

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ
ИНСТИТУТ БЕЛКА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Леконцева Наталья Владимировна

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

03. 01. 03 – молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат химических наук,
А.Д. Никулин

Москва – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

УСЛОВНЫЕ СОКРАЩЕНИЯ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ЧАСТЬ I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
Глава I. Семейство белков Lsm	9
Глава II. Структурная организация белков Lsm	11
Глава III. Функциональная роль белков семейства Lsm	18
3.1 Функции эукариотических белков Sm/Lsm	18
3.2 Функции бактериальных белков Hfq	27
3.3 Функции архейных представителей семейства Lsm	40
3.4 Существующие гипотезы по функционированию архейных белков SmAP	49
ЧАСТЬ II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	52
Глава I. Материалы и приборы	52
1.1. Химические реактивы и ферменты	52
1.2. Бактериальные штаммы и плазмиды	53
1.3. Приборы	53
Глава II. Методы генной инженерии и микробиологии	54
2.1. Подимеразная цепная реакция для получения генов белков SmAP из <i>Methanococcus jannaschii</i> , <i>Methanococcus vannielii</i> , <i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	54
2.2. Метод сайт-направленного мутагенеза последовательности ДНК	55
2.3. Электрофорез ДНК в агарозном геле	56
2.4. Очистка фрагментов ДНК	57
2.4. Обработка ДНК сайт-специфическими эндонуклеазами рестрикции	57
2.5. Лигирование фрагментов ДНК	57
2.6. Получение компетентных клеток <i>E. coli</i> с использованием хлорида кальция	58
2.7. Трансформация клеток <i>E. coli</i> с помощью метода теплового шока	58
2.8. Экспрессия генов SmAP из <i>Methanococcus jannaschii</i> , <i>Methanococcus vannielii</i> , <i>Sulfolobus solfataricus</i> и <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> в клетках <i>E. coli</i>	58
Глава III. Биохимические методы при работе с белками	59
3.1. Выделение и очистка белка SmAP из <i>M. jannaschii</i> и его мутантных форм из клеток штаммов-суперпродуцентов <i>E. coli</i>	59
3.2. Выделение и очистка белка SmAP из <i>M. vannielii</i> из клеток штаммов-суперпродуцентов <i>E. coli</i>	60
3.3. Выделение и очистка белков SmAP из <i>S. solfataricus</i> и <i>S. acidocaldarius</i> из клеток штаммов-суперпродуцентов <i>E. coli</i>	61

3.4. Спектрофотометрическое определение концентрации белков и нуклеиновых кислот	63
3.5. Электрофоретический анализ белков в ПААГ в присутствии ДСН	64
3.6. Кристаллизация исследуемых белков и их комплексов с рибонуклеотидмонофосфатами	64
Глава IV. Биохимические методы при работе с РНК и нуклеотидами	65
4.1. Используемые фрагменты РНК	65
4.2. Электрофорез РНК в ПААГ в денатурирующих условиях	66
4.3. Определение сродства исследуемых белков к одиночным нуклеотидмонофосфатам по изменению флуоресцентной анизотропии	66
Глава V. Биохимические методы работы с РНК-белковыми комплексами	67
5.1. Анализ сродства исследуемых белков к РНК методом поверхностного плазмонного резонанса	67
5.2. Анализ взаимодействий исследуемых белков с «молекулярным маяком»	68
ЧАСТЬ III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	71
Глава I. Получение и кристаллизация архейных белков семейства Lsm	71
1.1. Выделение и кристаллизация белка SmAP из <i>Methanococcus jannaschii</i> и его мутантных форм, а также комплексов с рибонуклеотидмонофосфатами	71
1.2. Выделение и кристаллизация белка SmAP из <i>Methanococcus vannielii</i> и его комплексов с рибонуклеотидмонофосфатами	75
1.3. Выделение и кристаллизация белков SmAP и их комплексов с рибонуклеотидмонофосфатами из кренархей рода <i>Sulfolobus</i>	79
Глава II. Сравнение уридин-связывающих сайтов бактериальных и архейных белков семейства Lsm	83
Глава III. Сравнение и анализ областей аденин-связывающих сайтов бактериальных и архейных белков семейства Lsm	89
Глава IV. Анализ взаимодействия исследуемых белков семейства Lsm с аденозинмонофосфатом, меченым флуорофором МАНТ	94
Глава V. Определение сродства исследуемых белков к олиго(У) и олиго(А) РНК методом поверхностного плазмонного резонанса	97
Глава VI. Анализ «РНК-шаперонной» активности исследуемых SmAP	101
Глава VII. Перспективы	106
ВЫВОДЫ	107
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	108
БЛАГОДАРНОСТИ	123

УСЛОВНЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

- а.о. – аминокислотные остатки
- БФС – бромфеноловый синий
- БСА – бычий сывороточный альбумин
- ДМСО – диметилсульфоксид
- ДСН – додецилсульфат натрия
- ДТТ – дитиотрейтол
- ИПТГ – изопропил- β -D-тиогалактозид
- мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
- мрРНК – малая регуляторная РНК
- мяРНК – малая ядерная рибонуклеиновая кислота
- мяРНП – малый ядерный рибонуклеопротеид
- мякРНК – малая ядрышковая РНК
- ПААГ – полиакриламидный гель
- ПСА – персульфат аммония
- ПЭГ (PEG) - полиэтиленгликоль
- рРНК – рибосомная рибонуклеиновая кислота
- ТЕМЕД – N,N,N',N' - тетраметилэтилендиамин
- Трис (tris) – трис(гидроксиметил)аминометан
- ЭДТА – этилендиаминтетраацетат
- E. coli (Eco) – Escherichia coli*
- HEPES – N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота
- M.jannaschii (Mja) – Methanococcus jannaschii*
- M. vanniellii (Mva) – Methanococcus vanniellii*
- P. aeruginosa (Pae) – Pseudomonas aeruginosa*
- РМСФ – фенилметансульфонилфторид
- S. solfataricus (Sso) – Sulfolobus solfataricus*
- S acidocaldarius (Sac) – Sulfolobus acidocaldarius*

ВВЕДЕНИЕ

Белки семейства Lsm представлены во всех трех доменах жизни. Это небольшие белки – длиной порядка 80-100 аминокислотных остатков. Принадлежность к данному семейству белков определяется наличием структурного Sm фолда, состоящего из пятитяжевого β -листа и α -спирали на N-конце. Все представители этого семейства формируют стабильную четвертичную структуру в виде тороидальных колец с числом мономеров белка 6 или 7, причем бактериальные белки этого семейства, называемые Hfq, образуют только гексамеры, а архейные и эукариотические – гептамеры. Сравнение аминокислотных последовательностей белков позволяет выделить среди них два консервативных аминокислотных участка называемых Sm1 и Sm2, причем последовательность Sm2 мотива строго консервативна среди белков, принадлежащих одному домену жизни, но консенсус у бактериальных белков отличается от такового для архейных/эукариотических белков.

Несмотря на структурную консервативность, функции белков в бактериях и эукариотах отличаются. Бактериальный белок Hfq является глобальным регулятором экспрессии многих генов, способствуя взаимодействию с мРНК малых регуляторных РНК. У эукариот белки семейства Lsm участвуют в формировании сплайсосомы и декэпировании мРНК. В отличие от них функции архейных представителей семейства (Sm-подобные архейные белки или SmAP) изучены весьма слабо, имеются лишь отдельные сведения об их участии в процессинге ряда РНК.

Цель данной работы – исследовать влияние структурных особенностей архейных белков SmAP на специфичность их взаимодействия с РНК, что может прояснить их возможную роль в клетках архей. Для исследования были выбраны по два белка эуархей рода *Methanococcus* и кренархей рода *Sulfolobus*. Белки из *Sulfolobus solfataricus* и *Sulfolobus acidocaldarius*, а также белок из *Methanococcus vanniellii* 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.

В рамках работы были поставлены следующие задачи:

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

Научная новизна и практическая ценность исследования.

В ходе работы впервые определены структуры белков SmAP 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 белками SmAP, а сравнение полученных нами структур с ранее определенными структурами гомологичных бактериальных и архейных белков позволило продемонстрировать различия в их взаимодействиях.

Проведенные нами 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 белков 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. Нами показано, что белки SmAP связывают олиго(У) РНК с несколько большим сродством, чем бактериальные белки Hfq, а величины констант диссоциации SmAP-олиго(А) РНК близки к неспецифическим. Исключением является SmAP из *M. jannaschii*, однако нами показано, что этот эффект объясняется наличием неупорядоченного положительно заряженного N-конца, неспецифически связывающего РНК.

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

Полученные нами данные показывают, что белки SmAP имеют большее сродство к поли(У) РНК, чем бактериальные белки Hfq, но в отличие от них не способны специфически связывать поли(А) РНК. Это позволяет исключить возможность участия белков SmAP 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 генной 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 резонанса плазмонов. 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 белка Hfq.
- Архейные белки SmAP способны плавить вторичную структуру целевой РНК независимо от присутствия комплементарной ей РНК.

Личный вклад соискателя состоит в выполнении всех этапов работы, а именно: осуществление генно-инженерных экспериментов, получение 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 проведённых на современном научном оборудовании экспериментов. Точность полученных структур оценена статистически и соответствует стандартным стереохимическим параметрам.

Апробация работы и публикации. Материалы диссертации представлены в 4 статьях ведущих научных журналов и 10 материалах международных и российских съездов и конференций. Структуры, полученные в ходе выполнения работы, депонированы в банк данных PDB (4X9C, 4X9D, 5MKI, 5MKL, 5MKN, 5DY9, 6FVD).

ЧАСТЬ I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Глава I. Семейство белков Lsm

Sm и Sm-подобные (Lsm) белки принадлежат к большому семейству белков, которые участвуют в метаболизме РНК. Представители данного семейства обнаружены во всех трех доменах жизни: бактериях, археях и эукариотах. Все они содержат Sm домен, состоящий из двух консервативных мотивов Sm1 и Sm2, разделенных варибельным по длине и аминокислотному составу участком (Mura *et al.*, 2013; Wilusz and Wilusz, 2005).

Эукариотические представители данного семейства были открыты при изучении аутоиммунного заболевания – системной красной волчанки. В ходе болезни человеческий организм вырабатывает антитела против собственных белковых антигенов, которые, как позднее выяснилось, входят в состав сплайсосомы и формируют комплексы с малыми ядерными РНК (Notman *et al.*, 1975). На сегодняшний день в геномах эукариот обнаружено, по крайней мере, 18 различных Sm и Lsm белков, участвующих в спайсинге мРНК, созревании гистонов, деградации мРНК, которые способны образовывать как минимум 6 различных гетерогептамерных комплексов (Thore *et al.*, 2003). Lsm белки формируют два гетерогептамерных комплекса: ядерный Lsm 2-8, ассоциированный с малой ядерной РНК U6, и цитоплазматический Lsm 1-7, участвующий в деградации мРНК (Tharun *et al.*, 2000). Белки, связанные с мРНК U6, стабилизируют ее, связываясь с У-богатым участком на 3'-конце. Дополнительной функцией ядерных белков является участие в процессинге предшественников малых ядрышковых РНК, рРНК, тРНК (Wilusz and Wilusz, 2005).

Бактериальный представитель семейства Lsm – высококонсервативный белок Hfq, обнаруженный во многих геномах (Sun, 2002). Хотя по аминокислотной последовательности Hfq не обладает высокой степенью гомологии с другими представителями семейства, он поразительно схож с

ними по четвертичной структуре и функциям (Møller *et al.*, 2002). Hfq связывает А/У богатые участки РНК в трех сайтах на поверхности образуемого им гексамера (Murina *et al.*, 2013). Он является глобальным регулятором транскрипции и трансляции, а также РНК-шапероном, способствующим взаимодействию малых регуляторных РНК и их целевых мРНК (Wassarman *et al.*, 2001).

Некоторые археи (представитель рода *Pyrococcus* и галофильные археи) кодируют только один ген белка (Lsm1), тогда как другие содержат два гена белков Lsm1 и Lsm2 (Salgado-Garrido *et al.*, 1999). У кренархеот обнаружен дополнительный представитель семейства, белок Lsm3. В этом белке Sm домен соединен с добавочным доменом гибким линкером (Mura *et al.*, 2003). Несмотря на то, что первые структуры архейных Lsm белков были открыты более 15 лет назад, их функции исследованы очень слабо (Collins *et al.*, 2001; Törö *et al.*, 2001). Известно, что архейные Lsm белки связывают уридин-богатые участки малых РНК и тРНК, а также взаимодействуют с рядом белков, участвующих в регуляции трансляции и метаболизме РНК (Мурина и Никулин, 2011; Mura *et al.*, 2013). На сегодняшний день остается открытым вопрос: являются ли они каркасными белками для формирования РНП, как белки эукариот, или же они действуют как шапероны малых регуляторных РНК, подобных бактериальным Hfq (Mura *et al.*, 2013).

Поскольку семейство Lsm белков включает в себя представителей из различных доменов жизни, первоначально открытых независимо друг от друга, то в литературе Lsm белки имеют несколько названий: архейные гомологи называются SmAP, бактериальные исторически называются Hfq, а эукариотические белки, входящие в состав сплайсосомы, называются Sm (Mura *et al.*, 2013). Эукариотические белки, имеющие гомологию с Sm белками, но не входящие в мяРНК, назвали Lsm (Like-Sm) – это цитоплазматический комплекс Lsm1-7 и ядерный комплекс Lsm2-8 (Tharun *et al.*, 2000). Часто встречаются статьи, в которых термин Lsm обозначает только неэукариотические гомологи. Во избежание недоразумений, в

представленной работе будут использоваться названия Sm/Lsm, Hfq и SmAP для обозначения белков эукариот, бактерий и архей соответственно.

Глава II. Структурная организация белков Lsm

Первыми структурами Sm белков, полученными с помощью рентгеноструктурного анализа, были комплексы двух гетеродимеров D1·D2 и D3·B из клеток человека (Kambach *et al.*, 1999). Немногим позже были определены гомогептамерные структуры SmAP из архей *Methanobacterium thermautotrophicum* (Collins *et al.*, 2001), *Pyrobaculum aerophilum* (Mura *et al.*, 2001) и *Archeoglobus fulgidus* (Törö *et al.*, 2001). Вскоре были получены пространственные структуры белков *Staphylococcus aureus* Hfq (Schumacher *et al.*, 2002) и *Pseudomonas aeruginosa* Hfq (Nikulin *et al.*, 2005), которые формируют четвертичную структуру в виде гомогексамера.

У всех белков этого семейства мономеры имеют одинаковую пространственную укладку элементов вторичной структуры (фолд) в виде 5-тяжевого антипараллельного β -листа, как правило, соединенного с N-концевой α -спиралью (рис.1). Она не является необходимой для сохранения структуры мономера и может отсутствовать у представителей семейства. Также, известен пример Sm-белка, формирующий пентамер, у которого α -спираль расположена на C-конце (Mura *et al.*, 2013). При формировании четвертичной структуры белка α -спирали мономеров оказываются по одну сторону мультимера, которую в литературе называют «проксимальной», а противоположную сторону тора - «дистальной» (Mura *et al.*, 2013).

Мономеры белка исключительно многофункциональны: одна часть Sm фолда (Sm2, тяжи β 4 и β 5) поддерживает межсубъединичные контакты, тогда как другая (Sm1, тяжи β 1, β 2 и β 3) участвует в формировании нескольких РНК-связывающих сайтов (сайт связывания одноцепочечных У-богатых РНК, обнаруженный у всех белков; поли(А) РНК-связывающий сайт и боковой РНК-связывающий сайт у белков Hfq) (Mura *et al.*, 2013).

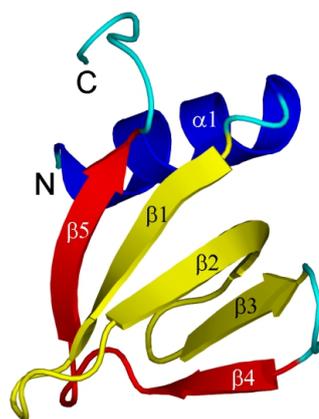


Рис. 1. Ленточная модель укладки мономера представителя белков семейства Lsm. Синим цветом выделена N-концевая α -спираль; мотив Sm1, состоящий из тяжей β 1, β 2 и β 3, выделен желтым цветом; мотив Sm2, состоящий из тяжей β 5 и β 4, выделен красным цветом.

Sm фолд обнаружен как структурный домен во многих мультидоменных белках (Albrecht and Lengauer, 2004). Их можно классифицировать по тому, где находится Sm домен – на N- или C-конце, либо посередине. Изучая мобильные генетические элементы рода *Thermococcus*, Круповик (Krupovic) с соавторами обнаружил «Hfq-подобные гены» в четырех архейных плаزمиде. В трех из них предполагаемый Hfq был соединен с N-концевым мотивом «цинковый палец», что предполагает участие этого белка в связывании ДНК (Krupovic *et al.*, 2013). Данные белки относятся к типу C-концевых Sm доменных белков.

Также «Sm-содержащие гомологи» встречаются в белках, не связанных с метаболизмом РНК и ДНК. Например, Sm домен обнаружен в структуре белка MscS, механочувствительного канала с малой проводимостью (Bass *et al.*, 2002). Этот мембранный белок формирует гомогептамеры, также как SmAP, причем Sm домен является вставкой между N- и C- концевыми участком белка. Белок SmAP3 из *Pyrobaculum aerophilum* является единственным известным белком, в котором Sm домен находится на N-конце (Mura *et al.*, 2003). Этот белок уникален способностью формировать 14-меры в кристаллах и в растворе.

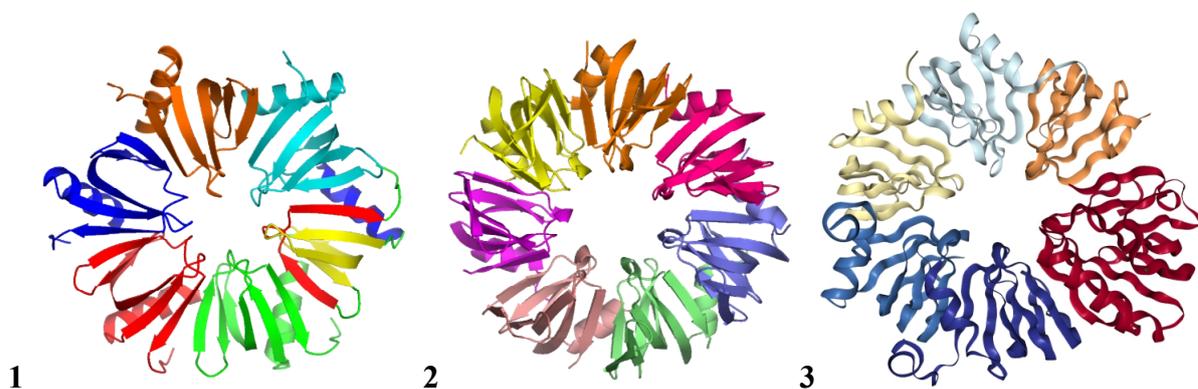


Рис. 2. Пространственные структуры ряда Sm- и Sm-подобных белков. (1) Гомогексамер белка Hfq *P. aeruginosa* (Nikulin *et al.*, 2005), (2) гомогептамер белка Sm1 *Archaeoglobus fulgidus* (Törö *et al.*, 2001), (3) коровый домен U1 малого ядерного рибонуклеопротеида, в его состав входят Sm D3, SmB, Sm D1, Sm D2, Sm F, Sm E, SmG (окраска от голубого до желтого). Малая ядерная РНК U1 не показана. (Weber *et al.*, 2010)

Как показывает анализ структур белков семейства Lsm, практически все представители архейных белков SmAP формируют гомогептамеры, эукариотические гомологи – гетерогептамеры, а белки Hfq – гомогексамеры (рис. 2) (Мурина и Никулин, 2011). Однако встречаются представители с другой степенью олигомеризации. Например, SmAP2 из *Archeoglobus fulgidus* формирует либо гексамеры, либо гептамеры в зависимости от присутствия РНК и изменения рН среды. Гексамеры формируются в кислой среде при отсутствии РНК, а добавление У-богатой РНК приводит к формированию гептамеров (Törö *et al.*, 2002). Кроме того, встречаются тримеры (N-концевой фрагмент белка Lsm4 из *Schizosaccharomyces pombe*) (Wu *et al.*, 2012), пентамеры (Lsm из предполагаемого цианофага) (Das *et al.*, 2009), октамеры (Lsm3 из *S. cerevisiae*) (Naidoo *et al.*, 2008).

Несмотря на структурную консервативность, белки SmAP имеют ряд отличительных признаков (рис. 3). Во-первых, у них отсутствует удлиненный С-конец, который характерен для бактериальных и эукариотических белков. Во-вторых, Sm2-мотив, являющийся частью РНК-связывающего сайта на

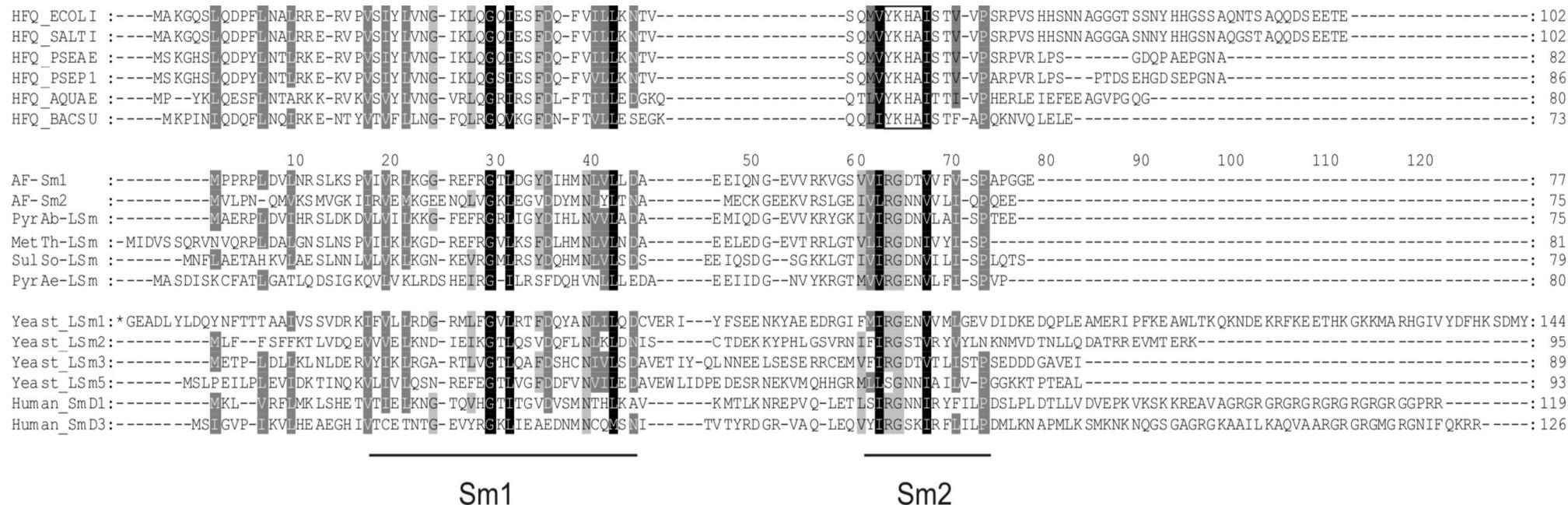


Рис. 3. Сравнение аминокислотных последовательностей архейных SmAP белков с представителями бактериальных белков Hfq и эукариотическими Sm/Lsm белками. Последовательности: бактериальные – *E. coli* (Hfq_ECOLI), *Salmonella typhimurium* (HFQ_SALTY), *P. aeruginosa* (HFQ_PSEAE), *Pseudomonas putida* (HFQ_PSEP1), *Aquifex aeolicus* (HFQ_AQUAE), *Bacillus subtilis* (HFQ_BACSU); архейные – *Archaeoglobus fulgidus* AF-Sm1 и AF-Sm2, *Pyrococcus abyssi* (PyrAb-Lsm), *Methanobacterium thermautotrophicum* (MetTh-Lsm), *Sulfolobus solfataricus* (SulSo-Lsm), *Pyrobaculum aerophilum* (PyrAe-Lsm); эукариотические – ряд Lsm белков из дрожжей (Yeast_Lsm1, Yeast_Lsm2, Yeast_Lsm3, Yeast_Lsm4, Yeast_Lsm5) и ряд Sm белков человека (Human_SmD1, Human_SmD3). Нумерация соответствует последовательности белка AF-Sm1. Аминокислотные остатки, консервативные среди всех приведенных последовательностей, выделены черным цветом, консервативные не менее чем среди 80% белков – темно-серым цветом, не менее чем в половине белков – светло серым. В бактериальных последовательностях прямоугольником выделен консервативный мотив [Y/F]KHA I. Внизу обозначены области консервативных мотивов Sm1 и Sm2 (Мурина и Никулин, 2011, с изменениями).

поверхности дистальной поверхности мультимера, у SmAP, как и эукариотических Sm/Lsm, содержит консенсус RGXX (X – любая заряженная аминокислота), в то время как у бактериальных Hfq этот консенсус – [Y/F]KNAI (Мурина и Никулин, 2011; Weichenrieder, 2014). В-третьих, SmAP характеризуются наличием большой длиной петли L4, соединяющей два мотива – Sm1 и Sm2. Такая длинная петля также характерна для эукариотических Sm белков. Показано, что петли L4 у эукариотических белков SmD2 и SmB, формирующих мяРНК U1, образуют сайт связывания РНК и стабилизируют шпильку мяРНК (Weber *et al.*, 2010). У бактериальных белков Hfq она отсутствует (Mura *et al.*, 2013).

Еще одной особенностью архейных SmAP белков является их способность к образованию фибрилл. Подобная олигомеризация была показана для архейных SmAP из *Methanothermobacter thermautotrophicum* и *Pyrobaculum.aerophilum* при помощи электронной микроскопии (Mura *et al.*, 2003). Оба белка воспроизводимо образуют фибриллы (в буфере, содержащем 10-25 mM Tris-HCl, pH 6.5-7.5, 20-60 mM NaCl, концентрация белка 0.5-1.2 мг/мл), хорошо различимые в электронном микроскопе. Диаметр отдельно взятой фибриллы соизмерим с размером гептамера SmAP1, полученным из данных рентгеноструктурного анализа (~70-75 Å). Совпадение диаметров фибриллы и гептамера позволило предложить модель, в которой ось гептамера параллельна оси фибриллы (рис. 4) (Mura *et al.*, 2003).

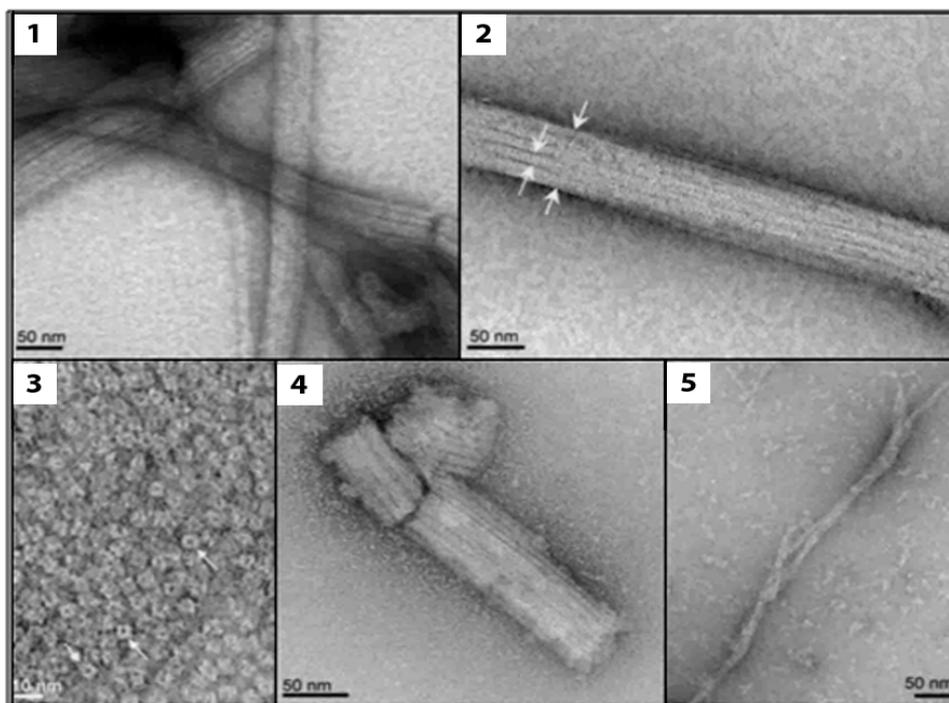


Рис. 4. (1, 2) Образование фибрилл белками SmAP (электронно-микроскопические фотографии). Белок SmAP из *M. thermotrophicum*; (3, 4) белок SmAP из *P. aerophilum* в окислительных и восстановительных условиях соответственно; (5) белок SmAP из *P. aerophilum* с заменой Cys8Ser . Расстояние между внутренними стрелками на фотографии (2) составляет $\sim 8,3$ нм, что соответствует диаметру гептамера. (Mura *et al.*, 2003, с изменениями).

В 2006 году Арлуизон (Arluison) с соавторами удалось получить фибриллы белк Hfq из *E. coli* (Arluison *et al.*, 2006). Для этого белок диализировали против раствора, содержащего 5 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM NaCl и 0,005% додецил- β -D-мальтозида, после чего белковый препарат лиофильно высушивали и ресуспендировали в воде. Расчетные данные позволили определить шаг спирали и угол между плоскостью гексамера и осью фибрилл – 170 \AA и $37,7^\circ$, соответственно. Полученные фибриллы были проанализированы и на основании полученных данных были построены трехмерные модели. Для сравнения тем же методом были проанализированы фибриллы белка SmAP из *M. thermotrophicum* (рис. 5) (Arluison *et al.*, 2006).

Полученные результаты позволили обозначить главное отличие образуемых фибрилл архейных и бактериальных Sm-подобных белков. В то

время как SmAP образуют полярные фибриллы, упакованные голова-к-хвосту (Muga *et al.*, 2003), бактериальный Hfq образует закрученные по спирали фибриллы, сформированные 6 гексамерами белка, находящимися на поверхности цилиндра (Arluison *et al.*, 2006).

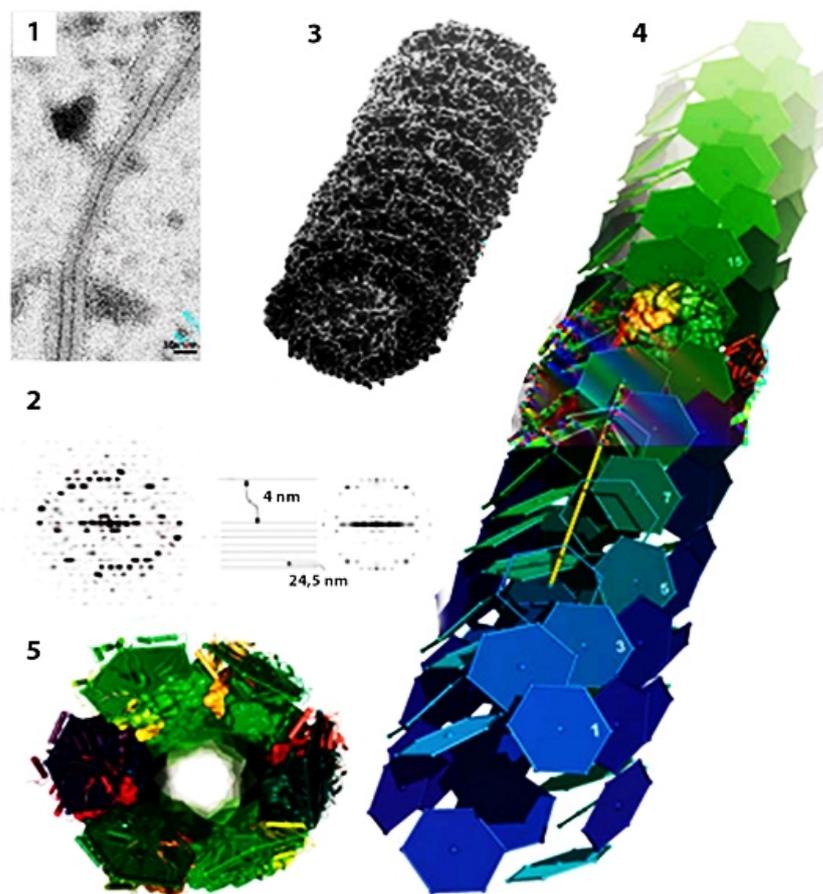


Рис. 5. (1) Модель фибрилл белка Hfq *E. coli*, построенная по электронно-микроскопическим данным. (2) Результаты анализа изображений. (3) Модель фибрилл по полученным данным, (4, 5) трехмерные модели строения фибрилл. Гексамер Hfq показан как гексагональная пластинка, окрашивание градиентное от синего (ближе) и до зеленого (дальше). Желтой линией показан шаг спирали $\sim 245 \text{ \AA}$ (Arluison *et al.*, 2006, с изменениями).

Глава III. Функциональная роль белков семейства Lsm

Клеточные функции Lsm белков и их бактериальных гомологов заключаются в участии в процессинге и деградации РНК (Wilusz and Wilusz, 2013). В *E. coli* белок Hfq связывает малые регуляторные РНК и способствует их взаимодействию с целевыми мРНК, влияя на эффективность трансляции мРНК (Wagner, 2013). Кроме того, Hfq влияет на распад мРНК, связываясь с 3'-концом транскрипта, способствуя его полиаденилированию, и ингибируя 3'-5'-экзонуклеазную активность рибонуклеаз (Vogel and Luisi, 2011).

Эукариотические комплексы Lsm сопровождают ряд мРНК и некодирующих РНК во время различных этапов их метаболизма (Tharun, 2008). У эукариот, начиная с дрожжей и заканчивая человеком, существуют многочисленные комплексы Lsm, но лучше всего охарактеризованы Lsm 1-7 и Lsm 2-8, которые находятся в цитоплазме и ядре, соответственно (Bouveret *et al.*, 2000; Mayes *et al.*, 1999). Lsm 1-7 – глобальный регулятор деградации мРНК, он способствует её взаимодействию с декэпирующей машиной (Bouveret *et al.*, 2000), в то время как Lsm 2-8 участвует в стабилизации мРНК U6 и сопровождает её во время сплайсинга (Mayes *et al.*, 1999).

Об архейных Lsm белках известно лишь то, что они взаимодействуют с полинуклеотидфосфорилазой Р и У-богатыми последовательностями РНК, и, возможно, участвуют в процессинге тРНК (Mura *et al.*, 2013).

3.1 Функции эукариотических белков Sm/Lsm

Первые представители семейства Lsm были идентифицированы как мишень антител у пациентов с системной красной волчанкой (Notman *et al.*, 1975). Вскоре было обнаружено, что они являются частью сплайсосомных мРНК и связываются с уридин-богатыми РНК-последовательностями мРНК, вокруг которых белки формируют гетерогептамерные Sm-комплексы (Walke *et al.*, 2001). Четыре из пяти основных компонентов сплайсосомы, мРНК U1, U2, U4 и U5 связываются с семью белками (SmB/B', SmD1, SmD2, SmD3, SmE, SmF и SmG). После экспорта мРНК U1, U2, U4 и U5 в

цитоплазму, белки, сопровождаемые комплексом SMN (выживания моторных нейронов), собираются вокруг одноцепочечной уридин-богатой последовательности мРНК, называемой сайтом Sm, с образованием корового домена мРНК. Формирование корового домена является предпосылкой для повторного импорта в ядро, где эти мРНК созревают путем добавления белков, специфичных для каждого рибонуклеопротеида (Weber *et al.*, 2010).

Sm комплекс специфически узнает Sm сайт на одноцепочечной мРНК U (Leung *et al.*, 2011; Pomeranz Krummel *et al.*, 2009). Данный комплекс состоит из протомеров SmE, SmG, SmD3, SmB/B', SmD1, SmD2 и SmF (перечислены в порядке взаимодействия с РНК от 5' к 3' концу). Каждый протомер связывает одно основание в своем РНК-связывающем сайте. Анализ структуры полученного комплекса показывает, что консервативный Asn39 взаимодействует с нуклеотидом посредством Уотсон-Криковских связей, а Arg 63 образует контакты с сахаро-фосфатным остовом. Исключением является SmE, у которого связывание с аденином происходит за счет лизина (рис. 6) (Weichenrieder, 2014).

