

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Леконцева Наталья Владимировна

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РНК-
СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА Lsm ИЗ АРХЕЙ**

03.01.03 – молекулярная биология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2018

Работа выполнена в группе структурных исследований рибосомных белков Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт белка Российской академии наук»

Научный руководитель: Никулин Алексей Донатович, кандидат химических наук, заведующий лабораторией структурных исследований аппарата трансляции Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт белка Российской академии наук»

Официальные оппоненты:

Сергиев Петр Владимирович, доктор химических наук, профессор кафедры химии природных соединений химического факультета Федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Кульбачинский Андрей Владимирович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной генетики микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт молекулярной генетики Российской академии наук»

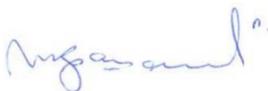
Самыгина Валерия Ролановна, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории рентгеновских методов анализа и синхротронного излучения Федерального государственного учреждения "Федеральный научно-исследовательский центр "Кристаллография и фотоника" Российской академии наук"

Защита диссертации состоится 24 апреля 2018 г. в 13.00 часов на заседании совета МГУ.03.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций по специальностям 03.01.03 — молекулярная биология (биологические науки); 03.02.02 — вирусология (биологические науки) Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, МГУ, д.1, стр. 12, Биологический факультет, ауд. 389.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова (Москва, Ломоносовский проспект, д. 27, отдел диссертаций), на сайте <http://www.bio.msu.ru/dissertations/council.php?ID=12> и на сайте ИАС.ИСТИНА.: <http://istina.msu.ru/dissertations/103672990/>

Автореферат разослан марта 2018 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



И.А.Крашенинников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы.

Белки семейства Lsm представлены во всех трех доменах жизни. Принадлежность к данному семейству белков определяется наличием структурного Sm фолда, состоящего из N-концевой α -спирали и пяти β -тяжей. Lsm белки формируют четвертичную структуру в виде тороидальных колец с числом мономеров белка 6 (бактериальные белки Hfq) или 7 (архейные и эукариотические Sm/Lsm белки).

Бактериальные белки Hfq являются глобальными регуляторами экспрессии генов, способствующие взаимодействию малых регуляторных РНК с мРНК. Эукариотические белки Sm/Lsm участвуют в формировании сплайсосомы и декэпировании мРНК. Sm-подобные архейные белки SmAP изучены слабо, имеются лишь сведения об их возможном участии в процессинге ряда РНК. Выяснение функции архейных белков семейства Lsm представляет собой интересную и важную задачу в области исследования регуляции экспрессии генов в клетках, а изучение взаимосвязи функции белков с их пространственной структурой является еще более актуальной проблемой.

Для проведения исследования выбраны по два белка эуархей рода *Methanococcus* и кренархей рода *Sulfolobus*. Белки из *Sulfolobus solfataricus* и *Sulfolobus acidocaldarius*, а также белок из *Methanococcus vannielii* имеют характерные для архейных и эукариотических Lsm белков структурные особенности: длинную петлю L4 и консенсус RGXX РНК-связывающего сайта. SmAP из *Methanococcus jannaschii* отличается от них тем, что имеет характерные признаки бактериальных белков Hfq: он формирует гексамеры, имеет короткую петлю L4, его уридин-связывающий сайт имеет бактериальный консенсус YKNAI.

Цель работы – исследовать влияние структурных особенностей архейных белков SmAP на специфичность их взаимодействия с РНК, что может прояснить их возможную роль в клетках архей.

Основные задачи работы:

- Определить структуры исследуемых белков в свободном состоянии и в комплексах с рибонуклеотидами для идентификации мест их связывания на поверхности белков.
- Измерить константы связывания (диссоциации) SmAP белками рибонуклеотидов, олиго(У) и олиго(А) РНК.
- Определить, способны ли SmAP белки плавить вторичную структуру РНК.
- Сравнить функциональные свойства архейных SmAP белков со свойствами их бактериального аналога – белка Hfq.

Научная новизна и практическая ценность исследования.

В ходе работы впервые определены структуры SmAP белков из *M. vannielii* и *S. acidocaldarius*, а также структуры комплексов белков SmAP из *M. jannaschii* и *M. vannielii* с уридинмонофосфатом. Это позволило описать структурные особенности узнавания оснований РНК SmAP белками, а

сравнение полученных нами структур с ранее определенными структурами гомологичных бактериальных и архейных белков позволило продемонстрировать различия в их взаимодействиях.

Проведенные в рамках работы измерения анизотропии флуоресценции меченого аденозинмонофосфата показали низкое сродство SmAP к АМФ и поли(А) РНК, что является существенным отличием SmAP от бактериальных гомологов. Анализ структур архейных SmAP показал, что этот эффект можно объяснить существенными изменениями в аналоге аденин-связывающего сайта Hfq.

Впервые измерены константы связывания исследуемых архейных белков с олиго(А) и олиго(У) РНК. Показано, что SmAP белки связывают олиго(У) РНК с несколько большим сродством, чем бактериальные Hfq, а величины констант диссоциации SmAP-олиго(А) РНК близки к неспецифическим. Исключением является SmAP из *M. jannaschii*, однако в работе было показано, что этот эффект объясняется наличием неупорядоченного положительно заряженного N-конца, неспецифически связывающего РНК.

Впервые проведены исследования РНК-шаперонной активности SmAP. С помощью метода «молекулярных маяков» показано, что архейные белки, в отличие от бактериальных белков Hfq, способны плавить вторичную структуру РНК в отсутствие комплементарной ей РНК.

Полученные данные показывают, что SmAP имеют большее сродство к поли(У) РНК, чем бактериальные Hfq, но в отличие от них не способны специфически связывать поли(А) РНК. Это позволяет исключить возможность участия SmAP белков в целом ряде процессов, в которые вовлечены их бактериальные гомологи, и значительно ограничить число возможных мишеней архейных Lsm белков.

Методология и методы исследования.

Экспрессионные вектора со вставкой генов исследуемых белков получены с помощью методов геной инженерии. Белки выделены с использованием хроматографических методов с чистотой, пригодной для кристаллизации. Проведен поиск условий кристаллизации и получены кристаллы нативных белков. Участки связывания одноцепочечных РНК на поверхности исследуемых белков определяли по методике, ранее предложенной нашей группой. Сродство исследуемых белков к нуклеотидам определяли по изменению анизотропии флуоресценции АМФ-МАНТ. Измерения констант связывания РНК исследуемыми белками проводили с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса. Для определения способности исследуемых белков плавить вторичную структуру РНК применен метод молекулярных маяков, использованный ранее для исследования этих свойств белка Hfq из *E. coli*.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Структура уридин-связывающего сайта архейных белков SmAP консервативна и гомологична бактериальным и эукариотическим белкам.
- В отличие от белков Hfq, белки SmAP не способны специфически связывать поли(А) участки РНК из-за существенно измененной

аминокислотной последовательности в области, эквивалентной аденин-связывающему сайту бактериального Hfq.

- Архейные SmAP белки способны плавить вторичную структуру целевой РНК независимо от присутствия комплементарной ей РНК.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии во всех этапах работы, а именно: проведение генно-инженерных экспериментов, выделение и очистка белков, кристаллизация белков и нуклеотид-белковых комплексов, сбор дифракционных данных с полученных кристаллов и анализ полученных структур, измерение констант связывания рибонуклеотидов и РНК с белками различными биохимическими методами.

Степень достоверности. Достоверность полученных результатов подтверждается воспроизводимостью неоднократно проведенных на современном научном оборудовании экспериментов. Точность полученных структур оценена статистически и соответствует стандартным стереохимическим параметрам.

Апробация работы и публикации. Результаты работы неоднократно представлялись на российских и международных конференциях. По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в ведущих научных журналах, рекомендованных ВАК, и 10 материалов международных и российских съездов и конференций. Полученные структуры депонированы в банк данных PDB (4X9C, 4X9D, 5MKI, 5MKL, 5MKN, 5DY9, 6FVD).

Структура диссертации. Диссертация изложена на 123 страницах, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка использованной литературы (127 наименований). Диссертация содержит 44 рисунка и 12 таблиц.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Получение и кристаллизация архейных белков семейства Lsm

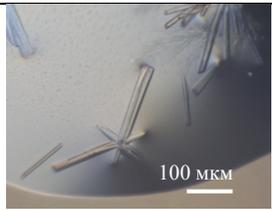
1.1. Выделение и кристаллизация белка SmAP из Methanococcus jannaschii и его мутантных форм, а также комплексов с рибонуклеотидмонофосфатами

Выделение белка Mja SmAP осуществляли по методике, отличающейся от представленной ранее (Nielsen *et al.*, 2007). Ген белка SmAP из *M. jannaschii* клонировали в экспрессионный вектор pET11a-PL, наработку белка проводили в клетках штамма BL21(DE3) *E. coli*, котрансформированных плазмидой pUBS520. Первый этап очистки - прогрев лизата при 82°C в течение 20 мин с последующим осаждением термолабильных белков *E. coli*. Второй этап - гидрофобная хроматография, позволившая очистить белок от примесных белков и РНК. Белок Mja SmAP сконцентрирован до 30 мг/мл и переведен диализом в буфер, содержащий 0,2 М NaCl и 50 мМ Трис-HCl, pH 8,0.

