

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ «ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ИНСТИТУТ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ»  
(ФГБНУ ВНИИСБ)

На правах рукописи

**Злобин Николай Евгеньевич**

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКОВ С ДОМЕНОМ ХОЛОДОВОГО ШОКА  
РАСТЕНИЯ-ЭКСТРЕМОФИТА *EUTREMA SALSUGINEUM* С  
НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ**

03.01.06 – Биотехнология (в т.ч. бионанотехнологии)

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Научный руководитель:**  
**д.б.н., профессор А.В. Бабаков**

Москва – 2019

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 Повреждающее действие пониженных температур на растительный организм	11
1.2 Проблема фолдинга РНК в условиях пониженной температуры	12
1.3 РНК-шаперонная активность белков. Белки с доменом холодового шока	15
1.4 Белки холодового шока прокариот	20
1.4.1 Общая характеристика	20
1.4.2 Особенности структуры белков холодового шока	22
1.4.3 Функции прокариотических белков холодового шока	25
1.5 Белки с доменом холодового шока эукариот	28
1.5.1 Общая характеристика	28
1.5.2 Функции белков с доменом холодового шока эукариот	30
1.5.3 Белки с доменом холодового шока растений	33
1.5.4 Белки с доменом холодового шока <i>Arabidopsis thaliana</i>	37
1.5.5 Белки с доменом холодового шока <i>Eutrema salsugineum</i>	42
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	44
2.1 Создание генетических конструкций для наработки рекомбинантных белков в бактериальных клетках	44
2.2 Выделение и очистка рекомбинантных белков	46
2.3 Измерение ДНК-плавающей и РНК-плавающей активности белков	48
2.4 Измерение связывания белков с олигонуклеотидами	50

2.5 Измерение РНК-шаперонной активности	51
2.6 Комплементация роста бактерий <i>E. coli</i> штамма ВХ04	52
РЕЗУЛЬТАТЫ	53
3.1 Белки с доменом холодового шока EsCSDP1-3 снижают T <sub>m</sub> молекулярных ДНК-маяков	55
3.2 Одноцепочечные участки в молекулярных маяках необходимы для проявления белками EsCSDP1-EsCSDP3 ДНК-плавящей активности	63
3.3 Взаимодействие белков с молекулярными маяками зависит от длины одноцепочечных последовательностей в маяках	65
3.4 ДНК-плавящая активность белка EsCSDP1 зависит от длины его С-концевой части	71
3.5 ДНК-плавящая активность белков EsCSDP1-3 при 4°C	73
3.6 РНК-плавящая активность белков с доменом холодового шока <i>Eutrema salsugineum</i>	76
3.7 РНК-шаперонная активность белков с доменом холодового шока <i>Eutrema salsugineum</i>	85
3.8. Биологическая активность доменов холодового шока <i>in vivo</i>	89
ОБСУЖДЕНИЕ	93
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	105
ВЫВОДЫ	106
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	107

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

BiFC – Bimolecular fluorescence complementation, бимолекулярная комплементация флуоресценции

CBF/DREB – C-repeat binding factor (фактор связывающий C-повтор)/dehydration responsive element binding (элемент реакции на обезвоживание)

CSP – Cold Shock Protein, белок холодового шока

CSDP – Cold Shock Domain Protein, белок с доменом холодового шока

IPTG – Изопропил- $\beta$ -D-тиогалактозид

$\Delta G$  – изменение свободной энергии

SOB – Super Optimal Broth (питательная среда)

TIR – Translation Initiation Region, регион инициации трансляции

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – ПЦР в реальном времени

ЯМР – ядерно-магнитный резонанс

## ВВЕДЕНИЕ

Одним из важнейших свойств растительного организма является его способность сопротивляться действию факторов абиотического стресса. Среди всего многообразия абиотических стрессовых факторов в средней полосе особое значение имеет воздействие на растение пониженных температур; способность переносить понижение температуры, или холодоустойчивость, изначально присуща растениям умеренного климата. В то же время, большинство культурных растений, возделываемых в областях средней полосы, были в свое время искусственно завезены (интродуцированы) из регионов с более теплым климатом, и системы холодоустойчивости у них могут не быть развиты в достаточной степени. Задача повышения холодоустойчивости культурных растений – одна из наиболее важных проблем сельского хозяйства средней полосы. В частности, повышение морозоустойчивости озимой пшеницы на 2°С позволит высевать ее на площадях, используемых в настоящий момент для выращивания яровой пшеницы, урожайность которой существенно ниже (Колесниченко, Войников, 2003).

Проблема устойчивости сельскохозяйственных культур к пониженным температурам обостряется тем обстоятельством, что, в отличие от некоторых других неблагоприятных абиотических стрессовых факторов (засуха, недостаток питательных элементов), существенно повысить холодо- и морозоустойчивость за счет применения агрономических и прочих технологических приемов практически невозможно. Методы традиционной селекции также обладают достаточно низкой эффективностью; например, последние серьезные успехи в выведении морозоустойчивых сортов пшеницы были достигнуты около полувека назад.

Перспективным средством повышения устойчивости различных сельскохозяйственных культур к холоду является генная инженерия. Опубликован ряд работ, в которых были получены трансгенные растения,

устойчивые к действию низких температур. Для переноса в растения применялись гены, продукты которых вовлечены в синтез совместимых осмолитов, а также в модификацию липидного состава клеточных мембран. Вследовалась возможность получения устойчивых к холоду растений путем сверхэкспрессии генов CBF/DREB, которые в настоящий момент считаются главными транскрипционными факторами, вовлеченными в низкотемпературную адаптацию (Sanghera et al., 2011). В экспериментах на модельных растениях удавалось повышать устойчивость к низким температурам путем трансгеноза, однако в конечном счете эти работы за редкими исключениями не привели к получению и внедрению в производство новых устойчивых к холоду трансгенных сортов сельскохозяйственных культур.

В целом, можно констатировать, что механизмы устойчивости растений к пониженной температуре, и в особенности к низким положительным температурам, недостаточно подробно изучены. Снижение температуры окружающей среды вызывает изменение экспрессии сотен генов, однако роль большинства из них в стрессовом ответе не установлена (Lee et al., 2005). Даже в том случае, когда значимость тех или иных генов была подтверждена прямыми методами, например путем анализа холодоустойчивости растений с нокаут-мутациями по этим генам, механизм функционирования кодируемых этими генами белков в процессе низкотемпературной адаптации может оставаться неизвестным (Shen et al., 2017).

К числу последних могут быть отнесены гены, кодирующие белки с доменом холодового шока. Эти белки были обнаружены в различных организмах от прокариот до млекопитающих (Chaikam et al., 2010; Sasaki et al., 2012). Гены, кодирующие белки с доменом холодового шока, найдены и в высших растениях; важная роль белков с доменом холодового шока в адаптации растений к низкотемпературному стрессу подтверждена рядом работ. Тем не менее, многие аспекты, связанные с функционированием этих

белков в растительной клетке, остаются практически неизученным. Наиболее критичным из них является собственно способ функционирования, то есть молекулярный механизм, посредством которого белки с доменом холодового шока оказывают свое влияние на адаптацию растений к пониженным температурам. Определение механизма действия белков с доменом холодового шока на молекулярном уровне необходимо для построения целостной картины функционирования этих белков в растительной клетке.

Многочисленные исследования продемонстрировали, что белки с доменом холодового шока в бактериальных и животных клетках вовлечены в различные стадии реализации генетической информации (Скабкин и др., 2004). Считается, что основной функцией бактериальных белков холодового шока является неспецифичное взаимодействие с молекулами мРНК, приводящее к дестабилизации образующихся на них вторичных структур, затрудняющих трансляцию этих мРНК (Phadtare et al., 2010). Помимо этого, показано участие бактериальных белков холодового шока в ряде других процессов, в частности активации транскрипции некоторых генов (Brandi et al., 1994). Для белков с доменом холодового шока животных показано участие в регуляции экспрессии генов на различных стадиях – транскрипции, процессинга и сплайсинга, транспорта из ядра в цитоплазму, трансляции, хранения и деградации мРНК, а также взаимодействие с малыми РНК (Mihailovich et al., 2010). Таким образом, отличительной особенностью большинства исследованных белков с доменом холодового шока является многофункциональность, то есть вовлеченность в различные биологические процессы.

Предполагается, что основные функции белков с доменом холодового шока в растительной клетке также определяются взаимодействием с нуклеиновыми кислотами (Chaikam et al., 2010). Для этих белков показана способность связываться с молекулами нуклеиновых кислот, имеющих различную последовательность нуклеотидов, а также плавить вторичные структуры в ДНК и РНК (Sasaki et al., 2012). Имеются данные, указывающие

на проявление этими белками РНК-шаперонной активности. Тем не менее, эти сведения носят весьма отрывочный характер и не дают удовлетворительного представления о механизме функционирования белков с доменом холодового шока в растительных клетках.