Ядерный комплекс Lsm 2-8 связывает пятиуридиновый участок на 3'-конце U6 мРНК и влияет на стабильность транскрипта (Achsel *et al.*, 2001). По всей видимости, длина уридинового участка важна для связывания Lsm. Растущая U6 мРНК содержит только 4 уридина на 3'-конце, что позволяет ей связывать La белок (Rinke and Steitz, 1985). Впоследствии этот участок увеличивается терминальной уридилтрансферазой, а затем обрезается экзонуклеазой MPN1 (Shcherachev *et al.*, 2012; Trippe *et al.*, 1998). В ходе созревания Lsm вытесняет La и защищает U6 от экзонуклеазного укорачивания (Licht *et al.*, 2008). Возможно, эти циклы увеличения и обрезки необходимы для того, чтобы U6 оставалась без изменений после каждого цикла сплайсинга (Wilusz and Wilusz, 2013).

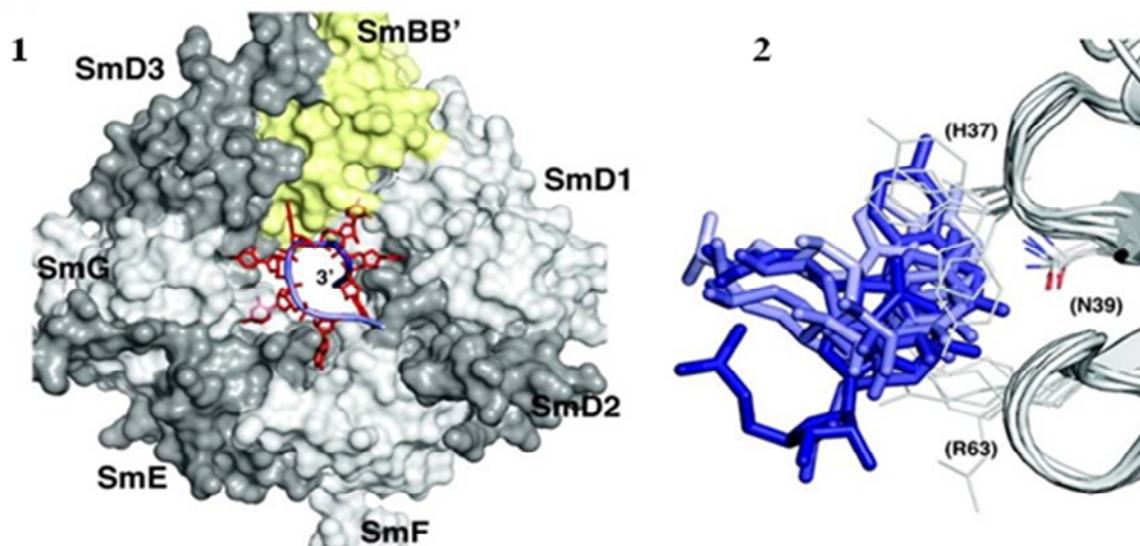


Рис. 6. Коровая часть мяРНК U4 (1). Все семь нуклеотид-связывающих карманов гетерогептамера заняты нуклеотидами Sm-сайта U4 мяРНК. (2) Наложение семи нуклеотид-связывающих карманов, включая связанные с ними нуклеотиды, иллюстрирующее сильную вариабельность и часто субоптимальную геометрию положения оснований. Верхний и нижний аминокислотные остатки, а также центральный аспарагин пронумерованы в соответствии с последовательностью Afu SmAP1 (Weichenrieder, 2014, с изменениями).

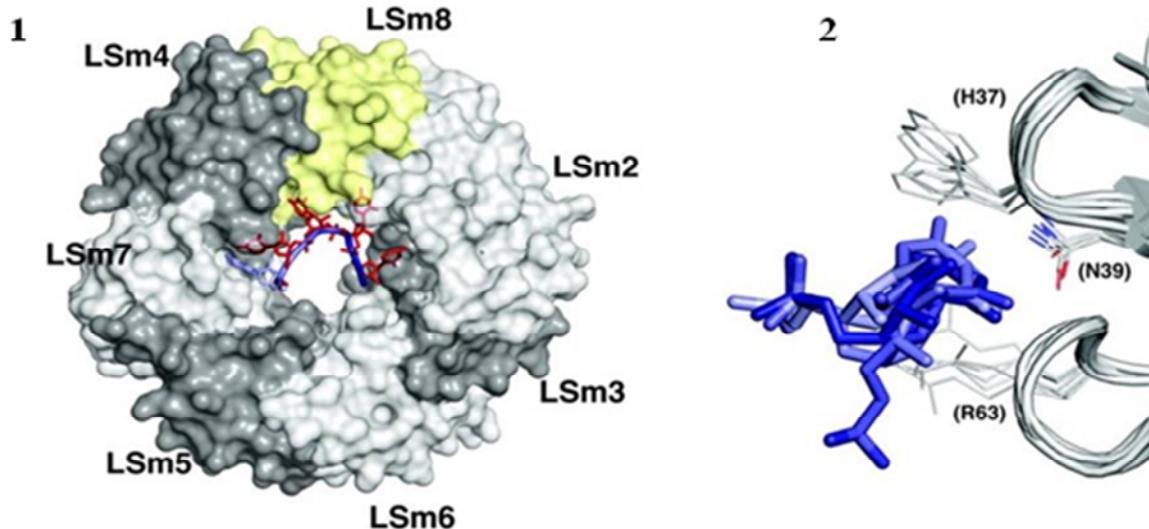


Рис. 7. Комплекс Lsm 2-8 с 3'-концом U6 мяРНК (1). Только четыре нуклеотид-связывающих кармана специфически взаимодействуют с уридинами мяРНК U6. 3'-концевой нуклеотид контактирует с Lsm 3и Lsm6 с хорошей геометрией распознавания основания в кармане Lsm3. Гетерогептамер Lsm 2-8 очень похож на комплекс Lsm 1-7, в котором Lsm8 (желтый) заменяется на Lsm1. (2) Наложение семи нуклеотид-связывающих карманов, включая связанные с ними нуклеотиды, иллюстрирующее сильную вариабельность и часто субоптимальную геометрию положения оснований. Верхний и нижний аминокислотные остатки, а также центральный аспарагин пронумерованы в соответствии с последовательностью Afu SmAP1 (Weichenrieder, 2014, с изменениями).

В отличие от Sm комплексов, комплекс Lsm 2-8 собирается в отсутствие РНК, а затем специфически узнает 3'-конец сплайсosomal мРНК U6, который содержит пять уридинов и 2'-3' циклофосфат вместо 3'-гидроксильной группы (Licht et al., 2008; Zaric et al., 2005). Сравнение аминокислотных последовательностей Lsm протомеров (Lsm5, Lsm7, Lsm4, Lsm8, Lsm2, Lsm3 и Lsm6) и Sm протомеров (SmE, SmG, SmD3, SmBB', SmD1, SmD2 и SmF) показало высокую степень гомологии между соответствующими субъединицами (Zhou et al., 2014a). Консервативные уридин-связывающие карманы сохраняются у всех белков, кроме Lsm7 и Lsm8, у которых нет ароматических аминокислот для стэкинга в нужном положении, а также Lsm5, в котором высоко консервативный аргинин Arg63 заменен на серин. Lsm 2-8 был закристаллизован с двумя олигонуклеотидами 5'-GCUUUU-3' и 5'-GCUUU-3' с ОН группой на 3'-конце (рис. 7) (Zhou et al., 2014a). Сравнение полученных структур показало, что последний уридин предпочтительно связывается с Lsm3, поскольку в этом случае создается оптимальное положение для контакта 2'-гидроксильной группы концевой рибозы и консервативного аргинина Lsm6 (Weichenrieder, 2014). Lsm3 является последней субъединицей в направлении 5'-3' РНК, в которой такой контакт возможен, поскольку у Lsm5 нет аргининов для образования данных связей. Однако полученные структуры не дают ответа на вопрос, каким образом происходит взаимодействие между белками и 2'-3' циклофосфатом? Чжоу (Zhou) с соавторами утверждает, что Lsm3 также может связывать и циклофосфат, если аргинин белка Lsm6 изменит свое положение (Zhou et al., 2014a). Однако может существовать и другой вариант, когда дополнительный уридин занимает сайт на поверхности Lsm6, а его 3'-фосфат заполняет место отсутствующего аргинина в Lsm5. В этом случае все пять уридинов будут распознаваться без изменений пути входа РНК в кольцо Lsm (Weichenrieder, 2014).

Цитоплазматический комплекс Lsm 1-7 вовлечен в процесс деградации мРНК (Tharun et al., 2000). Он узнает мРНК с короткими поли(А) 3'-концами

(≤ 10 аденинов), которые образуются в результате действия деаденилаз CCR4/NOT или PARN (Chen and Shyu, 2011). Хотя функции Lsm белков в процессе деградации мРНК еще не совсем ясны, существуют два четких последствия данного связывания. Первое, 3'-конец мРНК защищен от экзонуклеаз. Второе, Lsm 1-7 связывает факторы, необходимые для декэпирования 5'-конца мРНК, что ускоряет деградацию (Chowdhury *et al.*, 2007).

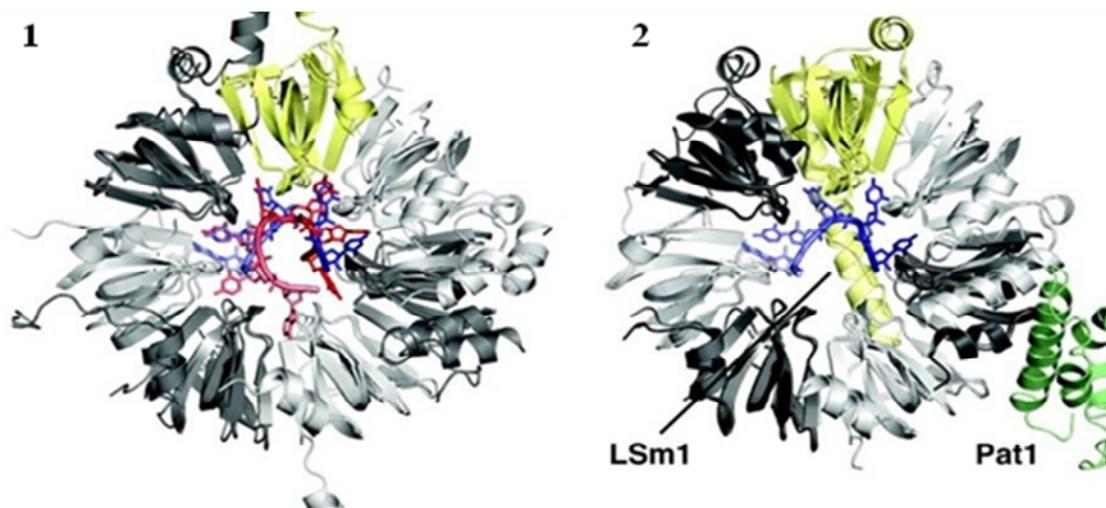


Рис.8. Наложение структуры комплекса Lsm 2-8 (РНК от светло- до темно-синего) на структуру комплекса Sm (РНК от светло- до темно-красного) (1). Показано сходство основных цепей белков и различия в связывании РНК. Наложение структуры комплекса Lsm 2-8 на структуру комплекса Lsm 1-7 (без привязки к РНК) (2). Показана С-концевая спираль Lsm1, которая закрывает центральную пору на дистальной (L4) поверхности гептамера, а также показано место связывания Pat1 с Lsm2 (Weichenrieder, 2014, с изменениями).

Lsm 1-7 связывает и защищает 3'-концы деаденилированных мРНК и инициирует их декэпирование, чаще всего, путем связывания С-концевого домена активатора декэпирования Pat1 (Braun *et al.*, 2010). Существует предположение, что Lsm1-7 вызывает декэпирование промежуточных продуктов распада олигоаденилированных мРНК, которые появляются в результате деаденилирования мРНК комплексами PAN2-PAN3 и CCR4-NOT (Chen and Shyu, 2011). Результаты, полученные *in vitro*, говорят о том, что эти

интермедиаты напрямую узнаются комплексом Lsm1-7/Pat1 (Chowdhury *et al.*, 2007).

Структурно субъединицы комплекса Lsm 1-7 очень похожи на субъединицы Lsm 2-8 (рис. 8) (Zhou *et al.*, 2014). Так же, как и белок Lsm8, Lsm1 имеет С-конец в виде длинной спирали, который проходит вдоль поры гетерогептамера и достигает поверхности Lsm6. По всей видимости, С-конец необходим для предотвращения выхода 3'-конца РНК с этой стороны (Weichenrieder, 2014). В противоположность Lsm8, Lsm1 сохраняет нуклеотид-связывающий карман. Следовательно, оба комплекса Lsm 1-7 и Lsm 2-8 образуют дугу из 6 нуклеотид-связывающих карманов, начинающуюся на Lsm7 и заканчивающуюся на Lsm6 (Weichenrieder, 2014). Исключением является Lsm5, у которого отсутствует консервативный аргинин в связывающем сайте. Поэтому удивительно, что Lsm 1-7 связывают октоуридины в 100 раз слабее, чем комплекс Lsm 2-8 (Zhou *et al.*, 2014). Предполагается, что причина может заключаться в сужении поры гептамера и, следовательно, в сложности расположения сахарофосфатного остова РНК. Такое предположение возможно, поскольку даже небольшие отличия в ориентации нуклеотид-связывающих сайтов имеют значительные эффекты. Скорее всего, остатки, находящиеся в поре, такие как Glu107 белка Lsm1 (Ser59 белка Lsm8, Asp65 белка Afu SmAP1) препятствуют прохождению РНК в пору, стимулируя ее выход из кольца и предотвращая последовательное связывание более двух-трех нуклеотидов (Weichenrieder, 2014). Описанный механизм не только объясняет снижение сродства Lsm1-7 к уридин-богатым РНК, а также наводит на мысль, как Lsm 1-7 узнает 3'-концы полиаденилированных РНК. В этом случае гептамер связывает два или три уридина, которые расположены в 3'-НТО мРНК, а также от одного до трех 3'-концевых аденинов, которые связываются в нуклеотид-связывающих карманах. Таким образом Lsm1-7 может защищать 3'-конец РНК и различать олигоаденилированные и полиаденилированные субстраты, т.к. олигоаденилированные, как показано *in vitro*, связываются гораздо хуже

(Weichenrieder, 2014). Дополнительный вклад, повышающий субстратную специфичность, вероятно, вносит белок Pat1. Pat1 связывается с субъединицами Lsm2 и Lsm3 и также взаимодействует с РНК (рис. 8) (Wu et al., 2014).

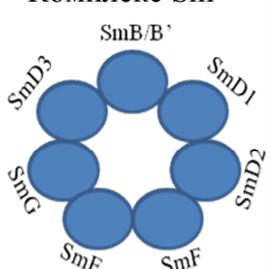
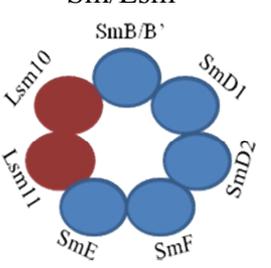
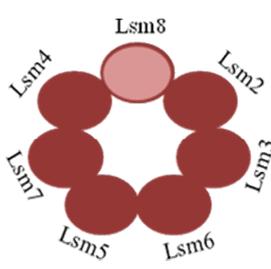
Недавние исследования показали новую роль Lsm 1-7 и олигоуридилирования в цитоплазматических путях распада мРНК. Большинство цитоплазматических мРНК *S. cerevisiae* деградируют по пути деаденилирования, который сохраняется у высших организмов (Chen and Shyu, 2011). Однако имеются убедительные доказательства дополнительного пути деградации у грибов и растений. Эти альтернативные пути также требуют взаимодействия Lsm с 3'-концом РНК. У *S. pombe* значительная доля мРНК распадается по пути, не требующего деаденилирования. В данном процессе принимает участие терминальная уридинтрансфераза Cid1 (Rissland and Norbury, 2009). Она способна добавлять один или два уридина на А-богатый 3'-конец некоторых транскриптов. Эта модификация ведет к декэпированию мРНК в обход деаденилирования, хотя требует участия Lsm 1-7 и ассоциированных с ним декэпирующих факторов. Похожий механизм был обнаружен у гриба *Aspergillus nidulans*, у которого все мРНК приобретают модификацию 3' CUCU после укорочения поли(А)-хвоста до 15 остатков (Morozov et al., 2010). Эта модификация осуществляется нуклеотидилтрансферазами CutA и CutB, родственными Cid1 *S. pombe* (Morozov et al., 2010). Хотя белки Lsm из *Aspergillus* не были охарактеризованы, по всей видимости, они вовлечены в данный механизм распада. Подобный путь также наблюдается у *Arabidopsis*, где на поли(А) 3'-концах мРНК обнаруживаются один или два пиримидина (чаще всего, уридины) (Morozov et al., 2012). До сих пор не ясно, сохраняется ли этот путь распада мРНК в клетках млекопитающих, хотя он очень похож на механизм, обнаруженный при деградации неаденилированных гистоновых мРНК у млекопитающих (Wilusz and Wilusz, 2013).

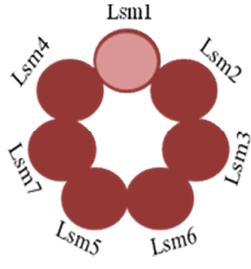
У высших эукариот, в репликативно-зависимых гистонах отсутствуют поли(А) концы, вместо этого у них обнаружены уникальные последовательности РНК, приводящие к образованию шпилечной структуры на 3'-конце. Она взаимодействует со специфическим набором факторов, включающих мяРНП U7 и белок, связывающий шпилечную структуру (stem-loop binding protein) (Dominski and Marzluff, 2010). Количество гистонов тесно связано с S фазой клеточного цикла. Эти белковые факторы необходимы для ускорения деградации гистоновых мРНК, когда S фаза подходит к концу или когда ингибируется репликация ДНК. 3'-олигоуридилирование является иницирующим фактором в деградации гистоновых мРНК и опосредовано терминальной уридилтрансферазой ZCCHC11 (Mullen and Marzluff, 2008). Олиго(У) позволяет Lsm1, который чаще всего находится в виде комплекса Lsm 1-7, связываться с 3'-концом гистоновых транскриптов (Mullen and Marzluff, 2008). Связывание индуцирует разрушение гистоновых мРНК путем декэпирования и 5'-3' деградации, осуществляемой экзонуклеазой Eri1 (Hoefig *et al.*, 2013). Следует отметить, что, хотя в дрожжах гистоновые мРНК полиаденилированы, Lsm1 необходим для их деградации, поскольку нокаутные по данному гену линии имеют дефекты стабильности генной информации, вызванные избыточным накоплением гистоновых мРНК (Herrero and Moreno, 2011).

Помимо описанных выше примеров, на данный момент изучены другие эукариотические Sm/Lsm комплексы (табл. 1).

Таблица 1.

Субъединичный состав и функции эукариотических Sm и Lsm комплексов (Carol J. Wilusz and Jeffrey Wilusz, 2013, с изменениями).

	Комплекс	РНК-партнеры	Клеточные функции	Сборка
Sm	<p>Комплекс Sm</p> 	мяРНК U1, U2, U4 и U5 (Lerner and Steitz, 1979)	Сплайсинг мРНК	Требует присутствия РНК (Raker <i>et al.</i> , 1996) У позвоночных шаперон SMN поддерживает комплекс Sm с мяРНК (Fischer <i>et al.</i> , 2011)
		мяРНК U11, U12 и U4 (Montzka and Steitz, 1988)	Сплайсинг мРНК с помощью малой сплайсосомы (Turunen <i>et al.</i> , 2013)	
		TLC1 (<i>S.cerevisiae</i>) TER1 (<i>S.pombe</i>)	Биогенез и поддержание стабильности РНК-компонента теломеразы (Tang <i>et al.</i> , 2012)	
	SmB, SmB', SmD	РНК-компоненты теломераз Малые специфичные для телец Кахаля РНК (вид мякРНК)	Взаимодействуют с РНК теломераз и малыми специфичными для телец Кахаля РНК в клетках человека, но роль пока не ясна (Fu and Collins, 2006)	Шаперон SMN также взаимодействует с теломеразой (Bachand <i>et al.</i> , 2002)
Sm/ Lsm	<p>Комплекс U7 Sm/Lsm</p> 	мяРНК U7	Необходим для процессинга гистоновых мРНК	SMN требуется для сборки (Pillai <i>et al.</i> , 2003)
Lsm	<p>Комплекс Lsm2-8</p> 	мяРНК U6	Стабилизирует U6 и способствует ее взаимодействию U4, пре-мРНК и т.д. (Ryan <i>et al.</i> , 2002)	Сборка в отсутствие РНК (Zaric <i>et al.</i> , 2005)
		TER1 (<i>S.pombe</i>)	Стимулирует присоединение каталитической субъединицы теломеразы и защищает 3' конец созревшей TER1 от экзонуклеаз (Tang <i>et al.</i> , 2012)	

	Комплекс Lsm1-7	Олигоденилированные цитоплазматические мРНК	Защищает 3' концы мРНК от действия экзонуклеаз (He and Parker, 2001) Рекрутирует факторы декэпирования (Tharun <i>et al.</i> , 2000)
		Олигоуридилированные гистоновые мРНК (у позвоночных)	Рекрутирует факторы декэпирования и экзонуклеазу Eri1 для инициации деградации (Hoefig <i>et al.</i> , 2013)
	Комплекс Lsm2-7	мякРНК R5 (Fernandez <i>et al.</i> , 2004) пре-РНКазы Р (Salgado-Garrido <i>et al.</i> , 1999)	Не определены
	Комплекс Lsm2-4/6-8	мякРНК U8 (Tomasevic and Peculis, 2002)	Не определены

3.2 Функции бактериальных белков Hfq

Hfq идентифицирован более 50 лет назад как клеточный белок *E.coli* HF-I (Host factor I), принимающий участие в репликации бактериофага $Q\beta$ (Franze de Fernandez *et al.*, 1972). Однако его принадлежность к семейству Lsm и наличие Sm фолда была обнаружена довольно поздно из-за того, что последовательность РНК-связывающего сайта, характерная для архей и эукариот, у Hfq отсутствовала (Mura *et al.*, 2013). Первые кристаллографические структуры Hfq показали, что белок формирует гексамер с диаметром $\sim 65 \text{ \AA}$. Каждая субъединица состоит из N-концевой α -спирали, пяти β -тяжей и неструктурированного C-конца (Sauer, 2013).

На данный момент Hfq является, возможно, наиболее изученным РНК-связывающим бактериальным белком. Он стабилизирует малые регуляторные РНК и способствует их взаимодействию с мРНК, что ведет к изменению их стабильности и/или уровня трансляции. У мутантных штаммов бактериальных клеток с делецией гена *hfq* наблюдаются

плейотропные фенотипы, включающие чувствительность к стрессу и сниженную вирулентность (Wagner, 2013).

Hfq имеет четыре доступных растворителю РНК-связывающих участка: проксимальный сайт (со стороны α -спиралей всех субъединиц белка), дистальный сайт (противоположная проксимальной поверхность гексамера), боковой сайт на внешней поверхности кольца и С-концевой (Updegrove *et al.*, 2016).

Пространственная структура Hfq из *Staphylococcus aureus* в комплексе с олигоРНК показала детали взаимодействия белка с поли(У) РНК в проксимальном сайте белка (Schumacher *et al.*, 2002). Важность проксимального сайта Hfq, который связывает уридин-богатые последовательности малых регуляторных РНК, подтверждена многими исследованиями (Otake *et al.*, 2011). Кристаллические структуры комплексов Hfq из *E.coli* (Sauer and Weichenrieder, 2011), *Salmonella typhimurium* (Sauer and Weichenrieder, 2011) и *Staphylococcus aureus* (Schumacher *et al.*, 2002) с олиго(У) РНК показывают, что структуры сайтов схожи между собой, а уридины в комплексах образуют стэкинг с фенилаланинами каждого мономера (рис.9).

Сравнение перечисленных структур комплексов Hfq с У-богатыми РНК показывает некоторые отличия. Ассиметричная ячейка структуры комплекса *S. typhimurium* Hfq с олиго(У) содержит один мономер белка и один уридин, причем свободные кислороды фосфата не формируют связи с белком и направлены в центральную пору (Sauer and Weichenrieder, 2011). Структура комплекса *Staphylococcus aureus* Hfq с AU₅G РНК показала, что свободные кислороды фосфата направлены от центра гексамера и формируют водородные связи с His56 (рис.10) (Schumacher *et al.*, 2002).

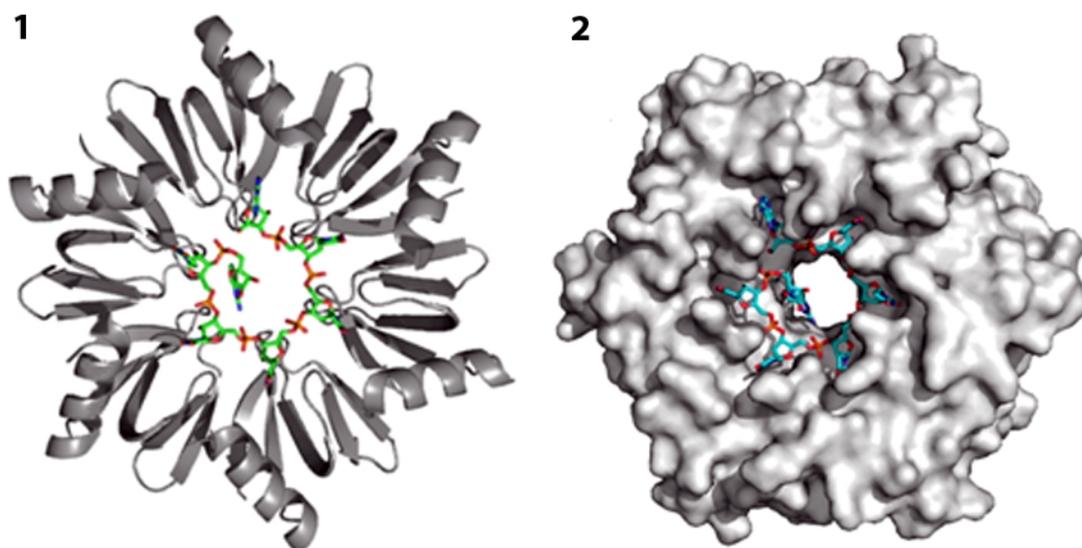


Рис. 9. Структура комплекса *Staphylococcus aureus* Hfq с AU₅G РНК, PDB ID 1KQ2. (1) Гексамер белка представлен в виде ленточной модели и выделен серым цветом. Связанная молекула AU₅G олигоРНК представлена в виде стержневой модели. (2) Показано расположение молекулы олиго РНК на поверхности гексамера белка.

Исследования, направленные на изучение регуляции целевых мРНК малыми регуляторными РНК в штаммах *E.coli*, экспрессирующих различные мутанты Hfq, показывают, что замены консервативных остатков Gln8Ala, Phe42Ala и Lys56Ala влияют на многие проанализированные малые регуляторные РНК, а замены Asp9Ala и Phe39Ala дают множественные эффекты в отношении разных мРНК (Zhang *et al.*, 2013). Также обнаружено, что аминокислотные остатки Asp9, Glu18 и Glu37 важны для распознавания мРНК от остальных РНК. Замены данных остатков приводили к неспецифическому связыванию РНК, а также снижали эффективность отжига мРНК-мРНК (Panja *et al.*, 2015).

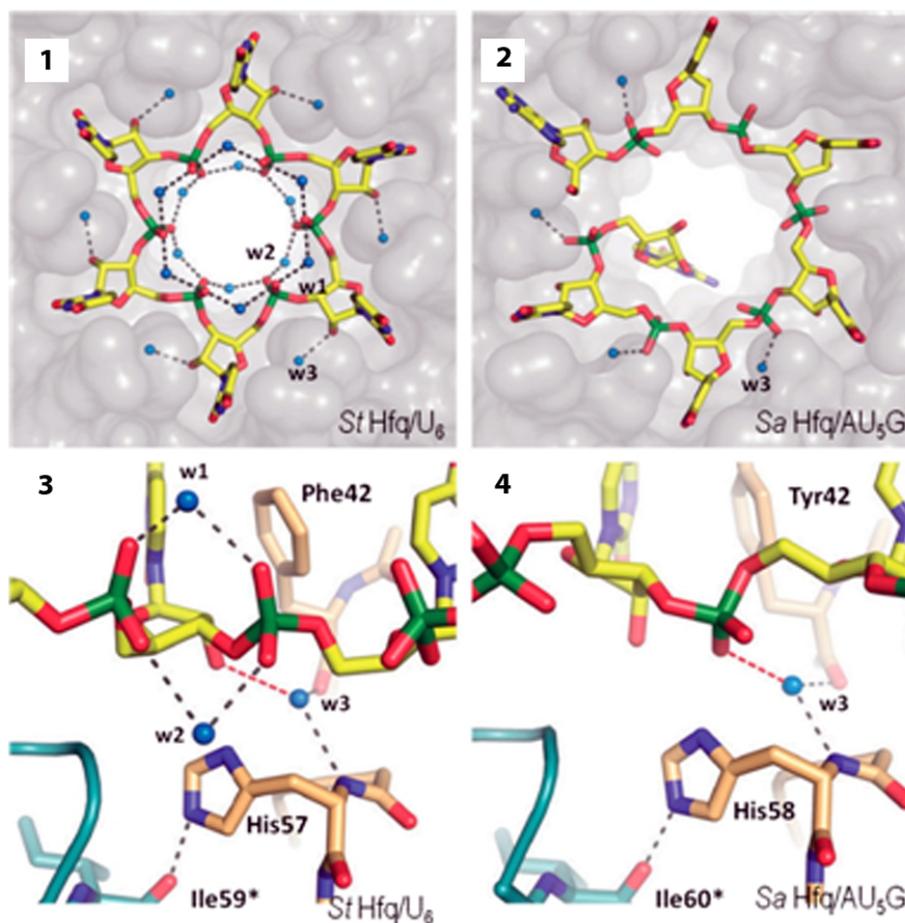


Рис.10. Сравнение структур комплексов белка Hfq с U₆ и AU₅G РНК. (1) В структуре комплекса белка Hfq из *Salmonella typhimurium* кислороды фосфатной группы ориентированы внутрь центральной полости. (2) В комплексе Hfq из *Staphylococcus aureus* с AU₅G РНК кислороды фосфата направлены к белку от центра гексамера. (3) Свободные кислороды U₆ РНК формируют водородные связи между собой через воду, что способствует закреплению их конформации в пространстве в данном положении и не формируют водородных связей с белком. (4) Свободные кислороды AU₅G формируют водородные связи с остатком His58 через воду (Sauer and Weichenrieder, 2011, с изменениями).

Пространственная структура комплекса Hfq из *E.coli* с поли(А) РНК показала особенности узнавания триплетов аденинов в дистальном сайте белка (Link *et al.*, 2009). Ее анализ показал, что олиго(А) связывается в дистальном сайте белка посредством повторяющегося тройственного мотива, названным А-R-Е РНК-связывающим мотивом, где А описан как аденин-специфический сайт, R – как пурин-специфический сайт, а Е –

неспецифический сайт, поскольку нуклеотид в этом положении не имеет контактов с поверхностью белка и основание смотрит от неё (рис. 11).

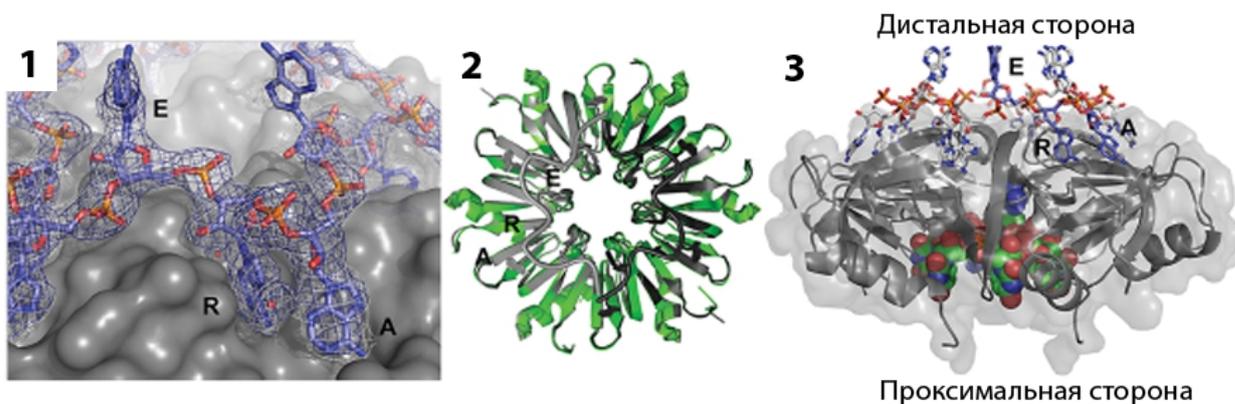


Рис. 11. Структура Hfq из *E.coli* в комплексе с A_{15} РНК. (1) Положение РНК на поверхности белка. РНК приведена в виде стержневой модели с фрагментом электронной плотности (1σ , выделена синим цветом), поверхность белка показана серым цветом. Выделены три сайта связывания - А, R и E. (2) Ленточная модель общего вида положения РНК на поверхности белка Hfq. Выполнено наложение Hfq (зеленого цвета) на комплекс белка с РНК (серого цвета). Выделены три сайта связывания А, R и E. (3) Вид комплекса белка с РНК сбоку. На структуру комплекса Hfq с A_{15} наложена структура Hfq с AU_5G . A_{15} РНК показана стержневой моделью, расположена на дистальной стороне гексамера. Выделены три сайта связывания А, R и E. AU_5G РНК расположена с проксимальной стороны гексамера, показана шариковой моделью (Link *et al.*, 2009, с изменениями).

Дальнейшие исследования показали, что детали взаимодействия олиго(А) РНК с Hfq в дистальном сайте несколько отличается для белков из грамотрицательных и грамположительных бактерий (рис. 12). Hfq из грамотрицательных бактерий взаимодействует с А-богатыми РНК за счет стэкинга между Tyr25 и основанием аденина, а также за счет гидрофобных взаимодействий между основанием и Leu26, Ile30, Leu32. Мутация с заменой Tyr25 на аланин приводит к уменьшению сродства Hfq к РНК в 100 раз (Arluison *et al.*, 2007). Кроме гидрофобных взаимодействий, формируются дополнительные водородные связи между боковыми цепями Gln52, Thr61 и Asn28 с основанием аденина (Link *et al.*, 2009).