Поиск условий кристаллизации проводили методом диффузии паров в висящей капле с использованием коммерческих наборов Nuc Pro (Jena Bioscience, Германия). Кристаллы достигали максимального размера в течение недели (табл. 1). Наборы дифракционных данных получали на синхротроне

BESSY II (Берлин, Германия). Сравнение полученной нами структуры белка с определенной ранее (PDB 2QTX, 2.5Å, Nielsen *et al.*, 2007) показало минимальное расхождение между ними (рис. 1). Высокое разрешение и качество набора дифракционных данных позволило нам дополнительно описать положение аминокислотных остатков Lys12-Val13-Ile14 на N-конце белка.

Таблица 1. Характеристика кристаллов Mja SmAP

Фотография кристалла	Условия кристаллизации	Параметры
	<u>Противораствор:</u> 50% ПЭГ 200, 0,1М Трис-НCl, pH 8,0 <u>Криопротекторный раствор:</u> 50% ПЭГ 200, 0,1М Трис-НCl, pH 8,0	Пространственная группа P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ Параметры ячейки: a=57,67 Å; b=66,86 Å; c=109,21 Å, α=β=γ=90° PDB код 4X9C Предел разрешения 1.4 Å

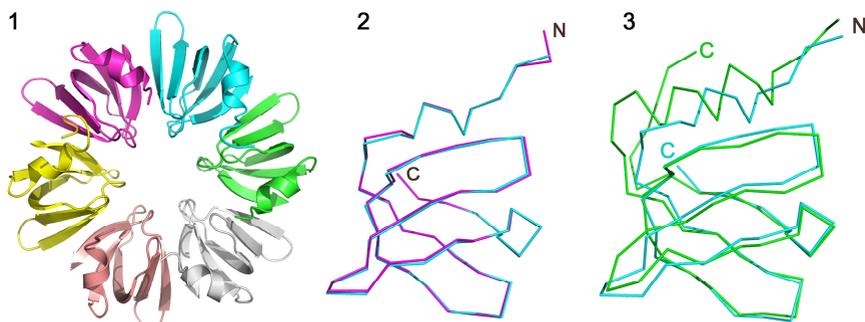


Рис. 1. (1) Структура гексамера белка SmAP из *M. jannaschii* (PDB 4X9C). Мономеры белка показаны разным цветом. (2) Сравнение пространственной структуры мономеров Mja SmAP с разрешением 1,4Å (голубой, PDB 4X9C) и 2,5Å (малиновый, PDB 2QTX). (3) Сравнение пространственных структур мономеров Mja SmAP (голубой) и Pae Hfq (зеленый).

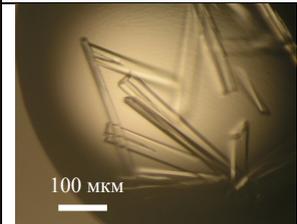
Несмотря на сохранение общей структуры мономера белка, структура Mja SmAP имеет заметные отличия от бактериального белка Hfq (рис. 1.3). N-концевая часть белка более длинная по сравнению с белком Hfq, имеет большее число положительно заряженных остатков, а N-концевая спираль как бы «растянута», по сравнению с α-спиралью Hfq. С другой стороны, белок Hfq имеет удлиненную неупорядоченную C-концевую последовательность в отличие от полностью редуцированного C-конца Mja SmAP.

Ранее нами было показано, что белок Hfq из *P. aeruginosa* (PaeHfq) связывает АТФ, УТФ и ЦТФ в сайтах взаимодействия белка с РНК (Murina *et al.*, 2013). Более того, положение оснований и их контакты с белком идентичны таковым в РНК-белковых комплексах. Это свойство рибонуклеотидов было применено для идентификации сайтов связывания РНК на поверхности

МjаSmАР поскольку позволяет найти их быстрее и проще, чем посредством получения, кристаллизации и определения структур РНК-белковых комплексов.

Кристаллы нуклеотид-белковых комплексов получали путем совместной кристаллизации или вымачиванием кристаллов белка в растворе, содержащем соответствующий рибонуклеотидмонофосфат. В первом варианте, в кристаллизационную каплю добавляли АМФ или УМФ до 5 мМ. Во втором варианте рибонуклеотидмонофосфаты добавляли в криораствор до конечной концентрации 24 мМ, а затем в него помещали кристаллы белка и инкубировали их в течение 10-20 часов при комнатной температуре (табл. 2).

Таблица 2. Характеристика кристаллов Мjа SmАР с УМФ

Фотография кристалла	Условия кристаллизации	Параметры
	<u>Противораствор:</u> 50% ПЭГ200, 0,1 М Tris-HCl, pH 8,0 <u>Криопротекторный раствор:</u> 50% ПЭГ200, 0,1М Tris-HCl, pH 8,0	Пространственная группа P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ Параметры ячейки: a=57,74 Å; b=66,87 Å; c=109.31 Å, α=β=γ=90° PDB код 4X9D Предел разрешения 1.5 Å

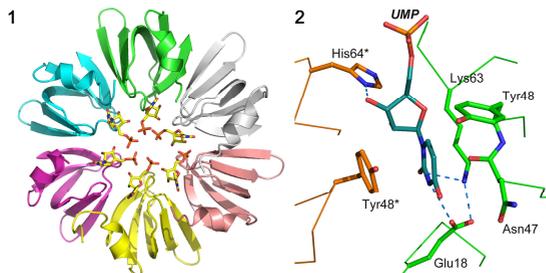


Рис. 2. (1) Общий вид структуры комплекса Мjа SmАР с УМФ (PDB 4X9D). (2) Расположение и контакты одной из молекул УМФ в сайте связывания. Оранжевым и зеленым показаны аминокислотные остатки соседних мономеров белка. Синим – молекула УМФ. Пунктирными линиями обозначены водородные связи.

Комплекс Мjа SmАР-УМФ получен сокристаллизацией в тех же условиях, что и нативный белок. Структура определена методом молекулярного замещения с использованием структуры нативного белка в качестве исходной модели. В процессе уточнения структуры в центральной поре гексамера идентифицированы и вписаны в экспериментальную электронную плотность 6 молекул УМФ (рис. 2).

Каждый уридин расположен между двумя Tyr48 (эквивалент Phe42 в EсоHfq и РаеHfq) двух соседних мономеров. His64 в Мjа SmАР (эквивалент His57 в EсоHfq и РаеHfq) контактирует с атомом O2' рибозы. Атомы основания УМФ формируют водородные связи с атомами кислорода Glu18 и азота Lys63, что отличается от контактов в комплексах белка Hfq с олиго(У) РНК и УМФ.

Комплекс Мjа SmАР с АМФ ни сокристаллизацией, ни вымачиванием кристаллов белка в растворах с концентрацией АМФ до 25 мМ получен не был.

Все протестированные варианты не имели участков карт электронной плотности, которые могли бы соответствовать молекулам АМФ.

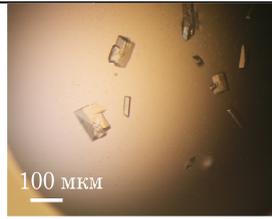
1.2. Выделение и кристаллизация белка SmAP из *Methanococcus vannielii* и его комплексов с рибонуклеотидмонофосфатами

Ген белка Mva SmAP клонирован в вектор pProExHTb, который позволяет добавить к белку олигогистидиновую последовательность на N-конце и сайт TEV-протеазы для его удаления. Полученной конструкцией были трансформированы клетки *E.coli* BL21(DE3), которые дополнительно несли плазмиду pLacIRARE (Novagen) с генами аргининовой, изолейциновой, лейциновой, пролиновой и глициновой тРНК, узнающими редкие для *E. coli* кодоны соответствующих аминокислот.

Для выделения Mva SmAP в растворимой форме температура инкубации клеток штамма-производителя понижалась до 20°C после добавления индуктора; время инкубации увеличивали до 12 ч. Первая стадия очистки - аффинная хроматография на смоле Ni-NTA agarose. Гистидиновую последовательность удаляли добавлением TEV-протеазы в соотношении 100:1 по оптической плотности. Оставшиеся в препарате примеси удаляли с помощью гель-фильтрации на смоле Superdex G75.

Поиск условий кристаллизации проводился методом диффузии паров в висящей капле с помощью коммерческих наборов условий Nuc Pro (Jena BioScience, Германия) (табл. 3).