**Целью** исследования было определение молекулярного механизма взаимодействия белков с доменом холодового шока из растения-экстремофита *Eutrema salsugineum* с нуклеиновыми кислотами.

**В задачи** исследования входило:

- получить в очищенном виде рекомбинантные белки EsCSDP1, EsCSDP2, EsCSDP3 *E. salsugineum*, а также отдельные фрагменты этих белков;
- осуществить дизайн и синтез флуоресцентно меченых олигонуклеотидов (молекулярных маяков) для исследования взаимодействия с рекомбинантными белками *in vitro*;
- исследовать взаимодействие рекомбинантных белков с молекулярными маяками (связывание, ДНК- и РНК-плавящую активность, РНК-шаперонную активность);
- построить модель взаимодействия белков с доменом холодового шока *E. salsugineum* с нуклеиновыми кислотами;
- предложить возможные механизмы функционирования белков с доменом холодового шока в растительных клетках, а также сделать выводы относительно потенциальной возможности практического применения этих белков в различных сферах биотехнологии.

**Научная новизна работы.** Была показана способность белков с доменом холодового шока EsCSDP1, EsCSDP2 и EsCSDP3 из растения *E. salsugineum* дестабилизировать (плавить) вторичные структуры в молекулах ДНК и РНК с различной последовательностью нуклеотидов и пространственной структурой. При этом, ДНК- и РНК-плавящая активность

коррелировала с количеством «цинковых пальцев» в С-концевой части белков. Была разработана новая система для измерения РНК-шаперонной активности белков *in vitro*, с помощью которой было доказано, что все три белка EsCSDP1, EsCSDP2 и EsCSDP3 обладают РНК-шаперонной активностью, но наибольшей – EsCSDP2. Кроме того, было установлено, что домены холодового шока из различных белков растений *E. salsugineum* и *A. thaliana* обладают различной биологической активностью при гетерологичной экспрессии в бактериальных клетках, причем это различие обуславливалось единичными аминокислотными заменами, располагающимися главным образом ближе к N-концу этих доменов.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** В данной работе с применением различных модельных систем *in vitro* и *in vivo* было исследовано взаимодействие белков с доменом холодового шока EsCSDP1, EsCSDP2 и EsCSDP3 из растения *E. salsugineum* с нуклеиновыми кислотами. Поскольку для белков с доменом холодового шока EsCSDP1-EsCSDP3 была показана высокая ДНК-плавящая и РНК-плавящая активность, а также термостабильность, перспективным представляется применение этих белков в различных молекулярно-биологических реакциях для амплификации с ДНК- или РНК-матриц, склонных к образованию вторичных структур, с целью повышения специфичности и выхода продукта этих реакций.

#### **Положения, выносимые на защиту.**

1) Белки с доменом холодового шока *E. salsugineum* обладают сильными ДНК- и РНК-плавящими активностями, намного превышающими соответствующую активность белка холодового шока CspA из *Escherichia coli*.

2) Для белков с доменом холодового шока *E. salsugineum* характерны все свойства РНК-шаперонных белков.

3) ДНК- и РНК-плавающая, а также РНК-шаперонная активности различны для разных белков. Эти различия определяются главным образом строением С-концевого фрагмента этих белков.

**Публикации и апробация работы.** Основные результаты диссертации изложены в 6 печатных работах. Материалы диссертации были доложены на 15-й научной конференции молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (Москва, 2015), научной конференции и школе для молодых ученых "Фундаментальные и прикладные проблемы современной экспериментальной биологии растений" (Москва, 2015), и 20-й международной Пуцинской школе-конференции молодых ученых «Биология - наука 21 века».

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из разделов: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение, Заключение, Выводы, Список литературы. Работа изложена на 124 страницах машинописного текста, включает 37 рисунков и 4 таблицы; список литературы включает 151 наименование.

# ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 Повреждающее действие пониженных температур на растительный организм

Понижение температуры окружающей среды ниже оптимальных для жизнедеятельности растения значений вызывает появление различных симптомов повреждений, степень выраженности которых определяется температурой, продолжительностью экспозиции, видом растения и рядом других условий (Якушкина, Бахтенко, 2004). К основным симптомам повреждения растений холодом относятся:

- изменение окраски и увядание побега и листьев;
- подсыхание краев или кончиков листовых пластинок, отмирание тканей и опадение листьев (при длительном охлаждении);
- ускоренное старение и механические повреждения тканей;
- замедленное, неполное или неравномерное созревание плодов (Кошкин, 2010).

Хорошо изучены эффекты охлаждения на ультраструктуру растительной клетки и различные клеточные процессы. Охлаждение приводит к конденсации хроматина и просветлению кариоплазмы в клеточном ядре, уменьшению числа рибосом, частичному разрушению цитоскелета, увеличению вакуолизации, разрушению различных мембранных структур и нарушению клеточной компартментации (Кошкин, 2010).

Наиболее чувствительны к низкотемпературному стрессу двумембранные органоиды клетки. При охлаждении в митохондриях и хлоропластах наблюдается набухание, разрушение внешних и внутренних мембран, замедление белкового синтеза; протекание этих процессов приводит к ослаблению, а потом и необратимому прекращению процессов окислительного фосфорилирования и фотосинтеза. Так, в клетках семядольных листьев томата уже после двухчасового охлаждения отмечались небольшие изменения структуры митохондрий и пластид; более длительное

охлаждение приводило к тяжелым повреждениям этих органоидов, а также прочих мембранных структур клетки – эндоплазматического ретикулума, пероксисом, ядра, тонопласта и, позднее, плазмалеммы. Охлаждение клеток растений приводит к изменению вязкости цитоплазмы, которая уменьшается при небольшом охлаждении вследствие увеличения дисперсности биокolloидов и распада некоторых структурных образований, и увеличивается при сильном или продолжительном охлаждении вследствие коагуляции структурных белков (Кошкин, 2010).

Клетки в разных фазах роста отличаются различной чувствительностью к холоду. Самую большую холодоустойчивость обычно проявляют уже дифференцированные клетки, в то время как растущие клетки менее холодоустойчивы. Особенно уязвимы к действию пониженных температур клетки в фазу роста растяжением (Якушкина, Бахтенко, 2004).

На молекулярном уровне, в клетках растений под действием низкотемпературного стресса в клетках растений наблюдаются 5 основных процессов:

- снижение текучести клеточных мембран;
- изменение структуры цитоскелета;
- угнетение фотосинтеза и накопление активных форм кислорода;
- изменение конформаций белков.
- изменение структуры нуклеиновых кислот (Ruelland et al., 2010).

## **1.2 Проблема фолдинга РНК в условиях пониженной температуры**

Электронная микроскопия подтверждает высокую степень подвижности одноцепочечных нуклеиновых кислот – как ДНК, так и РНК, – находящихся в свободном состоянии в растворе (Cristofari, Darlix, 2002). Одноцепочечные молекулы нуклеиновых кислот обладают способностью принимать множество различных конформаций. При этом могут формироваться как вторичные структуры, образующиеся в результате взаимодействия комплементарных участков в пределах одной

полинуклеотидной цепи, так и более сложные третичные структуры, возникающие в результате взаимодействия между различными вторичными структурами и отдаленными участками полинуклеотидной цепи (Cristofari, Darlix, 2002).

В отличие от клеточной ДНК, РНК всех типов сразу после своего синтеза и высвобождения с матричной цепи ДНК находятся в одноцепочечном состоянии, приобретая вследствие этого способность образовывать разнообразные вторичные структуры. При этом, если биологическая роль ДНК в клетке сводится к хранению наследственной информации и зависит главным образом от последовательности нуклеотидов, т. е. первичной структуры, функционирование многих клеточных РНК напрямую зависит не только от составляющей их последовательности нуклеотидов, но и от пространственной структуры, принимаемой этими РНК (Cristofari, Darlix, 2002; Rajkowitsch et al., 2007). Пространственная конформация играет важную роль в функционировании не только транспортных и рибосомальных РНК, но и матричных РНК. Приобретение молекулой мРНК определенной пространственной структуры может оказывать решающее влияние на синтез, процессинг, сплайсинг, транспорт, трансляцию или деградацию мРНК (Wan et al., 2011).