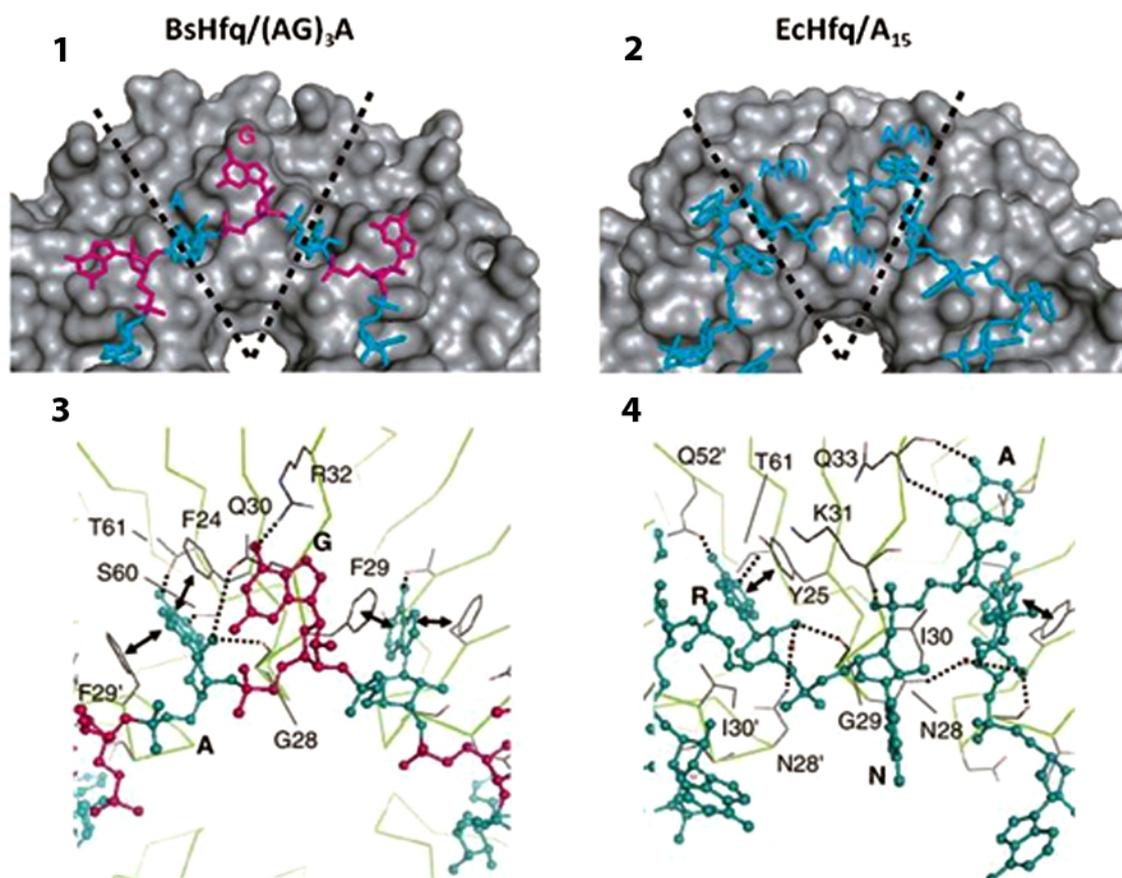


Рис. 12. Сравнение связывания А-богатых РНК в грамположительных (1) (*B. subtilis*) и грамотрицательных бактериях (2) (*E. coli*). Показано положение РНК на поверхности белков, выделен сектор на поверхности мономера, соответствующий повторяющемуся РНК-связывающему мотиву. (3, 4) Водородные связи, которые формируют молекулы РНК и белка в участке связывания (Someya *et al.*, 2012, с изменениями).

В 2011 году получена структура комплекса Hfq из грамположительной бактерии *Bacillus subtilis* с (AG)₃A РНК (Someya *et al.*, 2012). Hfq из *B. subtilis* не способен связать AU₅G РНК, обладает меньшим сродством к A₁₈-РНК по сравнению с белками грамотрицательных бактерий, но специфически связывает AG-богатую последовательность РНК. Вместо триплетов А-Р-Е формируются парные участки взаимодействия, которые были названы А-Л мотивом. Аденин связывается на поверхности белка в кармане А (аналог кармана R грамотрицательных бактерий). Стэкинг между основанием аденина и Phe24 и Phe29, а также водородные связи между аденином и остатками Ser60 и Thr61 белка обеспечивают специфическое связывание.

Гуанин формирует водородные связи с Arg32, который строго консервативен среди белков Hfq грамположительных бактерий (рис. 12) (Someya *et al.*, 2012).

Для некоторых мРНК положение А-богатой последовательности вблизи участка взаимодействия с мРНК критично для Hfq-опосредованной регуляции. Используя молекулярные маяки (molecular beacons), которые представляют собой шпилечную РНК, на одном конце которой находится флуорофор, а на другом – гаситель, было показано, что если А-богатый участок находится непосредственно после последовательности, комплементарной петле молекулярного маяка, то Hfq-опосредованный отжиг *in vitro* значительно усиливается (рис. 13). Это усиление снижается с увеличением расстояния между участком А-А-N и комплементарной последовательностью (Panja and Woodson, 2012a).

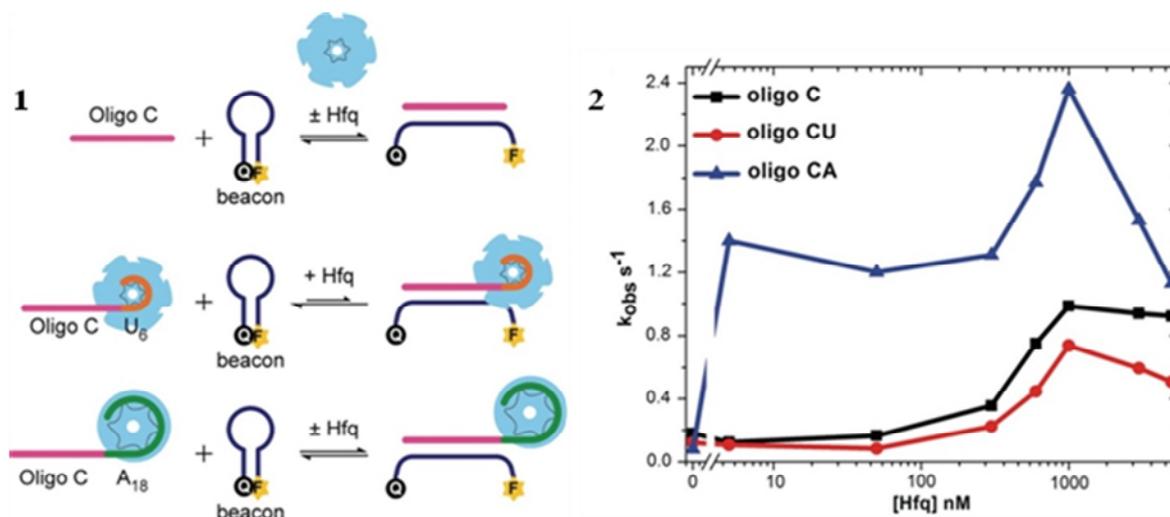


Рис. 13 А-богатая последовательность стимулирует Hfq-опосредованный отжиг РНК. (1) Взаимодействие молекулярного маяка (синего) с мишенью (пурпурной), содержащей 16 нуклеотидов, увеличивает интенсивность флуоресценции флуорофора FAM. ОлигоСА и олигоCU содержат 18 аденинов и 6 уридинов соответственно. (2) Скорость отжига РНК измеряли флуоресценцией остановленного потока. Наблюдаемые константы скорости из пяти независимых экспериментов были усреднены и нанесены на график относительно концентрации Hfq (Panja and Woodson, 2012a, с изменениями).

Целевые мРНК малой регуляторной РНК Spot42 не регулируются Hfq *in vivo*, если А-богатая последовательность перекрывает участок связывания мРНК, но регулируются, если данную последовательность перенести выше комплементарного участка (Beisel *et al.*, 2012). Перенос триплета А-А-Н в разные позиции 5'НТО области *rpoS* снижает эффективность влияния Hfq на отжиг мРНК DsrA *in vitro* и снижает активацию трансляции *rpoS in vivo* (Peng *et al.*, 2014). Хотя расстояние между Hfq-связывающим и мРНК-связывающим участками во многих мРНК превышает 20 нуклеотидов, вероятно, вторичная и третичная структура РНК способствует сближению этих двух сайтов (Updegrave *et al.*, 2016).

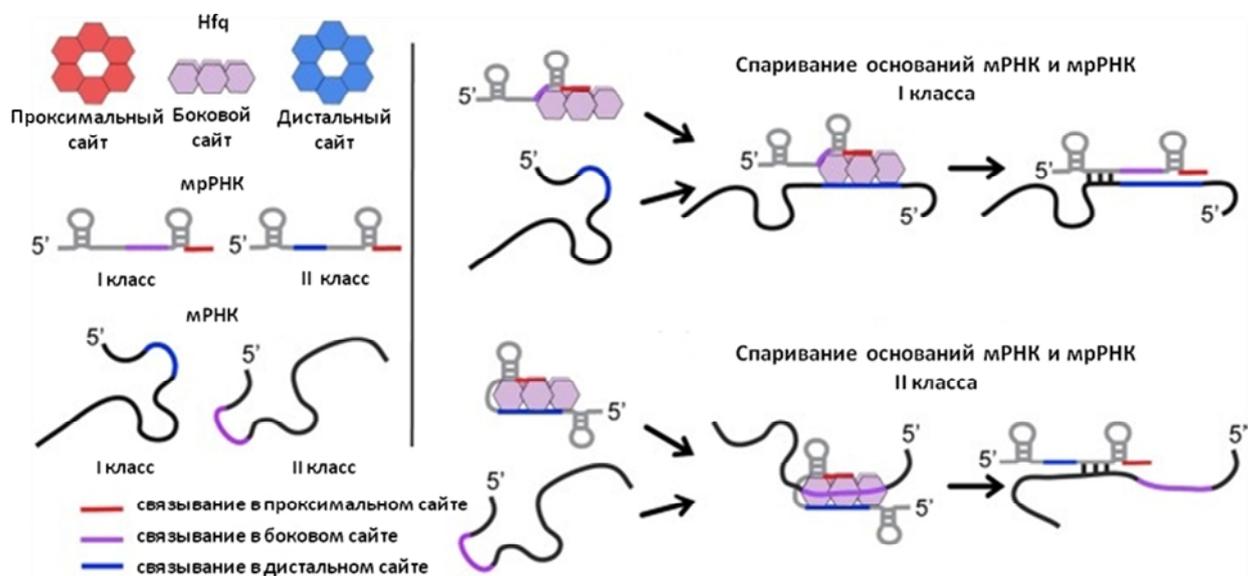


Рис. 14. Модель альтернативных способов взаимодействия РНК и Hfq. Представлены три РНК-связывающие поверхности Hfq: проксимальный сайт (красный), боковой (фиолетовый) и дистальный (синий). У мРНК и мРНК красным выделены участки, которые связываются в проксимальной сайте, фиолетовым – в боковом сайте, а синим – в дистальном сайте. Показаны два альтернативных пути связывания и регуляции парами мРНК-мРНК (Schu *et al.*, 2015, с изменениями).

Многочисленные исследования показывают, что мРНК также могут иметь поли(А) участки, что позволяет им взаимодействовать с Hfq в дистальном сайте (Małecka *et al.*, 2015; Schu *et al.*, 2015). Вообще, мРНК из *E.coli* можно разделить на две больших класса с некоторыми исключениями

(рис. 14) (Schu *et al.*, 2015). I класс, наиболее крупный, включает РНК, связывающиеся в проксимальном и боковом сайтах, а их целевые мРНК связываются с дистальным карманом. II класс составляют мРНК, которые взаимодействуют с проксимальным и дистальным сайтами, а мРНК связывается в боковом сайте гексамера. мРНК I класса используют У-богатую последовательность rho-независимого терминатора для связывания с проксимальным сайтом Hfq и последовательность УА для взаимодействия с боковым сайтом. мРНК, регулируемые этим классом мРНК, используют А-богатые участки для взаимодействия с дистальным сайтом Hfq. Взаимодействие мРНК I класса и ее целевой мРНК с Hfq приводит к спариванию и последующей деградации РНК. Второй класс мРНК использует У-богатую последовательность rho-независимого терминатора для связывания с проксимальным сайтом Hfq и А-богатую последовательность для связывания с дистальной сайтом. мРНК, регулируемые этим классом мРНК, содержат УА-богатые участки, которые позволяют им взаимодействовать с боковым сайтом Hfq. Связывание мРНК II класса и соответствующей им мРНК с Hfq приводит к спариванию оснований и последующей регуляции, но не обязательно к деградации РНК (Schu *et al.*, 2015). Одновременное связывание двух олигонуклеотидов AU₆A и A₇ с Hfq из *E.coli* показало, что при формировании тройного комплекса структура белка и положение РНК не претерпевают изменений (Wang *et al.*, 2013).

Боковой сайт Hfq из *E.coli* содержит участок положительно заряженных остатков (Arg 16, 17 и 19), что позволяет ему связывать УА-богатые последовательности мРНК (Schu *et al.*, 2015). Эксперименты *in vitro* показали, что замена всех заряженных остатков привела к ослаблению связывания мРНК RybВ, а дикий тип Hfq не способен связывать мРНК RybВ и SgrS с мутациями в УА-богатых участках (Sauer *et al.*, 2012). Кроме того, анализ недавней структуры Hfq из *E.coli* с мРНК RydС из *Salmonella*

enterica показал, что аргинины 16 и 17 образуют водородные связи с сахарофосфатным остовом U23 и U24 (рис. 15) (Dimastrogiovanni *et al.*, 2014). Эксперименты *in vivo* показали, что мутации заряженных аминокислот бокового сайта снижают уровень мРНК, принадлежащих к I классу, что указывает на снижение связывания и стабильности мРНК (Schu *et al.*, 2015). Для А-богатых последовательностей, которые взаимодействуют с дистальным сайтом, расстояние между УА-богатой последовательностью и комплементарным мРНК участком также влияет на регуляцию (Otake *et al.*, 2011). Последовательность с несколькими аргининами отсутствует практически у всех Hfq грамположительных бактерий (например, *B. anthracis* и *S. aureus*), однако, РНК связывается с белком за счет других аминокислотных остатков (Sobrero and Valverde, 2012).

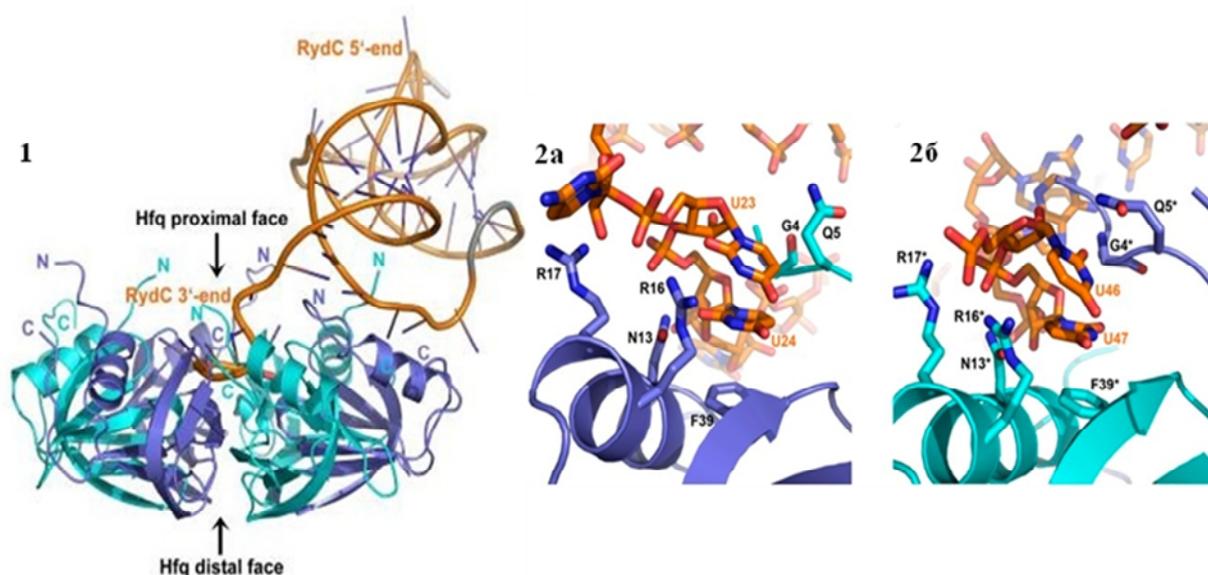


Рис. 15. Кристаллическая структура комплекса RydC/Hfq. (1) 3'-конец RydC взаимодействует с проксимальной поверхностью гексамера. N- и С-концы обозначены буквами (голубые и синие для разных мономеров Hfq). (2) Контакты между парами U-U RydC и боковым сайтом Hfq. (2а) Пара U23/U24 взаимодействует с Phe39, Arg16, Arg17 и Asn13 бокового сайта Hfq. (2б) Пара U46/U47 аналогично взаимодействует с гексамером Hfq в соседней асимметричной ячейке. Остатки, принадлежащие соседней молекуле Hfq, помечены звездочкой (*) (Dimastrogiovanni *et al.*, 2014, с изменениями).

С-конец, который сильно варьируется по длине и составу от вида к виду, не был виден в первых кристаллографических структурах. Ранние

исследования по определению его клеточных функций также давали противоречивые результаты (Sobrero and Valverde, 2012). Однако новые данные свидетельствуют о том, что С-конец исключительно важен для связывания с некоторыми мРНК. Было показано *in vivo*, что время полужизни RydС уменьшается в отсутствие С-конца Hfq (Dimastrogiovanni *et al.*, 2014). Делеция С-конца Hfq также снижает сродство к мРНК Qrr из *Vibrio cholera*, а эксперименты по тушению флуоресценции триптофана показали, что С-конец способен связывать мРНК *hfq* (Robinson *et al.*, 2014; Vincent *et al.*, 2012). Интересно, что Hfq из *Clostridium difficile*, в состав С-конца которого входят многочисленные аспарагины и глутамины, может выполнять многие функции Hfq *E.coli*, а его удаление ведет к потере регуляции (Caillet *et al.*, 2014). Все эти данные говорят о том, что С-конец связывает только некоторые РНК, причем это связывание неспецифическое и определяется большим числом заряженных аминокислотных остатков протяженной неупорядоченной структуры (Updegrave *et al.*, 2016).

Эксперименты, проведенные с использованием новейших методов, дают прямые доказательства того, что белок Hfq влияет на многочисленные этапы процессинга РНК. Hfq влияет на изменение структуры мРНК и ее сближение с целевой мРНК и на нейтрализацию отрицательных зарядов двух РНК, а также способствует дальнейшему отжигу комплементарных участков (Updegrave *et al.*, 2016). Эксперименты по пробингу определили, что Hfq способен изменять вторичную структуру связанных РНК (Sobrero and Valverde, 2012). Используя методы SAXS (малоугловое рентгеновское рассеяние) и SANS (малоугловое нейтронное рассеяние), а также круговой дихроизм, показано, что Hfq из *E.coli* связывает мРНК RprA и OxyS в соотношении 1:1, при этом меняется структура РНК, но не Hfq (Henderson *et al.*, 2013). С помощью методов SAXS и SHAPE (избирательное 2'-гидроксиацилирование и удлинение праймеров) обнаружено, что Hfq формирует контакты с U5 участком 5'-НТО *rpoS* в боковом сайте белка, а с А-А-Н последовательностью – в дистальном сайте. При этом мРНК

становится компактнее и сближается с мРНК, связанной с проксимальной стороны белка (Peng *et al.*, 2014). Мутации в боковом сайте связывания Hfq или удаление С-конца уменьшают стабильность тройного комплекса Hfq-RydC-*cfa*, подтверждая предположение, что Hfq играет важную роль в позиционировании мРНК и мРНК для оптимального взаимодействия (Dimastrogiovanni *et al.*, 2014).

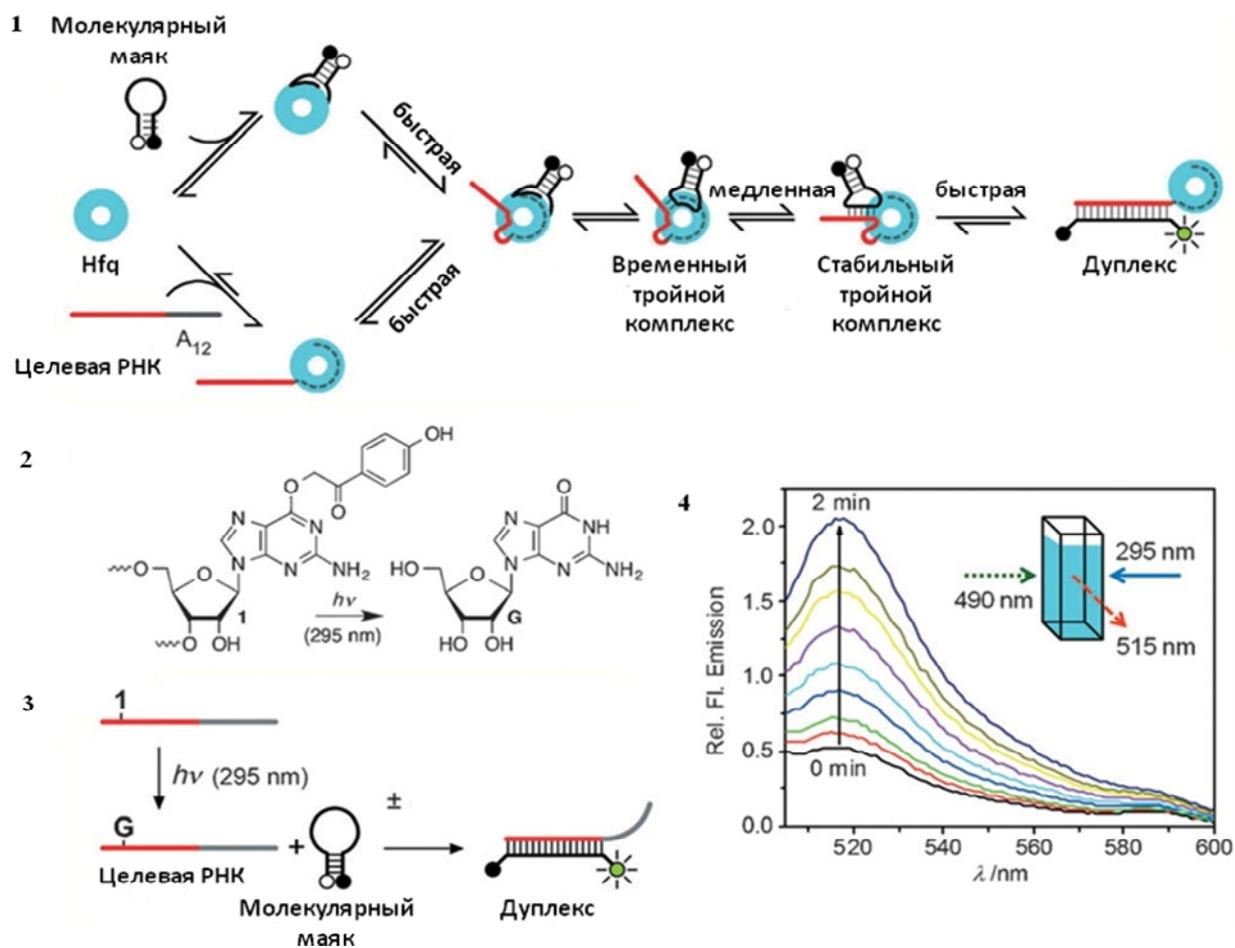


Рис. 16. Фотоактивируемый контроль отжига РНК. (1) Предполагаемая модель для Hfq-опосредованного формирования дуплекса РНК, в которой предполагается непосредственная стабилизация инициаторных комплексов РНК с белком. (2) Конверсия фотоактивируемого гуанозина (обозначен как 1) в гуанозин (G) при УФ-облучении. (3) Целевая РНК не отжигается на комплементарный молекулярный маяк до тех пор, пока не завершится фотохимическая активация. Интенсивность флуоресценции маяка показывает количество образованных дуплексов. (4) Спектры излучения комплексов Hfq – дуплекс после облучения УФ с длиной волны 295 нм (Panja *et al.*, 2015, с изменениями).

Другие исследования показали, что функции бокового РНК-связывающего сайта Hfq выходят за рамки простого позиционирования РНК; он выполняет каталитическую роль при взаимодействии (спаривании) оснований (Panja *et al.*, 2015). Эксперименты по отжигу мРНК-мрРНК с использованием спектроскопии остановленного потока и молекулярных маяков показали, что, в отличие от мутантного белка с делецией трех аргининов, белок дикого типа увеличивает скорость отжига комплементарных РНК в 100 раз, влияя как на энтропийные, так и электростатические барьеры (Panja *et al.*, 2013). Эксперименты, совмещающие использование молекулярного маяка и целевой РНК со вставкой фотозамещенного производного гуанозина в комплементарном участке, позволили оценить спаривание до и после активации производного (рис.16) (Panja *et al.*, 2015). Полученные данные показали, что Hfq уменьшает энергетический барьер образования двойной спирали РНК. Если Hfq протеолитически удалить после стадии инициации формирования дуплекса, то количественный выход двуспиральной РНК снижается (Updegrove *et al.*, 2016).

Один из наиболее интересных и до сих пор не решенных вопросов, касающийся функций Hfq – как данный белок способствует отжигу РНК в условиях присутствия многих тысяч РНК в клетке, а также учитывая минутные рамки жизни мРНК. Поскольку примерное количество гексамеров Hfq на клетку составляет от 400 до 10000, понятно, что во многих стадиях процессинга РНК его количество лимитировано (Wagner, 2013). Недавние исследования субклеточной локализации Hfq и РНК в клетках *E. coli*, дают ключ к решению этого вопроса. Скорость диффузии Hfq в клетке оценивалась путем мониторинга одномолекулярных траекторий (Persson *et al.*, 2013). Эти измерения показали три различных состояния белка с различными константами диффузии. Это свободный несвязанный Hfq (самая быстрая диффузия), Hfq, связанный с РНК и/или другими белками

(промежуточная скорость диффузии) и Hfq, связанный с РНК во время транскрипции и, таким образом, связанный с транскрипционным комплексом (самая медленная диффузия, которая исчезает после того, как транскрипция блокируется рифампицином). Полученные данные показали, что Hfq связывает некоторые РНК по мере их синтеза (Persson *et al.*, 2013). Недавнее исследование, в котором объединили метод smFISH (флуоресцентная гибридизация *in situ* для одной молекулы) с микроскопией высокого разрешения (определение субклеточной локализации молекул РНК), позволило подсчитать одиночные мРНК, мРНК, а также комплексы мРНК-мРНК. На основе этих данных была определена кинетика поиска целевой мРНК *in vivo*, а также кинетика совместной деградации мРНК-мРНК. Оказалось, что скорость ассоциации для образования дуплексов РНК намного меньше, чем скорость их диссоциации (Fei *et al.*, 2015).

Недавнее исследование по моделированию, направленное на изучение эффектов присутствия различных уровней РНК, показало, что при случайном порядке связывания мРНК и мРНК, наблюдаемых ранее, максимальная мРНК-зависимая регуляция возникает только при определенных концентрациях Hfq, которая меняется для разных пар мРНК-мРНК. Слишком малое или слишком большое количество Hfq приводит к субоптимальной активности мРНК, причем последнее приводит к изоляции одиночных комплексов Hfq-мРНК и Hfq-мРНК (Sagawa *et al.*, 2015).

3.3 Функции архейных представителей семейства *Lsm*

Архейные Lsm белки (SmAP) были впервые обнаружены в 1999 году в ходе системного анализа геномов эукариот и архей (Salgado-Garrido *et al.*, 1999). В геномах *Methanobacterium thermautotrophicum* и *Archaeoglobus fulgidus* были найдены по две последовательности различных Sm-подобных белков, в геноме *Pyrococcus horikoshii* – только одна последовательность, а в геноме *M. jannaschii* – ничего (Мурина и Никулин, 2011). Однако позднее в *M. jannaschii* был обнаружен Sm-подобный белок, гомологичный

бактериальным белкам Hfq (Nielsen *et al.*, 2007). Проведенный анализ геномов показал, что в археях закодированы гены одного или двух Sm-подобных белков, которые относятся к двум подсемействам, названных Sm1 и Sm2 (Salgado-Garrido *et al.*, 1999). Последовательности белков семейства Sm1 из разных организмов гомологичны между собой не менее чем на 60%, в то время как последовательности SmAP1 и SmAP2 белков одного организма могут отличаться друг от друга более чем 70% (Törö *et al.*, 2001).

Пространственные структуры архейных белков семейства SmAP1 из *M. thermautotrophicum* (рис.17) (Collins *et al.*, 2001), *P. aerophilum* (Mura *et al.*, 2001) и *A. fulgidus* AF-Sm1 (Törö *et al.*, 2001) показали, что все исследуемые белки формируют тороиды – гомогептамеры с межсубъединичными контактами, аналогичными таковым в димерах эукариотических Sm и в гексамерах бактериальных белков Hfq, что позволило констатировать консервативность структур белков семейства Lsm в процессе эволюции (Мурина и Никулин, 2011).

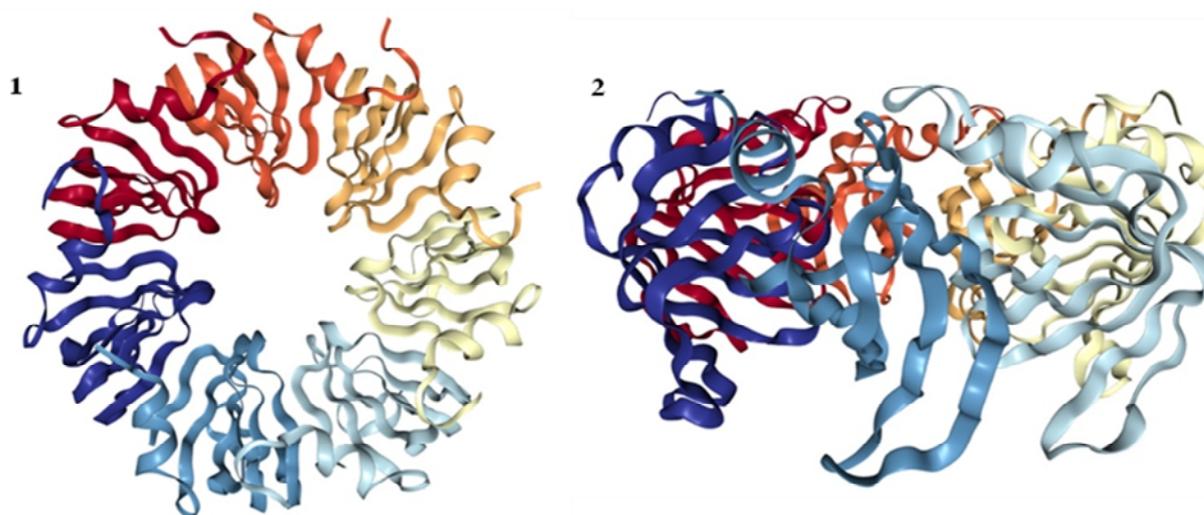


Рис. 17 (1) Кристаллографическая структура SmAP1 из *M. thermautotrophicum*. (2) Вид сбоку. Цветом выделены мономеры белка (Collins *et al.*, 2001, с изменениями).

В 2002 году было показано, что *Archaeoglobus fulgidus* SmAP2 – единственный представитель семейства Lsm, который формирует как гексамеры, так и гептамеры, в зависимости от pH буферного раствора и присутствия РНК (Achsel *et al.*, 2001; Törö *et al.*, 2002). При pH 4,5

практически весь белок находится в олигомерном состоянии, тогда как при рН 8,0 олигомеры белка не образуются. Было предположено, что такое свойство белка Afu SmAP2 можно объяснить контактами остатков Glu19 и Glu23 соседних мономеров (рис. 18) (Törö *et al.*, 2002). При рН>7,0 карбоксильные группы глутаминовых кислот депротонированы, что дестабилизирует олигомерную форму. Понижение рН приводит к протонированию боковых цепей глутамата, тем самым устраняя отталкивание одинаковых зарядов, и образование гексамера становится возможным (Kilic *et al.*, 2006).

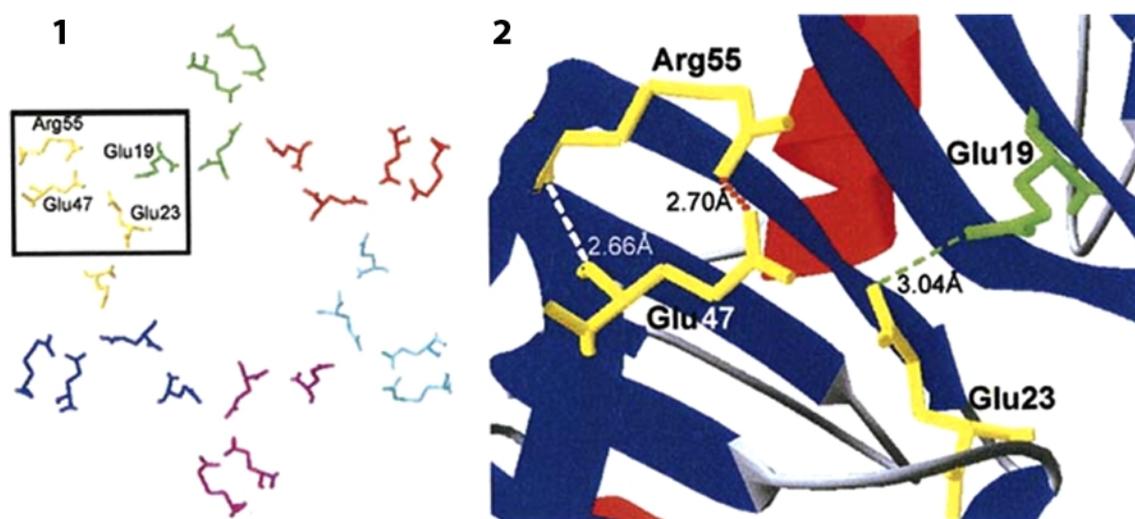


Рис. 18. Пространственное расположение и контакты остатков Glu19/Glu23 и Glu47/Arg55 в гексамере Afu SmAP1 (Törö *et al.*, 2002). (1) Расположение взаимодействующих остатков в гексамере белка Afu SmAP1. Цветом выделены остатки разных мономеров. (2) При рН<7 остатки Glu19 и Glu23 протонируются и образуют водородные связи, которые вносят положительный вклад в стабильность гексамера. Водородная связь показана зеленым цветом. Остаток Arg55 образует солевой мостик (показан красным цветом) с боковой цепью Glu47 и стабилизирует его ориентацию. Главные цепи Arg55 и Glu47 образуют водородную связь (показана белым цветом) (Kilic *et al.*, 2006, с изменениями).

Анализ кристаллической структуры комплекса Afu SmAP1 в комплексе с олиго(У) РНК показал, что уридины взаимодействуют с аминокислотными

остатками в поре гептамера путем образования специфических водородных связей оснований с консервативными аминокислотными остатками белка (рис.19). Эта структура подтвердила специфичность архейных и эукариотических представителей семейства Sm-подобных белков к У-богатым последовательностям. (Tögö *et al.*, 2002).

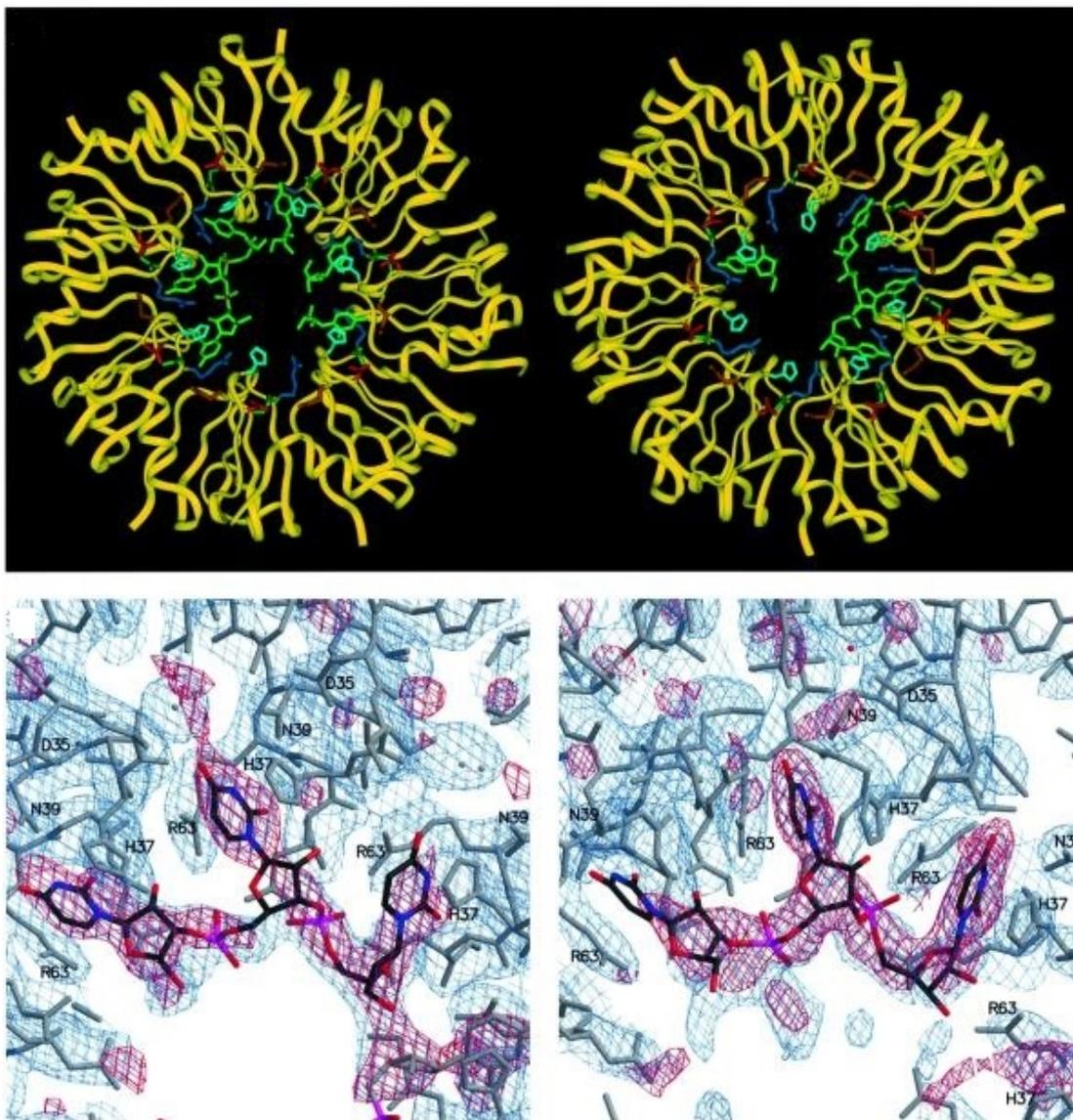


Рис 19. Комплекс Afu SmA1 с РНК U5. Два гептамера Afu SmA1 в асимметричной ячейке (желтые) и связавшиеся олигонуклеотиды (зеленые). Остатки, формирующие уридин-связывающий карман: Asp35 - красный, His37 - голубой, Met38 - коричневый, Asn39 - темно-зеленый и Arg63 - синий (сверху). Фрагмент экспериментальной карты электронной плотности. Плотность для олигоУ-РНК - малиновая, для белка - голубая. Пронумерованы остатки, взаимодействующие с основаниями РНК (снизу) (Tögö *et al.*, 2002, с изменениями).