Таблица 3. Характеристика кристаллов Mva SmAP

Фотография кристалла	Условия кристаллизации	Параметры
	<u>Противораствор:</u> 30% ПЭГ 400, 50 mM Трис-HCl, pH 8.5, 100 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ <u>Криопротекторный раствор:</u> 26.6 % ПЭГ 400, 0.19 M CaCl ₂ , 0.095 M HEPES, pH 7.5, 5% глицерин	Пространственная группа P 1 2 ₁ 1 Параметры ячейки: a=69,67 Å; b=114,22 Å; c=71,99 Å, α= γ=90°, β=113,70° PDB код 5MK1 Предел разрешения 2.05 Å

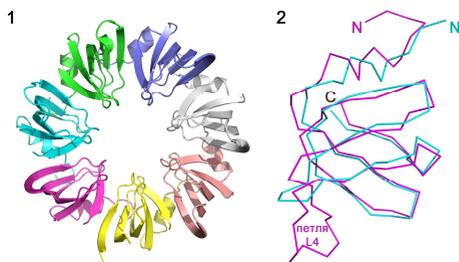
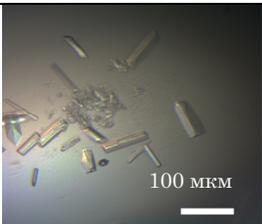


Рис. 3. (1) Структура гептамера белка Mva SmAP (PDB 5MK1). (2) Наложение структуры мономеров Mja SmAP (голубой) и Mva SmAP (малиновый). Обозначены N- и C-концы белков, а также петля L4.

Наборы дифракционных данных собирали на линии ID23 синхротрона ESRF (Гренобль, Франция) с разрешением 2.05 Å. Структуру белка определяли методом молекулярного замещения, первоначальной моделью служил гептамер SmAP белка из *Pyrococcus abussii* (PDB 1M8V). Как и ожидалось, белок формировал гептамеры (рис. 3). Сравнение структур мономеров Mja SmAP и Mva SmAP показало отличие конформации их N-концов, а также петли L4, которая у белка Mva SmAP гораздо длиннее.

Кристаллы комплексов Mva SmAP с УМФ получены путем совместной кристаллизации в тех же условиях, что и кристаллы нативного белка (табл. 4). Структура комплекса Mva SmAP с УМФ определена с разрешением 2,55Å (рис. 4). Семь молекул УМФ обнаружены в центральной поре гептамера в уридин-связывающем сайте каждого мономера. Сравнение участка связывания УМФ в Mva SmAP и Hfq показало значительное изменение контактов атомов нуклеотида и белка. Основание уридина находится в стэкинге с боковыми цепями аминокислотных остатков His39 и Arg63 одного мономера вместо фенилаланина двух соседних цепей в белке Hfq. Водородные связи с атомами основания формируют атомы боковой цепи остатка Asp41 и главной цепи Asp65. O2' атом рибозы также формирует водородную связь, однако со стороны белка в этом контакте участвует боковая цепь Arg63 соседнего мономера белка.

Таблица 4. Характеристика кристаллов Mva SmAP с УМФ

Фотография кристалла	Условия кристаллизации	Параметры
	<u>Противораствор:</u> 30% ПЭГ 400, 50 mM Трис–HCl, pH 8.5, 100 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ <u>Крипротекторный раствор:</u> 26.6 % ПЭГ 400, 0.19 M CaCl ₂ , 0.095 M HEPES, pH 7.5, 5% глицерин	Пространственная группа P 1 2 ₁ 1 Параметры ячейки: a=91,02 Å; b=97,87 Å; c=123,45 Å, α= γ=90°, β=103,70° PDB код 5MKN Предел разрешения 2.55 Å

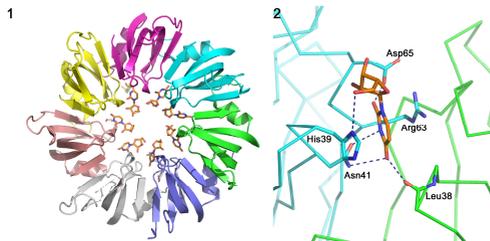


Рис. 4. (1) Структура комплекса Mva SmAP с УМФ (PDB 5MKN). (2) Область взаимодействия УМФ и белка. Голубым и зеленым показаны аминокислотные остатки соседних мономеров белка. Оранжевым – молекула УМФ. Пунктирными линиями обозначены водородные связи.

Ранее нами для белка Hfq были получены комплексы с ЦМФ в уридин-связывающем сайте, мы также проверили способность SmAP связывать этот нуклеотид. Кристаллы комплекса Mva SmAP с ЦМФ получены совместной кристаллизацией. Они отражали рентгеновские лучи с разрешением 1.5Å. В картах электронной плотности было найдено 7 молекул ЦМФ на гептамер белка, причем положение ЦМФ идентично положению УМФ в соответствующем

комплексе белка. Таким образом, мы подтвердили способность SmAP белков связывать как уридины, так и цитозины в одном участке.

Комплекс Mva SmAP с АМФ ни сокристаллизацией, ни вымачиванием кристаллов белка в растворах с различной концентрацией АМФ (до 25 мМ) получен не был. Все протестированные варианты в экспериментальных картах электронной плотности не имели участков, которые могли бы соответствовать молекулам АМФ.

1.3. Выделение и кристаллизация белков SmAP и их комплексов с рибонуклеотидмонофосфатами из кренархей рода *Sulfolobus*

Для сравнения и более полного анализа РНК-связывающих свойств архейных белков семейства Lsm, мы исследовали белки двух кренархей из рода *Sulfolobus* – *S. acidocaldarius* и *S. solfataricus*.

Плазмида, несущая ген Sso SmAP2, была любезно предоставлена доктором Удо Блези (Венский биоцентр, Австрия). Нарботку и выделение белка проводили по схеме, представленной в работе в которой впервые была определена структура белка (Märtens *et al.*, 2015). Структура комплекса белка с РНК в этой работе не была получена из-за его низкой стабильности. Нами получены кристаллы нативного белка в условиях 40 коммерческого набора Index (MDL, Англия), а также проведена совместная кристаллизация белка с УМФ и АМФ (табл. 5).

Дифракционные данные с кристаллов собирали на линии BL14.1 синхротрона BESSY (Берлин, Германия). Кристаллы препарата белка Sso SmAP2, полученные в присутствии УМФ, отражали рентгеновские лучи с разрешением 2.9Å, а кристаллы препарата белка, полученные в присутствии АМФ, отражали до 2.6Å. Структуры были определены методом молекулярного замещения с использованием в качестве исходной модели ранее полученной структуры белка (рис. 5.1). В обоих случаях нуклеотиды в расчетных картах электронной плотности обнаружить не удалось.

Таблица 5. Характеристика кристаллов белка Sso SmAP2 в присутствии АМФ

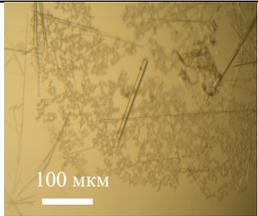
Фотография кристалла	Условия кристаллизации	Параметры
	Противораствор: 25% ПЭГ 3350, 0.1 М лимонная кислота, pH 3.5 Криопротекторный раствор: 30 % ПЭГ 3350, 0.1 М лимонная кислота, pH 3.5	Пространственная группа P 1 2 ₁ 1 a=34,65 Å; b=85,52 Å; c=105,26 Å, α=γ=90°, β=90,19° Предел разрешения 2.6 Å

Для наработки белка Sac SmAP использовали вектор pProExHTb, который добавляет гистидиновый хвост на N-конце белка и сайт TEV-протеазы для его удаления. Схема выделения белка была аналогична использованной для выделения белка Mva SmAP, но с добавлением 1 мМ ДТТ.

Кристаллы белка получены методом диффузии паров в висящей капле в условиях #10 скрина PEG/Ion II (табл. 6). Кристаллы появлялись на третий день при температуре 285K и достигали максимальной длины в течение 10 дней.

С кристаллов собраны наборы дифракционных данных с разрешением 2.1 Å на линии ID23 синхротрона ESRF (Гренобль, Франция). Поскольку кристаллы белка были длинными и тонкими, при сборе дифракционных данных мы применяли методику «спирального сканирования» по всей длине кристалла. Это позволило использовать весь полезный объем кристалла и получить дифракционные данные высокого разрешения с улучшенной статистикой. Структуру белка определяли методом молекулярного замещения, первоначальной моделью служил белок дикого типа SsoSmAP2, PDB 4XQ3.

Таблица 6. Характеристика кристаллов белка Sac SmAP

Фотография кристалла	Условия кристаллизации	Параметры
	Противораствор: 20% ПЭГ 3350, 8% Tascimate, pH 4.0 Криопротекторный раствор: 35 % ПЭГ 3350, 8% Tascimate, pH 4.0	Пространственная группа P 1 Параметры ячейки: a=31,62Å; b=133,52Å; c=135,77Å, α=86,18°; β=85,78°; γ=89,94° PDB код 5MKL Предел разрешения 2.1 Å

Инкубировать кристаллы белка в растворах рибонуклеотидов оказалось невозможно из-за их малых размеров и хрупкости. Кристаллы, получаемые сокристаллизацией с рибонуклеотидами, отражали рентгеновские лучи с низким разрешением, что не позволило определить структуру белков в присутствии рибонуклеотидов.

