

УДК 577.218

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РНК-ШАПЕРОНА PROQ ИЗ ESCHERICHIA COLI И ЕГО ДОМЕНОВ С МАЛОЙ РЕГУЛЯТОРНОЙ РНК 3'ETS(LEUZ)*Н.В. Леконцева, А.О. Михайлина, А.Д. Никулин**Институт белка РАН, Пушкино, Россия*

Во всех доменах жизни малые регуляторные РНК являются важными участниками регуляции экспрессии генов. Для поддержания стабильности и правильного функционирования мРНК часто необходимы специализированные РНК-связывающие белки, так называемые «РНК-шапероны». До недавнего времени единственными известными примерами таких белков у бактерий были CsrA и Hfq (Holmqvist et al., 2018). Недавно был найден еще один класс бактериальных белков – РНК-шаперонов. Это белки с доменом ProQ/FinO, которые также могут играть существенную роль в посттранскрипционной регуляции генов во всех бактериальных видах. Было показано, что у бактерий рода *Salmonella* белок ProQ может стабилизировать целый пул мРНК (так называемый «regulon»), имеющих в этих бактериях (Smirnov et al., 2016). Уровень экспрессии этих мРНК и время их полужизни напрямую зависят от присутствия или отсутствия ProQ (Smirnov et al., 2016). Следует отметить, что ProQ из *Salmonella enterica* взаимодействует преимущественно с двуцепочечными участками РНК. Позднее авторами был описан механизм работы ProQ-зависимой мРНК RaiZ, которая образует РНК-дуплекс с сайтом связывания рибосомы мРНК hupA, предотвращая синтез α -субъединицы гистон-подобного белка HU (Smirnov et al., 2017). Однако для такого модельного объекта, как *Escherichia coli*, подобные исследования не проводились.

ProQ из *Escherichia coli* представляет собой белок с молекулярной массой ~ 25 кДа, который первоначально был описан как фактор осморегуляции, необходимый для оптимальной экспрессии белка пролинового канала ProP (Kunte et al., 1999). Биоинформационный анализ первичной структуры белка предсказал наличие двух доменов, которые гомологичны белкам FinO (N-концевой домен) и Hfq (C-концевой домен). В 2017 году с помощью метода ЯМР была определена структура ProQ из *E. coli* (Gonzalez et al., 2017). Результаты подтвердили предложенную FinO-подобную структуру N-концевого домена, но показали, что C-концевой домен содержит лишь часть мономера Hfq, представленного так называемым Тюдор-доменом, состоящим из пяти коротких β -тяжей. Согласно имеющимся биохимическим и структурным данным, N-концевой домен ProQ является основным при связывании РНК, хотя и линкер, и C-концевой домен также могут вносить свой вклад в РНК-белковое взаимодействие (Chaulk et al., 2011, Gonzalez et al., 2017).

Используя данные о мРНК из *Salmonella enterica*, которые взаимодействуют с ProQ, нами был проведен биоинформатический поиск их гомологов в *E. coli*. Для дальнейших исследований была выбрана малая регуляторная РНК 3'ETS (LeuZ), длиной 67 нт. Эта мРНК представляет собой внешнюю транскрибируемую спейсерную последовательность предшественника лейциновой тРНК. В 2015 году было показано, что данная РНК специфически связывается с мРНК RyhB и RybB (Lalaouna et al., 2015). Мутации в 3'ETS (LeuZ), приводящие к уменьшению комплементарности к мРНК, вызывают многократное увеличение активности RyhB и RybB. Эти результаты свидетельствуют о роли 3'ETS (LeuZ) в качестве «молекулярной ловушки» или «губки», захватывающей эти мРНК и предотвращая их взаимодействие со своими обычными партнерами. Мы решили проверить, является ли данная мРНК целевой для белка ProQ в клетках *Escherichia coli*, а также определить вклад каждого из доменов при связывании белком РНК. Были взяты два варианта РНК – полноразмерный и укороченный. Укороченный фрагмент имеет длину 42 нт и содержит только шпильку, с которой предположительно связывается белок.

Экспрессию генов и очистку полноразмерного белка ProQ и его изолированных доменов проводили, как описано ранее (Nemchinova et al., 2017; Леконцева и др., 2018). Нуклеотидные последовательности вариантов РНК 3'ETS (LeuZ) были клонированы в вектор pUC18. РНК синтезировали с линейаризованных плазмид транскрипцией *in vitro* с помощью T7 РНК полимеразы. Очистку транскриптов проводили с помощью электрофореза в 10 % ПААГ в присутствии 8 М мочевины. Доочистку элюированной из геля РНК проводили анионообменной хроматографией на смоле DEAE-Sephrose.

Взаимодействие ProQ и его изолированных доменов с полученными вариантами 3'ETS (LeuZ) исследовали методом гель-шифта в полиакриламидном геле. РНК прогревали в течение 10 мин. при 70 °С, после чего охлаждали во льду, затем добавляли белки в молярном соотношении с РНК 2:1.