Несмотря на то, что первые структуры архейных SmAP были получены более 15 лет назад, об их функциях до сих пор известно очень мало. На сегодняшний день имеется лишь несколько экспериментов, направленных на исследования функций архейных SmAP белков в клетке. Для обоих паралофов SmAP из *Archaeoglobus fulgidus* методом ко-иммунопреципитации удалось обнаружить взаимодействие с РНКазой Р (процессирует 5'-концы в пре-тРНК) и с её длинным прекурсором, что предполагает участие белка в созревании этого важного рибозима (Törö *et al.*, 2001). В данной работе также показано, что антитела, специфические для одного белка, могут соосаждаться другим паралогом; это может говорить о потенциальном взаимодействии белков *in vivo* (Mura *et al.*, 2013).

Аналогичная работа была сделана для SmAP белков кренархеи *Sulfolobus solfataricus*. Показано, что Sso SmAP1 и Sso SmAP2 очищаются совместно с белками, участвующими в процессинге РНК, а также с белками экзосомы, участвующей в 3'-5' деградации РНК (Märtens *et al.*, 2017). В частности, таким белком экзосомы является поли(А)-связывающая (дополнительная) субъединица DnaG, которая напрямую связывается с SmAP. Повышение уровня экспрессии обоих белков (DnaG и SmAP) приводит к увеличению растворимой фракции экзосом, что предполагает влияние SmAP на субклеточную локализацию экзосомы в клетке. Повышенная растворимость экзосомы сопровождалась увеличением уровня РНК с удлинёнными поли(А)-хвостами. Полученные данные могут указывать на до сих пор неизвестную функцию SmAP белков в археях (Märtens *et al.*, 2017).

Данными авторами также было показано, что белки Sso SmAP1 и Sso SmAP2 могут связывать как одинаковые РНК, так и специфические субстраты (Märtens *et al.*, 2015). Sso SmAP1 соосаждается в большей степени с интрон-содержащими тРНК, что предполагает его участие в процессинге тРНК и рРНК. Sso SmAP2, по всей видимости, обладает специфичностью к мРНК и, следовательно, может участвовать в регуляции их трансляции.

Такую специфичность авторы объясняют некоторыми структурными отличиями РНК-связывающих сайтов белков, а также отличиями электростатических потенциалов поверхности Sso SmAP1 и SmAP2 (рис. 20) (Märtens *et al.*, 2015).

Недавние исследования по поиску партнеров SmAP у галофильной эуархеи *H. volcanii* методом ко-иммунопреципитации выявили большое разнообразие РНК и белков, однако не дали детального понимания о функциях (Fischer *et al.*, 2010). Также в данной работе было показано, что единственный SmAP белок этой археи необходим для роста клеток. Как и в случае бактериального Hfq, инактивация гена белка ведет к плеiotропным фенотипам и дефектам роста, которые проявляются в зависимости от условий роста. Тем не менее, мутанты *H. volcanii* с делецией SmAP являются жизнеспособными и их фенотип схож с мутантами *E.coli*, нокаутными по гену Hfq (Fischer *et al.*, 2010).

Недавние исследования позволяют судить о большом разнообразии малых нетранслируемых РНК архей. Многие из них могут являться возможными партнерами SmAP. Например, *cis*- и *trans*- антисмысловые РНК, которые могут модулировать посттранскрипционные модификации мРНК, а также фрагментов тРНК, и возможно, изменять эффективность трансляции в ответ на стресс (Gebetsberger *et al.*, 2012; Jäger *et al.*, 2012). Одна из первых регуляторных РНК, которая могла быть кандидатом на взаимодействие с SmAP, найдена в эуархее *Methanosarcina mazei*, однако, как оказалось, данная малая регуляторная РНК не взаимодействует с паралогом SmAP *in vitro* (Jäger *et al.*, 2012).

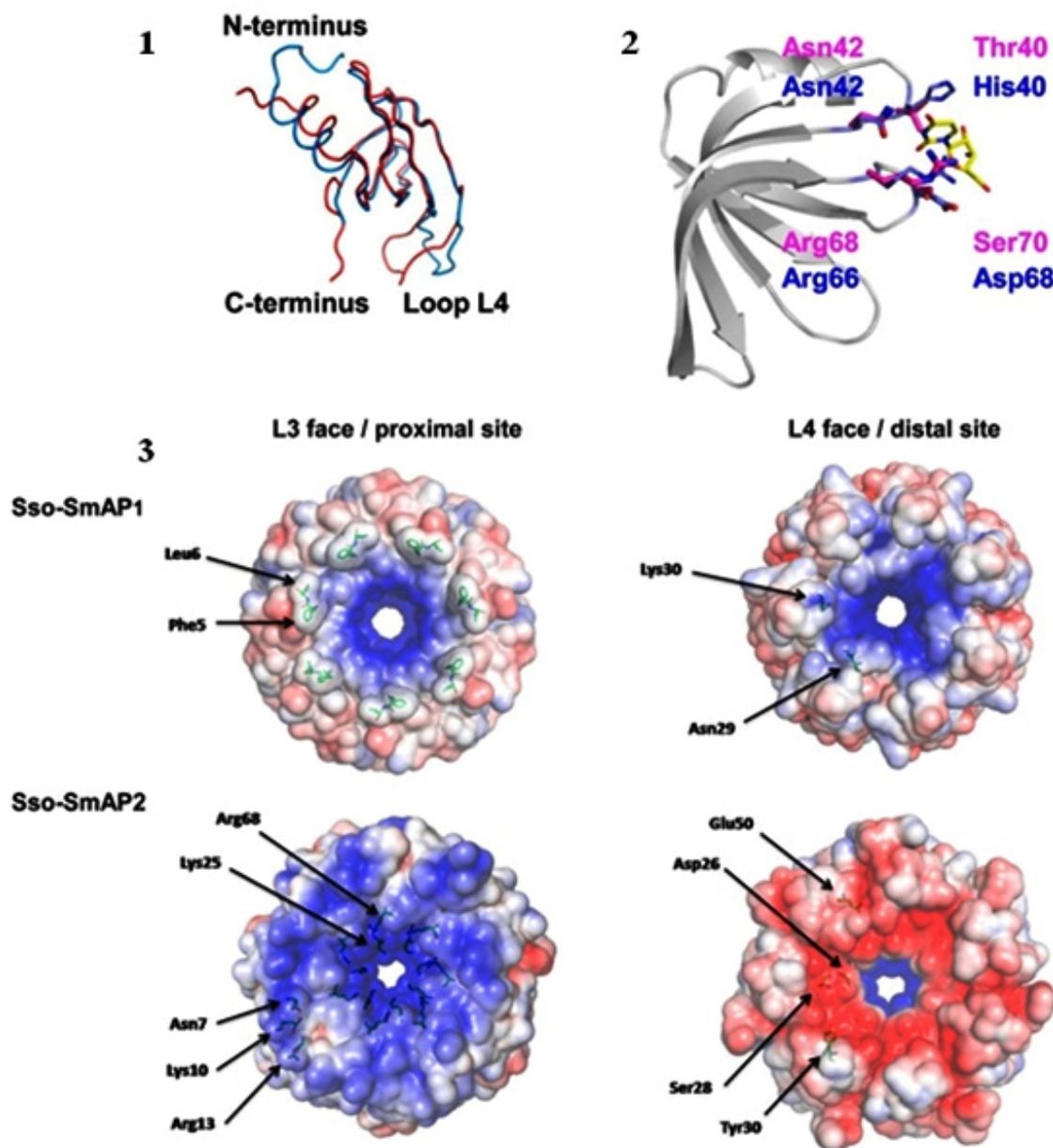


Рис. 20. Сравнение кристаллических структур Sso SmAP2 и Sso SmAP1. (1) Наложение структуры мономеров Sso SmAP1 (синий) и Sso SmAP2 (красный). (2) Положение предполагаемых уридин-связывающих карманов Sso SmAP1 и Sso SmAP2. Консервативные остатки, образующие уридин-связывающий карман белка Afu SmAP1, отмечены малиновым для Sso SmAP1 и синим для Sso SmAP2. (3) Электростатический потенциал поверхностей Sso SmAP1 и Sso SmAP2. Диапазон шкалы от -5 кТ / е (красный) до $+5$ кТ/е (синий). Показано сравнение проксимальной и дистальной поверхностей обоих белков (Märtens *et al.*, 2015, с изменениями).

Как уже упоминалось выше, SmAP обычно имеют четвертичную структуру в виде гомогептамеров (Muga *et al.*, 2003). Обнаружение Hfq-

подобного гексамерного белка SmAP из *M. jannaschii* стало сюрпризом (Nielsen *et al.*, 2007). Авторы даже именуют этот белок «Hfq из *M. jannaschii*». Сравнение структур Mja SmAP, Hfq из *Escherichia coli* и из *Staphylococcus aureus* подтвердило консервативность центральной части белков. Однако Mja SmAP имеет меньшую длину N-концевой α -спирали и полностью deletированную неупорядоченную C-концевую часть по сравнению с белками Hfq (рис. 21). Эти изменения коррелируют с уменьшением диаметра кольца гексамера (Mja Hfq $\sim 54\text{\AA}$, Eco Hfq $\sim 62\text{\AA}$) (Nielsen *et al.*, 2007). Другим важным отличием стала отрицательно заряженная дистальная поверхность Mja SmAP (в Eco Hfq эта область имеет положительный потенциал), что позволило предположить отсутствие характерного для многих бактериальных представителей поли(A)-связывающего сайта на этой стороне гексамера (Mura *et al.*, 2013).

Несмотря на эти структурные и физические различия, исследования *in vivo* показали, что Mja SmAP может частично восстанавливать плеiotропные фенотипы нокаутных по Hfq мутантных штаммов *Escherichia coli* и *Salmonella enterica* (Nielsen *et al.*, 2007; Sittka *et al.*, 2009). Показано, что Mja SmAP взаимодействует с малыми регуляторными РНК и стабилизирует их, а также принимает участие во взаимодействии мРНК и мРНК, причем способен формировать тройной комплекс с мРНК (*sucC*) и малой регуляторной РНК (*Spot42*) *in vitro*. Интересно, что эксперименты по изменению подвижности в геле предполагают, что *sucC* может конкурировать со *Spot42* в РНК-связывающем сайте белка (Nielsen *et al.*, 2007). Такое конкурентное связывание не типично для Hfq, что позволяет предположить фундаментальное отличие механизма формирования тройного комплекса мРНК - Mja SmAP – мРНК от такового комплекса с Eco Hfq. Несмотря на это, имеющиеся данные о функциях Mja SmAP предполагают некоторую степень взаимозаменяемости между архейными и бактериальными ортологами Hfq (Mura *et al.*, 2013).

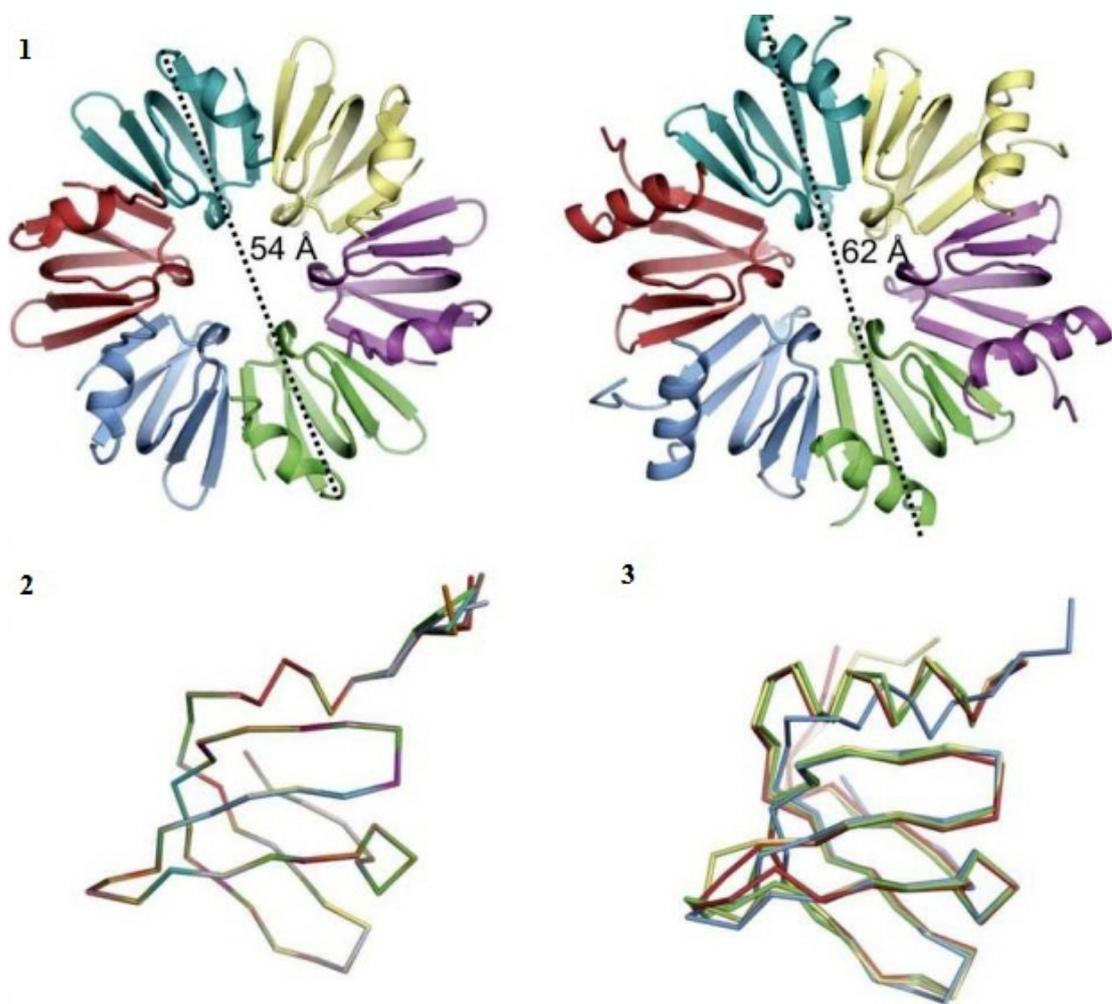


Рис. 21. Кристаллическая структура Mja SmAP. (1) Показана проксимальная сторона гексамеров *M. jannaschii* (слева) и *E. coli* (PDB ID 1HK9, справа). Указаны максимальные диаметры тороидов, 54 Å и 62 Å, соответственно. (2) Наложение всех 12 мономеров Mja Hfq, присутствующих в ассиметричной ячейке. (3) Наложение структур Eco Hfq (красный), Pae Hfq (желтый) и Sau Hfq (зеленый) на Mja SmAP (синий) (Nielsen *et al.*, 2007, с изменениями).

В дополнение к белку Mja SmAP, закодированному в хромосоме, Hfq-подобные белки недавно были обнаружены в четырех плаزمиде *Thermococcus* и трех плаزمиде *Methanococcus* (Krupovic *et al.*, 2013). Предполагается, что они могут представлять новую группу Sm-белков, функция которых связана со взаимодействием с ДНК, поскольку данные белки содержат мотив «цинковый палец C2H2» на N-конце. Для Hfq и SmAP известно, что с ДНК они могут взаимодействовать только неспецифически (Azam *et al.*, 2000; Mura *et al.*, 2003). Функциональные и структурные

исследования этих новых белков могут значительно расширить наше понимание как функций Hfq, так и взаимодействий Hfq/SmAP.

3.4 Существующие гипотезы по функционированию архейных белков SmAP

Археи, как и бактерии, являются безядерными одноклеточными организмами с отсутствием оформленных органелл, однако многие ключевые механизмы клеточного метаболизма у них ближе к эукариотам (Muga *et al.*, 2013). На основе сравнения рибосомных рРНК считается, что археи и эукариоты имели общего предка, который отличался от бактериальных предшественников (Woese *et al.*, 1990). Просуммируем существующие предположения о возможном участии SmAP в клеточных процессах.

Наиболее обсуждаемым вопросом является возможное участие SmAP в процессинге РНК. Одной из возможных ролей архейных Sm белков в клетке является биогенез некодирующих РНК, таких как тРНК, рРНК и мяРНК. У архей, как и у бактерий, нет интронов в генах, кодирующих белки, однако, в генах, кодирующих тРНК и рРНК, они встречаются (Lykke-Andersen *et al.*, 1997). Интроны архейных тРНК обычно расположены в антикодонной петле, а интроны рРНК имеют разное расположение. Некоторые из архейных интронов требуют присутствия специфических белков для процессинга (Sugahara *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2002).

Принято считать, что у архей нет сплайсосомных U мяРНК-подобных частиц, поскольку в их пре-мРНК нет интронов. Обнаружение архейных гомологов белков малого ядрышкового рибонуклеопротеида U3 позволяет предположить наличие у архей механизма процессинга рРНК с участием РНП (Mayer *et al.*, 2001). Также обнаружен некий предшественник интронов мРНК – ген псевдоуридиновой синтазы, модифицирующей тРНК и рРНК (архейный гомолог эукариотического центромеро-связывающего фактора 5, Cbf5b), который содержит интрон, сплайсирующийся *in vivo* (Watanabe *et al.*, 2002). Предполагается, что граница экзон/интрон в данном гене принимает

мотив выпуклость-спираль-выпуклость, которая узнается эндонуклеазами сплайсинга, участвующих в процессинге архейных пре-тРНК и рРНК. Центральная роль Sm белков в эукариотической системе процессинга мРНК предполагает, что в процессинге РНК и у архей SmAP белки могут участвовать в образовании подобных РНП (Mura *et al.*, 2013).

Еще один механизм процессинга РНК, который имеется в эукариотах, и, по всей видимости, сохраняется у архей, включает в себя экзосому – большой комплекс экзонуклеаз, РНК-связывающих белков и РНК-хеликаз, которые опосредуют 3'→5' деградацию мРНК и других РНК (Hartung and Hopfner, 2009). Однако по сравнению с архейными гомологами, эукариотические экзосомы обладают большей композиционной сложностью и включают в себя большее количество гетеромерных субъединиц (Mura *et al.*, 2013).

Другое важное сходство заключается в сходстве архейных и эукариотических РНК- полимераз, а также использование специфического класса некодирующих РНК (малых ядрышковых РНК) для прямых модификаций других молекул РНК (Hirata *et al.*, 2010; Omer *et al.*, 2000). Однако у архей отсутствуют многие опосредованные РНК процессы, такие как формирование сплайсосом и поддержание теломер, в которых Sm белки играют центральную роль (Seto *et al.*, 1999).

Возможная роль SmAP может быть связана с функциями эукариотического домена «Тюдор», который представляет собой 5-членный антипараллельный β-лист и поразительно похож на Sm фолд (Sprangers *et al.*, 2003). Данный домен встречается во многих белках, вовлеченных в метаболизм РНК, например, в комплексе SMN, способствующем сборке Sm белков на малой ядерной РНК. «Тюдор» связывает метилированные остатки субстратных белков, такие как дважды метилированные аргинины эукариотических Sm белков. Функциональная связь и физические взаимодействия данного домена с Sm гетеромерами происходит на ранних стадиях формирования мяРНП. Интересно, что домен «Тюдор» в археях не

был обнаружен. Таким образом, возможное отсутствие системы Тюдор/SMN у архей подразумевает, что SmAP белки отличаются от эукариотических тем, что они не метилируются, либо, они метилируются, следовательно, данные модификации могут возникать через альтернативные пути (Mura *et al.*, 2013).

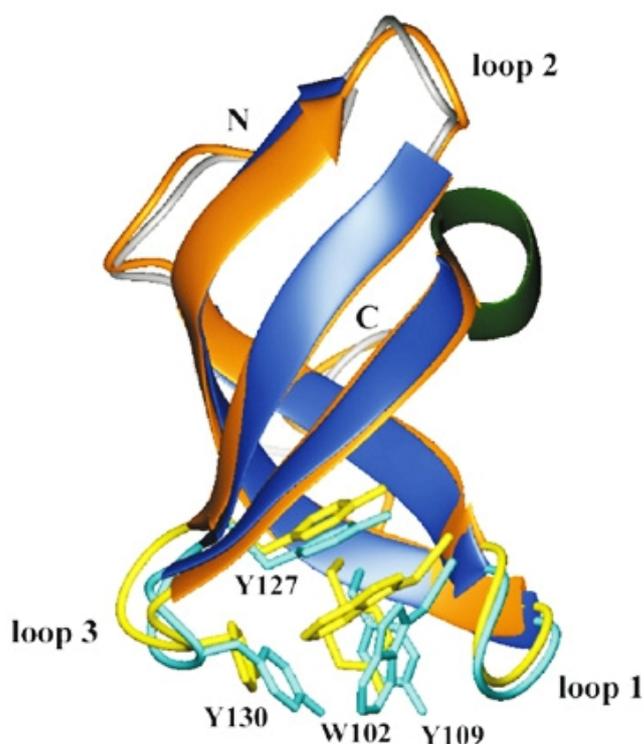


Рис. 22 Структура домена «Тюдор», полученная методами рентгеновской кристаллографии (оранжевый) и ЯМР (синий). Показаны ароматические боковые цепи (в структуре ЯМР – голубым, в кристаллической структуре – желтым) (Sprangers *et al.*, 2003, с изменениями).

Несмотря на все полученные результаты, до сих пор нельзя однозначно сказать, являются ли архейные SmAP белки каркасными белками для формирования мРНК, как Sm белки эукариот, действуют ли как шапероны малых регуляторных РНК, как бактериальные Hfq, или же занимают уникальную эволюционную нишу в биологии РНК (Mura *et al.*, 2013).

ЧАСТЬ II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Глава I. Материалы и приборы

1.1. Химические реактивы и ферменты

Difco (США): бакто-агар, бакто-триптон;

Fermentas (Германия): Т4 ДНК-лигаза;

Fluka (Швейцария): бромистый этидий, аминокислоты;

ЛКВ (Швеция): ксиленцианол;

Merck (Германия): хлористый натрий, хлористый магний, хлористый калий, мочеви́на, полиэтиленгликоль;

Oxoid (Великобритания): триптон, дрожжевой экстракт;

Promega (США): агароза;

Reanal (Венгрия): бромфеноловый синий, ТЕМЕД;

Serva (Германия): акриламид, ДСН, кумасси голубой G-250, МБА, β -МЭ, ЭДТА, спермидин, PMSF;

Sibenzyme (Россия): Taq ДНК-полимераза, сайт-специфические эндонуклеазы – HindIII, Bsp19I, BamHI, NdeI, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты;

Sigma (США): аминокислоты, ацетат натрия, ацетат калия, дитиотрейтол, рибонуклеаза А, толудиновый синий, лизоцим, агароза, БСА, ПСА, сахароза, сульфат аммония, Tris-(гидроксиметил)-аминометан (Tris), дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, силиконирующая жидкость Sigmacote;

Takara (Япония): ИПТГ;

остальные реактивы отечественного производства квалификации ОСЧ и ХЧ.

Хроматографические носители: CM-Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia, Швеция), DEAE-Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia, Швеция), Superdex G-75 (Amersham Pharmacia, Швеция), Butyl-sepharose Toyopearl 650S (Amersham Pharmacia, Швеция), Ni-NTA agarose (Qiagen, США).

1.2. Бактериальные штаммы и плазмиды

Штаммы		
Штамм <i>E. coli</i>	Генотип	Источник
XL1-Blue	$\Delta(mcrA)183 \quad \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \quad endA1 \quad supE44 \quad thi-1 \quad recA1 \quad gyrA96 \quad relA1 \quad lac \quad [F' \quad proAB \quad lacI^qZ\Delta M15 \quad Tn10(Tet^R)]$	Stratagene, США
BL21(DE3)	F ⁻ ompT r _b ⁻ m _b ⁻ (λ cI857 ind1 Sam7 nin5 lacUV-T7gene1) Содержит производное фага λ с геном РНК-полимеразы фага T7 под контролем <i>lacUV5</i> промотора	Stratagene, США

Векторы			
Плаزمида	Устойчивость	Размер	Описание
pET11a-PL	Ампициллин	5,7kb	pET11a, модифицированный (G. Baier LaJolla Institute, California, USA): вставлен полилинкер: BamHI-NotI-XhoI-SalI.
pLacIRARE	Хлорамфеникол	4,9kb	Вектор содержит гены для tRNA ^{Arg} _{AGA/AGG} , tRNA ^{Ile} _{AUA} , tRNA ^{Leu} _{CUA} , tRNA ^{Pro} _{CCC} , tRNA ^{Gly} _{GGA} из <i>E. coli</i> под промотором, индуцируемым ИПТГ
pUBS520	Канамицин	5,4kb	Вектор содержит ген для tRNA ^{Arg} _{AGA/AGG} из <i>E. coli</i> под промотором, индуцируемым ИПТГ.
pProExHTb	Ампициллин	4,8 kb	Вектор несет последовательность из 6 гистидинов и сайт TEV протеазы для его удаления

1.3. Приборы

В работе были использованы фирменные наборы для выделения ДНК – QIAquick® PCR Purification Kit, QIAquick® Gel-Extraction Kit, QIAprep® Spin Miniprep/Maxiprep Kit. Для диализа образцов белка

использовали диализные мембраны на 10 кДа фирмы Serva (Германия). Для фильтрования применяли нитроцеллюлозные фильтры MILLIPORE (США) и стекловолкнистые фильтры GF/A Whatman (Великобритания).

Хроматографические процедуры проводили, используя хроматографические системы хроматографические системы АКТА FPLC (Amersham, Швеция) и АКТА START (GE Healthcare, США);

Для измерения оптической плотности белков и РНК использовали спектрофотометр “Hitachi 150-20” (Япония).

Аmplификацию фрагментов ДНК методом ПЦР осуществляли с использованием амплификатора Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Сингапур).

Электрофоретический анализ образцов белка, РНК и РНК-белковых комплексов осуществляли, используя комплект оборудования для электрофореза Mini Protean II (BIO-RAD, США) и источник питания Biometra P-25 (Biotron, Германия).

Для разрушения клеток использовали ультразвуковой дезинтегратор Sonic Dismembrator 550 (Fisher Scientific, США).

В работе использовали низкоскоростные центрифуги J2-21 (Beckman, США), BR4i (Jouan, Франция), Eppendorf 5415C и Mini Spin (Eppendorf, Германия), ВЛА-200-М (СССР), SA 80 (Scientech, США), термостат MLW УН (MLW, ГДР), термостатированный шейкер innova 4000 (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC, США), ультрафиолетовый трансиллюминатор Cole-Parmer (Cole-Parmer Instrument Company, Франция), магнитные мешалки MM2A (СССР), рН-метр Accumet 20 (Fisher Scientific, США).

Глава II. Методы генной инженерии и микробиологии

2.1. Подимеразная цепная реакция для получения генов белков SmAP из Methanococcus jannaschii, Methanococcus vannielii, Sulfolobus acidocaldarius

Аmplификацию генов исследуемых белков проводили при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) в объеме 50 мкл. Реакционная смесь

содержала однократный буфер для ПЦР, смесь дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) в концентрации 0.2 mM каждого, олигонуклеотид-праймеры (по 0.3 мкМ каждого), Mg²⁺ 1.5 mM, 100 нг хромосомной ДНК и 1-2 единицы Kod Hot Start ДНК-полимеразы. Условия проведения: денатурация ДНК – 20 сек, 95°C; отжиг праймеров – 20 сек, 55°C; синтез ДНК – 60 сек, 70°C; повтор – 30 циклов.

Последовательности всех использованных в работе праймеров приведены ниже. Цветом выделены кодоны инициации и терминации трансляции, требуемые сайты рестрикции подчеркнуты:

Прямые праймеры:

mja_sm 5' -GAATTCCATATGAATAAGCCAGTAAAAAACAGCAACCCAAAGAAAGT-3' ,

mva_sm 5' -GCTCCATGGTGGACACACAA-3' ,

sac_sm 5' -GCTCCATGGAAGCCAAGATAGAAAATC-3' .

Обратные праймеры:

mja_sm 5' CAATATGAATTCCTTAGTATTCTATGTAGTCAATAGCATGTTTAAATACT-3' ,

mva_sm 5' -GGGATAAGCTTTTATAGTGATACGTAAAG-3' ,

sac_sm 5' -GGATAAGCTTTTATTTTTCTTACCCATTATTGA-3' .

Для анализа брали 1/10 объема реакционной смеси и проверяли наличие необходимого продукта с помощью агарозного электрофореза.

Плазмида, несущая ген *Sso SmAP2*, была любезно предоставлена доктором Удо Блези (Венский биоцентр, Австрия).

2.2. Метод сайт-направленного мутагенеза последовательности ДНК

Генетические конструкции с необходимыми мутациями получали методом сайт-направленного мутагенеза (QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit), по рекомендуемой фирмой методике (рис.23). Для получения мутации конструировали олигонуклеотидные праймеры, содержащие необходимую мутацию (выделены цветом).

Прямые праймеры:

Δ15-mja_sm 5' -CTTTAAGAAGGAGATATACATATGAACTTTGAATATGCAAGAAG-3' ,

mja_sm Y68T 5'-GТАТТТАААСАТGСТАТТGАСАССАТАGААТАС-3'.

Обратные праймеры были полностью комплементарны прямым праймерам.



Рис. 23. Схема проведения сайт-направленного мутагенеза. Голубыми кружками обозначены сайты для внесения мутаций в исходной плазмиде (кодирующей ген белка дикого типа), красными кружками обозначены вносимые мутации. Короткими дугами показаны праймеры.

2.3. Электрофорез ДНК в агарозном геле

Электрофорез ДНК в агарозном геле (с концентрацией агарозы 1%) проводили в буфере, содержащем 40 mM Tris-acetate и 1 mM ЭДТА. Электрофорез осуществляли в пластинке геля при напряжении электрического поля около 10 В/см. Вносимый образец содержал 5 частей анализируемого препарата ДНК и 1 часть 6-ти кратного буфера для электрофореза, содержащего 40% сахарозы и лидирующие красители бромфеноловый синий и ксиленцианол. После электрофореза ДНК в геле окрашивали раствором бромистого этидия (1,5 мкг/мл) и анализировали в ультрафиолетовом свете.

2.4. Очистка фрагментов ДНК

Для очистки фрагменты ДНК разделяли при помощи электрофореза в геле 1% или 2% легкоплавкой агарозы. После окрашивания бромистым этидием гель анализировали в ближнем ультрафиолете (356 нм). Зоны геля, содержащие целевые фрагменты, вырезали. Экстракцию образца из геля проводили с использованием фирменных наборов QIAquick®Gel-Extraction Kit в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя.

2.4. Обработка ДНК сайт-специфическими эндонуклеазами рестрикции

Рестрикцию ДНК (продукты ПЦР и плазмидные вектора pET11a-PL и pProExHTb) проводили с использованием сайт-специфических эндонуклеаз (*NdeI* и *BamHI*; *NcoI* и *HindIII*, соответственно) в буферах, поставляющихся вместе с ферментами. Обработку плазмидной ДНК и ПЦР-фрагментов проводили отдельно в объеме 40 мкл в течение 2 часов при температуре 37°C и рекомендуемым фирмой-производителем количеством фермента. Для обработки ДНК сразу двумя ферментами подбирали буфер, в котором оба фермента функционировали со 100% эффективностью. Фермент инактивировали прогревом в течение 20 минут при температуре 65°C, либо 80°C в случае *HindIII*. Для проверки полноты рестрикции отбирали пробу из реакционной смеси и анализировали электрофорезом в агарозном геле.

2.5. Лигирование фрагментов ДНК

Лигазная смесь (20 мкл) содержала лигазный буфер, 1 ед. активности T4 ДНК-лигазы, 100 нг вектора и вставку. Количество вносимой вставки брали в молярном соотношении вектор:вставка = 1:5. Реакцию лигирования осуществляли при 22°C в течение 12 часов. Фермент инактивировали прогревом в течение 20 минут при температуре 65°C. Для последующей трансформации компетентных клеток *E. coli* использовали весь объем лигазной смеси.

2.6. Получение компетентных клеток *E. coli* с использованием хлорида кальция

Компетентные клетки получали согласно методике описанной (Mandel and Higa, 1970) с применением хлористого кальция и ДМСО.

Культуру клеток выращивали при интенсивном перемешивании в 50 мл LB при 30°C до оптической плотности $OD_{590} = 0,4-0,6$. Клетки центрифугировали при 5000g в течение 10 мин. Полученный осадок суспендировали в буфере (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM CaCl₂) (15 мл) и снова осаждали клетки. К осадку клеток добавляли 2 мл охлажденного буфера (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM CaCl₂), а затем 225 мкл ДМСО. Отбирали аликвоты по 100 мкл и замораживали в жидком азоте. Компетентные клетки хранились при -70°C 1-2 месяца без значительного снижения эффективности трансформации.

2.7. Трансформация клеток *E. coli* с помощью метода теплового шока

200 мкл компетентных клеток смешивали с 10-20 нг плазмидной ДНК и оставляли на льду в течение 30 мин. Температурный шок, способствующий увеличению эффективности трансформации, проводили при 42°C в течение одной минуты. После охлаждения во льду (5 мин) клетки ресуспендировали в 0,8 мл среды LB и растили в течение часа при 37°C. После этого клеточную суспензию наносили на чашки с твердой средой LB и антибиотиком для селекции (ампициллин 100 мкг/мл) и инкубировали при 37°C до появления колоний.

2.8. Экспрессия генов SmAP из *Methanococcus jannaschii*, *Methanococcus vannielii*, *Sulfolobus solfataricus* и *Sulfolobus acidocaldarius* в клетках *E. coli*

Для экспрессии в клетках *E. coli* гены SmAP из *M. jannaschii*, *M. vannielii*, *S. solfataricus* и *S. acidocaldarius*, а также их мутантных форм использовали систему Штудиера (Studier *et al.*, 1990). Плазмидами pET11aPL-*mja_sm*, pET11aPL- Δ 15-*mja_sm*, pET11aPL-*mja-sm* Y68T трансформировали штамм *E. coli* BL21(DE3)/pUBS520, плазмидами

pProExHTb-*mva_sm*, pProExHTb-*sso_sm* и pProExHTb-*sac_sm* – штамм *E. coli* BL21(DE3)/pLacIRARE.