Структуры белков Sac SmAP и Sso SmAP2 похожи, среднее квадратичное отклонение по Ca атомам одного мономера составляет не более 1.0 Å (рис. 5.3). Небольшие отличия между ними имеются в положении N- и C-концов, и петли L4. Структуры SmAP белков из *S. solfataricus* и *S. acidocaldarius* похожи на полученную нами структуру Mva SmAP, однако в последнем петля L4 имеет меньший размер (рис. 5.4).

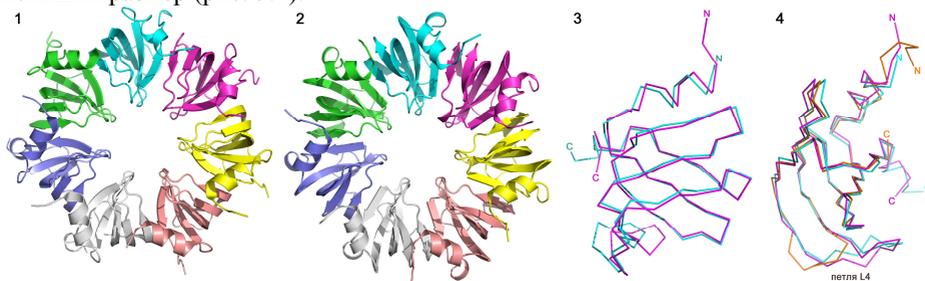


Рис. 5. Структуры SmAP белков из (1) *S. solfataricus* и (2) *S. acidocaldarius*. Наложение структур мономеров (3) Sso SmAP2 (голубой) и Sac SmAP (малиновый); (4) Sso SmAP2 (голубой), Sac SmAP (малиновый) и Mva SmAP (оранжевый).

2. Сравнение уридин-связывающих сайтов бактериальных и архейных белков семейства Lsm

Для детального анализа структуры уридин-связывающего сайта бактериальных и архейных Lsm белков, мы использовали имеющиеся на данный момент структуры следующих комплексов: полученные нами структуры комплексов Mja SmAP с УМФ (PDB 4X9D), Mva SmAP с УМФ (PDB 5MKN), определенные ранее структуры комплексов SmAP из *Pyrococcus abussii* с олиго(У) РНК (PDB 1M8V), SmAP из *Archaeoglobus fulgidus* с олиго(У) РНК (PDB 115L), SmAP из *Methanothermobacter thermoautotrophicus* с УМФ (PDB 1LOJ). В качестве структуры бактериального гомолога использована структура комплекса белка Pae Hfq с УМФ (PDB 4PNO). Результаты анализа были применены к полученным нами структурам SmAP белков из *S. acidocaldarius* и *S. solfataricus*.

Белок Hfq связывает уридины в центральной поре гексамера. Основание уридина находится в стэкинге с бензольными кольцами Phe42 двух соседних мономеров, а специфичность узнавания обеспечивается водородными связями между атомами основания и аминокислотных остатков белка: O2 и NE2 Gln8; O1 и N4 Gln41; O2' атом рибозы и ND His57. Конформация боковой цепи остатка Gln8 стабилизируется ее контактом с консервативным Lys65 (рис. 6.1).

В структуре комплекса Mja SmAP с УМФ каждый уридин расположен между двумя Tug48 двух соседних мономеров (рис. 6.2). His64 Mja SmAP контактирует с атомом O2' рибозы так же, как His57 Pae Hfq. Он входит в консервативный Sm2 мотив [Y/F]KHA1 белка Mja SmAP, характерного для бактериальных белков Hfq. В Mja SmAP Gln41 заменен на более короткий Asn47, и контакт между его боковой цепью с O4 атомом урацила не формируется. Водородная связь между Nξ лизина Lys63 и атомом O2 урацила компенсирует потерю предыдущего контакта. Lys63 также входит в состав Sm2 консенсуса, однако в бактериальных Hfq он не контактирует с атомами основания, а стабилизирует положение вышеупомянутого Gln41. Замена глутамина на аспарагин привела к тому, что лизин смог сформировать водородную связь с атомом основания уридина. В отличие от Pae Hfq, у которого еще одна водородная связь формируется Gln8, находящимся в N-концевой α -спирали, в Mja SmAP α -спираль редуцирована. В результате, роль Gln8 у Mja SmAP играет Glu18, формируя водородную связь с N3 атомом урацила. Конформация боковой цепи глутамата стабилизируется контактом с консервативным Lys63 (Lys65 в Pae Hfq). Сравнение структур показывает сохранение конформации проксимального уридин-связывающего сайта Mja SmAP, несмотря на некоторые изменения в этом участке белка по сравнению с Hfq.

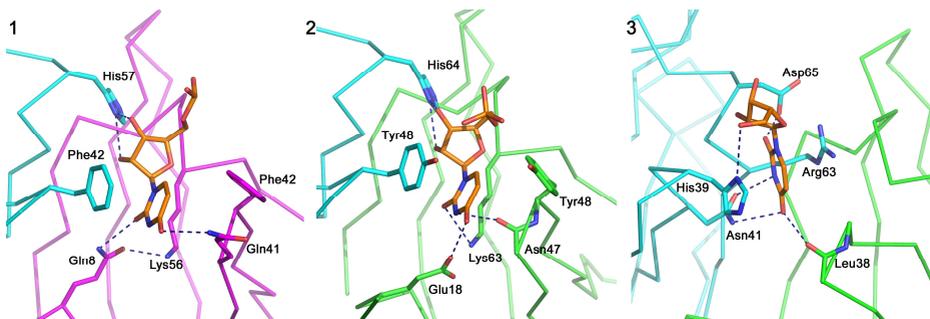


Рис. 6. Сравнение пространственных структур уридин-связывающего участка в белках (1) *Pae Hfq* (PDB 4PNO), (2) *Mja SmAP* (PDB 4X9D) и (3) *Mva SmAP* (PDB 5MKN). Соседние цепи белка показаны голубым и зеленым (для белка *Hfq* – голубым и малиновым), молекула уридинмонофосфата – оранжевым. Синими пунктирными линиями показаны водородные связи между атомами белка и УМФ.

В структуре комплекса *Mva SmAP* с УМФ нуклеотиды также располагаются в центральной поре мультимера белка. Основание расположено между боковыми цепями His39 (аналог Phe42 *Pae Hfq*) и Arg63 одного мономера белка, при этом His39 одновременно может формировать водородную связь с кислородом рибозы. Боковая цепь Asn41 развернута в противоположную сторону относительно своего аналога Gln41 в *Hfq*, и формирует две водородные связи с основанием: ND – O4 и OD – N3. Asp65 формирует еще одну водородную связь с атомом O2 основания. Остаток Asp65, как и Arg63, входят в состав Sm2 мотива, который у экариотических и архейных белков, в отличие от бактериальных, имеет консенсус RGXX, где XX – заряженные аминокислоты глутамат/глутамин или аспаргат/аспарагин, реже – полярные серин или треонин.

Сравнение структуры уридин-связывающего сайта *Mva SmAP* с его аналогом в белках из *P. abussii*, *A. fulgidus* и *M. thermotrophicus* показало, что в структурах лишь незначительно меняется положение основания (рис. 7).

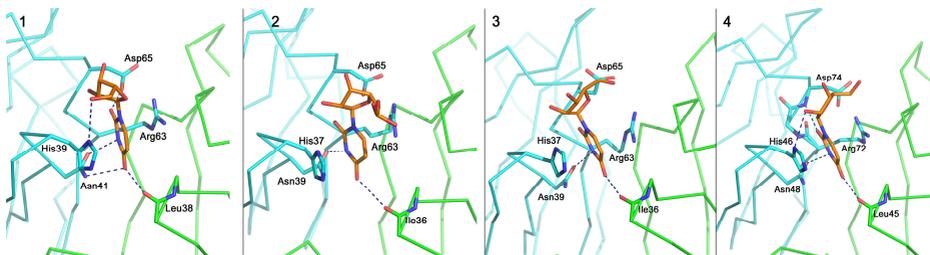


Рис. 7. Сравнение пространственных структур уридин-связывающего участка в SmAP белках из (1) *M. vannielii* (PDB 5MKN), (2) *P. abussii* (PDB 1M8V), (3) *A. fulgidus* (PDB 1I5L) (4) *M. thermotrophicus* (PDB 1LOJ). Соседние цепи белка показаны голубым и зеленым, молекула уридинмонофосфата – оранжевым. Синими пунктирными линиями показаны водородные связи между атомами белка и УМФ.

Все контакты между основанием и белком сформированы идентичными аминокислотными остатками, образующими одинаковые водородные связи. Следует отметить, что в гептамерных SmAP белках контакты с уридином формируют боковые цепи аминокислотных остатков только одного из мономеров белка. Это отличает их от гексамерных Hfq и Mja SmAP, у которых уридин-связывающий сайт формируется аминокислотными остатками соседних субъединиц.

