formation of 100S ribosomes in *Staphylococcus aureus* by the hibernation promoting factor homolog SaHPF // Genes Cells. – 2010. – V. 15, No 1. – P. 43–58. doi: 10.1111/j.1365-2443.2009.01364.x.
5. Ayupov R.K., Akberova N.I. Prediction of the three-dimensional structure of the protein SaHPF and analysis of its molecular dynamics // Int. J. Pharm. Technol. – 2016. – V. 8, No 2. – P. 14548–14557.
6. Аюпов Р.Х., Акберова Н.И. Анализ структуры белка SaHPF *Staphylococcus aureus* // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2016. – Т. 158, кн. 3. – С. 327–337.
7. Khusainov I., Vicens Q., Bochler A., Grosse F., Myasnikov A., Ménétret J.-F., Chicher J., Marzi S., Romby P., Yusupova G., Yusupov M., Hashem Y. Structure of the 70S ribosome from human pathogen *Staphylococcus aureus* // Nucleic Acid Res. – 2016. – V. 44, No 21. – P. 10491–10504. – doi: 10.1093/nar/gkw933.
8. Ayupov R.K., Khusainov I.Sh., Validov S.Z., Yusupova G.Z., Yusupov M.M. Isolation and purification of staphylococcus aureus hibernationpromoting factor inactivating of the ribosome // Int. J. Pharm. Technol. – 2016. – V. 8, No 2. – P. 14392–14398.

9. *Golovanov A.P., Hautbergue G.M., Wilson S.A., Lian L.-Y.* A simple method for improving protein solubility and long-term stability // *J. Am. Chem. Soc.* – 2004. – V. 126, No 29. – P. 8933–8939. – doi: 10.1021/ja049297h.
10. *Hjelmeland L.M.* A nondenaturing zwitterionic detergent for membrane biochemistry: Design and synthesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1980. – V. 77, No 11. – P. 6368–6370.
11. *Bachmann M., Trautmann F., Messer R., Zahn R.K., Meyer zum Büschenfelde K.-H., Müller W.E.G.* Association of a polyuridylylate-specific endoribonuclease with small nuclear ribonucleo-proteins which had been isolated by affinity chromatography using antibodies from a patient with systemic lupus erythematosus // *Eur. J. Biochem.* – 1983. – V. 136, No 3. – P. 447–451. – doi: 10.1111/j.1432-1033.1983.tb07762.x.
12. *Raman S., Vernon R., Thompson J., Tyka M., Sadreyev R., Pei J., Kim D., Kellogg E., DiMaio F., Lange O., Kinch L., Sheffler W., Kim B.-H., Das R., Grishin N.V., Baker D.* Structure prediction for CASP8 with all-atom refinement using Rosetta // *Proteins.* – 2009. – V. 77, No 9. – P. 89–99. – doi: 10.1002/prot.22540.
13. *Seetharaman J., Neely H., Wang D., Janjua H., Cunningham K., Owens L., Xiao R., Liu J., Baran M.C., Acton T.B., Rost B., Montelione G.T., Hunt J.F., Tong L.* Crystal structure of Ribosome-associated protein Y (PSrp-1) from *Clostridium acetobutylicum*. Northeast Structural Genomics Consortium target id CaR123A. – 2009. – URL: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?pdbId=3KA5>. – doi: 10.2210/pdb3ka5/pdb.

Поступила в редакцию  
07.04.17

---

**Аюпов Рустам Хасанович**, аспирант кафедры биохимии и биотехнологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет  
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия  
E-mail: [aurusta@mail.ru](mailto:aurusta@mail.ru)

**Усачев Константин Сергеевич**, кандидат физико-математических наук, доцент кафедры медицинской физики

Казанский (Приволжский) федеральный университет  
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия  
E-mail: [Konstantin.Usachev@kpfu.ru](mailto:Konstantin.Usachev@kpfu.ru)

**Хусаинов Искандер Шамильевич**, PhD, младший научный сотрудник НИЛ «Структурная биология»; научный сотрудник лаборатории «Рибосома»

Казанский (Приволжский) федеральный университет  
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия  
Институт генетики, молекулярной и клеточной биологии (IGBMC)  
г. Илькирш-Граффенштаден, 67400, Франция  
E-mail: [khusaino@igbmc.fr](mailto:khusaino@igbmc.fr)