В случае белка из *M. jannaschii* и его мутантных форм полученные на чашках колонии засеивали в жидкую среду LB (ампициллин 100 мкг/мл, канамицин 50 мкг/мл). Растили при 37°C, интенсивно перемешивая, до оптической плотности OD590=0.5 ОЕ. Индукцию гена белка осуществляли добавлением в среду 0.5 mM ИПТГ. После добавления индуктора клетки продолжали инкубировать при 37°C три часа, затем центрифугировали при 8000g, 10 мин, 4°C.

Для экспрессии генов белков из *M. vannielii*, *S. solfataricus* и *S. acidocaldarius* полученные на чашках колонии засеивали в жидкую среду LB (ампициллин 100 мкг/мл, хлорамфеникол 10 мкг/мл). Клетки растили при 37°C, интенсивно перемешивая, до оптической плотности OD590=0.5 ОЕ. Индукцию гена белка осуществляли добавлением в среду 0.5 mM ИПТГ. После добавления индуктора клетки растили в течение 12 часов при 20°C, затем центрифугировали при 8000g, 10 мин, 4°C.

Глава III. Биохимические методы при работе с белками

3.1. Выделение и очистка белка SmAP из *M. jannaschii* и его мутантных форм из клеток штаммов-суперпродуцентов *E. coli*

Выделение нативного SmAP из *M. jannaschii*, а также его мутантных форм осуществляли по следующей схеме. Клетки штаммов-суперпродуцентов для Mja SmAP дикого типа и мутантных форм суспендировали в буфере, содержащем 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 M NaCl, 0,25 M MgCl₂ и 5 mM ЭДТА, и разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора (время – 15 мин; пульс – 1 сек; пауза – 2 сек). Лизат центрифугировали в течение 30 мин при 14 000 g и 4°C. Супернатанты белка дикого типа и белка с заменой Y68T прогревали при 82°C в течение 20 мин для удаления термолабильных белков *E. coli*. В случае белка Δ15-Mja SmAP прогрев как стадия очистки не использовался. К супернатантам добавляли

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 1,5 М и наносили на колонку со смолой Butyl-Toyopearl 650S, уравновешенную буфером 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 М NaCl, 1,5 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Для элюции белка использовали градиент хлорида натрия и сульфата аммония от стартового буфера до 50 mM Tris-HCl, pH 8,0. (Табл. 2). Дополнительной стадией очистки для белка $\Delta 15$ -Mja SmAP стала хроматография на носителе CM-sepharose. Фракции, содержащие белок, наносили на колонку, уравновешенную буфером 50 mM NaCl и 50 mM NaOAc, pH 5.5. Для элюции белка использовали линейный градиент хлорида натрия от стартового буфера до 0.8 М NaCl. Фракции, содержащие белок Mja SmAP и его мутантные формы, анализировали с помощью электрофореза в 15% ПААГ в присутствии ДСН и диализовали против буфера, содержащего 0,2 М NaCl и 50 mM Tris-HCl, pH 8.0.

3.2. Выделение и очистка белка SmAP из *M. vanielii* из клеток штаммов-суперпродуцентов *E. coli*

Клетки штаммов-суперпродуцентов суспендировали в буфере, содержащем 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 300 mM NaCl, 15 mM имидазола, 1mM PMSF, 0.1% Triton X-100 и разрушали и разрушали ультразвуком (время – 15 мин; пульс – 1 сек; пауза – 2 сек). Лизат центрифугировали в течение 30 мин при 14 000 g и 4°C. Супернатант наносился на колонку со смолой Ni-NTA agarose для аффинной хроматографической очистки (Табл. 2)

Фракции, содержавшие Mva SmAP, объединяли, концентрировали и переводили диализом в буфер 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM ДТТ, 0.5 mM ЭДТА. К белку для удаления гистидинового хвоста добавляли TEV протеазу в соотношении 100:1 по оптической плотности (A_{280}). Обработка TEV протеазой проводилась в течение ночи при 4°C. После этого препарат прогревали при 65°C в течение 20 мин для инактивации протеазы, а затем центрифугировали при 14 000 g в течение 30 мин при 4°C.

Полученный супернатант концентрировали и наносили на гель-фильтрационную колонку с носителем Superdex G75 (V=120 мл),

уравновешенную буфером 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0. Фракции с Mva SmAP объединяли и концентрировали. Чистоту препарата оценивали с помощью электрофорезом в денатурирующих условиях.

3.3. Выделение и очистка белков SmAP из *S. solfataricus* и *S. acidocaldarius* из клеток штаммов-суперпродуцентов *E. coli*

Выделение и очистку белка SmAP из *S. acidocaldarius* осуществляли по методике, сходной с методикой выделения Mva SmAP. Клетки штаммов-суперпродуцентов суспендировали в буфере, содержащем 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 300 mM NaCl, 15 mM имидазола, 1mM PMSF, 0.1% Triton X-100, 1 mM ДТТ, и разрушали ультразвуком (время – 15 мин; пульс – 1 сек; пауза – 2 сек). Лизат центрифугировали в течение 30 мин при 14 000 g и 4°C. Супернатант наносился на колонку со смолой Ni-NTA agarose для дальнейшей хроматографической очистки (Табл. 2). Как и в случае белка Mva SmAP, для удаления гиститдинового хвоста проводилась обработка TEV протеазой.

Чтобы добиться желаемой чистоты препарата Sac SmAP, дополнительно проводили гель-фильтрацию на смоле Superdex G75, уравновешенной буфером 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM ДТТ. Объем колонки составлял 120 мл, скорость – 0.5 мл/мин, объем фракции – 1 мл. Фракции, содержащие Sac SmAP, анализировали с помощью электрофореза в 15% ПААГ в присутствии ДСН, объединяли и концентрировали.

Выделение SmAP2 из *S. solfataricus* проводилось по методике, представленной в работе (Märtens *et al.*, 2015).

Таблица 2.

Условия хроматографической очистки белков SmAP из *M. jannaschii*, *M. vannielii*, *S. solfataricus* и *S. acidocaldarius* и их мутантных форм, выделенных из биомассы штаммов-суперпродуцентов *E. coli*.

Белки	Условия первой хроматографии	Условия второй хроматографии
<p>Mja SmAP pI 9.74 71 а.о. 8.3 кДа</p> <p>Mja SmAP Y68T pI 9.74 71 а.о. 8.3 кДа</p>	<p>Смола Butyl-Toyopearl 650S (10 мл); скорость 0.5 мл/мин; обратный градиент: V = 150 мл, 1.5 – 0 М сульфата аммония и 1 – 0 М NaCl в 50 mM Tris-HCl, pH 8.0; Vфракции = 3 мл; фракции объединяли, концентрировали и переводили диализом в буфер 0.2 М NaCl и 50 mM Tris-HCl, pH 8.0</p>	
<p>Δ15-Mja SmAP pI 8.03 57 а.о. 6.3 кДа</p>	<p>Смола Butyl-Toyopearl 650S (10 мл); скорость 0.5 мл/мин; обратный градиент: V = 150 мл, 1.5 – 0 М сульфата аммония и 1 – 0 М NaCl в 50 mM Tris-HCl, pH 8.0; Vфракции = 3 мл; фракции объединяли, концентрировали и переводили диализом в буфер 50 mM NaCl, 50 mM NaOAc, pH 5.5</p>	<p>Смола CM-sepharose (10 мл); стартовый буфер 50 mM NaCl и 50 mM NaOAc, pH 5.5; скорость 0.5 мл/мин; линейный градиент: V = 90 мл, 50 – 800 mM NaCl в 50 mM NaOAc, pH 5.5 Vфракции = 2 мл.</p>
<p>Mva SmAP pI 5.71 72 а.о. 8.1 кДа</p>	<p>Смола Ni-NTA agarose (4 мл); скорость 0.5 мл/мин; градиент: V = 90 мл, 20 – 200 mM имидазола в 300 mM NaCl и 20 mM Tris-HCl, pH 8.0; Vфракции = 3 мл; фракции объединяли, концентрировали и переводили диализом в буфер 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM ДТТ, 0.5 mM ЭДТА с добавлением TEV протеазы в соотношении оптической плотности (A280) 1:100</p>	<p>Смола Superdex G75 (120 мл); скорость 0.5 мл/мин; V = 120 мл, 200 mM NaCl и 50 mM Tris-HCl, pH 8.0; Vфракции = 1 мл.</p>

Белки	Первая хроматография	Вторая хроматография
Sso SmAP2 pI 7.83 87 а.о. 9.8 кДа	Смола Ni-NTA agarose (4 мл); скорость 0.5 мл/мин; градиент: V = 90 мл, 15 – 200 mM имидазола в 300 mM NaCl и 20 mM Tris-HCl, pH 8.0; Vфракции = 3 мл; фракции объединяли, концентрировали и переводили диализом в буфер 200 mM NaCl и 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM ДТТ, 0.5 mM ЭДТА с добавлением TEV протеазы в соотношении оптической плотности (A280) 1:100	Смола Superdex G75 (120 мл); скорость 0.5 мл/мин; V = 120 мл, 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM ДТТ; Vфракции = 1 мл.
Sac SmAP pI 8.71 87 а.о. 9.8 кДа	Смола Ni-NTA agarose (4 мл); скорость 0.5 мл/мин; градиент: V = 90 мл, 20 – 200 mM имидазола в 300 mM NaCl и 20 mM Tris-HCl, pH 8.0; Vфракции = 3 мл; фракции объединяли, концентрировали и переводили диализом в 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM ДТТ, 0.5 mM ЭДТА с добавлением TEV протеазы в соотношении оптической плотности (A280) 1:100	Смола Superdex G75 (120 мл); скорость 0.5 мл/мин; V = 120 мл, 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM ДТТ; Vфракции = 1 мл.

3.4. Спектрофотометрическое определение концентрации белков и нуклеиновых кислот

Определение концентраций белков и нуклеиновых кислот проводили по поглощению в ультрафиолетовой области спектра (240 – 340 нм), используя спектрофотометр «Hitachi 150-20». В кювете с длиной оптического пути $l=1$ см измеряли поглощение A разбавленного раствора анализируемого вещества. С помощью основного закона светопоглощения $A=\varepsilon_{\lambda}Cl$ вычисляли концентрацию C (моль/л) вещества. Для этого в расчет брали молярный коэффициент поглощения ε_{λ} ($M^{-1}\cdot cm^{-1}$) в зависимости от природы поглощающего вещества: для белков $\varepsilon_{280}=1340 (\varepsilon_{Tyr}) \cdot \text{количество Tyr в белке} + 5550 (\varepsilon_{Trp}) \cdot \text{количество Trp в белке}$. В случае количественного определения

нуклеиновых кислот руководствовались тем, что раствор, содержащий 1 мг/мл РНК, характеризуется $A_{260}=24$, а для ДНК $A_{260}=20$.

3.5. Электрофоретический анализ белков в ПААГ в присутствии ДСН

Электрофорез белков осуществляли по метододике Леммли с изменениями (Laemmli, 1970) в пластинах геля размером 7x8 см толщиной 0,75 мм в аппарате "Mini Protean II" фирмы Bio-Rad.

Разделяющий гель содержал 15% акриламида (37,5:1), 0,375 М Tris-HCl, pH 8.8, 0,1% ДСН; полимеризация 4 мл раствора осуществлялась при добавлении 1/1000 объема TEMED и 1/100 объема 10% ПСА. Концентрирующий гель содержал: 6% акриламид (37,5:1), 0,125 мМ Tris-HCl, pH 6.8, 0,1% ДСН; полимеризация 2 мл раствора осуществлялась при добавлении 1/1000 объема TEMED и 1/100 объема 10% ПСА. Для электрофореза использовали электродный буфер, содержащий 0,025 М Tris-0,192 М глицин, pH 8.7; 0,1% ДСН.

Буфер для приготовления образцов содержал в 10 мл: 1% ДСН, 0,25% β -меркаптоэтанол, 0,3% глицерина, 0,5% БФС. К образцу добавляли данный забуференный раствор (1/4 объема образца) и кипятили в течение 10 мин.

3.6. Кристаллизация исследуемых белков и их комплексов с рибонуклеотидмонофосфатами

Для кристаллизационных экспериментов использовался метод диффузии паров в висящей капле (Davies and Segal, 1971). В данном методе происходит медленная диффузия паров между 2-3 мкл каплей и 0.4 мл противораствора. Для кристаллизации использовали 24-луночные плашки (VDX greased plates, Hampton Research Corp., USA) и силиконированные 22x0.96 мм круглые/квадратные стеклянные пластины (Hampton Research Corp., USA). Края стаканчика обрабатывали вакуумной смазкой для обеспечения герметичности системы. Кристаллизацию вели при 12 или 22°C.

При подборе условий кристаллизации исследуемых белков и их мутантных форм использовали коммерческие наборы Nuc-Pro 1 и 2, JCSG, Helix.

Для получения нуклеотид-белковых комплексов использовались методы совместной кристаллизации и вымачивания в криорастворе. В случае сокристаллизации раствор белка в буфере для концентрирования смешивали с раствором рибонуклеотида. В конечном растворе присутствовал 10-кратный избыток нуклеотида. Для получения нуклеотид-белковых комплексов методом вымачивания в криорастворе непосредственно перед сбором дифракционных данных белковые кристаллы вымачивали в криорастворе, содержащем индивидуальные рибонуклеотиды. Инкубация проводилась в течение определенного количества времени (3 ч., 4 ч., 12 ч.). В конечном растворе нуклеотиды присутствовали в 4-кратном избытке.

Глава IV. Биохимические методы при работе с РНК и нуклеотидами

4.1. Используемые фрагменты РНК

Для исследования РНК-связывающих свойств исследуемых архейных белков были использованы химически синтезированные РНК, последовательности которых были использованы ранее в работе (Panja *et al.*, 2013):

1. U₆-РНК: 5'GUGGUCAGUCGAGUGGUUUUUU 3',

2. A₁₈-РНК: 5' GUGGUCAGUCGAGUGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 3',

3. олигонуклеотид с фосфатной группой на 5'-конце и с молекулой биотина на 3'-конце:

5' CTCGACTGACCAC –биотин 3'.

4.2. Электрофорез РНК в ПААГ в денатурирующих условиях

Электрофоретический анализ РНК проводили в ПААГ (4% - концентрирующий гель, 15% - разделяющий гель), (соотношение акриламид:N,N'-метиленабисакриламид 19:1). Гель содержал Tris –ацетатный буфер б, рН 7.8, 1 мМ ЭДТА и 8 М мочевины. Образцы растворяли в буфере, содержащем 90 мМ Tris-ацетата рН 7.8, 2 мМ ЭДТА, 8 М мочевины, 0.1% БФС.

Электрофорез проводили в Tris -ацетатном буфере, рН 7.8 с 1 мМ ЭДТА при напряжении 120 В. Электрофоретический анализ останавливали после выхода БФС. После окончания электрофореза РНК в геле окрашивали в течение 3-5 минут при комнатной температуре раствором, содержащим 0.25% толуидинового синего, 5% уксусной кислоты, 10% этанола. Фоновую окраску отмывали в холодной воде.

4.3 Определение средства исследуемых белков к одиночным нуклеотидмонофосфатам по изменению флуоресцентной анизотропии

Эксперименты по анализу анизотропии флуоресценции N-метилантранилоил-меченного аденозина (АМФ-МАНТ) (рис. 24) проводились с использованием кюветы размером 300 × 300 мм в флуоресцентном спектрометре Cary Eclipse (Varian, США), как описано в (Göttle *et al.*, 2007). Перед началом проведения эксперимента готовили исходные растворы нуклеотида с концентрацией 10^{-6} М и белков с максимальной концентрацией 10^{-3} М. Для получения базовой (фоновой) точки в кювете смешивали 2 мкл исходного раствора нуклеотида и 98 мкл буфера 200 мМ NaCl, 50 мМ Tris-HCl, рН 8.0. Затем в кювету добавлялся раствор белка с постепенным повышением концентрации от 10^{-6} М до 10^{-4} М. Флуоресцентную анизотропию в кювете измеряли на спектрофлуориметре при постоянной температуре 22°C. Длина волны возбуждения – 355 нм, длина волны испускания – 448 нм. Для каждой точки прибор делал пять измерений и автоматически рассчитывал среднее значение величины погрешности. В ходе

работы получали три независимые кривые титрования для каждой пары нуклеотид – белок. Константы диссоциации нуклеотидов рассчитывали по зависимости нуклеотид-связанной фракции от логарифма концентрации белка, полученные из кривых насыщения согласно (Hulme and Trevethick, 2010).

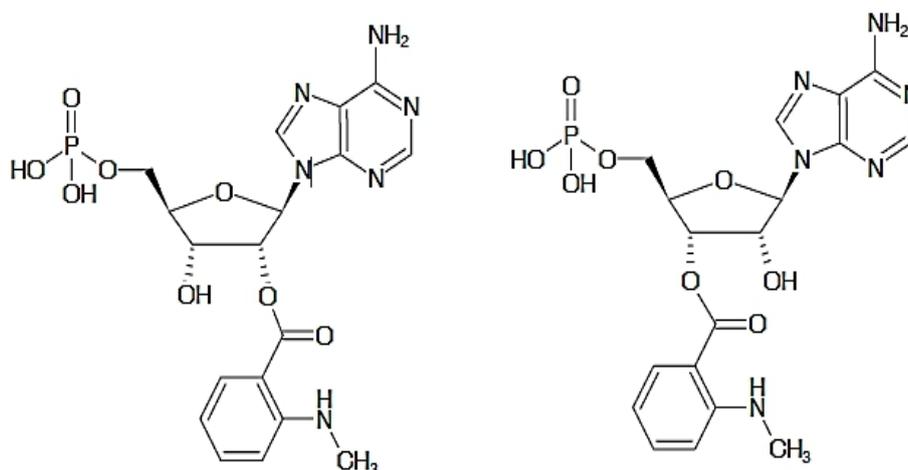


Рис. 24 Химическая структура АМФ-МАНТ (2'/3'-O-(N-метил-антранилоил)-аденозин-5'-монофосфат). АМФ-МАНТ поставляется в виде рацемической смеси 2' и 3'-меченых АМФ.

Глава V. Биохимические методы работы с РНК-белковыми комплексами

5.1. Анализ сродства исследуемых белков к РНК методом поверхностного плазмонного резонанса

Мониторинг взаимодействия исследуемых архейных белков с U_6 - и A_{18} -РНК осуществляли спомощью метода поверхностного резонанса плазмонов (SPR) на приборе ProteOn XPR36 (Bio-Rad, США). Эксперименты проводили при температуре 25°C. Биотинилированные фрагменты ПНК иммобилизовали на сенсорный чип, покрытый авидином. Концентрации белка, соответствующие каждой сенсограмме, различались не менее чем в три раза. Скорость потока жидкости, содержащей белок, составляла 30 мкл/мин. Фаза ассоциации длилась 300 с, а последующая фаза диссоциации –

300–1200 с. По окончании каждого цикла по верхность чипа регенерировали, пропуская через него 0,1% раствор додецилсульфата натрия, чтобы добиться полной диссоциации белка с поверхности РНК. Кинетический анализ проводили, используя четыре–пять сенсограмм для одностадийной реакции с помощью обсчета (по Лангмюру) с коррекцией масс-транспорта. Обсчет каждого набора данных давал нам константы ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d), а также рассчитываемую из них равновесную константу диссоциации ($KD = k_d/k_a$).

5.2. Анализ взаимодействий исследуемых белков с «молекулярным маяком»

Для исследования РНК-шаперонных свойств исследуемых архейных белков были использованы химически синтезированные РНК U_6 -РНК (см. пункт 4.1), а также «молекулярный маяк», последовательности которых были использованы ранее в работе (Panja *et al.*, 2013). «Молекулярный маяк» представляет собой шпилечную структуру РНК, на одном конце которой находится флуорофор FAM, а на другой – гаситель RTQ (рис. 25). Синтез олигонуклеотида осуществлялся фирмой «Синтол» (Россия). В исходном состоянии 5'- и 3'- концы молекулярного маяка сближены, при этом происходит гашение флуоресценции. При его взаимодействии с целевой РНК, имеющей комплементарную нуклеотидам петли последовательность, происходит разворачивание маяка и флуоресценция появляется. Выбранная последовательность петли комплементарна участку U_6 -РНК.

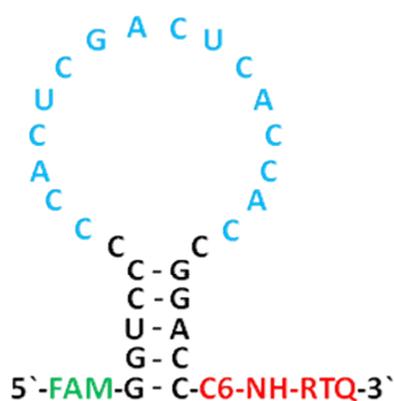


Рис. 25 Структура «молекулярного маяка».

Для проверки взаимодействия «молекулярного маяка» с РНК и белками по отдельности были взяты U_6 -РНК и белки Eco Hfq, Mja Sm, $\Delta 15$ -Mja Sm, Mva SmAP, Sac SmAP. Эксперименты по анализу изменения флуоресценции проводились с использованием кюветы размером 300×300 мм в флуоресцентном спектрометре Cary Eclipse (Varian, США) при постоянной температуре 22°C . Длина волны возбуждения – 496 нм, длина волны испускания – 500 нм. К 200 нМ «молекулярного маяка» в буфере, содержащем 15 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 50 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , добавляли белок (или РНК) с постепенным повышением концентрации от 10^{-9}M до 10^{-5}M . Для каждой точки прибор делал пять измерений и автоматически рассчитывал среднее значение величины погрешности. В ходе работы получали три независимые кривые титрования для каждой пары «молекулярный маяк» – белок (РНК).

Эксперименты по анализу изменения флуоресценции «молекулярного маяка» при взаимодействии с РНК в присутствии или отсутствии белка проводились с использованием белков Eco Hfq, Mja SmAP, $\Delta 15$ -Mja SmAP, Mva SmAP и Sac SmAP. К 100 нМ «молекулярного маяка» в буфере 15 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 50 mM KCl, 5 mM MgCl_2 добавляли сначала белок, а потом РНК в соотношении 1:1. Для каждой точки прибор делал пять измерений и автоматически рассчитывал среднее значение величины

погрешности. В ходе работы получали три независимые кривые титрования для каждой тройки «молекулярный маяк» – белок – РНК.

ЧАСТЬ III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

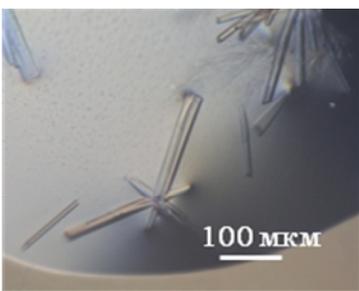
Глава I. Получение и кристаллизация архейных белков семейства Lsm

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 в статье Нильсена (Nielsen *et al.*, 2007). Ген белка SmAP из *M. jannaschii* клонировали в экспрессионный вектор pET11a-PL, наработку белка проводили в штамме *E. coli* BL21(DE3). Во избежание ошибочного включения аминокислот в архейный белок (лизина вместо аргинина) клетки были котрансформированы плазмидой pUBS520 (Calderone *et al.*, 1996). Поскольку архея *M. jannaschii* является гипертермофильным организмом, в качестве предварительной очистки белка мы использовали прогрев лизата при 82°C в течение 20 мин с последующим осаждением термолабильных белков *E. coli* низкоскоростным центрифугированием. Второй стадией очистки стала гидрофобная хроматография, позволившая очистить белок от оставшихся примесных белков и РНК. Белок Mja SmAP был сконцентрирован до 30 мг/мл и переведен диализом в буфер, содержащий 0,2 М NaCl и 50 mM Трис-НСl, рН 8.0.

Таблица 3.

Характеристика кристаллов Mja SmAP

Фотография кристалла	Условия кристаллизации	Параметры
	<u>Противораствор:</u> 50% PEG 200, 0,1M Tris-НСl, рН 8.0 <u>Криопротекторный раствор:</u> 50% PEG 200, 0,1M Tris-НСl, рН 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

Поиск условий кристаллизации был проведен с помощью метода диффузии паров в висящей капле с использованием коммерческих наборов

растворов Nuc Pro (Jena Bioscience, Германия). Кристаллы росли в условиях 50% PEG 200, 100 mM Tris–HCl, pH 8.0 и достигали максимального размера в течение недели (табл. 3). С выращенных кристаллов были сняты наборы дифракционных данных на синхротроне BESSY II (Берлин, Германия) с разрешением 1,4 Å. Сравнение полученной нами структуры белка с определенной ранее структурой (PDB код 2QTX, разрешение 2,5Å, Nielsen *et al.*, 2007) показало минимальное расхождение между ними (рис. 26.2). Основное отличие заключалось в том, что нам удалось идентифицировать дополнительные аминокислотные остатки на N-конце белка по сравнению с предыдущей структурой, а именно Lys12-Val13-Ile14. Это стало возможным из-за стабилизации их положения благодаря контактам с симметричной молекулой гексамера в кристалле.

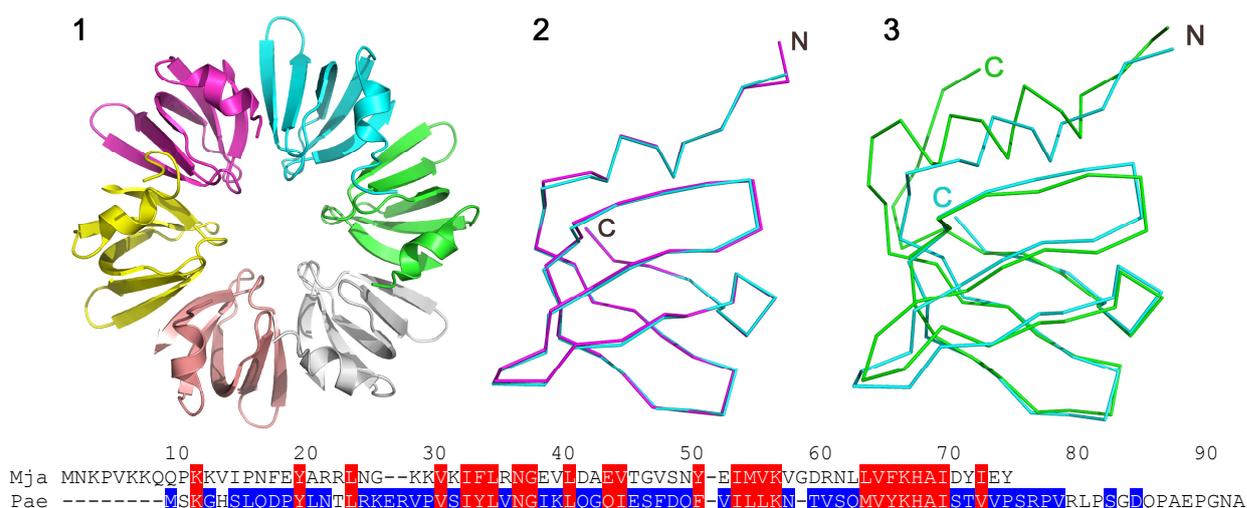


Рис. 26. (1) Общая структура белка SmAP из *M. jannaschii* (PDB 4X9C). Мономеры белка показаны разным цветом. (2) Сравнение пространственной структуры мономеров белков Mja SmAP с разрешением 1,4Å (голубой, PDB 4X9C) и 2,5Å (малиновый, PDB 2QTX). (3) Сравнение пространственных структур мономеров белков Mja SmAP (голубой) и Pae Hfq (зеленый). Внизу приведено сравнение аминокислотных последовательностей этих двух белков.

Следует отметить, что, несмотря на сохранение общей структуры мономера белка, Mja SmAP имеет заметные отличия от бактериальных белков Hfq по своей структуре (рис. 26.3). N-концевая спираль у белка Mja

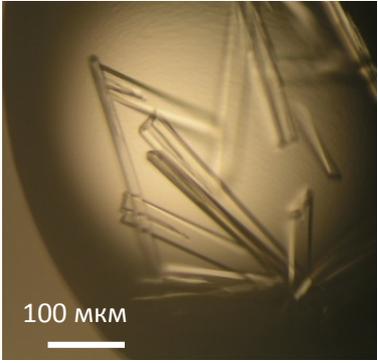
SmAP как бы «растянутая», по сравнению с α -спиралью Hfq и имеет меньшее количество витков. Кроме того, N-концевая часть Mja SmAP имеет большую длину, чем у белков Hfq, имеет больше положительно заряженных остатков, и не имеет жесткой вторичной структуры. Это приводит к тому, что более 10 N-концевых аминокислотных остатков белка не видны в карте электронной плотности. С другой стороны, C-концевая часть Mja SmAP значительно короче, чем в Hfq, в которых именно протяженная C-концевая часть белка неупорядочена.

Ранее мы показали, что белок Hfq из *P. aeruginosa* (Pae Hfq) связывает АТФ, УТФ и ЦТФ в РНК-связывающих участках (Murina *et al*, 2013). Более того, положение оснований и их контакты с белком идентичны таковым в РНК-белковых комплексах. Мы использовали этот метод для идентификации сайтов связывания РНК на поверхности Mja SmAP.

Кристаллы нуклеотид-белковых комплексов получали как путем совместной кристаллизации, так и вымачиванием кристаллов белка в растворе, содержащем соответствующий рибонуклеотидмонофосфат. В первом случае, при кристаллизации в каплю добавляли АМФ или УМФ до конечной концентрации 5 mM. Во втором случае в криораствор добавляли рибонуклеотидмонофосфаты до конечной концентрации 24 mM, а затем в него помещали кристаллы белка и инкубировали их в течение 10-20 часов при комнатной температуре (табл. 4).

Комплекс Mja SmAP-УМФ получен сокристаллизацией в тех же условиях, что и нативный белок. Структура определена с помощью метода молекулярного замещения с использованием структуры нативного белка в качестве исходной модели. В процессе уточнения структуры белка в центральной поре гексамера идентифицированы и вписаны в экспериментальную электронную плотность 6 молекул УМФ (рис. 27).

Характеристика кристаллов Mja SmAP с УМФ

Фотография кристалла	Условия кристаллизации	Параметры
	<u>Противораствор:</u> 50% PEG200, 0,1 М Tris-HCl, pH 8,0 <u>Криопротекторный раствор:</u> 50% PEG200, 0,1M Tris-HCl, pH 8,0	Пространственная группа P2 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

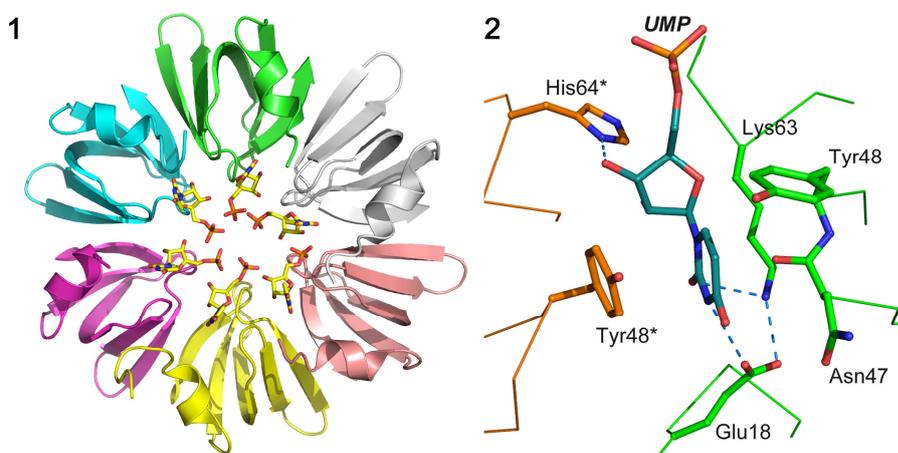


Рис. 27. (1) Общий вид структуры комплекса Mja SmAP с УМФ (PDB 4X9D). (2) Расположение и контакты одной из молекул УМФ в сайте связывания. Оранжевым и зеленым показаны аминокислотные остатки соседних мономеров белка. Синим – молекула УМФ. Пунктирными линиями обозначены водородные связи.

Каждый уридин расположен между двумя Tyr48 (эквивалент Phe42 в Eco Hfq и Pae Hfq) двух соседних мономеров. His64 в Mja SmAP (эквивалент His57 в Eco Hfq и Pae Hfq) 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. Подробное сравнение взаимодействий рибонуклеотидов и РНК с исследуемыми белками будет рассмотрено ниже.

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

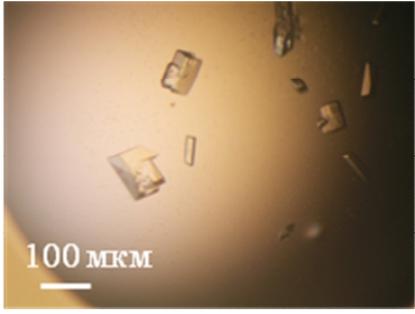
1.2. Выделение и кристаллизация белка SmAP из Methanococcus vannielii и его комплексов с рибонуклеотидмонофосфатами

Ген белка Mva SmAP был первоначально клонирован в вектор pET11a, но такая конструкция не позволила получить препарат белка с чистотой, необходимой для кристаллизации. Поэтому для получения белка было решено использовать 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 $tRNA^{Arg}_{AGA/AGG}$, $tRNA^{Ile}_{AUA}$, $tRNA^{Leu}_{CUA}$, $tRNA^{Pro}_{CCC}$, $tRNA^{Gly}_{GGA}$.

Чтобы получить Mva SmAP в растворимой форме, после добавления индуктора клетки растили при 20°C в течение ночи. Первой стадией очистки белка стала аффинная хроматография на смоле Ni-NTA agarose. Поскольку гистидиновый хвост может мешать кристаллизации белков, его 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 проводили с помощью метода диффузии паров в висящей капле с помощью коммерческих наборов условий Nuc Pro (Jena BioScience, Германия). Наиболее крупные кристаллы белка получены в условиях 30% PEG 400; 50 mM Tris-HCl, pH 8.5; 100 mM KCl; 10 mM MgCl₂ (табл. 5).

Характеристика кристаллов Mva SmAP

Фотография кристалла	Условия кристаллизации	Параметры
	<p><u>Противораствор:</u> 30% PEG 400; 50 mM Tris-HCl, pH 8.5; 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂</p> <p><u>Криопротекторный раствор:</u> 26.6 % PEG 400, 0.19 M CaCl₂, 0.095 M HEPES, pH 7.5, 5% глицерин</p>	<p>Пространственная группа P 1 2₁ 1</p> <p>Параметры ячейки: a=69,67 Å; b=114,22 Å; c=71,99 Å, α= γ=90°, β=113,70°</p> <p>PDB код 5MKI</p> <p>Предел разрешения 2.05 Å</p>

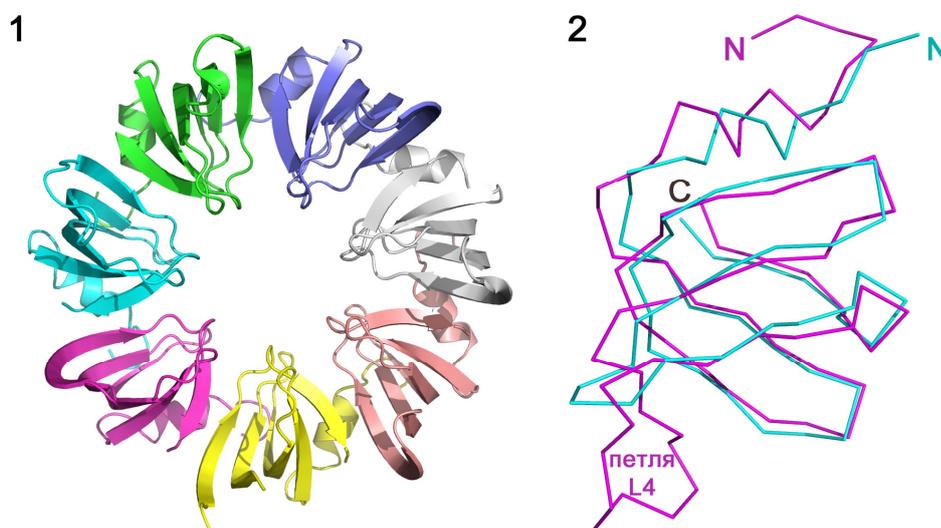


Рис. 28. (1) Структура гептамера белка Mva SmAP (PDB 5MKI). (2) Наложение структуры мономеров Mja SmAP (голубой) и Mva SmAP (малиновый). Обозначены N- и C-концы белков, а также петля L4.