За образованием молекулой РНК определенной пространственной структуры в конечном счете стоит термодинамически обусловленное стремление приобрести пространственную конформацию с минимумом свободной энергии, которая в большинстве случаев и является функционально активной (Cristofari, Darlix, 2002). В то же время, самостоятельное приобретение молекулой РНК одной или нескольких биологически активных конформаций затруднено, что и объясняется гибкостью молекул РНК, наличием огромного количества возможных вариантов взаимодействия между азотистыми основаниями в составе одной полинуклеотидной цепи, а также устойчивость образующихся при этом

вторичных структур. В совокупности, эти факторы приводят к наличию на пути «правильного» фолдинга молекулы РНК препятствий в виде множества альтернативных конформаций этой РНК, характеризующихся локальными минимумами свободной энергии и вследствие этого в физиологических условиях достаточно устойчивых, но не способных при этом выполнять в клетке функцию, присущую РНК в активной конформации (Hershlag, 1995; Russell, Herschlag, 2011). При этом очевидно, что чем длиннее молекула РНК, тем более затруднен ее фолдинг.

Исследования, проведенные в системах *in vitro* (Liphardt et al., 2001; Littauer et al., 2000; Woodson, 2010), продемонстрировали существенность вышеуказанных барьеров и позволили сформировать модель кинетического разделения, согласно которой лишь малая часть молекул РНК в растворе принимает структуру, соответствующую состоянию минимума свободной энергии. Большая же часть молекул РНК находятся в конформациях, соответствующих локальным минимумам свободной энергии и не являющихся функционально активными (Thirumalai, Nyeon, 2005). Эта проблема усугубляется при понижении температуры раствора (среды), которое приводит к снижению свободной энергии молекулы РНК и тем самым дополнительно уменьшающему вероятность самопроизвольного распада ее промежуточных конформаций (Sosnick, Pan, 2002).

Преобразование подобных неактивных конформаций в функционально значимую структуру в физиологических условиях и во временном интервале, приблизительно соответствующем времени жизни РНК в клетке, практически невозможно, что было экспериментально продемонстрировано в условиях *in vitro* (Pan et al., 1997; Russell, Herschlag, 1999; Russell, Herschlag, 2001; Varani, Nagai, 1998).

В то же время, очевидно, что в условиях *in vivo* фолдинг клеточных РНК протекает достаточно эффективно, что объясняется участием в этом процессе разнообразных белков (Cristofari, Darlix, 2002; Williams et al., 2001).

Связь с белками сохраняется на протяжении всех этапов формирования (транскрипция, процессинг, сплайсинг, редактирование), транспорта, функционирования и деградации РНК в клетке.

### **1.3 РНК-шаперонная активность белков. Белки с доменом холодового шока**

Среди всего многообразия белков, взаимодействующих с различными типами РНК в клетке, выделяют группу так называемых РНК-шаперонов (Rajkowitsch et al., 2007; Schroeder et al., 2004). Шаперонами называют белки, содействующие правильному фолдингу синтезирующихся полипептидных цепей и предотвращающее приобретение ими функционально неактивных конформаций. Аналогично, функцией РНК-шаперонных белков является взаимодействие с молекулами РНК с целью предотвращения образования ими нежелательных конформаций, либо дестабилизация («плавление») уже имеющихся вторичных структур (Hunseung et al., 2013).

РНК-шаперонные белки по механизму функционирования могут быть разделены на 2 большие группы (Herschlag, 1995; Weeks, 1997):

– Белки-кофакторы (белки-лиганды), связываясь с молекулой РНК, способствуют образованию ей определенной, необходимой для функционирования в клетке структуры, либо связываются с уже образовавшейся структурой и поддерживают ее стабильность. В обоих случаях, для поддержания структуры РНК требуется постоянная ее связь с белком; таким образом, белок в данном случае действует как лиганд. Такие белки как правило высокоспецифичны, то есть взаимодействуют с единственной РНК или относительно небольшим числом РНК;

– Собственно шаперонные белки, связываясь с молекулой РНК, дестабилизируют имеющиеся вторичные структуры, благодаря чему молекула РНК получает возможность преодолеть конформационные «ловушки» – структуры с локальными энергетическими минимумами.

Многократное взаимодействие с шаперонными белками позволяет молекуле РНК постепенно приобрести конформацию, соответствующую энергетическому минимуму (Williamson, 2000).

Среди важнейших особенностей собственно РНК-шаперонных белков необходимо отметить следующие три (Rajkowitsch et al., 2007; Weeks, 1997; Woodson, 2010):

- низкая специфичность по отношению к нуклеотидной последовательности или структуре молекулы РНК;
- относительно кратковременное и непрочное связывание с РНК;
- отсутствие необходимости в ассоциированном белке для поддержания структуры, приобретенной РНК.

Перечисленные свойства РНК-шаперонных белков диктуется самой сутью РНК-шаперонной активности. Клеточные РНК чрезвычайно разнообразны как с точки зрения нуклеотидных последовательностей, так и формируемых ими пространственных структур. Вследствие этого, ситуация, когда определенной структуре на молекуле РНК соответствует определенный взаимодействующий исключительно с ней РНК-шаперонный белок, невозможна в принципе. Соответственно, многие РНК-шаперонные белки в клетке должны иметь широкую специализацию, которая позволяет им взаимодействовать с целым спектром различных РНК.

Пониженные прочность связывания и время существования комплекса белок – РНК также являются важными особенностями функционирования РНК-шаперонных белков. Эти качества позволяют РНК-шаперонным белкам связываться с молекулой РНК лишь на время, необходимое для дестабилизации той или иной вторичной структуры, после чего быстро диссоциировать, не препятствуя функционированию РНК. На примере бактериального белка StrA было экспериментально продемонстрировано, что повышение аффинности связывания белка с РНК

может оказать отрицательное влияние на РНК-шаперонную активность белка (Mayer et al., 2007).

После того, как молекула РНК приобрела корректную конформацию, присутствие РНК-шаперонного белка больше не требуется. Это было показано, в частности, для белков StrA и S12 в ходе эксперимента *in vitro*, когда между периодом инкубирования РНК с шаперонным белком и замером функциональной активности этой РНК в реакционную смесь добавлялась протеаза (Coetzee et al., 1994).

Помимо этих трех свойств, для РНК-шаперонных белков характерны и ряд других особенностей, в частности способность нескольких белковых молекул одновременно взаимодействовать с одной молекулой РНК или одной вторичной структурой в пределах этой молекулы, а также отсутствие необходимости во внешних источниках энергии, таких как высокоэнергетические фосфаты (Ivani-Nagy et al., 2005; Rajkowitsch et al., 2007).

Многочисленные исследования демонстрируют высокую значимость РНК-шаперонных белков для функционирования живых организмов. Белки с подобными свойствами обнаружены во всех ветвях древа жизни, включая вирусы. Установлена критичная роль этих белков в таких процессах, как транскрипция, процессинг, сплайсинг, редактирование, транспорт, трансляция и деградация мРНК. Значимость РНК-шаперонных особенно велика в условиях пониженной температур (Hunseung et al., 2013).

Учитывая широкое филогенетическое распространение, а также вовлеченность в многообразные клеточные процессы, логичным представляется тот факт, что обнаруженные белки с РНК-шаперонной функцией принадлежат к различным неродственным белковым семействам, негомологичны по своим аминокислотным последовательностям и не

содержат какого-либо общего мотива или структуры, которые были бы свойственны всем РНК-шаперонным белкам (Rajkowitsch et al., 2007).

Тем не менее, существуют некоторые структурные особенности, характерных для РНК-шаперонных белков в целом. На уровне аминокислотной последовательности, в таких белках обычно содержится значительное количество аминокислотных остатков с положительно заряженными и ароматическими боковыми группами. Ароматические остатки обладают способностью интеркалировать между азотистыми основаниями в полинуклеотидной цепи, вступая в ван-дер-ваальсовы и стэкинг-взаимодействия. Положительно заряженные аминокислотные остатки участвуют в электростатических взаимодействиях с отрицательно заряженным сахарофосфатным остовом нуклеиновых кислот. В РНК-шаперонных белках часто содержатся такие известные РНК-связывающие домены, как RRM, KH, RGG, а также мотивы типа «цинковые пальцы» (Cristofari, Darlix, 2002). В одном РНК-шаперонном белке обычно содержится несколько РНК-связывающих доменов одного или различных типов, при этом для эффективного функционирования белка может требоваться их одновременная работа. Это было продемонстрировано, в частности, для белка hnRNP A1, связывающего нуклеиновые кислоты посредством скоординированного действия нескольких RRM-мотивов, а также для белков TRAP и PABP (Deo et al., 1999; Handa et al., 1999)

Некоторые домены, встречающиеся в РНК-шаперонных белках, относятся к суперсемейству доменов с так называемой ОВ-структурой (Bucroft et al., 1997; Murzin, 1993). Домены типа ОВ (от «oligosaccharide-oligonucleotide binding») представляют собой структуру типа  $\beta$ -баррель, состоят из 5 антипараллельных  $\beta$ -цепей аминокислотных остатков, соединенных между собой гибкими аминокислотными петлями без определенной структуры. Общий размер домена может существенно различаться, колеблясь в пределах 70-150 аминокислотных остатков,

главным образом за счет варьирования длины петель, соединяющих  $\beta$ -цепи (Mihailovich et al., 2010). Домены такого типа встречаются в белках, негомологичных по своей первичной структуре и выполняющих в клетке различные функции посредством взаимодействия с полисахаридами, нуклеиновыми кислотами, белками и ионами металлов (Arcus, 2002).