**Бруно Киффер**, PhD, Департамент структурной биологии и геномики

Институт генетики, молекулярной и клеточной биологии (IGBMC)  
г. Илькирш-Граффенштаден, 67400, Франция  
E-mail: [bruno.kieffer@igbmc.fr](mailto:bruno.kieffer@igbmc.fr)

**Юсупов Марат Миратович**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник НИЛ «Структурная биология»; профессор кафедры биохимии и биотехнологии; руководитель лаборатории «Рибосома»

Казанский (Приволжский) федеральный университет  
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия  
Институт генетики, молекулярной и клеточной биологии (IGBMC)  
г. Илькирш-Граффенштаден, 67400, Франция  
E-mail: [marat@igbmc.fr](mailto:marat@igbmc.fr)



**Expression and Purification of HPF Protein from *Staphylococcus aureus*  
and Analysis of Its Structure by the Method of NMR Spectroscopy**R.Kh. Ayupov<sup>a\*</sup>, K.S. Usachev<sup>a\*\*</sup>, I.Sh. Khusainov<sup>a,b\*\*\*</sup>, B. Kieffer<sup>b\*\*\*\*</sup>, M.M. Yusupov<sup>a\*\*\*\*\*</sup><sup>a</sup>Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia<sup>b</sup>Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology (IGBMC),  
Illkirch-Graffenstaden, 67400 FranceE-mail: <sup>\*</sup>aurusta@mail.ru, <sup>\*\*</sup>Konstantin.Usachev@kpfu.ru, <sup>\*\*\*</sup>khusaino@igbmc.fr,  
<sup>\*\*\*\*</sup>bruno.kieffer@igbmc.fr, <sup>\*\*\*\*\*</sup>marat@igbmc.fr

Received April 7, 2017

**Abstract**

*Staphylococcus aureus* hibernation-promoting factor (SaHPF) is a 22.2 kDa translation factor which under stress conditions (under amino acid starvation or antibiotic pressure) binds with the ribosome and inactivates it, thereby ensuring cell survival under stress. There are many problems with crystallization of this protein which still remain unsolved. Therefore, its analysis by NMR spectroscopy is of great interest. In this paper, we have described expression, purification, and NMR analysis of <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N-labeled SaHPF protein and showed that it is present in a dimeric form in the solution. Notably, two types of signals in the NMR spectra have been observed: with weak intensity and high dispersion from N-terminal domain; with high intensity but low dispersion from a flexible loop between domains. No signals from C-terminal domain have been observed in the NMR spectra, which may indicate possible dimerization of this part of the protein. Protein dimerization has been also detected by the method of electrophoresis under native conditions.

**Keywords:** SaHPF, *Staphylococcus aureus*, NMR, ribosome, antibiotic, translation factor

**Acknowledgments.** This study was funded by the subsidy allocated to Kazan Federal University as part of the state program for increasing its competitiveness among the world's leading centers of science and education and by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 16-34-60001\_mol\_a\_dk).

**Figure Captions**

- Fig. 1. <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N HSQC NMR spectrum (700 MHz) of SaHPF (0.1 mM) in PBS buffer + 250 mM NH<sub>4</sub>Cl (<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N), *T* = 298 K.
- Fig. 2. <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N HSQC NMR spectra (700 MHz) of SaHPF at various NH<sub>4</sub>Cl salt concentrations, *T* = 298 K.
- Fig. 3. <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N HSQC NMR spectra (700 MHz) of SaHPF in the RE buffer with 500 mM NH<sub>4</sub>Cl, *T* = 308 K. On the left – an increase in the intensity of weak signals from residues corresponding to N-terminal domain.
- Fig. 4. The structure of SaHPF protein predicted using the ROBETTA program. Color changes designate amino-acid residue number growth (sequence beginning is shown with blue, sequence end is shown with red).
- Fig. 5. Electrophoresis of SaHPF protein under native conditions: M – protein ladder, 1 – SaHPF.

**References**

1. Wada M., Yamazaki Y., Fujita N., Ishihama A. Structure and probable genetic location of a “ribosome modulation factor” associated with 100S ribosomes in stationary-phase *Escherichia coli* cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1990, vol. 87, no 7, pp. 2657–2661.