С полученных кристаллов на линии ID23 синхротрона ESRF (Гренобль, Франция) собраны наборы дифракционных данных с разрешением 2.05 Å. Структуру белка определяли методом молекулярного замещения, первоначальной моделью служил гептамер SmAP белка из *Pyrococcus abussii* (PDB 1M8V).

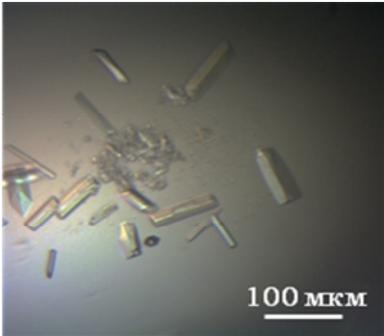
Как и ожидалось, белок формировал гомогептамеры (рис. 28). Мономер Mva SmAP имеет укладку Sm-фолд, состоящий из N-концевой α-спирали и пяти β-тяжей. Взаимодействие соседних мономеров обеспечивается водородными связями между тяжами β4 и β5 соседних мономеров.

Сравнение структур мономеров Mja SmAP и Mva SmAP показало отличие в конформации их N-концов, а также петли L4, которая у белка Mva SmAP гораздо длиннее.

Кристаллы комплексов Mva SmAP с УМФ были получены путем совместной кристаллизации путем добавления рибонуклеотидмонофосфатов до 5 mM в тех же условиях, что и кристаллы нативного белка (табл. 6).

Таблица 6.

Характеристика кристаллов Mva SmAP с УМФ

Фотография кристалла	Условия кристаллизации	Параметры
	<p><u>Противораствор:</u> 30% PEG 400; 50 mM Tris-HCl, pH 8.5; 100 mM KCl; 10 mM MgCl₂</p> <p><u>Криопротекторный раствор:</u> 26.6 % PEG 400, 0.19 M CaCl₂, 0.095 M HEPES, pH 7.5, 5% глицерин</p>	<p>Пространственная группа P 1 2₁ 1</p> <p>Параметры ячейки: a=91,02 Å; b=97,87 Å; c=123,45 Å, α= γ=90°, β=103,70°</p> <p>PDB код 5MKN</p> <p>Предел разрешения 2.55 Å</p>

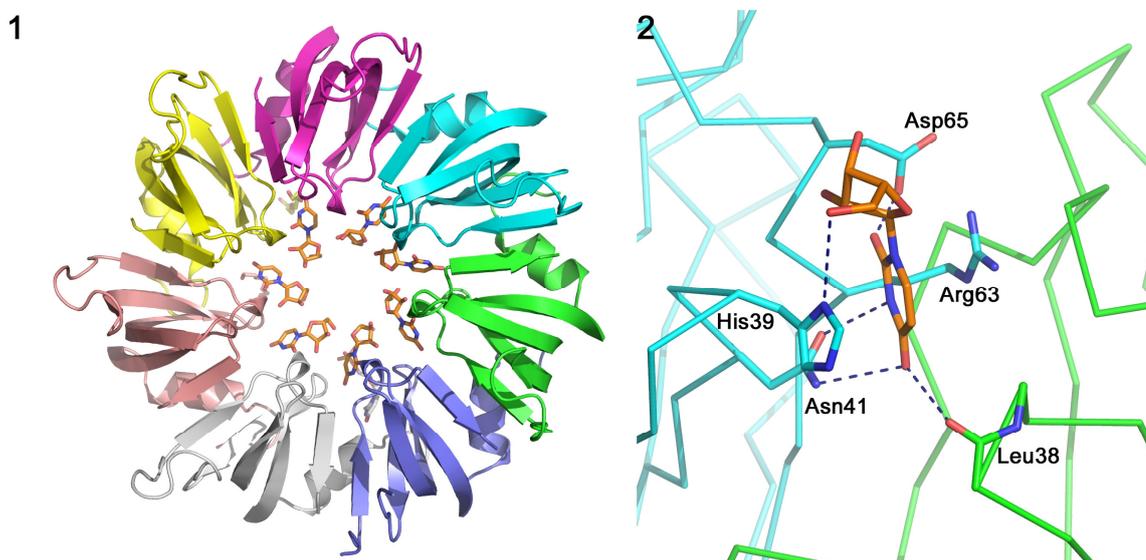


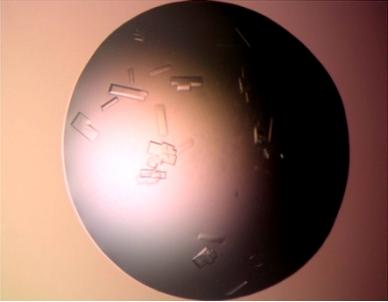
Рис. 29. (1) Структура комплекса Mva SmAP с УМФ (PDB 5MKN). (2) Область взаимодействия УМФ и белка. Оранжевым и зеленым показаны аминокислотные остатки соседних мономеров белка. Голубым – молекула УМФ. Пунктирными линиями обозначены водородные связи.

Структура комплекса Mva SmAP с УМФ определена с разрешением 2,55 Å (рис. 29). Семь молекул УМФ были обнаружены в центральной поре гептамера в уридин-связывающем сайте каждого мономера. Поскольку аминокислотная последовательность консервативного мотива РНК-связывающего сайта SmAP белков отличается от таковой у бактериальных белков Hfq, то и система контактов атомов УМФ и белка претерпела значительные изменения. Основание уридина находится в стекинге 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 Asn41 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.

На основании полученных ранее данных о том, что Hfq связывает ЦМФ в уридин-связывающем сайте, мы решили проверить, могут ли архейные гомологи взаимодействовать с цитидином. Сокристаллизацией были получены кристаллы комплекса Mva SmAP с ЦМФ в тех же условиях, что и кристаллы комплекса белка с УМФ (табл. 7).

Таблица 7.

Характеристика кристаллов Mva SmAP с ЦМФ

Фотография кристалла	Условия кристаллизации	Параметры
	<p><u>Противораствор:</u> 30% PEG 400; 50 mM Tris-HCl, pH 8.5; 100 mM KCl; 10 mM MgCl₂</p> <p><u>Криопротекторный раствор:</u> 26.6 % PEG 400, 0.19 M CaCl₂, 0.095 M HEPES, pH 7.5, 5% глицерин</p>	<p>Пространственная группа P 1 2₁ 1</p> <p>Параметры ячейки: a=71,17 Å; b=86,99 Å; c=84,45 Å, α= γ=90°, β=101,92°</p> <p>PDB код 6FVD</p> <p>Предел разрешения 1.5 Å</p>

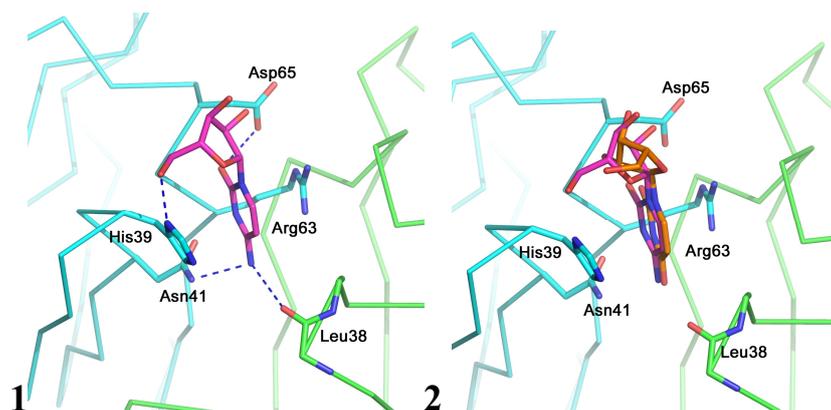


Рис. 30. (1) Область взаимодействия Mva SmAP с ЦМФ. (2) Наложение структуры УМФ (оранжевый) и ЦМФ (малиновый) в области РНК-связывающего сайта Mva SmAP.

Полученные кристаллы 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 (рис. 30). 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 mM) получен не был. Все протестированные варианты в экспериментальных картах электронной плотности не имели неописанных участков, которые могли бы соответствовать молекулам АМФ.

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

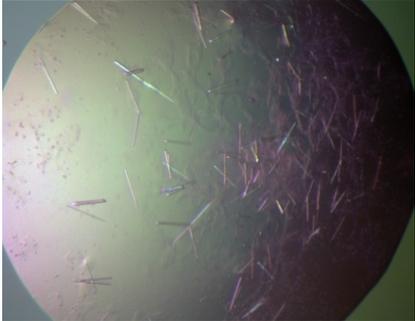
Для сравнения и более полного анализа РНК-связывающих свойств архейных белков семейства Lsm, мы исследовали белки двух кренархей из рода *Sulfolobus* – *S. acidocaldarius* и *S. solfataricus*. Хотя структура белка Sso SmAP2 была определена в 2015, структура комплекса белка с РНК не была получена из-за его низкой стабильности. Мы использовали одиночные рибонуклеотиды для определения мест их связывания.

Плазмида, несущая ген Sso SmAP2, была любезно предоставлена доктором Удо Блези (Венский биоцентр, Австрия). Нарботка и выделение

белка проводили по схеме, представленной в работе (Märtens *et al.*, 2015). Мы получили кристаллы нативного белка и препаратов комплексов с УМФ и АМФ методом совместной кристаллизации в условиях 40 коммерческого набора Index (MDL, Англия) (табл. 8).

Таблица 8.

Характеристика кристаллов белка Sso SmAP2 в присутствии АМФ

Фотография кристалла	Условия кристаллизации	Параметры
	Противораствор: 25% PEG 3350, 0.1 М лимонная кислота, pH 3.5 Криопротекторный раствор: 30 % PEG 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

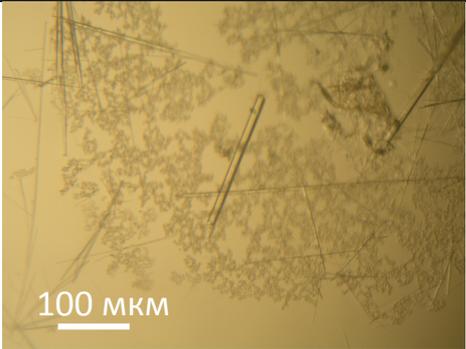
Дифракционные данные с полученных кристаллов собирались на линии BL14.1 синхротрона BESSY (Берлин, Германия). Кристаллы препарата белка Sso SmAP2, полученные в присутствии УМФ, отражали рентгеновские лучи с разрешением 2.9Å, а кристаллы препарата белка, полученные в присутствии АМФ, отражали до 2.6Å. Структуры были определены методом молекулярного замещения с использованием в качестве исходной модели ранее полученной структуры белка (рис. 30.1). В обоих случаях нуклеотиды в расчетных картах электронной плотности обнаружить не удалось.

Как и при получении белка Mva SmAP, ген белка Sac SmAP был первоначально клонирован в вектор pET11a, но такая конструкция не позволила получить нам препарат с чистотой, необходимой для кристаллизации. Поэтому для наработки белка также решили использовать вектор pProExHTb, который несет гистидиновый хвост на N-конце и сайт TEV-протеазы для его удаления. Схема выделения белка была аналогичной использованной для выделения белка Mva SmAP. Единственное отличие заключалось в добавлении ДТТ до конечной концентрации 1 mM, поскольку Sac SmAP содержит по одному цистеину на мономер белка.

Кристаллы белка получены методом диффузии паров в висящей капле в условиях #10 скрина PEG/Ion II (табл. 9). Кристаллы появлялись на третий день при температуре 285К и достигали максимальной длины в течение 10 дней. Палочкообразные кристаллы также были получены в условиях 25 скрина JSCG, но они отражали рентгеновские лучи с меньшим разрешением.

Таблица 9.

Характеристика кристаллов белка Sac SmAP

Фотография кристалла	Условия кристаллизации	Параметры
	Противораствор: 20% PEG 3350, 8% Tascimate, pH 4.0 Криопротекторный раствор: 35 % PEG 3350, 8% Tascimate, pH 4.0	Пространственная группа P 1 Параметры ячейки: $a=31,62\text{\AA}$; $b=133,52\text{\AA}$; $c=135,77\text{\AA}$, $\alpha=86,18^\circ$; $\beta=85,78^\circ$; $\gamma=89,94^\circ$ PDB код 5MKL Предел разрешения 2.1 \AA

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

Общая структура белков Sac SmAP и Sso SmAP очень похожа, среднеквадратичное отклонение по Ca атомам одного мономера составляет не более 1.0 \AA (рис. 31.3). Небольшие отличия между двумя структурами белков рода *Sulfolobus* имеются в положении N- и C-концов, несколько больше отличий имеет конформация петли L4. В целом структуры SmAP белков из *S. solfataricus* и *S. acidocaldarius* похожи на полученную нами

структуру MvaSmAP, однако в нём петля L4 имеет меньший размер и в меньшей степени прикрывает центральную часть белка от растворителя (рис. 31.4).

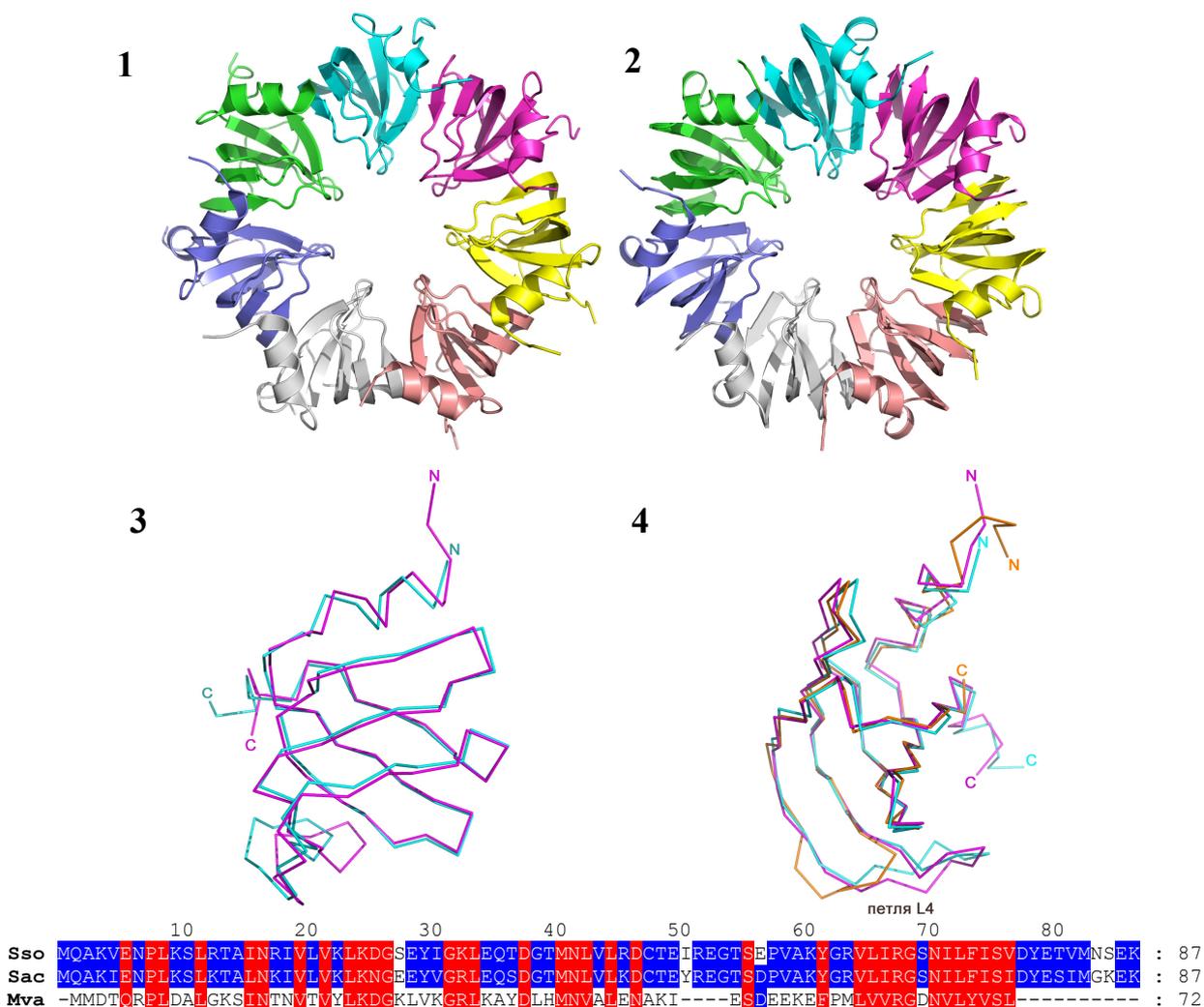


Рис. 31. Структуры SmAP белков из (1) *S. solfataricus* и (2) *S. acidocaldarius*. Наложение структур мономеров (3) Sso SmAP2 (голубой) и Sac SmAP (малиновый); (4) Sso SmAP2 (голубой), Sac SmAP (малиновый) и Mva SmAP (оранжевый). Рисунок (4) развернут на 90° по вертикальной оси относительно (3). Ниже – сравнение аминокислотных последовательностей трёх SmAP белков.

Поскольку инкубировать тонкие кристаллы в растворах рибонуклеотидов невозможно из-за их малых размеров и чувствительности к внешним воздействиям, мы попытались получить кристаллы комплексов белка с рибонуклеотидами совместной кристаллизацией. Такие кристаллы были получены, однако они отражали рентгеновские лучи с низким

разрешением, что не позволило нам определить структуру белков, кристаллизованных в присутствии рибонуклеотидов.

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

Для детального анализа уридин-связывающих свойств бактериальных и архейных представителей семейства Lsm, мы сравнили имеющиеся на данный момент структуры комплексов Hfq и SmAP с УМФ и олиго(У) РНК. Для анализа взяты 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 1I5L), SmAP из *Methanothermobacter thermautotrophicus* с УМФ (PDB 1LOJ). В качестве структуры бактериального гомолога использован комплекс белка Рае Hfq с УМФ (PDB 4PNO). Результаты анализа были применены к полученным нами структурам SmAP белков из *S. acidocaldarius* и *S. solfataricus*.

Белок Hfq специфически связывает уридины в проксимальном сайте связывания в центральной поре гексамера. Основание уридина находится в стэкинге с бензольными кольцами Phe42 двух соседних мономеров, а специфичность узнавания обеспечивается водородными связями между атомами аминокислотных остатков белка и атомами основания: NE2 Gln8 и O2; N4 Gln41 и O1; ND His57 и O2' атомом рибозы. Конформация боковой цепи глутамин стабилизируется ее контактом с консервативным Lys65 (рис. 32.1).

В структуре комплекса Mja SmAP с УМФ каждый уридин расположен между двумя Tyr48 двух соседних мономеров (рис. 31.2). His64 Mja SmAP контактирует с атомом O2' рибозы так же, как His57 Рае Hfq. Он входит в состав консервативного Sm2 мотива [YF]KNAI бактериального консенсуса Lsm белков, который сохраняется в Mja SmAP. Поскольку в Mja SmAP глутамин в 41 положении заменен на более короткий аспарагин Asn47, то

контакт между его боковой цепью и O4 урацила не формируется. Однако водородная связь между N ξ лизина Lys63 Mja SmAP и атомом O2 урацила компенсирует потерю предыдущего контакта. Lys63 также входит в состав Sm2 консенсуса, однако в бактериальных белках Eco Hfq и Pae Hfq он не контактирует с атомами основания, а стабилизирует положение вышеупомянутого Gln41. Замена же глутамин 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). Полученные данные подтверждают сохранение конформации проксимального уридин-связывающего сайта Mja SmAP, несмотря на некоторые структурные изменения в этом участке белка по сравнению с Pae Hfq.

В структуре комплекса Mva SmAP с УМФ нуклеотид также обнаружен в центральной поре гептамера. У эукариот и архей, в отличие от бактерий, Sm2 мотив имеет консенсус RGXX, где XX – заряженные аминокислоты глутамат/глутамин или аспартат/аспарагин, реже – полярные серин или треонин. Основание уридина расположено между боковыми цепями His39 (аналог Phe42 PaeHfq) и Arg63 одного мономера белка, при этом His39 одновременно формирует водородную связь с кислородом O4 рибозы. Боковая цепь Asn41 (аналог Gln41 в Pae Hfq) развернут в противоположную сторону относительно своего гомолога в Hfq и формирует две водородные связи с основанием: ND – O4 и OD – N3. Asp65 формирует еще одну водородную связь с атомом O2 основания. Asp65, как и Arg63, входят в состав Sm2 мотива архей RGXX.

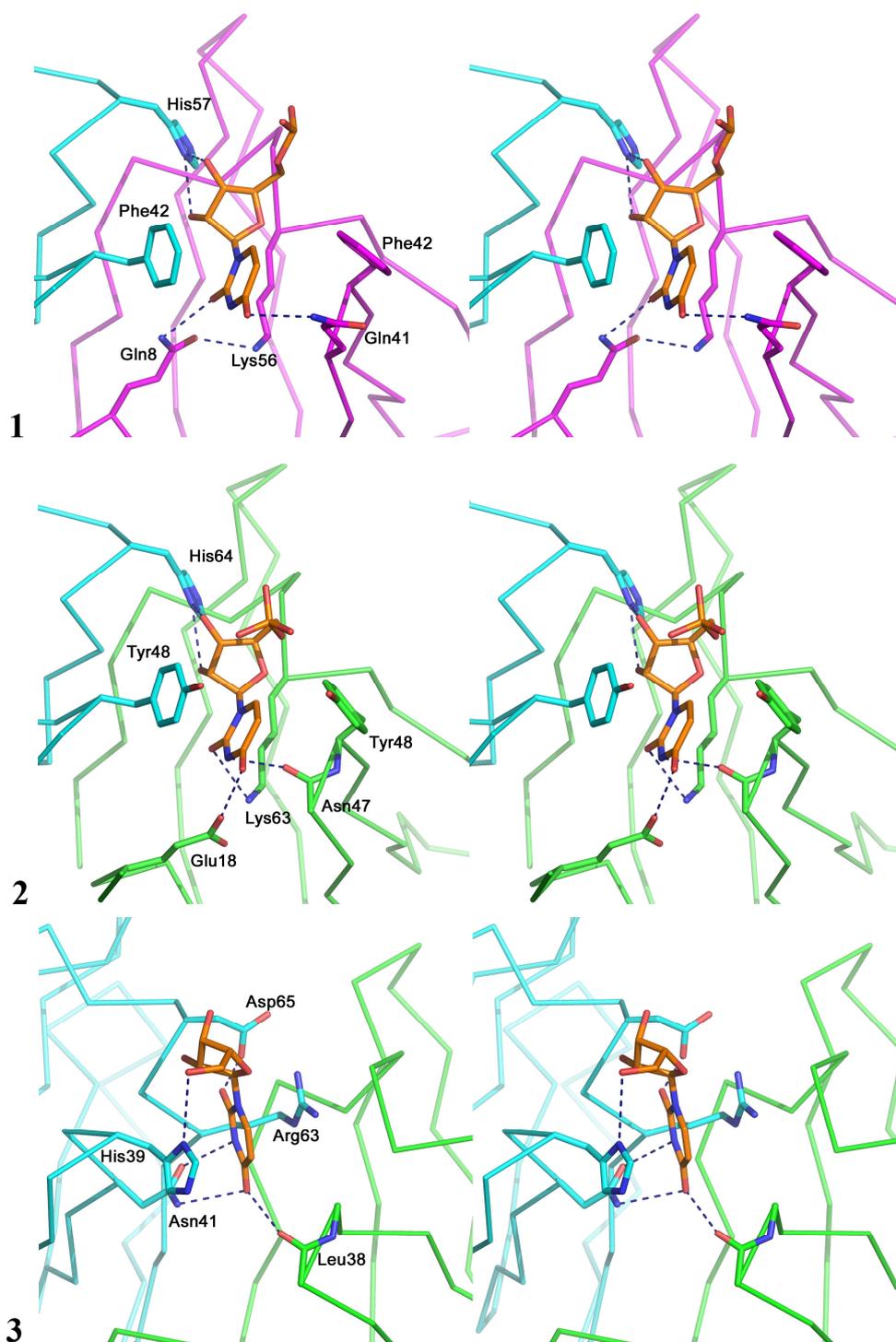


Рис. 32. Сравнение пространственных структур уридин-связывающего участка в белках (1) *Paе Hfq* (PDB 4PNO), (2) *Mja SmAP* (PDB 4X9D) и (3) *Mva SmAP* (PDB 5MKN). Стереопары. Соседние цепи белка показаны голубым и зеленым (для белка *Hfq* – голубым и малиновым), молекула уридинмонофосфата – оранжевым. Синими пунктирными линиями показаны водородные связи между атомами белка и УМФ.

Сравнение структуры уридин-связывающего сайта *Mva SmAP* с его аналогом в *SmAP* белках из *P. abussii*, *A. fulgidus* и *M. thermotrophicus*

показало, что все они сформированы идентичными аминокислотными остатками, которые формируют одни и те же водородные связи. В разных комплексах лишь незначительно меняется положение основания (рис. 33). Кроме того, следует отметить, что в случае гептамерных SmAP белков контакты с основанием уридина формируют боковые цепи аминокислотных остатков только одного из мономеров белка. Это отличает их от гексамерных PaeHfq и MjaSmAP, у которых уридин-связывающий сайт формируется аминокислотными остатками двух соседних субъединиц.

Уридин-связывающие сайты белков Sac SmAP и Sso SmAP2 имеют одинаковую структуру, поскольку аминокислотные остатки в этом участке двух белков идентичные (рис. 34). Однако структура сайта значительно отличается от его структуры в Mva SmAP и других рассматриваемых нами белков (рис. 34). У Sso SmAP2 и Sac SmAP он формируется аминокислотными остатками Thr40 (в Mva SmAP – His39), Asn42 (Asn41), Arg68 (Arg63) и Ser70 (Asp65). Замены His39 на треонин и Asp65 на серин (по сравнению с другими SmAP белками) должно привести к потере возможности формирования нескольких водородных связей с основанием нуклеотида, а значит и к ослаблению связывания. Кроме того, замена His39 на треонин привела к неспособности белка формировать стэкинг-взаимодействия с основанием нуклеотида. Моделирование положения уридинмонофосфата в структуре белка Sso SmAP2 (рис. 34.4), подтвердили наши предположения. На рисунке видно, что, несмотря на наличие аминокислотных остатков, способных формировать водородные связи с нуклеотидом, отсутствие остатков, формирующих стэкинг-взаимодействия с основанием, не позволяет сформировать стабильный комплекс.

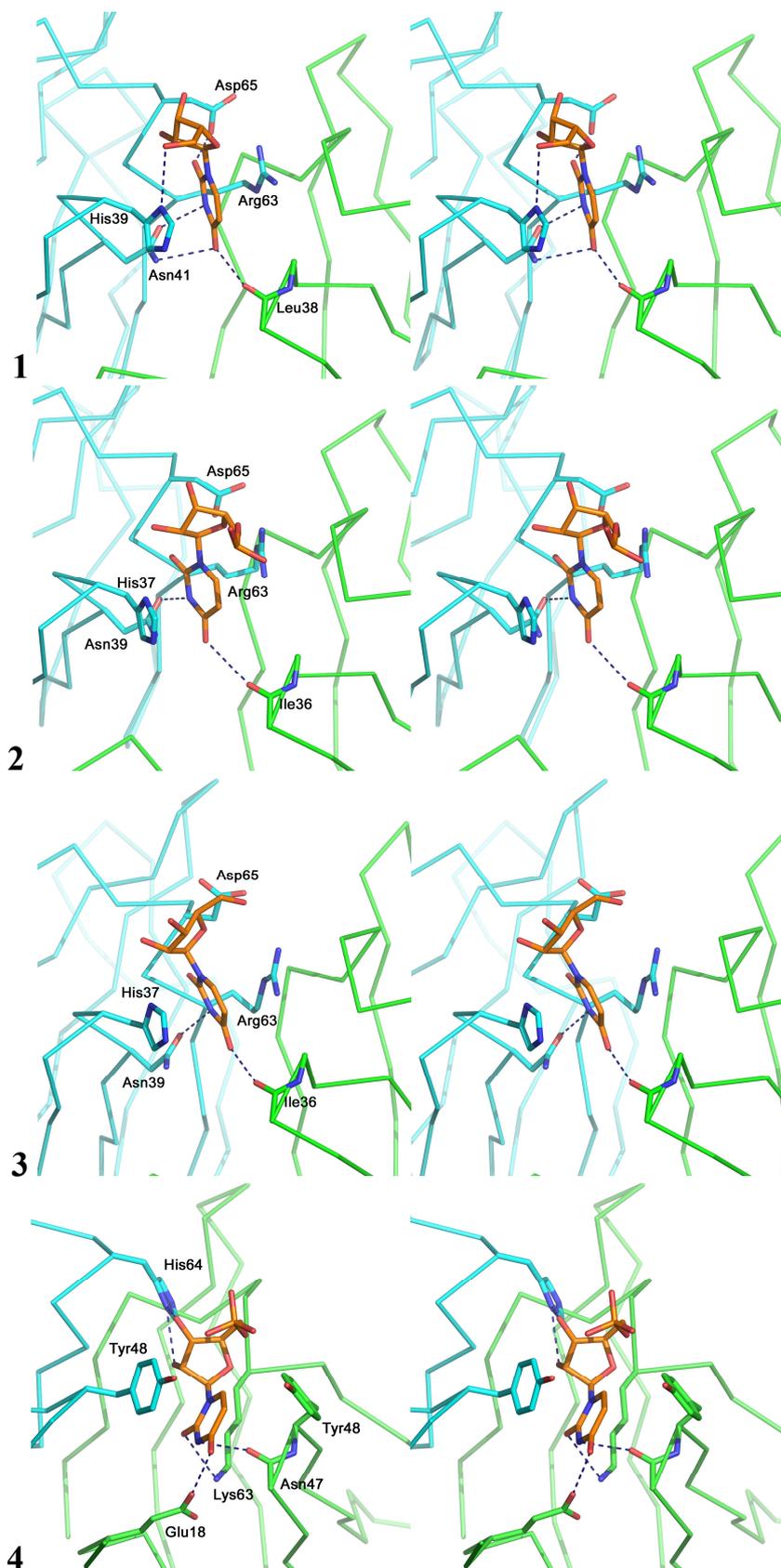


Рис. 33. Сравнение пространственных структур уридин-связывающего участка в SmAP белках из (1) *M. vannielii* (PDB 5MKN), (2) *P. abussii* (PDB 1M8V), (3) *A. fulgidus* (PDB 1I5L) (4) *M. thermautotrophicus* (PDB 1LOJ). Стереопары. Соседние цепи белка показаны голубым и зеленым, молекула уридинмонофосфата – оранжевым. Синими пунктирными линиями показаны водородные связи между атомами белка и УМФ.

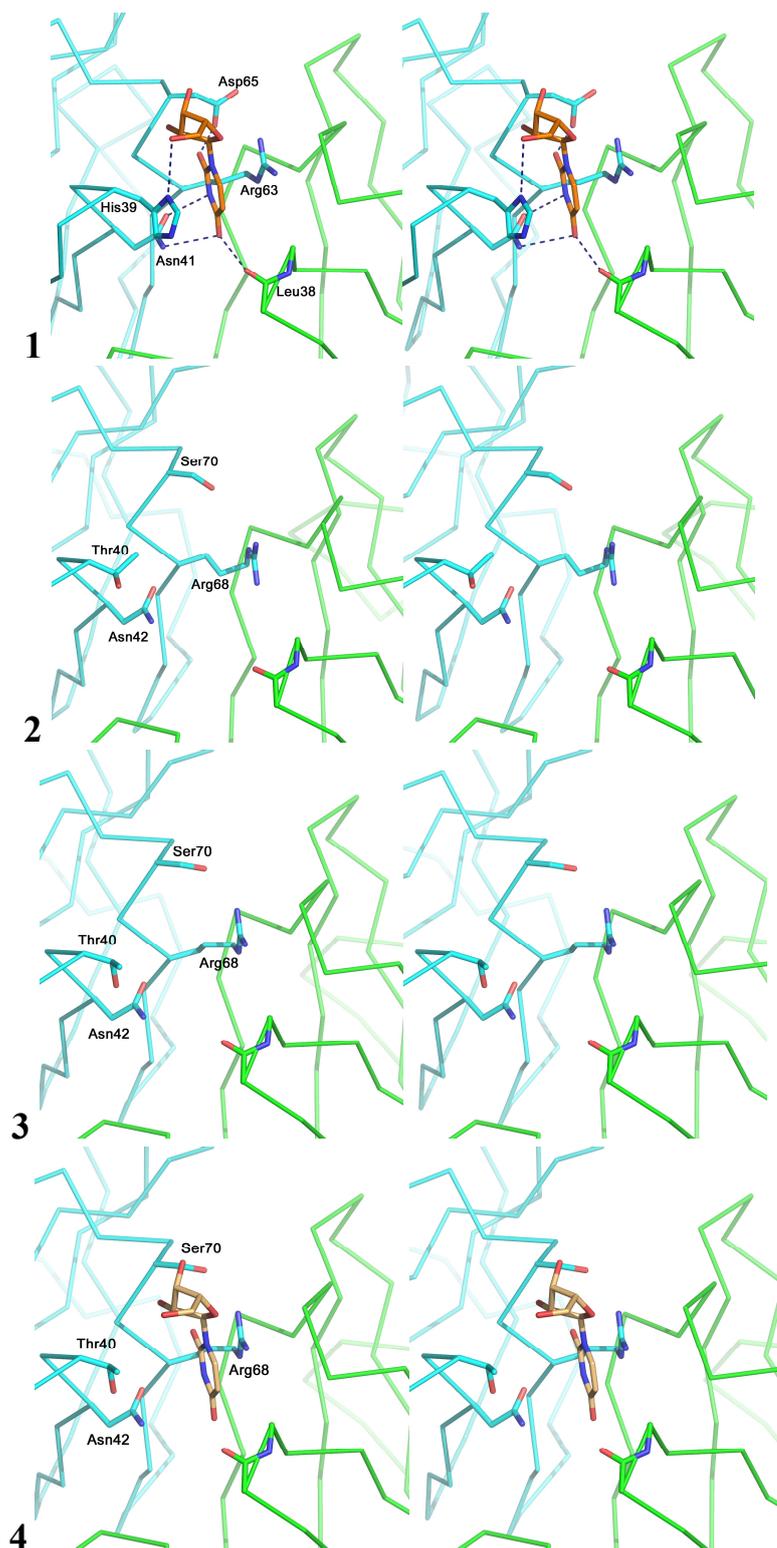


Рис. 34. Сравнение пространственных структур уридин-связывающего участка белка *Mva* SmAP (1) с соответствующим участком в белках *Sac* SmAP (2, PDB 5MKL) и *Sso* SmAP2 (3, PDB 4XQ3). Стереопары. Соседние цепи белка показаны голубым и зеленым, молекула уридинмонофосфата – оранжевым. Синими пунктирными линиями показаны водородные связи между атомами белка и УМФ. (4) Предположительное расположение УМФ (светло-коричневая) в структуре *Sso* SmAP2 белка, смоделированное на основе структур комплексов SmAP белков с УМФ.

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

Сравнение структуры Mja SmAP со структурой Eco Hfq показало, что предполагаемый аденин-связывающий сайт Mja SmAP претерпевает значительные изменения. Аденин-связывающий сайт Eco Hfq располагается в межсубъединичном интерфейсе между двумя соседними мономерами. Адениновое основание образует стэкинг с консервативным аминокислотным остатком тирозина (или фенилаланина) одного мономера и гидрофобным патчем соседнего. В комплексе Eco Hfq с A₁₅ РНК аденин располагается между гидрофобным участком (Leu26, Ile30 и Leu32) и Tyr25 соседнего мономера (рис. 35.1). Остатки Gln52 и Thr61 образуют водородные связи с N6 и N1 атомами основания, обеспечивая специфическое узнавание аденина. Водородные связи между 2'-ОН рибозы и кислородом карбонила фиксируют положение сахара в комплексе. В отличие от Eco Hfq, в Bsu Hfq и Sau Hfq, аденин не проникает так глубоко в расщелину белка, поэтому основание взаимодействует с атомами кислорода боковой цепи треонина и предшествующего серина. В результате Gln52 Bsu Hfq (His53 в Sau Hfq) не могут контактировать с аденином и не участвуют в распознавании основания.