ОВ-структура характерна для двух типов доменов, широко представленных среди РНК-шаперонных белков. Первый из них – это домены S1 типа. Этот тип доменов чрезвычайно распространен и характерен для всех ветвей древа жизни, включая археобактерии (Mihailovich et al., 2010). Домен S1 содержат, в частности, рибосомальный белок прокариот S1 (благодаря которому домен и получил свое наименование), дрожжевая РНК-хеликаза PRP22, факторы инициации трансляции IF1 и IF2 $\alpha$ , рибонуклеаза RNase E (Bycroft et al, 1997; Company et al., 1991; Graumann, Marahiel, 1998).

К домену S1 чрезвычайно близок по структуре, но негомологичен по аминокислотной последовательности другой тип доменов с укладкой ОВ-типа – домен холодового шока, или CSD (от «cold shock domain») (Graumann, Marahiel, 1998). Считается, что близость структуры доменов S1 и CSD указывает на их происхождение от общего белка-предшественника, ген которого находился в геноме последнего общего предка современных эукариот, прокариот и археобактерий (Mihailovich et al., 2010).

CSD – один из наиболее консервативных доменов, взаимодействующий с нуклеиновыми кислотами, из известных на данный момент (Graumann, Marahiel, 1998). Белки, содержащие этот домен, обнаружены в представителях различных таксономических групп, как в прокариотах, так и в эукариотах. Доказано присутствие генов, кодирующих белки с доменом холодового шока в некоторых археобактериях, вероятно приобретенных ими в ходе горизонтального переноса (Mihailovich et al., 2010).

## 1.4 Белки холодового шока прокариот

### 1.4.1 Общая характеристика

Происхождение названия домена холодового шока связано с историей его открытия при изучении адаптации бактерий к пониженной температуре.

Процесс адаптации прокариотического организма к снижению температуры среды лучше всего изучен на примере мезофильной бактерии *Esherichia coli*. Оптимальная температура роста *E. coli* составляет 37°C; температуры менее 20°C являются для этого организма низкотемпературным стрессом. Наиболее очевидным последствием внезапного снижения температуры среды (холодового шока) является прекращение роста и деления бактериальных клеток на срок 2-4 часа и более (Jones et al., 1987). Было установлено, что холодовой шок вызывает практически полную остановку синтеза большинства белков, что и является основной причиной прекращения роста бактерий (Etchegaray et al., 1996; Etchegaray, Inouye, 1999). В то же время, небольшое количество видов белков (не более 30) продолжает синтезироваться, причем в значительно более высоком количестве, чем до возникновения неблагоприятных температурных условий (Jones et al., 1987; Gualerzi et al., 2003).

Было обнаружено, что при снижении температуры среды с 37°C до 15°C один из этих белков накапливается в количестве, достигающем 13% от общего пула клеточного белка в этих условиях, что позволило назвать его главным белком холодового шока бактерии *E. coli* (Goldstein et al., 1990). Белок получил наименование CspA (Cold Shock Protein A). Было установлено, что структурно молекула этого белка представляет собой  $\beta$ -баррель, состоящий из пяти антипараллельных  $\beta$ -тяжей аминокислот; таким образом, белок CspA относится к структурам OB-типа (Schindelin et al., 1994).

Подобные CspA белки были обнаружены в бактериях, относящихся к различным экологическим группам – психрофилах, психротрофах, мезофилах, термофилах и гипертермофилах (Graumann, Marahiel, 1998). Для некоторых из них было показано участие в процессе адаптации бактерий к низкотемпературному стрессу, вследствие чего все подобные белки были названы белками холодного шока, а структура, лежащая в основе каждого из подобных белков – доменом холодного шока.

Белки холодного шока обычно представлены в геномах прокариот не отдельными генами, а семействами гомологичных генов (Phadtare et al., 1999). В мезофиле *E. coli* было обнаружено семейство белков холодного шока, состоящее из 9 представителей. Белки холодного шока *E. coli* получили наименования CspA-CspI; при этом заметная индукция в условиях пониженной температуры среды установлена для CspA, CspB, CspG и CspI (в особенности для первых трех) (Etchegaray, Inouye, 1999; Wang, 1999). Белки CspC и CspE экспрессируются в клетках *E. coli* и при оптимальной температуре 37°C (Bae et al., 1999; Yamanaka et al., 1994).

С помощью делеционного анализа было продемонстрировано, что функции белков холодного шока *E. coli* перекрываются, по крайней мере в контексте низкотемпературной адаптации (Xia et al., 2001). Так, штаммы, несущие делеции сразу по двум или трем генам – гомологам CspA ( $\Delta cspA\Delta cspB$ ,  $\Delta cspA\Delta cspG$ ,  $\Delta cspB\Delta cspG$ ,  $\Delta cspA\Delta cspI$ ,  $\Delta cspA\Delta cspB\Delta cspG$ ) сохраняли способность к росту при низкой температуре 15°C. В штамме  $\Delta cspA\Delta cspB\Delta cspG$  при снижении температуры наблюдалась сверхэкспрессия гена CspE. Перечисленные выше факты доказывают, что представители семейства белков холодного шока *E. coli* проявляют функциональную взаимозаменяемость и могут компенсировать отсутствие экспрессии одного или нескольких гомологов. Создать штамм *E. coli*, не растущий при пониженной температуре, удалось лишь делецией четырех генов семейства ( $\Delta cspA\Delta cspB\Delta cspG\Delta cspE$ ); штамм получил название VX04. При этом, чувствительность этого штамма к пониженной температуре может быть

компенсирована путем сверхэкспрессии любого белка холодового шока *E. coli* за исключением CspD (Xia et al., 2001).

Другой модельный микробиологический объект – бактерия *Bacillus subtilis* – также содержит семейство белков холодового шока, состоящее из 3 гомологов – CspB, CspC и CspD (Graumann et al., 1997). Делеционный анализ, проведенный по аналогии с *E. coli*, продемонстрировал необходимость синтеза в бактериальных клетках по крайней мере одного из трех этих белков для сохранения жизнеспособности, причем не только при пониженной, но и при нормальной температуре. В отсутствие экспрессии всех трех белков холодового шока синтез белка в *B. subtilis* приобретал неуправляемый и нерегулируемый характер (Graumann et al., 1997).

#### **1.4.2 Особенности структуры белков холодового шока**

Все бактериальные белки холодового шока имеют общее строение. Для них характерны небольшой размер (67-73 аминокислотных остатка), а также отсутствие каких-либо дополнительных последовательностей помимо собственно домена холодового шока. Основу структуры белка составляют пять антипараллельных  $\beta$ -цепей, имеющих численные наименования от 1 до 5, образующих компактную укладку типа  $\beta$ -баррель. На цепях  $\beta_2$  и  $\beta_3$  имеются высококонсервативные РНК-связывающие мотивы RNP1 и RNP2 (Horn et al., 2007). Мотивы этого типа характерны как для любых белков с доменом холодового шока, так и для белков RRM-типа – другого широко распространенного суперсемейства взаимодействующих с РНК белков (Maris et al., 2005). Ароматические радикалы аминокислотных остатков, входящих в состав RNP1 и RNP2, обеспечивают взаимодействие бактериальных белков холодового шока с нуклеиновыми кислотами за счет стэкинг-эффектов без очевидной специфичности по отношению к нуклеотидной последовательности. Ароматические аминокислотные остатки имеют критическое значение для РНК-связывающей и РНК-плавающей активности белков холодового шока (Schroder et al., 1995).

Плоскость белковой молекулы, содержащая мотивы RNP1 и RNP2, включает в себя не только ароматические, но и множество основных положительно заряженных аминокислотных остатков. Общий положительный заряд, характерный для данного участка белковой молекулы, обеспечивает неспецифичное электростатическое взаимодействие с отрицательно заряженными молекулами нуклеиновых кислот, в то время как ароматические боковые группы стабилизируют это взаимодействие за счет гидрофобных и стэкинг-взаимодействий (Schroder et al., 1995).