Уридин-связывающие сайты белков Sac SmAP и Sso SmAP2 имеют одинаковую структуру с идентичными аминокислотными остатками, которая заметно отличается от структуры этого участка в других рассматриваемых нами белках (рис. 8). У Sso SmAP2 и Sac SmAP он формируется аминокислотными остатками Thr40 (в Mva SmAP – His39), Asn42 (Asn41), Arg68 (Arg63) и Ser70 (Asp65). Замены гистидина на треонин и аспартата на серин должны привести к потере нескольких водородных связей с основанием нуклеотида, а значит и к существенному ослаблению связывания. Кроме того, замена гистидина на треонин приводит к неспособности белка формировать стэкинг с основанием нуклеотида. Моделирование положения уридинмонофосфата в структуре белка Sso SmAP2 подтверждает наши предположения (рис. 8.4).

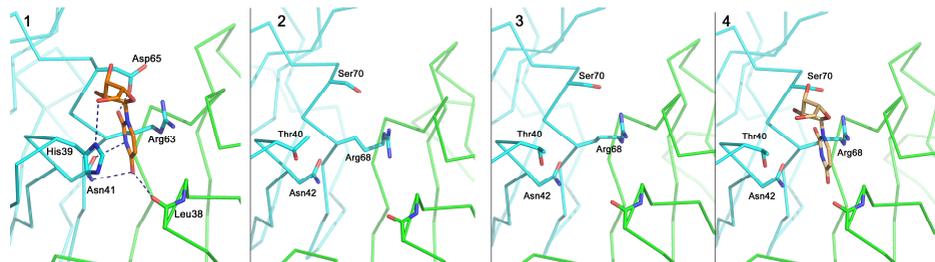


Рис. 8. Сравнение пространственных структур уридин-связывающего участка белка Mva SmAP (1) с соответствующим участком в белках (2) Sac SmAP (PDB 5MKL) и (3) Sso SmAP2 (PDB 4XQ3). Соседние цепи белка показаны голубым и зеленым, молекула уридинмонофосфата – оранжевым. Синими пунктирными линиями показаны водородные связи между атомами белка и УМФ. (4) Предположительное расположение УМФ (светло-коричневая) в структуре белка Sso SmAP2, смоделированное на основе структур комплексов SmAP белков с УМФ.

3. Сравнение и анализ областей аденин-связывающих сайтов бактериальных и архейных белков семейства Lsm

Аденин-связывающий сайт Eco Hfq располагается в межсубъединичном интерфейсе между двумя соседними мономерами. Основание находится в стэкинге с консервативным аминокислотным остатком тирозина Tyr25 одного мономера, с противоположной стороны располагается обширная гидрофобная область из остатков Leu26, Leu30 и Leu32 соседнего мономера (рис. 9). Остатки Gln52 и Thr61 образуют водородные связи с N6 и N1 атомами основания, обеспечивая специфическое узнавание аденина. Водородная связь между 2'-ОН

сахара и кислородом карбонила главной цепи Gly34 фиксирует положение сахара в комплексе.

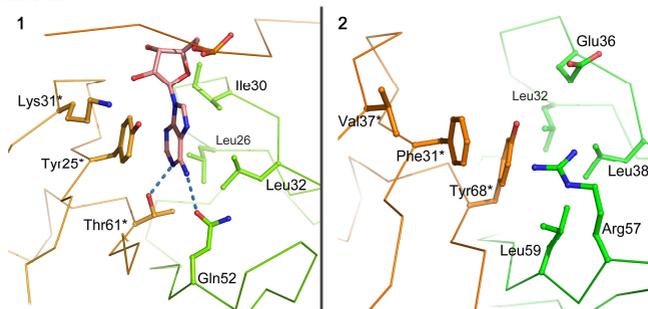
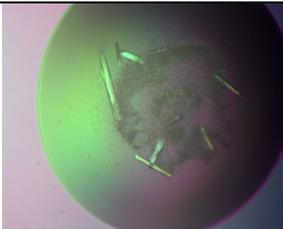


Рис. 9. Сравнение области аденин-связывающего сайта *Eco* Hfq (1, PDB 3GIB) и соответствующей области *Mja* SmAP (2, PDB 4X9C).

Аналог аденин-связывающий сайта в белке *Mja* SmAP значительно изменен. Замены Ile30/Glu36, Gln52/Leu59 и Thr61/Tyr68 должны привести к потере способности связывать основания из-за отсутствия полярных оснований, которые могут взаимодействовать с нуклеотидом. Более того, боковая цепь Tyr68, положение которой стабилизировано водородной связью с азотом боковой цепи Arg57, располагается в области расположения аденина в комплексе *Eco* Hfq с поли(А) РНК, что должно стерически мешать связыванию.

Мы предположили, что замена Tyr68Thr в белке *Mja*SmAP может несколько повысить сродство белка к аденину и привести к его связыванию. Генетическая конструкция, несущая ген с заменой Y68T получена путем сайт-направленного мутагенеза. Нуклеотидные последовательности клонированного гена были проверены путем секвенирования. Белок нарабатывали и очищали по той же схеме, что и белок дикого типа. Кристаллы белка получены в условиях В2 коммерческого набора Nuc Pro2 с помощью метода диффузии паров в висящей капле (табл. 7).

Таблица 7. Характеристика кристаллов белка *Mja* SmAP Tyr68Thr

Фотография кристалла	Условия кристаллизации	Параметры
	Противораствор: 32% ПЭГ4000, 100 мМ Трис-НСl, рН 8.5, 5% глицерин. Криопротекторный раствор: 25.5% ПЭГ4000, 15% глицерин, 85 мМ Трис-НСl, рН 8.5, 170 мМ LiSO4	Пространственная группа P 1 2 ₁ 1 Параметры ячейки: a=60.64 Å; b=67.64 Å; c=91.17 Å; α=γ=90.00°; β=90.95°; PDB код 5DY9 Предел разрешения 1.6 Å

Пространственная группа кристалла оказалась P 1 2₁ 1 с двумя гексамерами в асимметричной части ячейки. Структура белка была определена с разрешением 1.6 Å и оказалась идентична структуре белка дикого типа за исключением замены Tyr68Thr. Для получения комплекса с АМФ кристаллы белка

инкубировали в криорастворе, содержащем 24 мМ АМФ, в течение нескольких часов. Наличие АМФ определяли по картам электронной плотности. После трех часов инкубации ни одна молекула АМФ не связалась, а после 9 часов была идентифицирована одна молекула АМФ в центральной поре одного из гексамеров белка (рис. 10). Аналогичное положение аденина в уридин-связывающем сайте ранее было обнаружено в структурах комплексов AU₅G-Sau Hfq (Schumacher *et al.*, 2002) и ADPNP-Pae Hfq (Murina *et al.*, 2013).

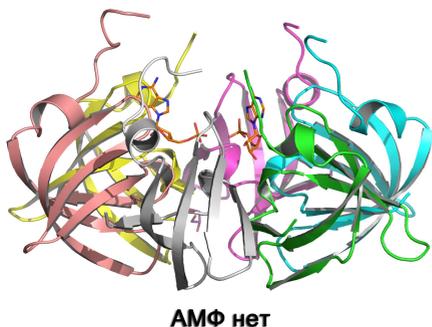


Рис. 10. Структура одного из двух гексамеров белка Mja SmAP Tyr68Thr в комплексе с АМФ в уридин-связывающем сайте белка.

При уточнении структуры были найдены еще две молекулы АМФ в аналогичном участке белка. Все описанные молекулы АМФ имеют очень небольшой коэффициент замещения, то есть, встречаются не во всех молекулах белка кристалла. Мы не можем утверждать, что Mja SmAP связывает АМФ в уридин-связывающем сайте функционально, поскольку такой комплекс был получен в присутствии очень высокой концентрации АМФ. Несмотря на жесткие условия, ни одна молекула АМФ не была обнаружена в предполагаемом аденин-связывающем сайте мутантной формы белка, поэтому мы можем утверждать, что замена Tyr68Thr не повлияла на связывание АМФ белком Mja SmAP.

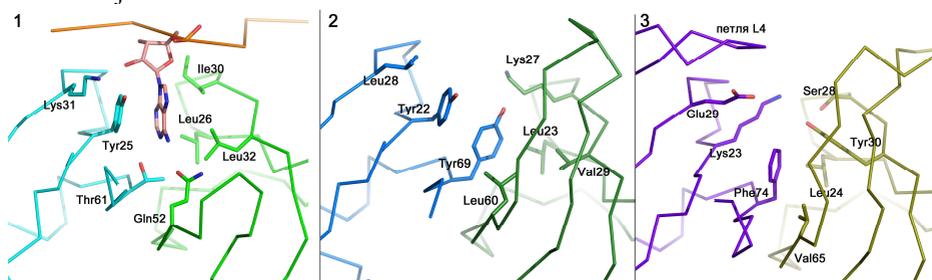


Рис. 11. Сравнение пространственных структур области аденин-связывающего участка белка Eco Hfq в комплексе с олиго(A) РНК (PDB 3GIB) (1) и соответствующих участков в Mva SmAP (2, PDB 5MKL) и Sso SmAP2 (3, PDB 4XQ3). Соседние цепи белка показаны синим и зеленым. В структуре Eco Hfq с олиго(A) РНК цепь РНК показана оранжевым, розовым показан один из аденинов. В структуре Sso SmAP2 показана петля L4, направленная в сторону рассматриваемого участка белка.