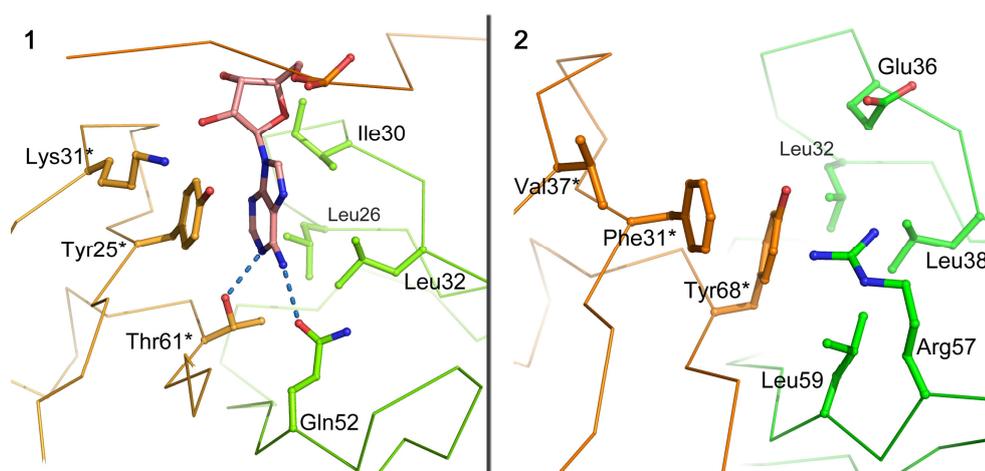


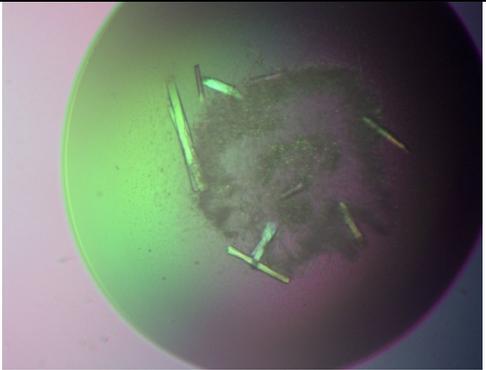
Рис. 35. Сравнение области аденин-связывающего сайта Eco Hfq (1, PDB 3G1B) и соответствующей области Mja SmAP (2, PDB 4X9C).

Предполагаемый аденин-связывающий сайт Mja SmAP сильно изменен по сравнению с бактериальным. 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 располагается в том месте, в котором расположен аденин в комплексе Eco Hfq-A15, что должно стерически мешать связыванию, а положение боковой цепи тирозина дополнительно стабилизировано водородной связью с азотом боковой цепи Arg57.

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 была 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 B2 коммерческого набора Nuc Pro2 (32% PEG 4000, 100 mM Tris-HCl, pH 8.5, 5% глицерин) с помощью метода диффузии паров в висящей капле (табл. 10).

Таблица 10.

Характеристика кристаллов белка Mja SmAP Tyr68Thr

Фотография кристалла	Условия кристаллизации	Параметры
	Противораствор: 32% PEG4000, 100 mM Tris-HCl, pH 8.5, 5% глицерин. Криопротекторный раствор: 25.5% PEG4000, 15% глицерин, 85 mM Tris-HCl, pH 8.5, 170 mM 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

Анализ полученных дифракционных данных показал, что пространственная группа кристалла $P 1 2_1 1$, в асимметричной части ячейки находятся два гексамера. Структура была определена с разрешением 1.6 Å и оказалась идентична структуре белка дикого типа за исключением замены Tyr68Thr. Для получения комплекса Mja SmAP-AMФ полученные кристаллы вымачивались в криорастворе, содержащем 24 mM AMФ в течение нескольких часов. После трех часов инкубации ни одна молекула AMФ не связалась. После 9 часов вымачивания в структуре белка была идентифицирована одна молекула AMФ в двух гексамерах белка с невысоким коэффициентом замещения – до 0,6. (Коэффициент замещения (по-английски – occupancy) показывает, в какой доле ячеек всего кристалла может присутствовать молекула лиганда. В данном случае величина 0,6 означает, что молекула AMФ наблюдается не более чем в 60% молекул кристалла). Она была найдена в центральной поре Mja SmAP, в уридин-связывающем сайте (рис. 36). Аналогичное положение аденина ранее было обнаружено в структурах комплексов AU5G-Sau Hfq (Schumacher *et al.*, 2002) и ADPNP-Pae Hfq (Murgina *et al.*, 2013). В ходе определения структуры были найдены 2 дополнительные молекулы AMФ в уридин-связывающих сайтах других мономеров в соответствии с некристаллографической симметрией также с очень невысоким коэффициентом замещения. Мы не можем утверждать, что Mja SmAP связывает AMФ в уридин-связывающем сайте функционально, поскольку такой комплекс был получен в присутствии очень высокой концентрации AMФ. Поскольку ни в одной из молекул белка AMФ не был обнаружен в предполагаемом аденин-связывающем сайте при замене Tyr68Thr, то можно утверждать, что проведенная замена не повлияла на связывание AMФ.

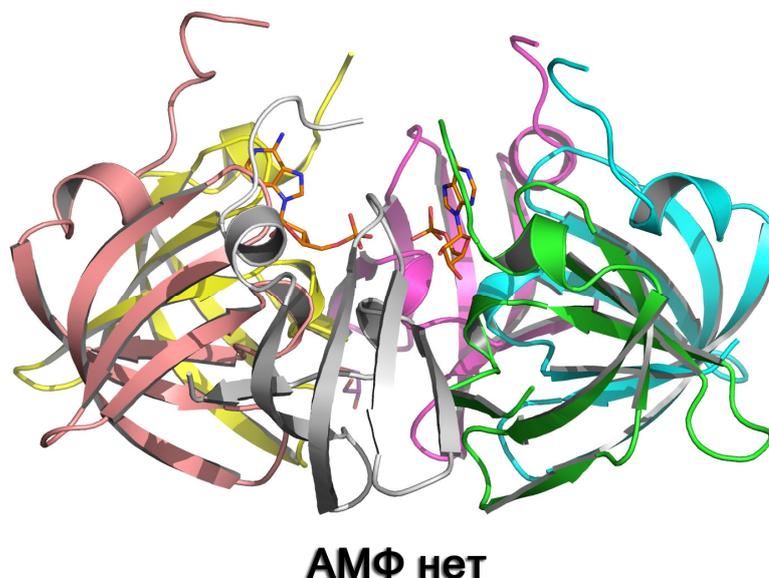


Рис. 36. Структура одного из двух гексамеров белка Mja SmAP Tyr68Thr в комплексе с АМФ в уридин-связывающем сайте белка.

Попытки получить комплексы других SmAP белков с АМФ не увенчались успехом. Сравнение структур SmAP белков со структурой комплекса Eso 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. 37). 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 коровой части белка РНК или рибонуклеотиду (рис. 38).

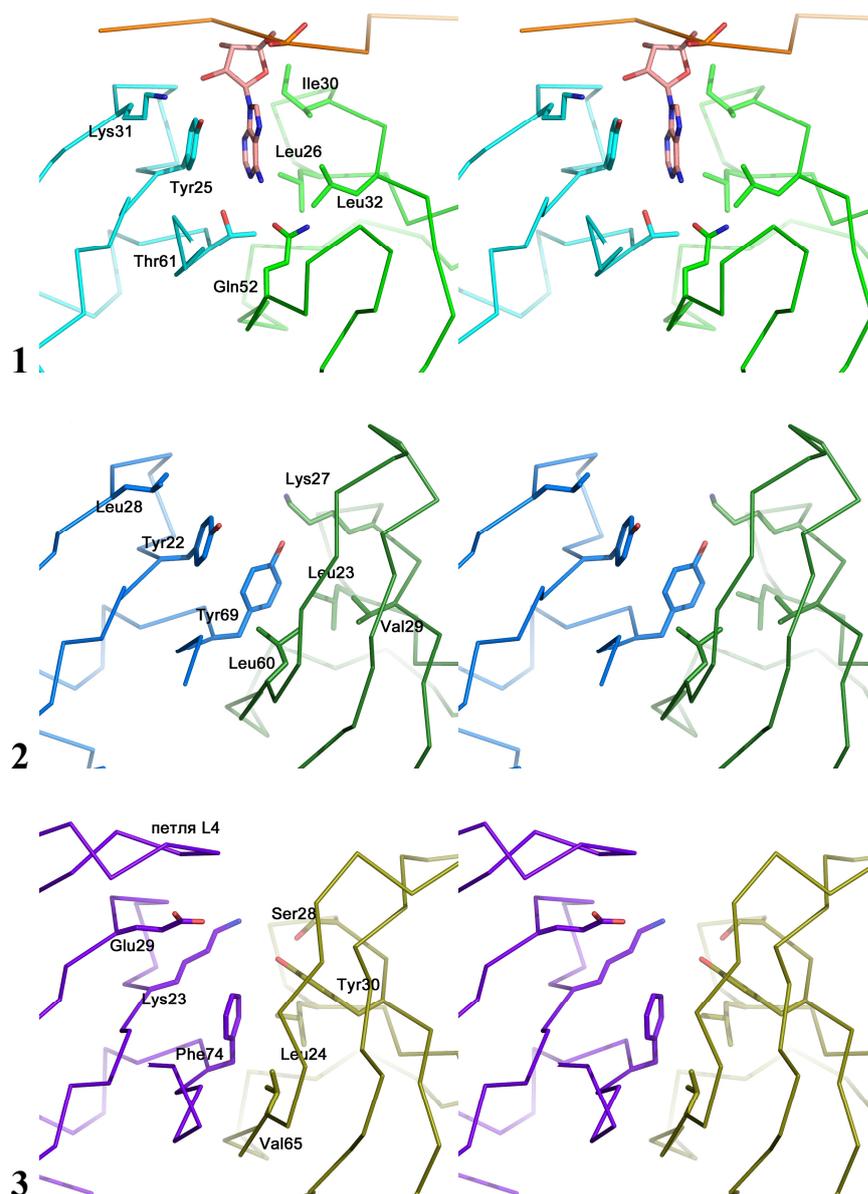


Рис. 37. Сравнение пространственных структур области аденин-связывающего участка белка *E. coli* Hfq в комплексе с олиго(A) РНК (PDB 3GIB) (1) и соответствующих участков в *Mva* SmAP (2, PDB 5MKL) и *Sso* SmAP2 (3, PDB 4XQ3). Стереопары. Соседние цепи белка показаны синим и зеленым. В структуре *E. coli* 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.

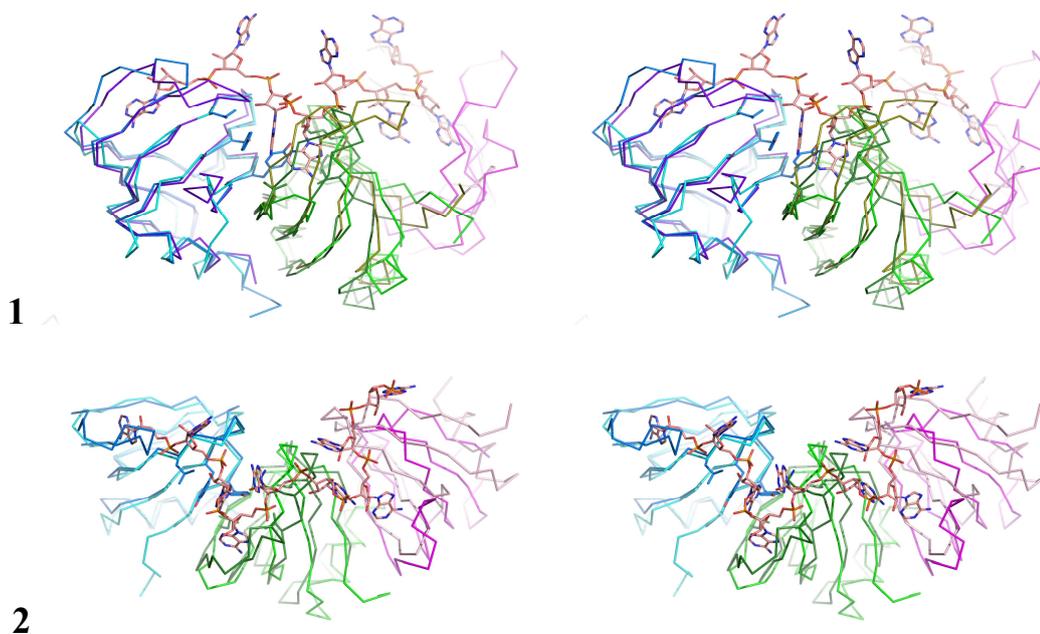


Рис. 38. Наложение структуры Mva SmAP на структуру комплекса Eco Hfq – олиго(A) РНК. Стереопары. (1) Вид с торца гексамера. (2) Вид сверху. Показаны три соседних мономера белка: для Eco Hfq – голубым, зеленым и розовым, для Mva SmAP – синим, тёмнозеленым и малиновым.

Глава IV. Анализ взаимодействия исследуемых белков семейства Lsm с аденозинмонофосфатом, меченым флуорофором МАНТ

Нам не удалось получить комплексы исследуемых архейных белков с аденозинмонофосфатом, поэтому мы решили измерить сродство АМФ к исследуемым белкам. Ранее мы попытались использовать часто применяемый в таких случаях метод изотермической титрационной калориметрии (ИТС), однако титрование растворов белков растворами АМФ, АТФ и УМФ давало кривые титрования с высоким уровнем шума, что не позволило оценить и рассчитать K_D . Данные эксперименты проводили в двух разных независимых лабораториях с одинаковым отрицательным результатом. Поэтому мы решили проанализировать нуклеотид-белковые взаимодействия с помощью изменения анизотропии флуоресценции АМФ-МАНТ. В этом нуклеotide к АМФ присоединена флуоресцирующая N-метилантраноильная группа через 2'- или 3'- кислород рибозы. Для

проведения эксперимента использованы исходные растворы нуклеотида с концентрацией 10^{-6} М и белков с максимальной концентрацией 10^{-3} М. К раствору флуоресцентно-меченого нуклеотида добавляли раствор белка с постепенным увеличением его концентрации в кювете. В ходе работы получали три независимые кривые титрования для каждой пары нуклеотид – белок. Константы диссоциации нуклеотидов рассчитывали по зависимости нуклеотид-связанной фракции от логарифма концентрации белка, полученные из кривых насыщения.

Для анализа были выбраны белки Mja SmAP, Mva SmAP, Sac SmAP и Sso SmAP2, а также мутантная форма белка Mja SmAP с заменой Y68T. В качестве положительного контроля использовали белок Eco Hfq, для которого известна структура комплекса с АМФ. В качестве контроля использовался лизоцим, поскольку он заряжен положительно и может обладать неспецифическим сродством к отрицательно заряженным нуклеотидам.

На рисунках 39 и 40 представлены кривые титрования растворов нуклеотидов исследуемыми белками и зависимость доли связанного нуклеотида от логарифма концентрации исследуемых белков для АМФ-МАНТ. Полученные данные (табл. 11) позволили показать, что белок Mja SmAP имеет на порядок меньшее сродство к АМФ, чем бактериальный белок Hfq. Это приводит к неспособности белка формировать стабильный комплекс с АМФ в условиях кристаллизации. Мутантный белок с заменой Tyr 68 на Thr 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 область белка Mja SmAP, соответствующая аденин-связывающему сайту белка Hfq, не связывает АМФ.

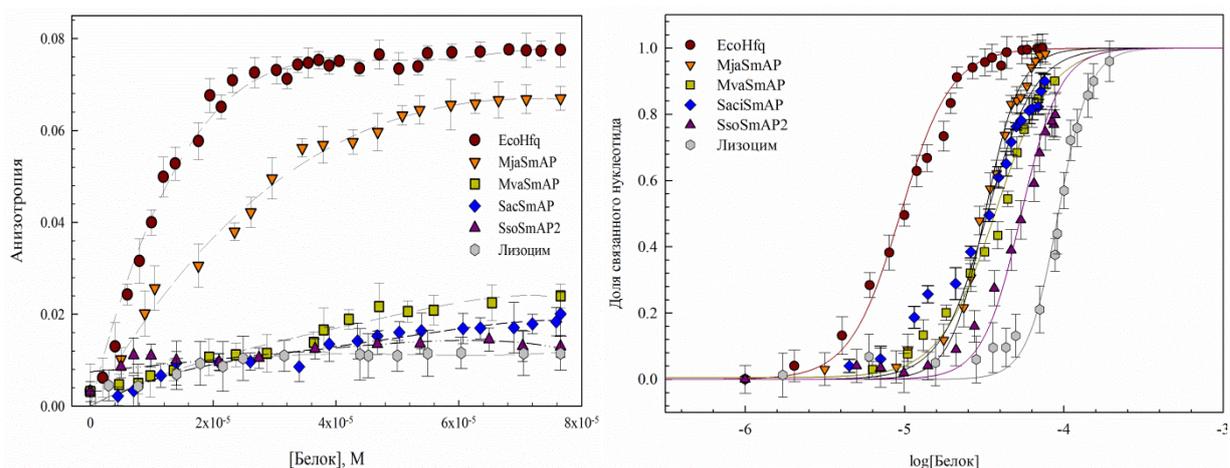


Рис. 39. Кривые титрования раствора АМФ-МАНТ исследуемыми белками (слева). Доля связанного нуклеотида в зависимости от логарифма концентрации белка для АМФ-МАНТ при связывании с Eco Hfq, Mja SmAP, Mva SmAP, Sac SmAP, Sso SmAP2 и лизоцимом (справа).

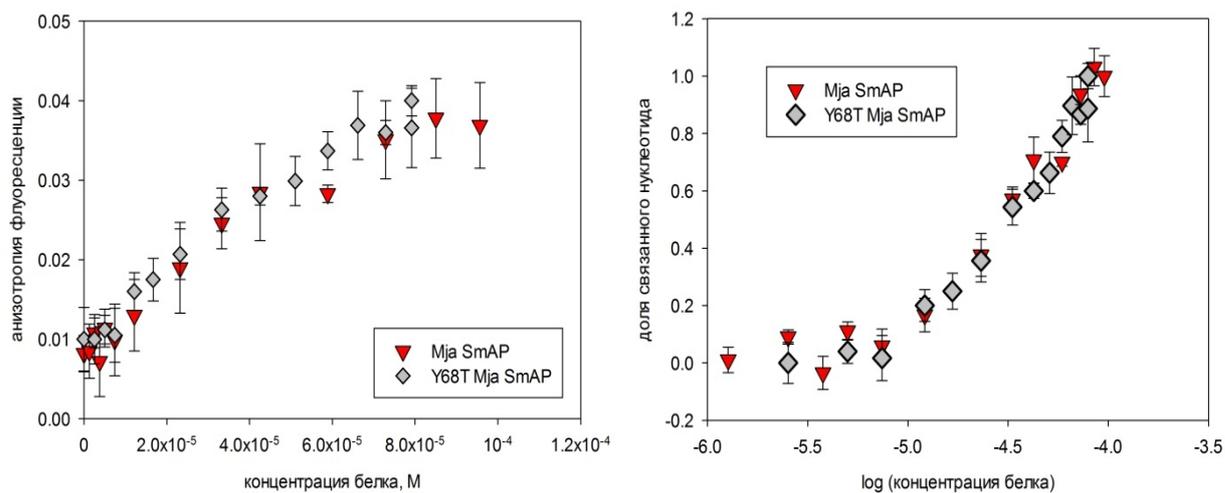


Рис. 40. Сравнение кривых титрования раствора АМФ-МАНТ белком Mja SmAP дикого типа и с заменой Y68T (слева). Доля связанного нуклеотида в зависимости от логарифма концентрации белка для АМФ-МАНТ при связывании с Mja SmAP и Mja SmAP Y68T (справа).

Таблица 11.

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

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

Остальные SmAP показали еще меньшее сродство к АМФ-МАНТ, близкое к значению, полученному для лизоцима, который не может иметь специфическое сродство к рибонуклеотидам. Полученные данные подтверждают предположения, что значительное, по сравнению с бактериальным гомологом Hfq, изменение структуры этой РНК-связывающей области архейных белков, приводит к уменьшению сродства белка к АМФ. Все они имеют длинную петлю L4, которая стерически закрывает область аденин-связывающего сайта. Мы предполагаем, что наличие этой протяженной петли подавляет аденин-связывающие свойства архейных белков данного класса.

Глава V. Определение сродства исследуемых белков к олиго(У) и олиго(А) РНК методом поверхностного плазмонного резонанса

Чтобы оценить сродство исследуемых белков к последовательностям РНК, был использован метод поверхностного плазмонного резонанса (Surface Plasmon Resonance). Биотинилированные фрагменты РНК иммобилизовали на сенсорный чип, покрытый авидином. Концентрации белка,

соответствующие каждой сенсограмме, различались не менее чем в три раза. Скорость потока жидкости, содержащей белок, составляла 30 мкл/мин. Фаза ассоциации длилась 300 с, а последующая фаза диссоциации –300–1200 с. Кинетический анализ проводили, используя четыре–пять сенсограмм для одностадийной реакции с помощью обсчета (по Лангмюру) с коррекцией масс-транспорта. Обсчет каждого набора данных давал нам константы ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d), а также рассчитываемую из них равновесную константу диссоциации ($KD = k_d/k_a$). Работа проводилась совместно с лабораторией Е.А. Пермякова (Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН, Пущино).

Для связывания с белками мы выбрали последовательности олигонуклеотидов, использованных ранее для работ с Hfq (Panja *et al.*, 2013) с целью последующего соотнесения получаемых результатов с уже имеющимися:

U₆-РНК: 5'-(биотин) – GUGGUCAGUCGAGUGG(U)₆-3'

A₁₈-РНК: 5'-(биотин) – GUGGUCAGUCGAGUGG(A)₁₈-3'

Очень важным для проведения данных 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 mM NaCl. Однако при такой концентрации соли сродство белков к РНК значительно уменьшается, поэтому мы увеличили концентрацию хлорида магния до 10 mM. Ранее было показано, что увеличение концентрации MgCl₂ увеличивает сродство белков Hfq к РНК (Kovach *et al.*, 2014). Действительно, это позволило получить нам хорошо интерпретируемые экспериментальные данные. Сенсограммы, демонстрирующие связывание некоторых исследуемых белков с U₆-РНК и A₁₈-РНК, приведены на рис. 41.

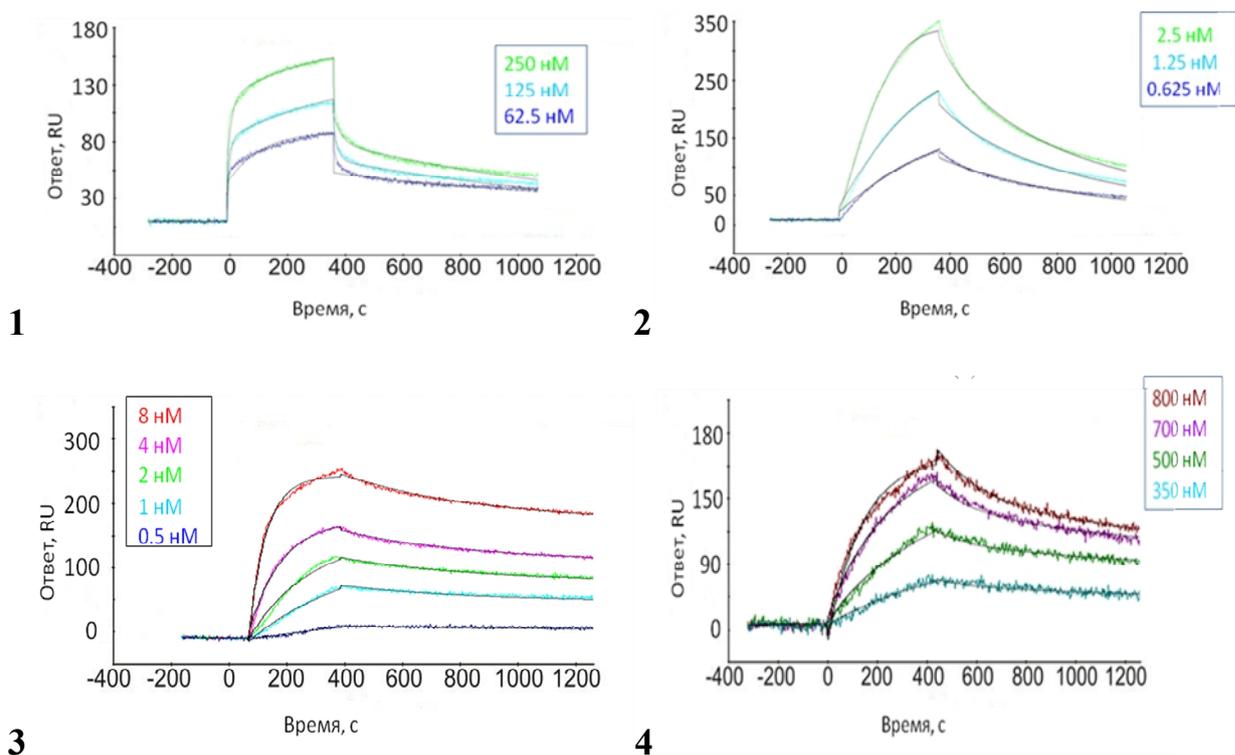


Рис. 41. Сенсограммы, демонстрирующие взаимодействие бактериального Paε Hfq с Y₆- (1) и A₁₈-РНК (2) и архейного Sac SmAP с Y₆- (3) и A₁₈-РНК (4).

Таблица 12.

Результаты кинетического анализа взаимодействия белков семейства Lsm с Y₆- и A₁₈-РНК

Белки	Равновесная константа диссоциации, K _D (нМ)	
	Y ₆ -РНК	A ₁₈ -РНК
Eco Hfq	0,05±0,01	0,096±0,004
Paε Hfq	17±2	1,0±0,3
Mja SmAP	0,03±0,01	0,7±0,4
MjaSmAP Y68T	0,02±0,01	0,9±0,2
Δ15-MjaSmAP	0,2±0,1	900±60
Mva SmAP	0,03±0,005	530±70
Sac SmAP	2,3±0,9	380±40
Sso SmAP2	7,7±1,2	400±50

На основании полученных сенсограмм были определены кинетические константы для этих комплексов (таблица 12).

Анализ полученных констант показал, что архейные белки имеют сравнимое или даже несколько большее сродство к U_6 -РНК, по сравнению с бактериальными белками Hfq. Однако, белки кренархей имеют меньшее сродство к олиго(У) РНК, чем белки из *Methanococcus*, что хорошо согласуется с нашим анализом изменения структуры уридин-связывающего сайта в белках SmAP.

К A_{18} -РНК белки Mva SmAP, Sac SmAP и Sso SmAP2 имеют значительно меньшее сродство как по сравнению с U_6 -РНК, так и относительно бактериальных Hfq. Разница в 1000-10000 раз показывает, что они связывают олиго(А) последовательность РНК очень слабо, можно считать – 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. Анализ структуры Mja SmAP показал, что белок имеет длинный положительно заряженный N-конец, который отсутствует в других исследуемых нами белках SmAP и который может обладать неспецифическим сродством к РНК. Для проверки влияния N-концевой последовательности белка на взаимодействия с РНК мы получили мутантную форму белка с делецией первых 15 N-концевых аминокислотных остатков. $\Delta 15$ -MjaSmAP выделяли так же, как и белок дикого типа, дополнительной стадией очистки стала хроматография на CM-sepharose. Измерение K_D показало, 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.

Глава VI. Анализ «РНК-шаперонной» активности исследуемых SmAP

Бактериальные белки Hfq реализуют свои функции, разрушая («расплавляя») вторичную структуру РНК и способствуя взаимодействию двух разных молекул РНК. Таким образом, Hfq исполняют роль посредников, способствующих молекулам РНК принимать нужную для их взаимодействия конформацию. Поэтому белки Hfq зачастую по аналогии с белковыми шаперонами, способствующими правильной сборке полипептидной цепи в нативную конформацию, называют «РНК-шаперонами». Мы решили определить, обладают ли архейные SmAP белки аналогичными функциями и способны ли они плавить вторичную структуру РНК. Для этого мы использовали метод, ранее примененный для исследования РНК-шаперонной активности белка Hfq, с использованием «молекулярного маяка» (Hopkins *et al.*, 2009). Он представляет собой короткую шпилечную РНК, на одном конце которой расположен флуорофор, а на противоположном – гаситель флуоресценции (рис. 25, глава 5.2). 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). С помощью этого метода также было показано, что положение А-богатой последовательности вблизи участка взаимодействия с мРНК критично для Hfq-опосредованной регуляции (Panja and Woodson, 2012). Для наших экспериментов мы взяли последовательности, которые были использованы ранее в работе (Panja *et al.*, 2013) – химически синтезированные U₆-РНК и молекулярный маяк, петля которого комплементарна участкам этих РНК.

Первоначально мы проверили взаимодействие молекулярного маяка с U₆-РНК при постепенном повышении концентрации последней. На рис. 42 видно, что добавление U₆-РНК заметно повышает уровень флуоресценции

только при большом избытке. Добавление Eсо Hfq к молекулярному маяку не повышает уровень флуоресценции (рис. 43), то есть белок без добавления комплементарной РНК не разрушает вторичную структуру «маяка». Однако добавление SmAP белков из *M. jannaschii*, *M. vannielii* и *S. acidicaldarius* к молекулярному маяку вызывает заметный эффект. При соотношении молекулярный маяк/белок больше 1:10 происходит значительное увеличение флуоресценции, что демонстрирует способности этих белков плавить вторичную структуру шпильки молекулярного маяка без добавления одноцепочечной РНК. При этом, $\Delta 15$ -Mja SmAP не способен плавить молекулярный маяк даже при соотношении 100:1, что говорит в пользу нашего предположения о существенном влиянии N-концевой части Mja SmAP на сродство к РНК.

Следующим шагом стала проверка способности SmAP белков способствовать взаимодействию молекулярного маяка и комплементарной РНК. К 100 нМ молекулярного маяка сначала добавляли белок, а затем эквивалентное ему количество Y_6 -РНК. В контрольном эксперименте белок не добавляли. На рисунке 44.1 видно, что при добавлении Y_6 -РНК к молекулярному маяку в эквивалентном количестве происходит незначительное увеличение флуоресценции. При добавлении к молекулярному маяку белка Eсо Hfq в 20-кратном избытке увеличения флуоресценции не наблюдается, а после добавления Y_6 -РНК происходит значительное увеличение флуоресценции. Это полностью согласуется с данными, полученными ранее при исследовании РНК-шаперонных свойств белка: Eсо Hfq не взаимодействует с молекулярным маяком, но способствует образованию дуплекса между маяком и комплементарной РНК.

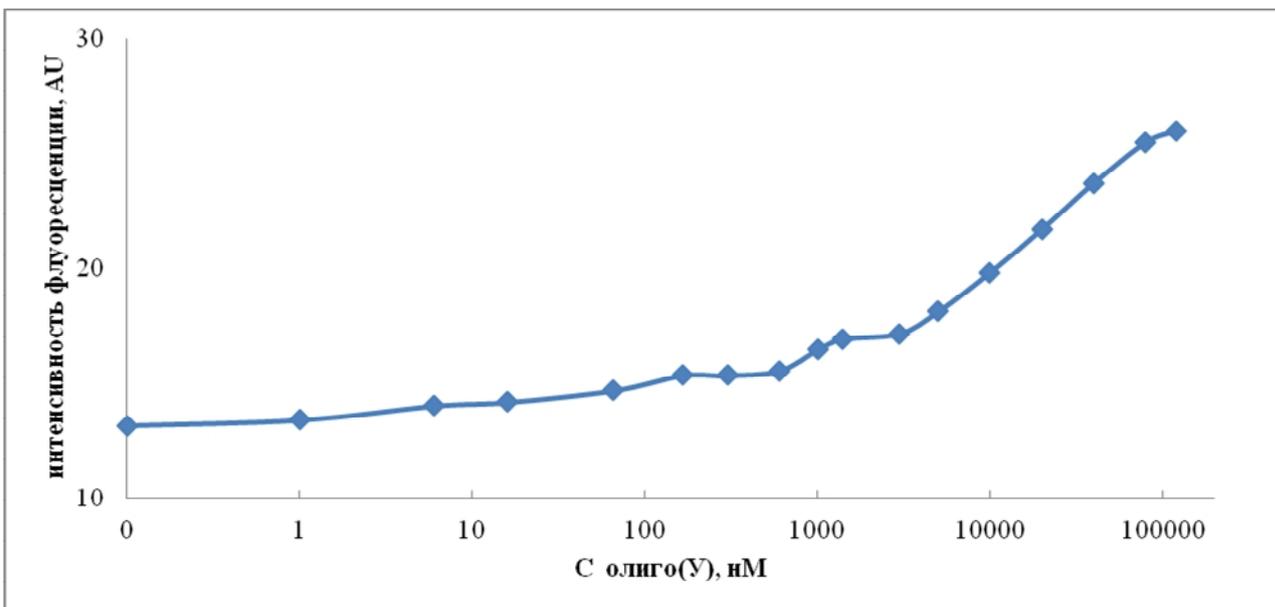


Рис. 42. Кривая титрования раствора 200 нМ «молекулярного маяка» раствором У₆-РНК.

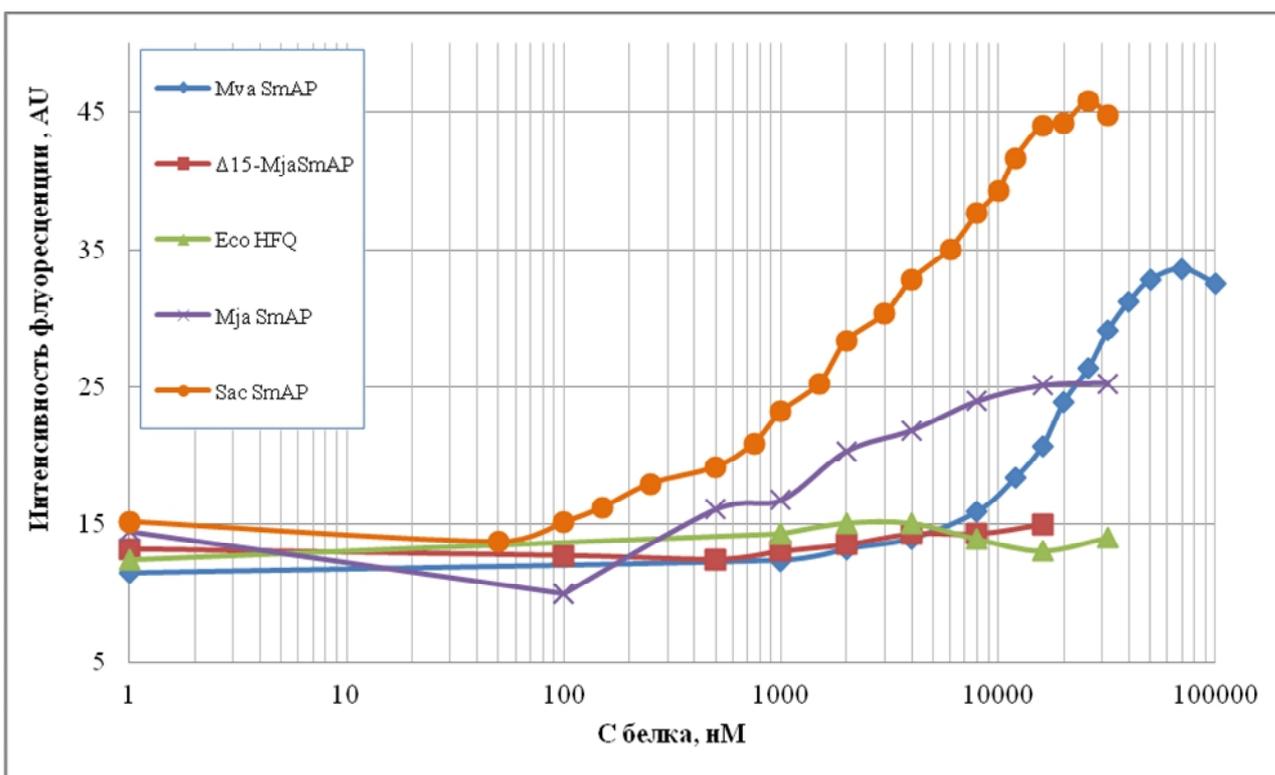


Рис. 43. Кривые титрования раствора «молекулярного маяка» исследуемыми белками семейства Lsm. Концентрация «молекулярного маяка» составляет 100 нМ.