Благодаря общей пространственной организации глобул прокариотических белков холодового шока ароматические аминокислотные остатки оказываются расположенными в одной плоскости, образуя на поверхности белковой молекулы гидрофобный кластер необычно большого размера, положительно заряженный благодаря присутствию основных аминокислотных радикалов (Kremer et al., 2001; Schnuchel et al., 1993).

С помощью ЯМР и рентгеноструктурного анализа были установлены трехмерные структуры ряда бактериальных белков холодового шока, в частности CspA из *E. coli*, CspB из *B. subtilis*, CspB из *Bacillus caldolyticus* и CspB из *Thermotoga maritima* (Kremer et al., 2001; Mueller et al., 2000; Schindelin et al., 1994; Schindelin et al., 1993). При этом, несмотря на достаточно существенные различия в аминокислотной последовательности, пространственные структуры этих белков чрезвычайно схожи. Исследование трехмерной структуры молекулы CspA из *E. coli* подтвердило наличие на поверхности, составленной цепями  $\beta 2$  и  $\beta 3$ , компактного гидрофобного кластера, содержащего ароматические аминокислотные остатки F18, F20, F31, H33 и F34 (рис. 1.1). Остатки F18 и F20 входят в состав мотива RNP1, F31, H33 и F34 – в состав мотива RNP2 (Newkirk et al., 1994).

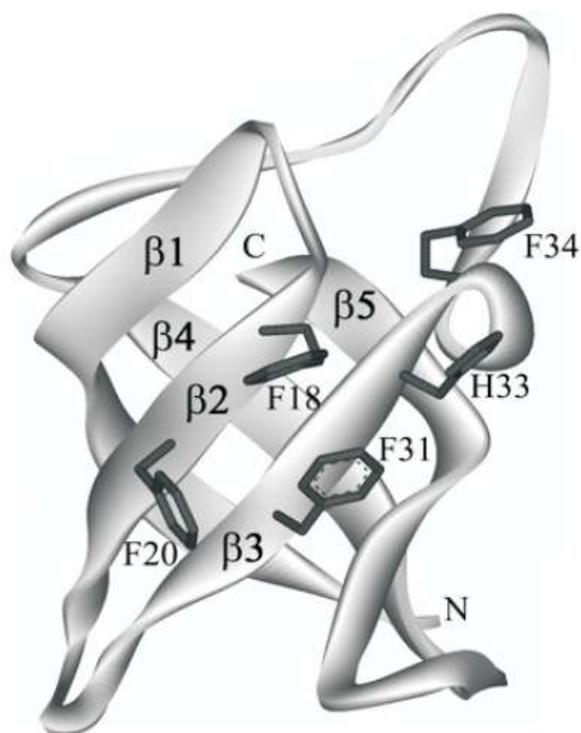


Рис. 1.1. Пространственная структура CspA. Показаны боковые цепи ароматических аминокислотных остатков, входящие в состав мотивов RNP1 и RNP2 и образующих гидрофобный кластер на поверхности белка (Скабкин и др., 2004).

Трехмерная структура белка CspB из *B. subtilis* была получена в комплексе с олигодезоксирибонуклеотидом. Было установлено, что во взаимодействии непосредственно принимали участие 17 аминокислотных остатков, в том числе семь из девяти ароматических остатков, содержащихся в молекуле CspB. При этом, восемь из семнадцати остатков входили в состав мотивов RNP1 и RNP2 (Zeeb et al., 2003).

На примере этого же белка было установлено, что единичные аминокислотные замены остатка фенилаланина в положениях 15, 17 или 27 на остаток аргинина приводили к потере способности связываться с нуклеиновыми кислотами *in vitro* (Schroder et al., 1995). Аминокислотные замены F17R, F30R и H32R в белке CspE из *E. coli* приводили к потере РНК-плавающей активности *in vivo* (Phadtare et al., 2004).

### 1.4.3 Функции прокариотических белков холодового шока

Все известные на данный момент функции белков холодового шока прокариот определяются взаимодействием с нуклеиновыми кислотами. Для некоторых белков холодового шока было продемонстрировано возрастание прочности связывания с одноцепочечной РНК и ДНК при понижении температуры (Lopez et al., 1999).

Для ряда белков холодового шока показана как потенциальная способность связывать ДНК *in vitro*, так и взаимодействие с клеточной ДНК *in vivo* для поддержания структуры бактериальной хромосомы или в ходе ее репликации. В *E. coli* сверхэкспрессией белка CspE удавалось нивелировать деконденсацию хроматина, вызванную добавлением камфоры (Hu et al., 1996). Другой белок холодового шока *E. coli*, CspD, участвовал в регуляции репликации бактериальной хромосомы в условиях дефицита питательных элементов (Yamanaka et al., 2001). В штаммах *B. subtilis*, содержащих мутации по генам белков холодового шока, были отмечены нарушения в таких процессах, как поддержание структуры нуклеоида и сегрегации бактериальных хромосом при делении (Weber et al., 2001).

В то же время, большинство клеточных функций, выполняемых белками с доменом холодового шока, определяется взаимодействием с РНК. Одной из характерных функций белков холодового шока бактерий является антитерминация транскрипции. Многие прокариотические гены организованы в функциональные единицы – опероны, и совместно транскрибируются в составе единой полицистронной мРНК. Между кодирующими последовательностями генов, входящих в состав одного оперона, могут находиться терминаторные последовательности, образующие вторичные структуры – шпильки – на мРНК. Вторичные структуры тормозят продвижение РНК-полимеразы, препятствуя транскрипции мРНК и приводя в конечном счете к отсутствию экспрессии дистально расположенных генов.

РНК-плавающая активность белков с доменом холодового шока позволяет им, взаимодействуя с терминаторными последовательностями, дестабилизировать вторичные структуры (Bae et al., 2000; Phadtare et al., 2002). Благодаря этому достигается непрерывное продвижение РНК-полимеразы вдоль всего оперона и образование полноразмерной полицистронной мРНК. Антитерминаторная активность показана, например, для белка CspE, участвующего в поддержании высокого уровня экспрессии отдаленных от промотора генов в опероне *metYrpsO* (Bae et al., 2000). Доказано, что экспрессия некоторых генов, участвующих в адаптации бактериальных клеток к пониженным температурам, действительно активируется посредством механизма антитерминации (Bae et al., 2000).

Участие бактериальных белков холодового шока в транскрипции не ограничено антитерминаторной активностью. Так, CspA может действовать как транскрипционный фактор, усиливая экспрессию гена *H-NS*, продукт которого взаимодействует с хромосомной ДНК, а также гена *gyrA*, кодирующего последовательность субъединицы А ДНК-гиразы (Brandi et al., 1994). Примечательно, что оба этих белка активируются холодовым шоком и принимают участие в низкотемпературной адаптации клеток *E. coli* (Thieringer et al., 1998).

Одно из любопытных доказательств вовлеченности белков холодового шока прокариот в транскрипцию было получено при изучении внутриклеточной локализации белков холодового шока *B. subtilis*. Было выяснено, что все три белка холодового шока этой бактерии накапливаются в области цитоплазмы, окружающей нуклеоид; при этом, ингибирование транскрипции приводило к потере белками холодового шока этой специфической локализации (Weber et al., 2001). Схожий результат, свидетельствующий о вовлеченности белков холодового шока в сопряжение транскрипции и трансляции в бактериях, был получен другой исследовательской группой (Mascarenhas et al., 2001).

Как уже упоминалось ранее, образующиеся на длинных гибких молекулах мРНК вторичные структуры могут препятствовать продвижению рибосом либо скрывать последовательность Шайна-Дельгарно, оказывая подавляющее воздействие на процесс трансляции; масштаб данного явления возрастает при снижении температуры окружающей среды (Ermolenko et al., 2002). РНК-плавящая активность белков холодового шока способствует дестабилизации вторичных структур, нивелируя их неблагоприятное влияние на трансляцию и способствуя тем самым бесперебойной работе белоксинтезирующего аппарата (Barria et al., 2013). При этом следует отметить, что, ввиду относительно невысокой «прочности» связывания белков холодового шока с мРНК, молекулы этих белков не создают существенных препятствий на пути продвижения рибосом при трансляции (Yamanaka, 1999).