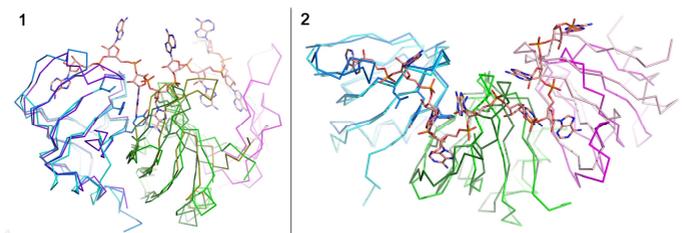


Рис. 12 Наложение структуры Mva SmAP на структуру комплекса Eco Hfq – олиго(A) РНК. 1) Вид с торца гексамера. 2) Вид сверху. Показаны три соседних мономера белка: для Eco Hfq – голубым, зеленым и розовым, для Mva SmAP – синим, темнозеленым и малиновым.

Попытки получить комплексы других SmAP белков с АМФ также не увенчались успехом. Сравнение структур SmAP белков и комплекса Eco Hfq с олиго(A) РНК показало, что область аденин-связывающего сайта у исследуемых белков значительно изменена. Замены Ile30/Ser28, Gln52/Val65, Thr61/Phe74 в белке Mva SmAP привели к неспособности формирования специфических взаимодействий с основанием нуклеотида (рис. 11). Область аденин-связывающего сайта у Sso SmAP2 и Sac SmAP также претерпела значительные изменения аминокислотного состава. Дополнительным стерическим препятствием является длинная петля L4, характерная для большинства SmAP белков. Она прикрывает поверхность гептамера белка со стороны дистальной поверхности и не позволяет подойти к ней РНК или рибонуклеотиду (рис. 12).

4 Анализ взаимодействия исследуемых белков семейства Lsm с аденозинмонофосфатом, меченым флуорофором МАНТ

Измерение сродства АМФ к исследуемым белкам позволило нам дополнить полученные структурные данные и проверить предполагаемые заключения. Мы использовали метод определения константы диссоциации по измерению анизотропии флуоресценции АМФ-МАНТ при титровании его исследуемым белком. В этом нуклеotide к АМФ присоединена флуоресцирующая N-метилантраноильная группа через 2'- или 3'- кислород рибозы. Для проведения эксперимента использованы раствор нуклеотида с концентрацией 10^{-6} М и несколько образцов растворов белков Mva SmAP, Sac SmAP, Sso SmAP2, Mja SmAP и его мутантная форма Y68T Mja SmAP, с максимальной концентрацией 10^{-3} М. В качестве положительного контроля использовали белок Eco Hfq. В качестве отрицательного контроля использовался положительно заряженный лизоцим, потенциально способный связывать отрицательно заряженный АМФ.

Полученные данные (рис. 12, 13 и таблица 8) позволили подтвердить наши предположения. Белок Mja SmAP имеет на порядок меньшее сродство к АМФ, чем Hfq, что приводит к неспособности белка формировать стабильный комплекс в условиях кристаллизации. Y68T Mja SmAP имеет такое же низкое сродство к АМФ, что и белок дикого типа, что полностью согласуется с

полученными структурными данными и подтверждает наше предположение о том, что данная замена не влияет на сродство Mja SmAP к АМФ. Остальные SmAP показали еще меньшее сродство к АМФ-МАНТ, близкое к значению величины K_D для лизоцима, который не может иметь специфическое сродство к рибонуклеотидам. Полученные данные подтверждают наши предположения, что значительное изменение структуры РНК-связывающей области архейных белков, соответствующей поли(А) РНК связывающей области Hfq, подавляет специфическое узнавание АМФ и поли(А) РНК.

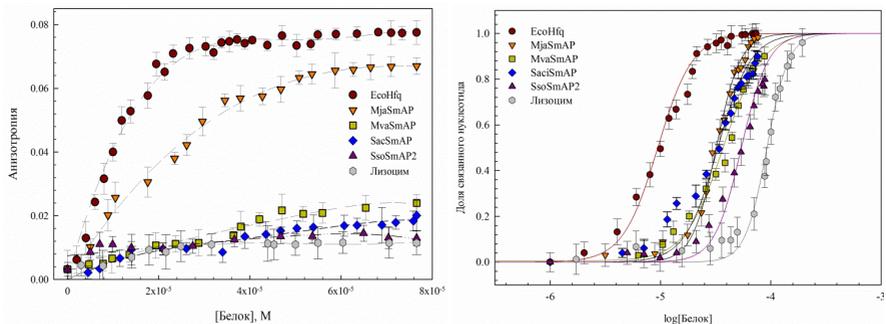


Рис. 12. Кривые титрования раствора АМФ-МАНТ исследуемыми белками (слева). Доля связанного нуклеотида в зависимости от логарифма концентрации белка для АМФ-МАНТ при связывании с EcoHfq, Mja SmAP, Mva SmAP, Sac SmAP, Sso SmAP2 и лизоцимом (справа).

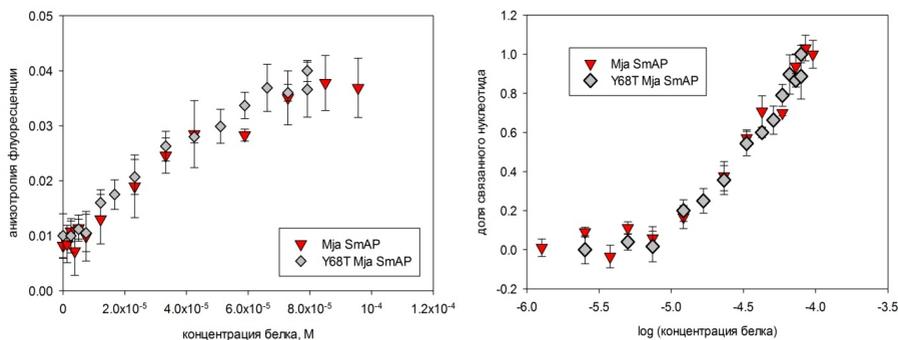


Рис. 13. Сравнение кривых титрования раствора АМФ-МАНТ белком Mja SmAP дикого типа и с заменой Y68T (слева). Доля связанного нуклеотида в зависимости от логарифма концентрации белка для АМФ-МАНТ при связывании с Mja SmAP и Mja SmAP Y68T (справа).

Таблица 8. Значения равновесных констант диссоциации (K_D), вычисленные для комплексов белков с АМФ-МАНТ по изменению анизотропии флуоресценции

Белок	K_D , мкМ
Eco Hfq	$4 \pm 0,2$
Mja SmAP	30 ± 4
Mja SmAP Y68T	32 ± 5
Mva SmAP	60 ± 4
Sac SmAP	80 ± 4
Sso SmAP2	90 ± 7
Лизоцим	>100

5. Определение сродства исследуемых белков к олиго(Y) и олиго(A) РНК методом поверхностного плазмонного резонанса

Чтобы оценить сродство исследуемых белков к последовательностям РНК, мы использовали метод поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Последовательности олигорибонуклеотидов соответствовали использованным ранее в экспериментах с Eco Hfq (Panja *et al.*, 2013) для последующего соотнесения получаемых результатов с уже имеющимися.

Важным для проведения экспериментов оказался состав буфера, а именно содержание NaCl и MgCl₂. Поскольку архейные белки, а особенно Mja SmAP, имеют склонность к агрегации при низкой концентрации соли, мы использовали буфер, содержащий 350 мМ NaCl. Однако при такой концентрации соли сродство белков к РНК значительно уменьшается, поэтому мы увеличили концентрацию хлорида магния до 10 мМ. Ранее было показано, что увеличение концентрации MgCl₂ увеличивает сродство белков Hfq к РНК (Kovach *et al.*, 2014). Это позволило получить нам хорошо интерпретируемые экспериментальные данные. Они были обработаны с помощью программы BIAevaluation, в качестве теоретической модели использовали модель взаимодействия Лангмюра (1:1). Полученные кинетические константы представлены в таблице 9.

Таблица 9. Результаты кинетического анализа взаимодействия белков семейства Lsm с РНК

Белки	Равновесная константа диссоциации, K_D (нМ)	
	V_6 -РНК	A_{18} -РНК
Eco Hfq	$0,05 \pm 0,01$	$0,096 \pm 0,004$
Paе Hfq	17 ± 2	$1,0 \pm 0,3$
Mja SmAP	$0,03 \pm 0,01$	$0,7 \pm 0,4$
Mja SmAP Y68T	$0,02 \pm 0,01$	$0,9 \pm 0,2$
$\Delta 15$ -MjaSmAP	$0,2 \pm 0,1$	900 ± 60
Mva SmAP	$0,03 \pm 0,005$	530 ± 70
Sac SmAP	$2,3 \pm 0,9$	380 ± 40
Sso SmAP2	$7,7 \pm 1,2$	400 ± 50

V_6 -РНК: 5' - (биотин) - GUGGUCAGUCGAGUGG (**U**)₆ -3'

A_{18} -РНК: 5' - (биотин) - GUGGUCAGUCGAGUGG (**A**)₁₈ -3'

Анализ полученных результатов показал, что большинство архейных белков SmAP имеют сравнимое или даже несколько большее сродство к U_6 -РНК, чем бактериальные Hfq. Исключением являются белки кренархей, которые имеют меньшее сродство к олиго(У) РНК. Эти результаты хорошо согласуются с нашим анализом структур уридин-связывающего сайта в SmAP белках.