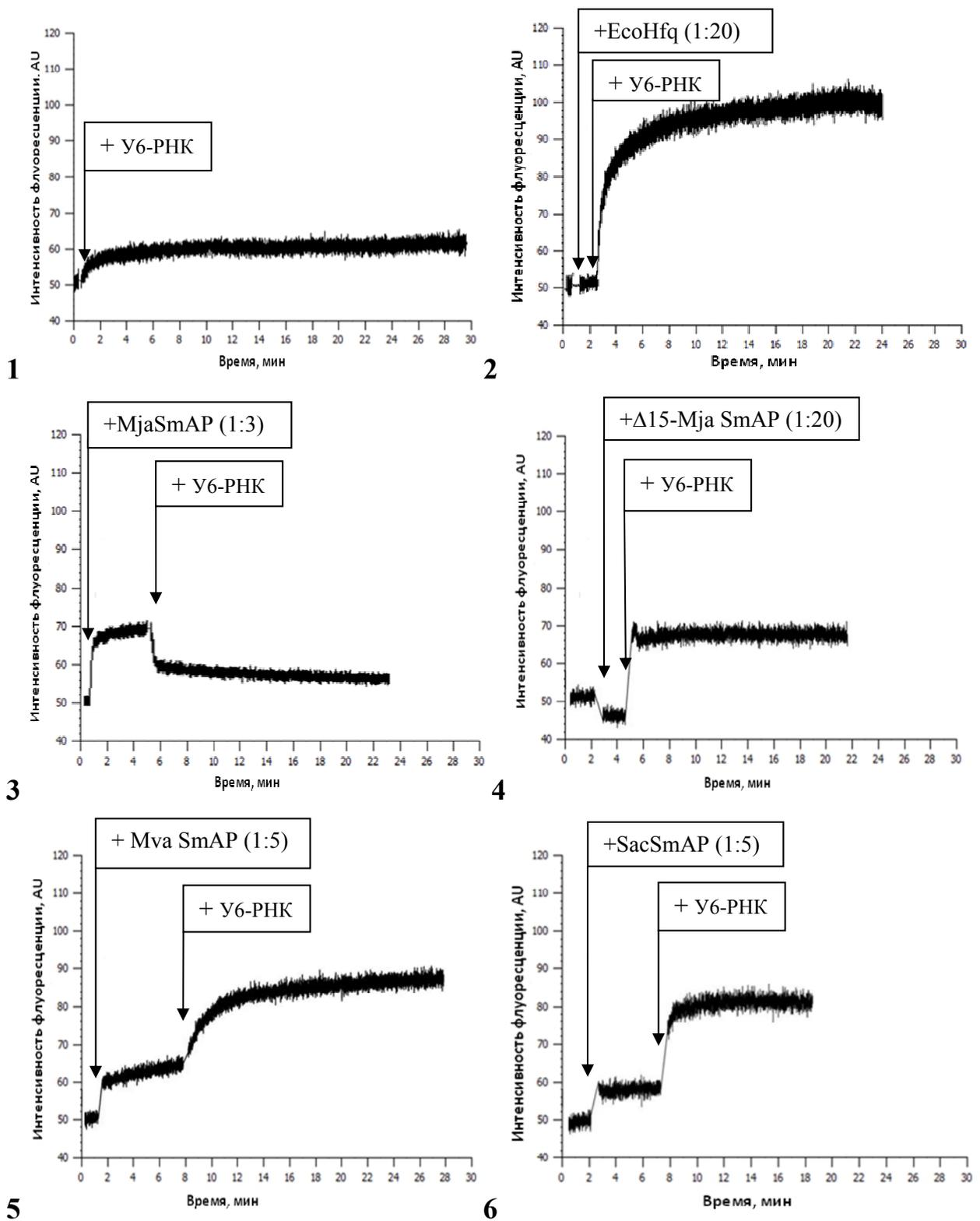


Рис. 44. Кривые изменения флуоресценции молекулярного маяка при взаимодействии с РНК в отсутствии (1) и присутствии белков Eco Hfq (2), Mja SmAP (3), $\Delta 15$ -Mja SmAP (4), Mva SmAP (5) и Sac SmAP (6).

При добавлении к молекулярному маяку белков Mva SmAP или Sac SmAP при незначительном избытке белка происходит увеличение флуоресценции, которая увеличивается еще больше при добавлении У₆-РНК. Неожиданные результаты были получены для белка из *M. jannashcii* (рис. 44.3) На графике видно, что при добавлении белка к молекулярному маяку происходит увеличение флуоресценции, т.е. разворачивание маяка, как и для других SmAP. Когда же мы добавляем У₆-РНК, то флуоресценция резко падает, по-видимому, из-за большего сродства белка к У₆-РНК по сравнению с РНК - молекулярным маяком. Добавление У₆-РНК вытесняет РНК-маяк из комплекса с Mja SmAP, происходит гашение флуоресценции и уменьшение интенсивности флуоресценции. Определяющую роль в этом процессе играет положительно заряженная N-концевая последовательность Mja SmAP, поскольку её удаление подавляет описанный эффект (рис. 44.4).

Глава VII. Перспективы

Дальнейшее исследование архейных белков семейства Lsm позволит получить приоритетные знания относительно их функций в клетках, их РНК-шаперонных свойств. Результаты будут иметь большую научную значимость, поскольку позволят проследить эволюционную связь бактерий, архей и эукариот на основе высокоомологичного семейства белков, представители которого есть во всех доменах жизни. Полученные данные позволят восполнить имеющийся пробел в исследованиях архейных SmAP белков.

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 отсутствие 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мурина, В.Н., и Никулин, А.Д. (2011). РНК-связывающие Sm-подобные белки бактерий и архей: сходство и различия структур и функций. *Успехи Биологической Химии* 51, 133–164.
2. Achsel, T., Stark, H., and Lührmann, R. (2001). The Sm domain is an ancient RNA-binding motif with oligo(U) specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3685–3689.
3. Albrecht, M., and Lengauer, T. (2004). Novel Sm-like proteins with long C-terminal tails and associated methyltransferases. *FEBS Lett.* 569, 18–26.
4. Arluison, V., Mura, C., Guzmán, M.R., Liquier, J., Pellegrini, O., Gingery, M., Régnier, P., and Marco, S. (2006). Three-dimensional structures of fibrillar Sm proteins: Hfq and other Sm-like proteins. *J. Mol. Biol.* 356, 86–96.
5. Arluison, V., Mutyam, S.K., Mura, C., Marco, S., and Sukhodolets, M. V (2007). Sm-like protein Hfq: location of the ATP-binding site and the effect of ATP on Hfq- RNA complexes. *Protein Sci.* 16, 1830–1841.
6. Azam, T.A., Hiraga, S., and Ishihama, A. (2000). Two types of localization of the DNA-binding proteins within the Escherichia coli nucleoid. *Genes Cells* 5, 613–626.
7. Bachand, F., Boisvert, F.-M., Côté, J., Richard, S., and Autexier, C. (2002). The product of the survival of motor neuron (SMN) gene is a human telomerase-associated protein. *Mol. Biol. Cell* 13, 3192–3202.
8. Bass, R.B., Strop, P., Barclay, M., and Rees, D.C. (2002). Crystal structure of Escherichia coli MscS, a voltage-modulated and mechanosensitive channel. *Science* 298, 1582–1587.
9. Beisel, C.L., Updegrave, T.B., Janson, B.J., and Storz, G. (2012). Multiple

- factors dictate target selection by Hfq-binding small RNAs. *EMBO J.* *31*, 1961–1974.
10. Bouveret, E., Rigaut, G., Shevchenko, A., Wilm, M., and Séraphin, B. (2000). A Sm-like protein complex that participates in mRNA degradation. *EMBO J.* *19*, 1661–1671.
 11. Braun, J.E., Tritschler, F., Haas, G., Igraja, C., Truffault, V., Weichenrieder, O., and Izaurralde, E. (2010). The C-terminal α - α superhelix of Pat is required for mRNA decapping in metazoa. *EMBO J.* *29*, 2368–2380.
 12. Caillet, J., Gracia, C., Fontaine, F., Caillet, J., Gracia, C., Fontaine, F., and Hajnsdorf, E. (2014). Clostridium difficile Hfq can replace Escherichia coli Hfq for most of its function Clostridium difficile Hfq can replace Escherichia coli Hfq for most of its function. *RNA* *20*, 1567–1578.
 13. Chen, C.-Y.A., and Shyu, A.-B. (2011). Mechanisms of deadenylation-dependent decay. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* *2*, 167–183.
 14. Chowdhury, A., Mukhopadhyay, J., and Tharun, S. (2007). The decapping activator Lsm1p-7p-Pat1p complex has the intrinsic ability to distinguish between oligoadenylated and polyadenylated RNAs. *RNA* *13*, 998–1016.
 15. Collins, B.M., Harrop, S.J., Kornfeld, G.D., Dawes, I.W., Curmi, P.M., and Mabbutt, B.C. (2001). Crystal structure of a heptameric Sm-like protein complex from archaea: implications for the structure and evolution of snRNPs. *J. Mol. Biol.* *309*, 915–923.
 16. Das, D., Kozbial, P., Axelrod, H.L., Miller, M.D., McMullan, D., Krishna, S.S., Abdubek, P., Acosta, C., Astakhova, T., Burra, P., et al. (2009). Crystal structure of a novel Sm-like protein of putative cyanophage origin at 2.60 Å resolution. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* *75*, 296–307.

17. Davies, D., and Segal, D. (1971). Protein crystallization: microtechniques involving vapor diffusion. *Methods Enzym.* 22, 266–269.
18. Dimastrogiovanni, D., Fröhlich, K.S., Bandyra, K.J., Bruce, H.A., Hohensee, S., Vogel, J., and Luisi, B.F. (2014). Recognition of the small regulatory RNA RydC by the bacterial Hfq protein. *Elife* 3, 1–19.
19. Dominski, Z., and Marzluff, W.F. (2007). Formation of the 3' end of histone mRNA: Getting closer to the end. *Gene* 396, 373–390.
20. Fei, J., Singh, D., Zhang, Q., Park, S., Balasubramanian, D., Golding, I., Vanderpool, C.K., and Ha, T. (2015). Determination of in vivo target search kinetics of regulatory noncoding RNA. *Science* 347, 1371–1374.
21. Fernandez, C.F., Pannone, B.K., Chen, X., Fuchs, G., and Wolin, S.L. (2004). An Lsm2-Lsm7 complex in *Saccharomyces cerevisiae* associates with the small nucleolar RNA snR5. *Mol. Biol. Cell* 15, 2842–2852.
22. Fischer, S., Benz, J., Späth, B., Maier, L.-K., Straub, J., Granzow, M., Raabe, M., Urlaub, H., Hoffmann, J., Brutschy, B., et al. (2010). The archaeal Lsm protein binds to small RNAs. *J. Biol. Chem.* 285, 34429–34438.
23. Fischer, U., Englbrecht, C., and Chari, A. (2011). Biogenesis of spliceosomal small nuclear ribonucleoproteins. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 2, 718–731.
24. Franze de Fernandez, M.T., Hayward, W.S., and August, J.T. (1972). Bacterial proteins required for replication of phage Q ribonucleic acid. Purification and properties of host factor I, a ribonucleic acid-binding protein. *J. Biol. Chem.* 247, 824–831.
25. Fu, D., and Collins, K. (2006). Human telomerase and Cajal body ribonucleoproteins share a unique specificity of Sm protein association. *Genes Dev.* 20, 531–536.

26. Gebetsberger, J., Zywicki, M., Künzi, A., and Polacek, N. (2012). tRNA-derived fragments target the ribosome and function as regulatory non-coding RNA in *Haloferax volcanii*. *Archaea* 2012, 260909.
27. Göttle, M., Dove, S., Steindel, P., Shen, Y., Tang, W.-J., Geduhn, J., König, B., and Seifert, R. (2007). Molecular analysis of the interaction of *Bordetella pertussis* adenylyl cyclase with fluorescent nucleotides. *Mol. Pharmacol.* 72, 526–535.
28. Hartung, S., and Hopfner, K.-P. (2009). Lessons from structural and biochemical studies on the archaeal exosome. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 83–87.
29. He, W., and Parker, R. (2001). The yeast cytoplasmic Lsm1/Pat1p complex protects mRNA 3' termini from partial degradation. *Genetics* 158, 1445–1455.
30. Henderson, C.A., Vincent, H.A., Casamento, A., Stone, C.M., Phillips, J.O., Cary, P.D., Sobott, F., Gowers, D.M., Taylor, J.E., and Callaghan, A.J. (2013). Hfq binding changes the structure of *Escherichia coli* small noncoding RNAs OxyS and RprA, which are involved in the riboregulation of rpoS. *RNA* 19, 1089–1104.
31. Herrero, A.B., and Moreno, S. (2011). Lsm1 promotes genomic stability by controlling histone mRNA decay. *EMBO J.* 30, 2008–2018.
32. Hirata, A., Klein, B.J., and Murakami, K.S. (2010). The X-ray Crystal Structure of RNA Polymerase from Archaea. *Archaea* 451, 851–854.
33. Hoefig, K.P., Rath, N., Heinz, G.A., Wolf, C., Dameris, J., Schepers, A., Kremmer, E., Ansel, K.M., and Heissmeyer, V. (2013). Eri1 degrades the stem-loop of oligouridylated histone mRNAs to induce replication-dependent decay. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 73–81.

34. Hopkins, J.F., Panja, S., McNeil, S.A.N., and Woodson, S.A. (2009). Effect of salt and RNA structure on annealing and strand displacement by Hfq. *Nucleic Acids Res.* *37*, 6205–6213.
35. Hulme, E.C., and Trevethick, M.A. (2010). Ligand binding assays at equilibrium: Validation and interpretation. *Br. J. Pharmacol.* *161*, 1219–1237.
36. Jäger, D., Pernitzsch, S.R., Richter, A.S., Backofen, R., Sharma, C.M., and Schmitz, R.A. (2012). An archaeal sRNA targeting cis- and trans-encoded mRNAs via two distinct domains. *Nucleic Acids Res.* *40*, 10964–10979.
37. Kambach, C., Walke, S., Young, R., Avis, J.M., De La Fortelle, E., Raker, V.A., Lührmann, R., Li, J., and Nagai, K. (1999). Crystal structures of two Sm protein complexes and their implications for the assembly of the spliceosomal snRNPs. *Cell* *96*, 375–387.
38. Kilic, T., Sanglier, S., Van Dorsselaer, A., and Suck, D. (2006). Oligomerization behavior of the archaeal Sm2-type protein from *Archaeoglobus fulgidus*. *Protein Sci.* *15*, 2310–2317.
39. Kovach, A.R., Hoff, K.E., Canty, J.T., Orans, J., and Brennan, R.G. (2014). Recognition of U-rich RNA by Hfq from the Gram-positive pathogen *Listeria monocytogenes*. *RNA* *20*, 1548–1559.
40. Krupovic, M., Gonnet, M., Hania, W. Ben, Forterre, P., and Erauso, G. (2013). Insights into dynamics of mobile genetic elements in hyperthermophilic environments from five new *Thermococcus* plasmids. *PLoS One* *8*, e49044.
41. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680–685.
42. Lerner, M.R., and Steitz, J.A. (1979). Antibodies to small nuclear RNAs

- complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 5495–5499.
43. Leung, A.K.W., Nagai, K., and Li, J. (2011). Structure of the spliceosomal U4 snRNP core domain and its implication for snRNP biogenesis. *Nature* 473, 536–539.
44. Licht, K., Medenbach, J., Luhrmann, R., Kambach, C., and Bindereif, A. (2008). 3'-cyclic phosphorylation of U6 snRNA leads to recruitment of recycling factor p110 through LSm proteins. *RNA* 14, 1532–1538.
45. Link, T.M., Valentin-Hansen, P., and Brennan, R.G. (2009). Structure of *Escherichia coli* Hfq bound to polyriboadenylate RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 19292–19297.
46. Lykke-Andersen, J., Aagaard, C., Semionenkova, M., and Garrett, R.A. (1997). Archaeal introns: splicing, intercellular mobility and evolution. *Trends Biochem. Sci.* 22, 326–331.
47. Małecka, E.M., Stróżecka, J., Sobańska, D., and Olejniczak, M. (2015). Structure of bacterial regulatory RNAs determines their performance in competition for the chaperone protein Hfq. *Biochemistry* 54, 1157–1170.
48. Mandel, M., and Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53, 159–162.
49. Märten, B., Bezerra, G.A., Kreuter, M.J., Grishkovskaya, I., Manica, A., Arkhipova, V., Djinovic-Carugo, K., and Bläsi, U. (2015). The heptameric SmAP1 and SmAP2 proteins of the crenarchaeon *Sulfolobus Solfataricus* bind to common and distinct RNA targets. *Life (Basel, Switzerland)* 5, 1264–1281.
50. Märten, B., Hou, L., Amman, F., Wolfinger, M.T., Evgenieva-Hackenberg, E., and Bläsi, U. (2017). The SmAP1/2 proteins of the

- crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* interact with the exosome and stimulate A-rich tailing of transcripts. *Nucleic Acids Res.* *45*, 7938–7949.
51. Mayer, C., Suck, D., and Poch, O. (2001). The archaeal homolog of the Imp4 protein, a eukaryotic U3 snoRNP component. *Trends Biochem. Sci.* *26*, 143–144.
52. Mayes, A.E., Verdone, L., Legrain, P., and Beggs, J.D. (1999). Characterization of Sm-like proteins in yeast and their association with U6 snRNA. *EMBO J.* *18*, 4321–4331.
53. Møller, T., Franch, T., Højrup, P., Keene, D.R., Bächinger, H.P., Brennan, R.G., and Valentin-Hansen, P. (2002). Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction. *Mol. Cell* *9*, 23–30.
54. Montzka, K.A., and Steitz, J.A. (1988). Additional low-abundance human small nuclear ribonucleoproteins: U11, U12, etc. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *85*, 8885–8889.
55. Morozov, I.Y., Jones, M.G., Razak, A.A., Rigden, D.J., and Caddick, M.X. (2010). CUCU modification of mRNA promotes decapping and transcript degradation in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 460–469.
56. Morozov, I.Y., Jones, M.G., Gould, P.D., Crome, V., Wilson, J.B., Hall, A.J.W., Rigden, D.J., and Caddick, M.X. (2012). mRNA 3' Tagging Is Induced by Nonsense-Mediated Decay and Promotes Ribosome Dissociation. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 2585–2595.
57. Mullen, T.E., and Marzluff, W.F. (2008). Degradation of histone mRNA requires oligouridylation followed by decapping and simultaneous degradation of the mRNA both 5' to 3' and 3' to 5'. *Genes Dev.* *22*, 50–65.
58. Mura, C., Cascio, D., Sawaya, M.R., and Eisenberg, D.S. (2001). The crystal structure of a heptameric archaeal Sm protein: Implications for the

- eukaryotic snRNP core. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 5532–5537.
59. Mura, C., Phillips, M., Kozhukhovskiy, A., and Eisenberg, D. (2003a). Structure and assembly of an augmented Sm-like archaeal protein 14-mer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 4539–4544.
60. Mura, C., Kozhukhovskiy, A., Gingery, M., Phillips, M., and Eisenberg, D. (2003b). The oligomerization and ligand-binding properties of Sm-like archaeal proteins (SmAPs). *Protein Sci.* *12*, 832–847.
61. Mura, C., Randolph, P.S., Patterson, J., and Cozen, A.E. (2013). Archaeal and eukaryotic homologs of Hfq. *RNA Biol.* *10*, 636–651.
62. Murina, V., Lekontseva, N., and Nikulin, A. (2013). Hfq binds ribonucleotides in three different RNA-binding sites. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* *69*, 1504–1513.
63. Naidoo, N., Harrop, S.J., Sobti, M., Haynes, P. a, Szymczyna, B.R., Williamson, J.R., Curmi, P.M.G., and Mabbutt, B.C. (2008). Crystal structure of Lsm3 octamer from *Saccharomyces cerevisiae*: implications for Lsm ring organisation and recruitment. *J. Mol. Biol.* *377*, 1357–1371.
64. Nielsen, J.S., Boggild, A., Andersen, C.B.F., Nielsen, G., Boysen, A., Brodersen, D.E., and Valentin-Hansen, P. (2007). An Hfq-like protein in archaea: Crystal structure and functional characterization of the Sm protein from *Methanococcus jannaschii*. *RNA* *13*, 2213–2223.
65. Nikulin, A., Stolboushkina, E., Perederina, A., Vassilieva, I., Blaesi, U., Moll, I., Kachalova, G., Yokoyama, S., Vassylyev, D., Garber, M., et al. (2005). Structure of *Pseudomonas aeruginosa* Hfq protein. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* *61*, 141–146.
66. Notman, D.D., Kurata, N., and Tan, E.M. (1975). Profiles of antinuclear antibodies in systemic rheumatic diseases. *Ann Intern Med* *83*, 464–469.

67. Omer, A.D., Lowe, T.M., Russell, A.G., Ebhardt, H., Eddy, S.R., and Dennis, P.P. (2000). Homologs of small nucleolar RNAs in Archaea. *Science* 288, 517–522.
68. Otaka, H., Ishikawa, H., Morita, T., and Aiba, H. (2011). PolyU tail of rho-independent terminator of bacterial small RNAs is essential for Hfq action. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 13059–13064.
69. Panja, S., and Woodson, S.A. (2012a). Hfq proximity and orientation controls RNA annealing. *Nucleic Acids Res.* 40, 8690–8697.
70. Panja, S., and Woodson, S.A. (2012b). Hexamer to monomer equilibrium of *E. coli* Hfq in solution and its impact on RNA annealing. *J. Mol. Biol.* 417, 406–412.
71. Panja, S., Schu, D.J., and Woodson, S.A. (2013). Conserved arginines on the rim of Hfq catalyze base pair formation and exchange. *Nucleic Acids Res.* 41, 7536–7546.
72. Panja, S., Santiago-Frangos, A., Schu, D.J., Gottesman, S., and Woodson, S.A. (2015a). Acidic Residues in the Hfq Chaperone Increase the Selectivity of sRNA Binding and Annealing. *J. Mol. Biol.* 427, 3491–3500.
73. Panja, S., Paul, R., Greenberg, M.M., and Woodson, S.A. (2015b). Light-Triggered RNA Annealing by an RNA Chaperone. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 54, 7281–7284.
74. Peng, Y., Soper, T.J., and Woodson, S.A. (2014). Positional effects of AAN motifs in *rpoS* regulation by sRNAs and Hfq. *J. Mol. Biol.* 426, 275–285.
75. Persson, F., Lindén, M., Unoson, C., and Elf, J. (2013). Extracting intracellular diffusive states and transition rates from single-molecule tracking data. *Nat. Methods* 10, 265–269.
76. Pillai, R.S., Grimmmler, M., Meister, G., Will, C.L., Lührmann, R., Fischer,

- U., and Schümperli, D. (2003). Unique Sm core structure of U7 snRNPs: Assembly by a specialized SMN complex and the role of a new component, Lsm11, in histone RNA processing. *Genes Dev.* *17*, 2321–2333.
77. Pomeranz Krummel, D.A., Oubridge, C., Leung, A.K.W., Li, J., and Nagai, K. (2009). Crystal structure of human spliceosomal U1 snRNP at 5.5 Å resolution. *Nature* *458*, 475–480.
78. Raker, V.A., Plessel, G., and Lührmann, R. (1996). The snRNP core assembly pathway: identification of stable core protein heteromeric complexes and an snRNP subcore particle in vitro. *EMBO J.* *15*, 2256–2269.
79. Rinke, J., and Steitz, J.A. (1985). Association of the lupus antigen La with a subset of U6 snRNA molecules. *Nucleic Acids Res.* *13*, 2617–2629.
80. Rissland, O.S., and Norbury, C.J. (2009). Decapping is preceded by 3' uridylation in a novel pathway of bulk mRNA turnover. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 616–623.
81. Robinson, K.E., Orans, J., Kovach, A.R., Link, T.M., and Brennan, R.G. (2014). Mapping Hfq-RNA interaction surfaces using tryptophan fluorescence quenching. *Nucleic Acids Res.* *42*, 2736–2749.
82. Ryan, D.E., Stevens, S.W., and Abelson, J. (2002). The 5' and 3' domains of yeast U6 snRNA: Lsm proteins facilitate binding of Prp24 protein to the U6 telestem region. *RNA* *8*, 1011–1033.
83. Sagawa, S., Shin, J.-E., Hussein, R., and Lim, H.N. (2015). Paradoxical suppression of small RNA activity at high Hfq concentrations due to random-order binding. *Nucleic Acids Res.* *43*, 8502–8515.
84. Salgado-Garrido, J., Bragado-Nilsson, E., Kandels-Lewis, S., and Séraphin, B. (1999). Sm and Sm-like proteins assemble in two related complexes of deep evolutionary origin. *EMBO J.* *18*, 3451–3462.

- 85.Sauer, E. (2013). Structure and RNA-binding properties of the bacterial LSm protein Hfq. *RNA Biol.* *10*, 610–618.
- 86.Sauer, E., and Weichenrieder, O. (2011). Structural basis for RNA 3'-end recognition by Hfq. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 13065–13070.
- 87.Sauer, E., Schmidt, S., and Weichenrieder, O. (2012). Small RNA binding to the lateral surface of Hfq hexamers and structural rearrangements upon mRNA target recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 9396–9401.
- 88.Schu, D.J., Zhang, A., Gottesman, S., and Storz, G. (2015). Alternative Hfq-sRNA interaction modes dictate alternative mRNA recognition. *EMBO J.* *34*, 2557–2573.
- 89.Schumacher, M.A., Pearson, R.F., Møller, T., Valentin-Hansen, P., and Brennan, R.G. (2002). Structures of the pleiotropic translational regulator Hfq and an Hfq-RNA complex: a bacterial Sm-like protein. *EMBO J.* *21*, 3546–3556.
- 90.Seto, A.G., Zaug, A.J., Sobel, S.G., Wolin, S.L., and Cech, T.R. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* telomerase is an Sm small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nature* *401*, 177–180.
- 91.Shchepachev, V., Wischniewski, H., Missiaglia, E., Sonesson, C., and Azzalin, C.M. (2012). Mpn1, mutated in poikiloderma with neutropenia protein 1, is a conserved 3'-to-5' RNA exonuclease processing U6 small nuclear RNA. *Cell Rep.* *2*, 855–865.
- 92.Sittka, A., Sharma, C.M., Rolle, K., and Vogel, J. (2009). Deep sequencing of *Salmonella* RNA associated with heterologous Hfq proteins in vivo reveals small RNAs as a major target class and identifies RNA processing phenotypes. *RNA Biol.* *6*, 266–275.
- 93.Sobrero, P., and Valverde, C. (2012). The bacterial protein Hfq: much more

- than a mere RNA-binding factor. *Crit. Rev. Microbiol.* *38*, 276–299.
94. Someya, T., Baba, S., Fujimoto, M., Kawai, G., Kumasaka, T., and Nakamura, K. (2012). Crystal structure of Hfq from *Bacillus subtilis* in complex with SELEX-derived RNA aptamer: Insight into RNA-binding properties of bacterial Hfq. *Nucleic Acids Res.* *40*, 1856–1867.
95. Sprangers, R., Groves, M.R., Sinning, I., and Sattler, M. (2003). High-resolution X-ray and NMR structures of the SMN Tudor domain: Conformational variation in the binding site for symmetrically dimethylated arginine residues. *J. Mol. Biol.* *327*, 507–520.
96. Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., and Dubendorff, J.W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *J. Methods Enzimol* *185*, 60–89.
97. Sugahara, J., Kikuta, K., Fujishima, K., Yachie, N., Tomita, M., and Kanai, A. (2008). Comprehensive analysis of archaeal tRNA genes reveals rapid increase of tRNA introns in the order thermoproteales. *Mol. Biol. Evol.* *25*, 2709–2716.
98. Sun, X. (2002). Predicted structure and phyletic distribution of the RNA-binding protein Hfq. *Nucleic Acids Res.* *30*, 3662–3671.
99. Tang, T.H., Rozhdestvensky, T.S., D’Orval, B.C., Bortolin, M.-L., Huber, H., Charpentier, B., Branlant, C., Bachellerie, J.-P., Brosius, J., and Hüttenhofer, A. (2002). RNomics in Archaea reveals a further link between splicing of archaeal introns and rRNA processing. *Nucleic Acids Res.* *30*, 921–930.
100. Tang, W., Kannan, R., Blanchette, M., and Baumann, P. (2012). Telomerase RNA biogenesis involves sequential binding by Sm and Lsm complexes. *Nature* *484*, 260–264.
101. Tharun, S. (2008). Roles of Eukaryotic Lsm Proteins in the Regulation

- of mRNA Function. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 272, 149–189.
102. Tharun, S., He, W., Mayes, A.E., Lennertz, P., Beggs, J.D., and Parker, R. (2000). Yeast Sm-like proteins function in mRNA decapping and decay. *Nature* 404, 515–518.
 103. Thore, S., Mayer, C., Sauter, C., Weeks, S., and Suck, D. (2003). Crystal structures of the *Pyrococcus abyssi* Sm core and its complex with RNA: Common features of RNA binding in archaea and eukarya. *J. Biol. Chem.* 278, 1239–1247.
 104. Tomasevic, N., and Peculis, B.A. (2002). *Xenopus* LSm proteins bind U8 snoRNA via an internal evolutionarily conserved octamer sequence. *Mol. Cell. Biol.* 22, 4101–4112.
 105. Törö, I., Thore, S., Mayer, C., Basquin, J., Séraphin, B., and Suck, D. (2001). RNA binding in an Sm core domain: X-ray structure and functional analysis of an archaeal Sm protein complex. *EMBO J.* 20, 2293–2303.
 106. Törö, I., Basquin, J., Teo-Dreher, H., and Suck, D. (2002). Archaeal Sm proteins form heptameric and hexameric complexes: crystal structures of the Sm1 and Sm2 proteins from the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*. *J. Mol. Biol.* 320, 129–142.
 107. Trippe, R., Sandrock, B., and Benecke, B.J. (1998). A highly specific terminal uridylyl transferase modifies the 3'-end of U6 small nuclear RNA. *Nucleic Acids Res.* 26, 3119–3126.
 108. Turunen, J.J., Niemelä, E.H., Verma, B., and Frilander, M.J. (2013). The significant other: splicing by the minor spliceosome. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 4, 61–76.
 109. Updegrave, T.B., Zhang, A., and Storz, G. (2016). Hfq: The flexible RNA matchmaker. *Curr. Opin. Microbiol.* 30, 133–138.

110. Vincent, H.A., Henderson, C.A., Ragan, T.J., Garza-Garcia, A., Cary, P.D., Gowers, D.M., Malfois, M., Driscoll, P.C., Sobott, F., and Callaghan, A.J. (2012). Characterization of *Vibrio cholerae* Hfq provides novel insights into the role of the Hfq C-terminal region. *J. Mol. Biol.* *420*, 56–69.
111. Vogel, J., and Luisi, B.F. (2011). Hfq and its constellation of RNA. *Nat. Rev. Microbiol.* *9*, 578–589.
112. Wagner, E.G.H. (2013). Cycling of RNAs on Hfq. *RNA Biol.* *10*, 619–626.
113. Walke, S., Bragado-Nilsson, E., Séraphin, B., and Nagai, K. (2001). Stoichiometry of the Sm proteins in yeast spliceosomal snRNPs supports the heptamer ring model of the core domain. *J. Mol. Biol.* *308*, 49–58.
114. Wang, W., Wang, L., Wu, J., Gong, Q., and Shi, Y. (2013). Hfq-bridged ternary complex is important for translation activation of *rpoS* by DsrA. *Nucleic Acids Res.* *41*, 5938–5948.
115. Wassarman, K.M., Repoila, F., Rosenow, C., Storz, G., and Gottesman, S. (2001). Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays. *Genes Dev.* *15*, 1637–1651.
116. Watanabe, Y., Yokobori, S., Inaba, T., Yamagishi, A., Oshima, T., Kawarabayasi, Y., Kikuchi, H., and Kita, K. (2002). Introns in protein-coding genes in Archaea. *FEBS Lett.* *510*, 27–30.
117. Weber, G., Trowitzsch, S., Kastner, B., Lührmann, R., and Wahl, M.C. (2010). Functional organization of the Sm core in the crystal structure of human U1 snRNP. *EMBO J.* *29*, 4172–4184.
118. Weichenrieder, O. (2014). RNA binding by Hfq and ring-forming (L)Sm proteins. *RNA Biol.* *11*, 537–549.
119. Wilusz, C.J., and Wilusz, J. (2005). Eukaryotic Lsm proteins: lessons

- from bacteria. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *12*, 1031–1036.
120. Wilusz, C.J., and Wilusz, J. (2013). Lsm proteins and Hfq. *RNA Biol.* *10*, 592–601.
121. Woese, C.R., Kandler, O., and Wheelis, M.L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 4576–4579.
122. Wu, D., Jiang, S., Bowler, M.W., and Song, H. (2012). Crystal structures of Lsm3, Lsm4 and Lsm5/6/7 from *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS One* *7*, e36768.
123. Wu, D., Muhlrads, D., Bowler, M.W., Jiang, S., Liu, Z., Parker, R., and Song, H. (2014). Lsm2 and Lsm3 bridge the interaction of the Lsm1-7 complex with Pat1 for decapping activation. *Cell Res.* *24*, 233–246.
124. Zaric, B., Chami, M., Rémygy, H., Engel, A., Ballmer-Hofer, K., Winkler, F.K., and Kambach, C. (2005). Reconstitution, of two recombinant LSm protein complexes reveals aspects of their architecture, assembly, and function. *J. Biol. Chem.* *280*, 16066–16075.
125. Zhang, A., Schu, D.J., Tjaden, B.C., Storz, G., and Gottesman, S. (2013). Mutations in interaction surfaces differentially impact *E. coli* Hfq association with small RNAs and their mRNA targets. *J. Mol. Biol.* *425*, 3678–3697.
126. Zhou, L., Hang, J., Zhou, Y., Wan, R., Lu, G., Yin, P., Yan, C., and Shi, Y. (2014a). Crystal structures of the Lsm complex bound to the 3' end sequence of U6 small nuclear RNA. *Nature* *506*, 116–120.
127. Zhou, L., Zhou, Y., Hang, J., Wan, R., Lu, G., Yan, C., and Shi, Y. (2014b). Crystal structure and biochemical analysis of the heptameric Lsm1-7 complex. *Cell Res.* *24*, 497–500.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю глубокую благодарность моему научному руководителю Алексею Донатовичу Никулину за чуткое руководство, ценные советы, нескончаемый интерес к работе. Также хочу сказать спасибо Алексею Донатовичу за всевозможную помощь и рекомендации, сделанные как во время выполнения, так и в процессе подготовки настоящей диссертационной работы.

Искренне признательна Станиславу Владимировичу Никонову и Марине Борисовне Гарбер за постоянный интерес к выполняемой работе, ценные советы и замечания.

Особую благодарность хочу выразить Светлане Викторовне Тищенко, Алисе Михайлиной, Екатерине Никоновой и Виталию Балобанову за помощь в планировании и проведении экспериментов.

Признательна Сергею Евгеньевичу Пермякову и Алескею Казакову за возможность проведения экспериментов на биосенсорах.

Благодарна всему коллективу группы структурных исследований рибосомных белков и лаборатории структурных исследований аппарата трансляции за доброе отношение и прекрасную атмосферу, способствовавшую выполнению данной работы.

Безмерно благодарна своим родителям за любовь и поддержку.