Помимо общего повышения эффективности трансляции, белки холодового шока способны влиять и на стабильность мРНК, регулируя их деградацию (Barria et al., 2013). В частности, CspC и CspE из *E. coli* играют роль в стабилизации мРНК таких белков, как общий регулятор стрессового ответа *groS* и универсальный белок стрессового ответа *uspA* (Phadtare et al., 2001). CspE взаимодействует с полиА-концами образующихся мРНК в составе комплекса элонгации транскрипции. Способность этого белка связываться с полиА-участками мРНК, а также плавить образующиеся на них вторичные структуры приводят к замедлению деградации мРНК РНКазами PNP и RNaseE (Feng et al., 2001).

Таким образом, за счет различных механизмов белки холодового шока прокариот регулируют синтез различных клеточных белков как при пониженных значениях температуры, так и в оптимальных для роста температурных условиях.

Взаимодействие белков холодового шока бактерий с нуклеиновыми кислотами активно исследовалось *in vitro*. Было установлено, что CspA из *E.*

*coli* связывается с молекулами РНК с низкой аффинностью, не проявляя при этом заметной специфичности по отношению к нуклеотидной последовательности (Jiang et al., 1997). Прочие представители семейства белков холодого шока из *E. coli* также способны связывать РНК и одноцепочечную ДНК, проявляя при этом, однако, несколько большую специфичность. Так, CspB с наибольшей аффинностью взаимодействует с мотивом UUUUU, CspC – с мотивом AGGGAGGGA, CspE избирательно связывает AU-богатые регионы (Phadtare, Inouye, 1999). Белок CspB из бактерии *B. subtilis* проявляет повышенную аффинность к T-богатым последовательностям; в то же время, специфичность взаимодействия этого белка с молекулами нуклеиновых кислот довольно незначительна (Lopez et al., 2001).

## **1.5 Белки с доменом холодого шока эукариот**

### **1.5.1 Общая характеристика**

Белки, содержащие домен холодого шока, характерны не только для бактерий, но и для высших организмов, принадлежащих к различным царствам. При этом, если белки холодого шока прокариот практически всегда состоят только из домена холодого шока, то белки эукариот обычно имеют в своем составе также и дополнительные мотивы. Вследствие этого, эукариотические белки часто именуется белками с доменом холодого шока (cold shock domain proteins, CSDP), что подчеркивает их мультидоменную природу, в отличие от прокариотических белков, называемых белками холодого шока.

CSDP, состоящие исключительно из доменов холодого шока без каких-либо дополнительных последовательностей, немногочисленны. Таковы, в частности, белки Cla h 8 из *Cladosporium herbarum* и zfY1 из *Danio rerio*, состоящие из единственного домена холодого шока, а также белок UNR, обнаруженный в ряде животных – как высших, так и низших, молекула которого состоит из пяти доменов холодого шока, обычно без каких-либо

дополнительных разделяющих или фланкирующих аминокислотных последовательностей (Chang et al., 1999; Falsone et al., 2002; Ferrer et al., 1999).

Дополнительные мотивы, входящие в состав CSDP, разнообразны. Наиболее часто встречаются глицин-богатые последовательности, КН-домены, домены «цинковые пальцы» ССНС-типа, протяженные домены, состоящие из чередующихся кластеров положительно и отрицательно заряженных аминокислотных остатков, RG- и RGG-повторы, RNB-домены, PinC-домены в различных сочетаниях друг с другом (Mihailovich et al., 2010). В базе белковых семейств Pfam представлено 174 различных конфигураций эукариотических белков, содержащих домен холодового шока (Bateman et al., 2004). Основой подобного разнообразия являются, по всей видимости, многочисленные перестановки и дубликации доменов, происходившие в процессе эволюции эукариот (Mihailovich et al., 2010).

Пространственная структура доменов холодового шока в CSDP практически идентична структуре белков прокариот, представляя собой  $\beta$ -баррель из 5  $\beta$ -цепей. Основным различием является несколько большая длина участка, соединяющего цепи  $\beta 3$  и  $\beta 4$ , в эукариотических белках по сравнению с прокариотическими (Скабкин и др., 2004). Наряду со сходством структурной организации, отмечается и существенный уровень гомологии аминокислотных последовательностей доменов холодового шока про- и эукариот. Так, последовательности CspA и домена холодового шока из эукариотического белка YB-1 идентичны на 43% и гомологичны на 60% (Wolffe et al., 1994). Степень гомологии возрастает в участках аминокислотной последовательности, образующих взаимодействующую с нуклеиновыми кислотами поверхность, и особенно высока в области мотивов RNP1 и RNP2.

Таким образом, для CSDP характерна, с одной стороны, высокая консервативность доменов холодового шока и, с другой стороны, – вариабельность их сочетаний с прочими доменами в составе белка.

### **1.5.2 Функции белков с доменом холодового шока эукариот**

Наиболее изученными эукариотическими белками с доменом холодового шока являются YB-1 и lin-28. Пример этих двух белков как нельзя лучше демонстрирует многофункциональность, присущую белкам с доменом холодового шока.

YB-1 принадлежит к семейству белков, связывающих Y-боксы, которое состоит из 3 представителей: DBPA (DNA binding protein A), также известного как CSDA, DBPB (альтернативное название белка YB-1) и DBPC (FRGY2, frog germ-cell-specific Y-box protein 2) (Mihailovich et al., 2010). Гены, кодирующие гомологи YB-1, обнаружены в геномах беспозвоночных, личиночнохордовых и позвоночных (Eliseeva et al., 2011; Wada et al., 1998). Структура YB-1 весьма консервативна. Этот белок состоит из короткого N-концевого фрагмента, богатого аминокислотами аланином и пролином, домена холодового шока, располагающегося в центре белковой молекулы, и протяженного C-концевого фрагмента, состоящего из восьми чередующихся участков положительно и отрицательно заряженных аминокислотных остатков, не имеющего определенной пространственной структуры. Предполагается, что специфичность взаимодействия с нуклеиновыми кислотами определяется главным образом доменом холодового шока YB-1, в то время как C-концевой домен усиливает это взаимодействие; во взаимодействии с белками принимают участие все три домена YB-1 (Eliseeva et al., 2011).

YB-1 был идентифицирован как ДНК-связывающий белок, взаимодействующий с последовательностью Y-бокса в промоторах некоторых генов, что и отражено в названии этого белка (Didier et al., 1988). Ряд генов, в том числе вовлеченных в нормальную жизнедеятельность

клетки, регулируются этим белком на уровне транскрипции (Skabkin et al., 2006). YB-1 вероятно участвует в репликации ДНК, и взаимодействует с некоторыми белками, вовлеченными в рекомбинацию (Eliseeva et al., 2011). Установлено, что YB-1 связывается со структурами, образующимися на поврежденной ДНК, и принимает участие в их репарации (Gaudreault et al., 2004; Ise et al., 1999).

Несмотря на участие в различных ДНК-зависимых процессах, основной биологической активности YB-1 является взаимодействие с мРНК. Это взаимодействие начинается уже на этапе транскрипции и может продолжаться в течение всего времени существования мРНК (Kohno et al., 2003). YB-1 участвует в сплайсинге, трансляции, хранении и деградации мРНК (Eliseeva et al., 2011). Этот белок является основным компонентом цитоплазматических рибонуклеопротеидных частиц, которые состоят из разнообразных клеточных мРНК, связанных с набором белков (Evdokimova et al., 1995). Способность YB-1 связываться с различными мРНК и ассоциировать с образованием гомополимерных комплексов позволяет ему служить основным структурным компонентом рибонуклеопротеидных частиц, связывающим воедино прочие составляющие.

Одно из исследований, несколько выделяющееся из общего «пула» работ по YB-1, было посвящено исследованию влияния этого белка на холодоустойчивость клеток высшего позвоночного животного. Линия клеток курицы с нокаутом гена YB-1 демонстрировала пониженную холодоустойчивость по сравнению с клетками дикого типа, что выражалось в остановке роста мутантных клеток при пониженной температуре. При этом, способность к росту была восстановлена путем экспрессии YB-1 в клетках мутантной линии (Matsumoto et al., 2005).

Другим хорошо изученным эукариотическим белком с доменом холодового шока является lin-28. Этот белок, обнаруженный в различных беспозвоночных и позвоночных, характеризуется уникальной для белков с

доменом холодового шока животных структурой. В N-концевой части lin-28 находится домен холодового шока, в C-концевой части – 2 мотива «цинковый палец» CCHC-типа. В некоторых вариантах этого белка также присутствуют дополнительные последовательности длиной несколько десятков аминокислотных остатков, располагающиеся перед доменом холодового шока и после «цинковых пальцев» (Tzialikas et al., 2015).