2. Ueta M., Yoshida H., Wada C., Baba T., Mori H., Wada A. Ribosome binding proteins YhbH and YfiA have opposite functions during 100S formation in the stationary phase of *Escherichia coli*. *Genes Cells*, 2005, vol. 10, no. 12, pp. 1103–1112. doi: 10.1111/j.1365-2443.2005.00903.x.
3. Polikanov Yu.S., Blaha G.M., Steitz T.A. How hibernation factors RMF, HPF, and YfiA turn off protein synthesis. *Science*, 2012, vol. 336, no. 6083, pp. 915–918. doi: 10.1126/science.1218538.
4. Ueta M., Wada Ch., Wada A. Formation of 100S ribosomes in *Staphylococcus aureus* by the hibernation promoting factor homolog SaHPF. *Genes Cells*, 2010, vol. 15, no. 1, pp. 43–58. doi: 10.1111/j.1365-2443.2009.01364.x.
5. Ayupov R.K., Akberova N.I. Prediction of the three-dimensional structure of the protein SaHPF and analysis of its molecular dynamics. *Int. J. Pharm. Technol.*, 2016, vol. 8, no. 2, pp. 14548–14557.
6. Ayupov R.Kh., Akberova N.I. Analysis of the structure of SaHPF *Staphylococcus aureus* protein. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennyye Nauki*, 2016, vol. 158, no. 3, pp. 327–337. (In Russian)
7. Khusainov I., Vicens Q., Bochler A., Grosse F., Myasnikov A., Ménétret J.-F., Chicher J., Marzi S., Romby P., Yusupova G., Yusupov M., Hashem Y. Structure of the 70S ribosome from human pathogen *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acid Res.*, 2016, vol. 44, no. 21, pp. 10491–10504. doi: 10.1093/nar/gkw933.
8. Ayupov R.K., Khusainov I.Sh., Validov S.Z., Yusupova G.Z., Yusupov M.M. Isolation and purification of staphylococcus aureus hibernationpromoting factor inactivating of the ribosome. *Int. J. Pharm. Technol.*, 2016, vol. 8, no. 2, pp. 14392–14398.
9. Golovanov A.P., Hautbergue G.M., Wilson S.A., Lu-Yun Lian. A simple method for improving protein solubility and long-term stability. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, vol. 126, no. 29, pp. 8933–8939. doi: 10.1021/ja049297h.
10. Hjelmeland L.M. A nondenaturing zwitterionic detergent for membrane biochemistry: Design and synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1980, vol. 77, no. 11, pp. 6368–6370.
11. Bachmann M., Trautmann F., Messer R., Zahn R.K., Meyer zum Büschenfelde K.H., Müller W.E.G. Association of a polyuridylylate-specific endoribonuclease with small nuclear ribonucleo-proteins which had been isolated by affinity chromatography using antibodies from a patient with systemic lupus erythematosus. *Eur. J. Biochem.*, 1983, vol. 136, no. 3, pp. 447–451. doi: 10.1111/j.1432-1033.1983.tb07762.x.
12. Raman S., Vernon R., Thompson J., Tyka M., Sadreyev R., Pei J., Kim D., Kellogg E., DiMaio F., Lange O., Kinch L., Sheffler W., Kim B.-H., Das R., Grishin N.V., Baker D. Structure prediction for CASP8 with all-atom refinement using Rosetta. *Proteins*, 2009, vol. 77, no. 9, pp. 89–99. doi: 10.1002/prot.22540.
13. Seetharaman J., Neely H., Wang D., Janjua H., Cunningham K., Owens L., Xiao R., Liu J., Baran M.C., Acton T.B., Rost B., Montelione G.T., Hunt J.F., Tong L. Crystal structure of Ribosome-associated protein Y (PSrp-1) from *Clostridium acetobutylicum*. Northeast Structural Genomics Consortium target id CaR123A. 2009. Available at: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?pdbId=3KA5>. doi: 10.2210/pdb3ka5/pdb.

**Для цитирования:** Аюпов Р.Х., Усачев К.С., Хусаинов И.Ш., Киффер Б., Юсупов М.М. Выделение и очистка белка HPF из *Staphylococcus aureus* и анализ его структуры методом спектроскопии ЯМР // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2017. – Т. 159, кн. 2. – С. 332–341.

**For citation:** Ayupov R.Kh., Usachev K.S., Khusainov I.Sh., Kieffer B., Yusupov M.M. Expression and purification of HPF protein from *Staphylococcus aureus* and analysis of its structure by the method of NMR spectroscopy. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennyye Nauki*, 2017, vol. 159, no. 2, pp. 332–341. (In Russian)