К A_{18} -РНК белки Mva SmAP, Sac SmAP и Sso SmAP2 имеют значительно меньшее сродство как относительно U_6 -РНК, так и по сравнению с бактериальными Hfq. Разница в 1000-10000 раз показывает, что они связывают олиго(А) последовательность РНК очень слабо либо неспецифически. Эти результаты находятся в полном согласии с нашими данными по определению сродства АМФ-МАНТ к SmAP.

Неожиданным для нас оказалось, что Mja SmAP имеет намного более низкую константу диссоциации A_{18} -РНК среди остальных исследуемых SmAP, примерно равную белку Hfq. Мы предположили, что на сродство к РНК может влиять длинный положительно заряженный N-конец Mja SmAP, который отсутствует в других нами исследуемых SmAP белках. Нами была получена мутантная форма белка с делецией первых 15 N-концевых аминокислотных остатков. Проведенные с ним измерения показали, что удаление 15 остатков приводит к десятикратному падению сродства к U_6 -РНК и к 1000-кратному падению сродства к A_{18} -РНК по сравнению с белком дикого типа. В результате сродство $\Delta 15$ -MjaSmAP к A_{18} -РНК становится сравнимым с другими SmAP белками. Таким образом, мы подтвердили, что высокое сродство Mja SmAP к олиго(А) РНК имеет неспецифический характер и обусловлено взаимодействием сахарофосфатного остова РНК с положительно заряженным N-концом белка.

6. Анализ «РНК-шаперонной» активности исследуемых SmAP

Бактериальные белки Hfq реализуют свои функции, разрушая («расплавляя») вторичную структуру РНК и способствуя взаимодействию двух разных молекул РНК. Мы проверили способность архейных белков SmAP плавить вторичную структуру РНК с использованием ранее примененного для исследования РНК-шаперонной активности белка Hfq метода с использованием «молекулярного маяка» (Hopkins *et al.*, 2009). Такой «маяк» представляет собой короткую шпильчатую РНК, на одном конце которой расположен флуорофор, а на противоположном – гаситель флуоресценции. В обычной, двухцепочечной форме, 5' и 3' концы молекулярного маяка сближены и происходит гашение флуоресценции, а при взаимодействии его с комплементарной РНК или белком – РНК-шапероном шпилька разворачивается и флуоресценция появляется. При изучении РНК-шаперонных свойств Eso Hfq было показано, что белок ускоряет отжиг молекулярного маяка к комплементарной РНК в 100 раз (Hopkins *et al.*, 2009). Для наших экспериментов мы взяли последовательности, которые были использованы ранее в работе (Panja *et al.*, 2013) – химически синтезированные U_6 -РНК и молекулярный маяк, петля которого комплементарна участкам этих РНК.

Первоначально было проверено взаимодействие молекулярного маяка с U_6 -РНК при постепенном повышении концентрации последней. На рис. 14 видно, что добавление U_6 -РНК повышает уровень флуоресценции заметно только при большом избытке. Добавление Eco Hfq к молекулярному маяку не повышает флуоресценцию (рис. 14), то есть белок без добавления комплементарной РНК не разрушает вторичную структуру «маяка». Однако добавление SmAP белков из *M. jannaschii*, *M. vannielii* и *S. acidocaldarius* к молекулярному маяку вызывает заметный эффект. При соотношении РНК/белок больше 1:10 происходит значительное увеличение флуоресценции, что демонстрирует способности этих белков плавить вторичную структуру шпильки молекулярного маяка без добавления одноцепочечной РНК. Важно отметить, что $\Delta 15$ -MjaSmAP не способен плавить молекулярный маяк даже при соотношении 100:1.

Следующим шагом стала проверка способности SmAP белков способствовать взаимодействию молекулярного маяка и комплементарной РНК (рис. 15). К 100 нМ молекулярного маяка сначала добавляли белок, а затем эквивалентное ему количество U_6 -РНК. В контрольном эксперименте белок не добавляли. При добавлении к молекулярному маяку белка Eco Hfq в 20-кратном избытке увеличения флуоресценции не наблюдается, а после добавления U_6 -РНК происходит значительное увеличение флуоресценции. Это полностью согласуется с литературными данными (Panja *et al.*, 2013): Eco Hfq не взаимодействует с молекулярным маяком, но способствует формированию дуплекса маяк - комплементарная РНК. При добавлении к молекулярному маяку белков Mva SmAP или Sac SmAP при незначительном избытке белка происходит увеличение флуоресценции, которая увеличивается при добавлении U_6 -РНК. Неожиданные результаты были получены опять-таки для белка из *M. jannaschii* (рис. 15.3) На графике видно, что при добавлении белка к молекулярному маяку происходит увеличение флуоресценции, как и для других SmAP. Добавление U_6 -РНК приводит к резкому падению флуоресценции. Мы предполагаем, что этот эффект можно объяснить большим сродством белка к U_6 -РНК по сравнению с РНК-молекулярным маяком. Тогда добавление U_6 -РНК вытесняет РНК-маяк из комплекса с Mja SmAP, происходит «схлопывание» маяка, что приводит к гашению флуоресценции и уменьшению её интенсивности. Определяющую роль в этом процессе играет положительно заряженная N-концевая последовательность Mja SmAP, поскольку её удаление подавляет описанный эффект (рис. 15.4).

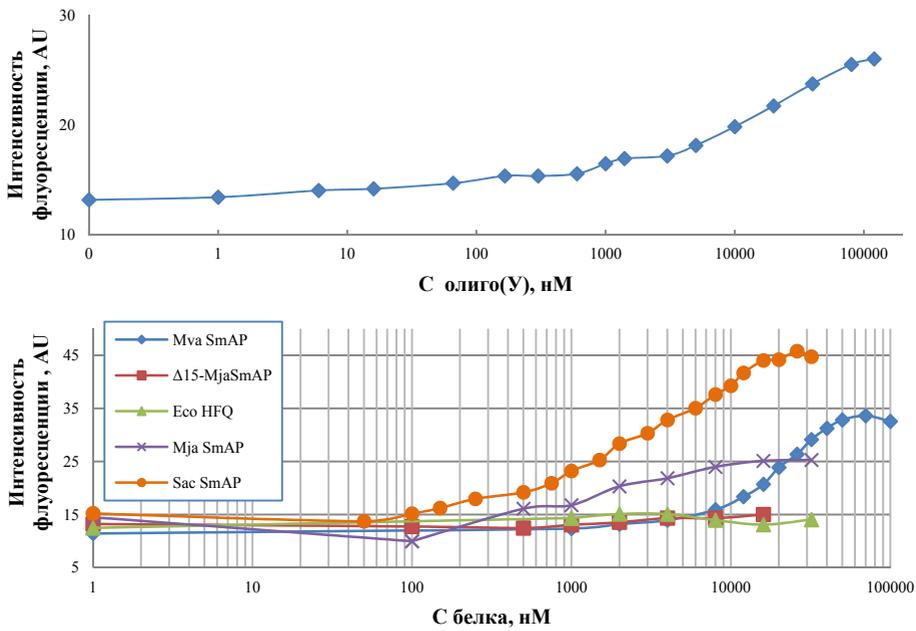


Рис. 14 Кривая титрования раствора 200 нМ «молекулярного маяка» раствором U_6 -РНК (сверху) и кривые титрования раствора «молекулярного маяка» исследуемыми белками семейства Lsm (снизу). Концентрация «молекулярного маяка» составляет 100 нМ.