Изучение функционирования lin-28 в различных тканях и органах организмов, находящихся в разных фазах развития, позволило охарактеризовать его как активатор клеточного деления и ингибитор дифференцировки (Tzialikas et al., 2015). Lin28 входит в число четырех ключевых белковых факторов, необходимых для репрограммирования соматических клеток в стволовые (Yu et al., 2007). Повышенная экспрессия lin-28 наблюдается в наименее дифференцированных и наиболее агрессивных раковых опухолях (Hamano et al., 2012; Hsu et al., 2015; Wang et al., 2015).

В настоящее время, выделяют 2 молекулярных механизма функционирования lin-28 в клетке: let7-зависимый и let7-независимый (Tzialikas et al., 2015). Первым был открыт и подробно охарактеризован let7-зависимый путь. let7 – это микроРНК, регулирующая переход клеток к дифференцировке (Lee et al., 2016). Показано, что lin-28 ингибирует образование зрелой let7, связываясь с pri-let7 или pre-let7 и блокируя их процессинг нуклеазами Drosha или Dicer соответственно (Tzialikas et al., 2015). Кроме того, lin-28 способствует олигоуридилированию pre-let7 с 3'-конца, ускоряя деградацию этой микроРНК (Neo et al., 2008). Во взаимодействии с let7 принимает участие как домен холодового шока lin-28, связывающийся с вторичной структурой типа «стебель-петля», так и «цинковые пальцы», связывающие консервативный мотив GGAG (Nam et al., 2011).

В настоящее время известно множество функций белка lin-28, непосредственно не определяющихся взаимодействием с let7 (Tzialikas et al., 2015). С помощью коиммунопреципитации в сочетании с высокопроизводительным секвенированием было показано, что lin-28 связывается с большим количеством клеточных мРНК, среди которых наиболее широко представлены мРНК белков-регуляторов клеточного цикла, РНК-связывающих белков, гистонов, а также белков, вовлеченных в трансляцию и метаболизм глюкозы (Peng et al., 2011; Tzialikas et al., 2015). Снижение экспрессии lin-28 с помощью РНК-интерференции ингибировало трансляцию некоторых из этих мРНК. Предполагается, что lin-28 может функционировать в клетке как усилитель трансляции генов, вовлеченных в активацию клеточного метаболизма, роста и деления клеток (Maug et al., 2013; Polesskaya et al., 2007).

### **1.5.3 Белки с доменом холодового шока растений**

Степень изученности белков с доменом холодового шока растений значительно уступает таковой для белков с доменом холодового шока животных. Вместе с тем, изучение растительных белков может представлять собой даже больший интерес, особенно в контексте участия в адаптации к пониженным температурам. Растения, в отличие от животных, не способны поддерживать постоянную температуру тела или отвечать на изменения температуры окружающей среды какими-либо поведенческими реакциями, направленными на их избегание. Вследствие этого, им требуются особенно эффективные механизмы, позволяющие противодействовать негативному влиянию пониженных температур.

Исследования транскриптома *Arabidopsis thaliana* продемонстрировали, что доля генов, изменяющих свою экспрессию при понижении температуры окружающей среды, может достигать 20% (Hannah et al., 2005). Наиболее изученным с точки зрения молекулярной биологии механизмом ответа растений на низкотемпературное воздействие является

активация экспрессии факторов транскрипции семейства CBF/DREB, регулирующих экспрессию различных генов, вовлеченных в низкотемпературную адаптацию (Jaglo-Ottosen et al., 1998; Liu et al., 1998). В то же время, установлено, что факторы транскрипции CBF/DREB регулируют не более 12% от общего пула генов, экспрессия которых изменяется под действием пониженной температуры (Fowler et al., 2002).

К оставшейся, относительно слабоизученной части, независимой от регуляции факторами CBF/DREB, принадлежат и гены белков с доменом холодового шока. Эти гены были обнаружены в растениях различных систематических групп, относящихся к низшим растениям, однодольным, двудольным и древесным формам (Karlson et al., 2003). При этом, для всех видов растений, геномы которых исследовались на предмет наличия соответствующих генов, показано присутствие по крайней мере двух представителей этого семейства. Именно такое количество генов, кодирующих белки с доменом холодового шока, содержат *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Sorghum bicolor* и *Vitis vinifera*; самое большое количество генов обнаружено в геноме *Glycine max* – семь (Sasaki et al., 2012).

Ряд исследований указывает на вовлеченность белков с доменом холодового шока различных растений в процесс низкотемпературной адаптации. Так, экспрессия белка WCSP1 в надземной части пшеницы возрастала при снижении температуры, причем как на уровне транскрипта, так и на уровне белка (Karlson et al., 2003). В модельном древесном растении пурпурной корзинчатой иве, отличающейся высокой холодоустойчивостью, с помощью вестерн-блоттинга было показано, что периоды наибольшего накопления белков с доменом холодового шока совпадают с периодами максимальной холодоустойчивости (Karlson et al., 2009). Напротив, в рисе – растении, не способном к холодовой акклиматизации, – не наблюдалось индукции экспрессии белков с доменом холодового шока в ответ на снижение температуры окружающей среды (Chaikam et al., 2010).

Все белки с доменом холодого шока растений имеют схожее строение (Sasaki et al., 2012). Доменная структура растительных белков наиболее близка к структуре lin-28: в N-концевой части этих белков находится домен холодого шока, в С-концевой части – от 1 до 7 мотивов «цинковый палец» ССНС-типа. В отличие от lin-28, растительные белки с доменом холодого шока содержат повышенное содержание глицина и аргинина в С-концевой части. Кроме того, в них отсутствуют протяженные последовательности длиной несколько десятков аминокислотных остатков в N-концевой и С-концевой частях белковой молекулы, характерные для lin-28. Трехмерные структуры для белков с доменом холодого шока из растений в настоящий момент не получены (Chaikam et al., 2010).

Первым белком с доменом холодого шока растений, который был функционально охарактеризован, является белок WCSP1, обнаруженный в мягкой пшенице *Triticum aestivum*. Индукция экспрессии гена WCSP1 на уровне мРНК и белка наблюдается в ответ на снижение температуры; при этом, другие стрессоры (засоление, засуха, перегрев, обработка абсцизовой кислотой) не вызывали подобного эффекта, что свидетельствует о специфичной роли WCSP1 именно в стрессовом ответе на понижение температуры (Karlson et al., 2002). WCSP1 способен связываться с ДНК и РНК, а также плавить вторичные структуры в нуклеиновых кислотах как *in vitro*, так и *in vivo* (Karlson et al., 2002; Nakaminami et al., 2005; Nakaminami et al., 2006). С помощью делеционного анализа белка WCSP1 было установлено, что связывание двуцепочечной ДНК происходит исключительно благодаря С-концевому домену, в то время как для связывания одноцепочечной ДНК С-концевой домен не требуется (Karlson et al., 2002). Точечные мутации, введенные в N-концевой домен, приводили к полной потере белком способности связывать одноцепочечную ДНК (Nakaminami et al., 2006).

После секвенирования генома мягкой пшеницы в этом растении было обнаружено еще 3 гена, кодирующих белки с доменом холодового шока (Radkova et al., 2014). Было установлено, что экспрессия всех четырех белков пшеницы характеризуется различными ткане- и органоспецифичными профилями, а также по-разному изменяется в растениях, подвергнутых низкотемпературной обработке. Примечательно, что закаливание озимого сорта мягкой пшеницы вызывало существенное накопление белков с доменом холодового шока в тканях конуса нарастания, сохранностью которого определяется общая морозоустойчивость растения, в то время как в яровом сорте подобного эффекта не наблюдалось (Radkova et al., 2014).

В другом важнейшем сельскохозяйственном растении – рисе *O. sativa* – было идентифицировано два белка с доменом холодового шока, получивших обозначения OsCSP1 и OsCSP2 (Chaikam, Karlson, 2008). Экспрессия их генов на уровне мРНК незначительно возрастала при воздействии пониженной температуры, однако повышенного накопления собственно белков не наблюдалось даже после 10 дней низкотемпературной обработки. Анализ экспрессии OsCSP1 и OsCSP2 в различных частях и органах растений риса выявил их накопление в развивающихся соцветиях, цветках и семенах, что свидетельствует об роли этих белков в развитии и функционировании генеративной сферы. Для обоих белков с доменом холодового шока риса было продемонстрирована способность связывать одноцепочечную ДНК *in vitro* (Chaikam, Karlson, 2008).