Полученный раствор выдерживали в течение часа при комнатной температуре. Для анализа изменения подвижности РНК-белковых комплексов в геле проводили электрофорез в 8 % ПААГ, который окрашивали красителем SYBR® Green I (рис. 1).

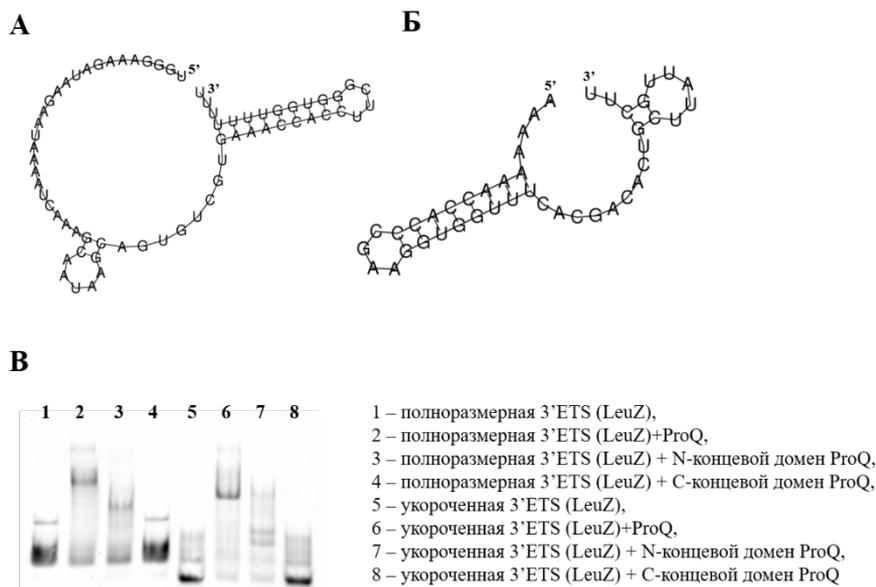


Рисунок 1 – Расчетная вторичная структура полноразмерной (А) и укороченной (Б) мРНК 3'ETS (LeuZ) и электрофоретический анализ связывания 3'ETS (LeuZ) с белком ProQ и его изолированными доменами в неденатурирующих условиях (В)

Результаты показали, что полноразмерный ProQ связывает оба варианта мРНК 3'ETS (LeuZ), что подтверждает предположение о том, что укороченный фрагмент содержит сайт связывания и может быть использован в дальнейшем для кристаллизации РНК-белкового комплекса. N-концевой домен, как и целый белок, связывает оба варианта РНК, а С-концевой домен с обеими мРНК не взаимодействует. Полученные результаты подтверждают выдвинутую ранее гипотезу о том, что N-концевой домен определяет специфичность связывания РНК, а С-концевой домен играет вспомогательную роль и не обладает сродством к РНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-34-00073.

ЛИТЕРАТУРА

- Holmqvist E., Li L., Bischler T., Barquist L., Vogel J. (2018) Mol Cell 70(5) : 971–982.
- Smirnov A et al. (2016). Grad-seq guides the discovery of ProQ as a major small RNA-binding protein. Proc Natl Acad Sci 113: 11591–11596.
- Smirnov A, Wang C, Drewry LL, Vogel J. (2017). Molecular mechanism of mRNA repression in trans by a ProQ-dependent small RNA. EMBO J 36:1029–1045.
- Kunte HJ, Crane RA, Culham DE, Richmond D, Wood JM. (1999). Protein ProQ influences osmotic activation of compatible solute transporter ProP in Escherichia coli K-12. J Bacteriol 81: 1537–1543.
- Chaulk SG, et al. (2011) ProQ is an RNA chaperone that controls ProP levels in Escherichia coli. BioChemistry 50:3095–3106.
- Gonzales GM, Hardwick SW, Maslen SL, Skehel JM, Holmqvist E, Vogel J, Bateman A, Luisi BF, Broadhurst RW. (2017). Structure of the Escherichia coli ProQ RNA-binding protein. RNA 23: 696–711.
- Lalaouna D. et al. (2015) A 3' external transcribed spacer in a tRNA transcript acts as a sponge for small RNAs to prevent transcriptional noise. Mol Cell. 58(3): 393–405.
- Nemchinova M., et al. (2017) An Experimental Tool to Estimate the Probability of a Nucleotide Presence in the Crystal Structures of the Nucleotide-Protein Complexes. Protein J. 36(3): 157–165.
- Леконцева Н.В., Фандо М.С., Михайлина А.О., Коробейникова А.В., Никулин А.Д. (2018) Исследование взаимодействия РНК-шаперона ProQ из Escherichia coli и его доменов с малой регуляторной РНК rdID. Актуальные вопросы биологической физики и химии 3(3): 651–653.