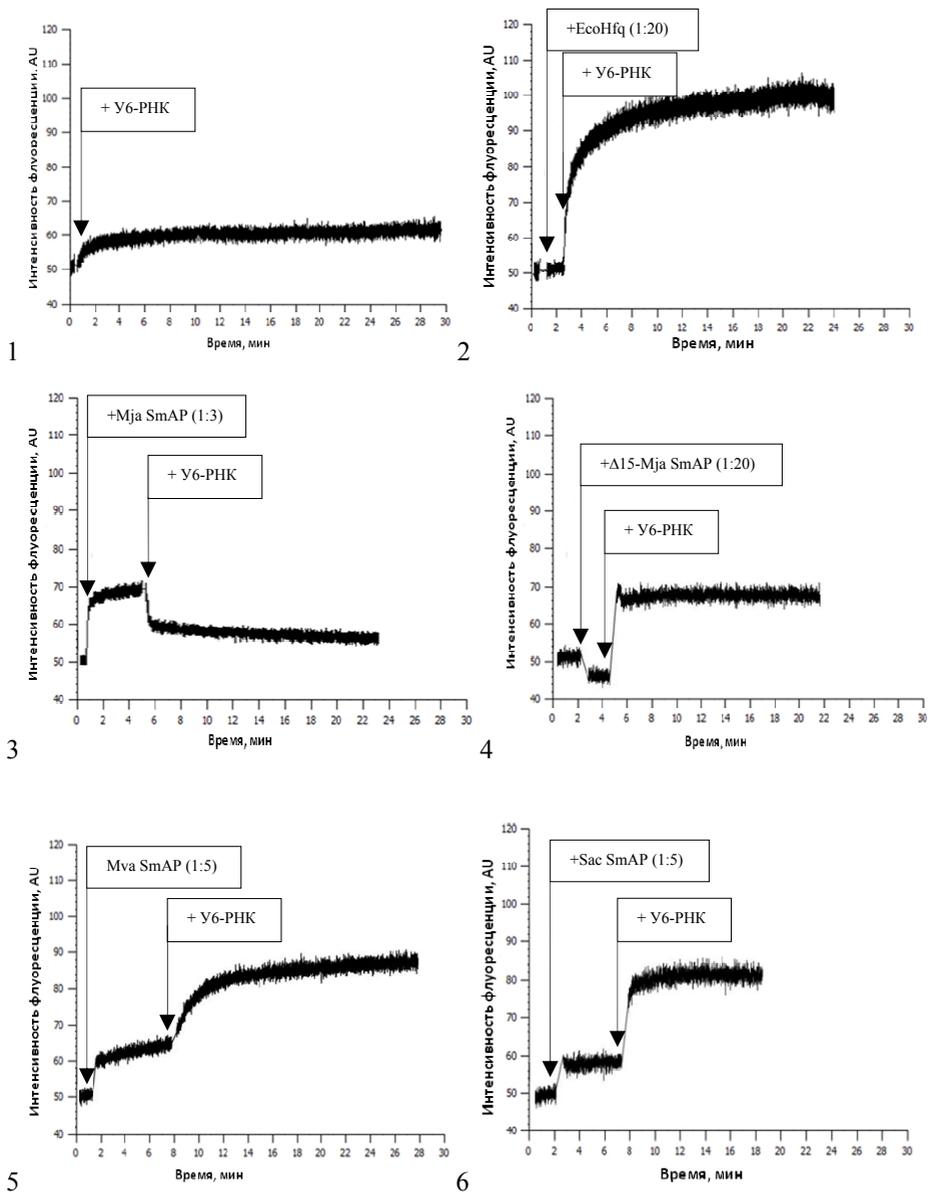


Рис. 15 Кривые изменения флуоресценции молекулярного маяка при взаимодействии с РНК в отсутствии (1) и присутствии белков Eco Hfq (2), Mja SmAP (3), $\Delta 15$ -Mja SmAP (4), Mva SmAP (5) и Sac SmAP (6).

ВЫВОДЫ

- Структура уридин-связывающего сайта архейных белков SmAP консервативна, гомологична бактериальным и эукариотическим белкам; белки способны связывать УМФ и олиго(У) РНК.
- Изменения аминокислотных последовательностей и пространственных структур архейных белков в области, эквивалентной аденин-связывающему сайту бактериального белка Hfq, привели к подавлению связывания АМФ и олиго(А) РНК.
- Положительно заряженная N-концевая последовательность белка Mja SmAP обладает неспецифическим сродством к РНК.
- Архейные белки SmAP, в отличие от бактериальных белков Hfq, способны плавить вторичную структуру РНК в отсутствии комплементарных РНК.
- Архейные белки SmAP имеют большее, чем бактериальные белки Hfq, сродство к поли(У) РНК, но не способны специфически взаимодействовать с поли(А) РНК.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК

1. Hfq binds ribonucleotides in three different RNA-binding sites / V. N. Murina, **N.V. Lekontseva**, A.D. Nikulin // *Acta Crystallographica Section D*. – 2013. – V. 69, № 8. – 1504-1513.
2. Supramolecular organization of Hfq-like proteins / V. N. Murina, O. M. Selivanova, A. O. Mikhaylina, A. S. Kazakov, E. Yu. Nikonova, **N. V. Lekontseva**, S. V. Tishchenko, A. D. Nikulin // *Biochemistry (Moscow)* – 2015. – V. 80, № 4. – 441-448.
- Надмолекулярная организация фибрилл Hfq-подобных белков / В.Н. Мурина, О.М. Селиванова, А.О. Михайлина, А.С. Казаков, Е.Ю. Никонова, **Н.В. Леконцева**, С.В. Тищенко, А.Д. Никулин // *Биохимия* – 2015. Т. 80, № 4. – 517-526.
3. Characterization of RNA-binding properties of the archaeal Hfq-like protein from *Methanococcus jannaschii* / A. Nikulin, A. Mikhailina, **N. Lekontseva**, V. Balobanov, E. Nikonova, S. Tishchenko // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* – 2016. – V. 1. – 1-14.
4. An experimental tool to estimate the probability of a nucleotide presence in the crystal structures of the nucleotide-protein complexes / M. Nemchinova, V. Balobanov, E. Nikonova, **N. Lekontseva**, A. Mikhaylina, S. Tishchenko, A. Nikulin // *Protein Journal* – 2017. – V. 36. – 157-165.

Тезисы международных и всероссийских конференций

1. Nikulin A.D., **Lekontseva N.V.**, Murina V. N., Nikonova E. Yu., Mikhaylina A. O., Tishchenko S. V. Application structures of nucleotide-protein complexes to study RNA recognition by bacterial and archaeal Lsm proteins. // 29th European Crystallographic meeting, Rovinj, Croatia. 2015. Acta Crystallogr. Section A: Foundations and Advances, V.71 (s), 245.
2. **Lekontseva N.V.**, Murina V. N., Nikonova E. Yu., Selivanova O. M., Tishchenko S. V., Nikulin A. D. Investigation of RNA-binding properties and oligomerization behavior of Sm-like archaeal proteins. // 40th FEBS Congress “The Biochemical Basis of Life”. Berlin, Germany. 2015. FEBS J., V. 282 (s), 341.
3. **Леконцева Н.В.**, Никонова Е.Ю., Мурина В.Н., Михайлина А.О., Тищенко С.В., Никулин А.Д. Исследование нуклеотид- и РНК связывающих свойств архейных Sm-подобных белков. // VII Российский симпозиум «Белки и пептиды», Новосибирск, Россия, 12 – 17 июля 2015, с. 301.
4. **Леконцева Н.В.**, Михайлина А.О., Никонова Е.Ю., Тищенко С.В., Никулин А.Д. Изучение нуклеотид- и РНК-связывающих свойств архейных Sm-подобных белков из *Methanococcus vannielii* и *Sulfolobus acidocaldarius*. // XXVIII зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, Россия, 8 – 11 февраля 2016, с. 55.
5. **Леконцева Н.В.**, Михайлина А.О., Никонова Е.Ю., Тищенко С.В., Никулин А.Д. Структурно-функциональные исследования нуклеотид-связывающих

свойств Sm-подобного белка из археи *Methanococcus vannielii*. XVII зимняя молодежная школа по биофизике и молекулярной биологии, Гатчина, Россия, 29 февраля – 5 марта 2016, с. 74.

6. **Lekontseva N.**, Mikhailina A., Balobanov V., Nemchinova M., Tishchenko S., Nikulin A. Structural studies of RNA-binding properties of archaeal Lsm proteins from *Methanococcus vannielii* and *Sulfolobus acidocaldarius*. //16th International Conference on the Crystallization of Biological Macromolecules, Prague, Czech Republic. 2016. Materials structure in chemistry, biology, physics and technology, 23 (2): 127.

7. А.Д. Никулин, **Н.В. Леконцева**, А.О. Михайлина, Е.Ю. Никонова, О.В. Кравченко, В.А. Балобанов, С.В. Тищенко. Структурные и функциональные исследования РНК-связывающих Sm-подобных белков: от бактериальных Hfq к архейным SmAP. // V Съезд Биохимиков России, Дагомыс, Россия, 4-8 октября 2016.

8. Никулин А.Д., **Леконцева Н. В.**, Михайлина А.О., Никонова Е.Ю., Кравченко О.В., Балобанов В.А., Немчинова М.С., С.В. Тищенко. Использование структур нуклеотид-белковых комплексов для исследования РНК-белковых взаимодействий. // Первый Российский кристаллографический конгресс, Москва, Россия, 21-25 ноября 2016,

9. **Леконцева Н.В.**, Михайлина А.О., Балобанов В.А., Никулин А.Д. Исследование РНК-связывающих свойств нативной и мутантной форм белка SmAP из археи *Sulfolobus acidocaldarius*. // XXI Международная школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пущино, Россия, 17 – 21 апреля 2017, с. 110.

10. **Н.В. Леконцева**, А.Д. Никулин. Использование источников синхротронного излучения ESRF для улучшения разрешения дифракционных данных с кристаллов белков. // Совещание пользователей Курчатовского комплекса синхротронно-нейтронных исследований, Москва, Россия, 20-23 ноября 2017 г., с. 117.