Несмотря на исследования, указывающие на вовлеченность белков с доменом холодового шока в стрессоустойчивость и развитие растений, ощущается недостаток данных относительно конкретных молекулярных механизмов функционирования этих белков. Так, отсутствует информация, касающаяся непосредственного влияния белков с доменом холодового шока растений на транскрипцию или трансляцию. Основываясь на данных о функциональной активности белков бактерий и животных, можно

предположить, что белки с доменом холодого шока растений принимают участие в ряде процессов, связанных с ДНК или РНК, в особенности мРНК. Ядерно-цитоплазматическая локализация ряда CSDP пшеницы и арабидопсиса указывает на их вероятное участие в процессах, связанных с образованием и функционированием мРНК (Fusaro et al., 2007; Kim et al., 2009; Nakaminami et al., 2006; Park et al., 2009; Sasaki et al., 2007). Работ, посвященных изучению роли белков с доменом холодого шока растений в таких процессах, как рекомбинация и репарация ДНК, к настоящему моменту не опубликовано.

#### **1.5.4 Белки с доменом холодого шока *Arabidopsis thaliana***

Наиболее изученными CSDP растений являются белки из *A. thaliana*. Геном этого модельного растения содержит 4 гена, кодирующих эти белки, получивших соответствующие наименования – AtCSDP1 (*Arabidopsis thaliana* Cold Shock Domain Protein 1), AtCSDP2, AtCSDP3 и AtCSDP4; другие обозначения этих белков, часто встречающиеся в научной литературе – AtCSP1 (CSDP1; At4g36020), AtCSP2 (AtGRP2/CSDP2; At4g38680), AtCSP3 (At2g17870), AtCSP4 (AtGRP2b; At2g21060) (Sasaki, Imai, 2012; Nakaminami et al., 2009).

Белки арабидопсиса имеют строение, типичное для CSDP растений. В N-концевой части белковой молекулы находится домен холодого шока, в C-концевой части – протяженная, богатая остатками глицина последовательность, содержащая несколько (два или семь) мотивов «цинковые пальцы» ССНС-типа (Nakaminami et al., 2009). Основные структурные характеристики белков с доменом холодого шока арабидопсиса приведены в Таблице 1.1.

Некоторые структурные характеристики белков с доменом  
холодового шока *Arabidopsis thaliana*

Название белка	Общая длина, а.о.	Длина N-концевого фрагмента, а.о.	Длина C-концевой фрагмента, а. о.	Количество мотивов «цинковые пальцы»
AtCSDP1	300	78	222	7
AtCSDP2	204	78	126	2
AtCSDP3	302	78	224	7
AtCSDP4	201	78	123	2

Было установлено присутствие CSDP в клетках различных тканей и органов арабидопсиса, однако наибольшее их накопление было характерно для апексов побегов и корней, прокамбия, а также различных репродуктивных органов, таких как цветковые почки, семязачатки, цветки, стручки и семена (в особенности зародышевая часть) (Fusaro et al., 2007; Kim et al., 2009; Nakaminami et al., 2009; Yang et al., 2013). Экспрессия генов CSDP в арабидопсисе активировалась при переходе к цветению, а также в условиях, благоприятствующих цветению. Таким образом, белки с доменом холодового шока арабидопсиса накапливаются в меристематических тканях, характеризующихся высокой скоростью деления клеток.

Сверхэкспрессия белка AtCSDP4 приводила к возникновению ряда отклонений в развитии растений арабидопсиса, таких как уменьшение длины стручка, понижение жизнеспособности семязачатков, а также сморщивание и побурение семян начиная с ранней стадии «сердечка». При этом, отсутствие экспрессии AtCSDP4 в нокаут-линиях арабидопсиса не вызывает каких-либо значимых отклонений в развитии (Nakaminami et al., 2009). Было также обнаружено, что в одном из экотипов арабидопсиса – Ler – экспрессия AtCSDP4 была в 1000 раз ниже, чем в экотипе Columbia-0. Для объяснения

этого феномена была выдвинута гипотеза, согласно которой функции, свойственные AtCSDP4, принимает на себя AtCSDP2. Белок AtCSDP2 не только схож с AtCSDP4 по своей структуре, но и экспрессируется на самом высоком уровне среди всех четырех CSDP арабидопсиса (Nakaminami et al., 2009). При этом, мутантные линии, в которых экспрессия AtCSDP2 была повышена или снижена, демонстрировали различные отклонения в апикальном доминировании, времени цветения или развитии семян. Растения с искусственно сниженной экспрессией AtCSDP2 зацветали в среднем на 2 недели раньше, чем растения дикого типа, и формировали повышенное количество ненормально развитых стручков и семян. Еще одним эффектом, характерным для этих растений, было снижение числа тычинок (Fusaro et al., 2007).

В настоящий момент нет четкого представления о механизме, посредством которого AtCSDP2 регулирует время цветения. Высказывалось предположение, согласно которому этот белок контролирует накопление белков-регуляторов цветения на посттранскрипционном уровне за счет влияния на процессинг, экспорт из ядра или стабильность их мРНК (Fusaro et al., 2007). На посттранскрипционный характер активности AtCSDP2 косвенно указывает его внутриклеточная локализация преимущественно в цитоплазме и в меньшей степени в ядре, а также в ядрышке (Sasaki et al., 2007).

Помимо изучения роли белков с доменом холодового шока арабидопсиса в развитии, активно исследовалось их функционирование в контексте стрессоустойчивости, и в первую очередь холодоустойчивости. Обнаружено усиление экспрессии генов AtCSDP1 и AtCSDP2 в результате холодной обработки растений арабидопсиса (Fusaro et al., 2007; Yang, Karlson, 2013). Схожий эффект отмечен и для гена AtCSDP3 (Kim et al., 2009).

Мутантные линии арабидопсиса, сверхэкспрессирующие гены AtCSDP1 или AtCSDP2, не демонстрировали повышенной

холодоустойчивости по сравнению с растениями дикого типа. В то же время, экспрессия каждого из этих генов восстанавливала холодоустойчивость линии арабидопсиса, мутантной по гену глицин-богатого белка GRP7, имеющего схожую с CSDP структуру (Sasaki et al., 2012).

Линии арабидопсиса с нокаутом по гену AtCSDP3 были более чувствительны к отрицательным температурам, чем растения дикого типа, причем как после акклиматизации, так и в ее отсутствие. Сверхэкспрессия AtCSDP3 вызывала повышение морозоустойчивости растений (Kim et al., 2009). Было также установлено, что AtCSDP3 принимает участие в адаптации к засухе и повышенным концентрациям солей в среде (Kim et al., 2013). Была показана регуляция белком AtCSDP3 экспрессии ряда стресс-индуцибельных генов, не входящих в регулон CBF/DREB (Kim et al., 2009).

Данные интерактомного исследования AtCSDP3, полученные с помощью дрожжевого двугибридного анализа и BiFC, продемонстрировали вовлеченность этого белка в процессы, происходящие в цитоплазме, ядре и ядерных гранулах (nuclear speckles), в которых отсутствует транскрипция, но происходит сплайсинг мРНК (Kim et al., 2013; Lamond, Spector, 2003).

Молекулярный механизм функционирования белков с доменом холодового шока *A. thaliana* наиболее подробно изучался для AtCSDP1 (Juntawong et al., 2013). В частности, ультрацентрифугирование позволило установить наличие этого белка в полисомальной фракции, а ко-иммунопреципитация – взаимодействие с большим количеством различных мРНК, обладающих, однако, рядом общих признаков. Эти мРНК в большинстве своем кодировали белковые продукты, вовлеченные в энергоемкие клеточные процессы, такие как биогенез рибосом. Нуклеотидный состав их 5'-нетранслируемых областей характеризовался повышенным содержанием GC-пар, что потенциально затрудняет трансляцию этих мРНК в неблагоприятных для растительного организма условиях (Kawaguchi et al., 2005; Puckette et al., 2012). С применением

методов компьютерного моделирования было доказано, что 5'-нетранслируемые области этих РНК склонны к образованию вторичных структур, что наводит на мысль о необходимости их взаимодействия с РНК-плавящим белком для эффективной трансляции.

Примечательно, что при воздействии пониженных температур содержание AtCSDP1 в полисомальной фракции увеличивалось; повышалась и трансляционная активность целевых мРНК, с которыми взаимодействовал этот белок. Подобный эффект наблюдался не только при понижении температуры, но и в условиях дефицита влаги. Предполагается, что AtCSDP1, по аналогии с белками холодового шока прокариот, проявляет РНК-плавящую активность в отношении определенных мРНК, облегчая взаимодействие с ними 43S-преинициаторного комплекса и в конечном счете способствуя их трансляции (Juntawong et al., 2013).

Помимо функциональных исследований *in vivo*, для изучения белков с доменом холодового шока арабидопсиса широко применялись методики исследования *in vitro*, в частности изучение связывания с искусственно синтезированными олигонуклеотидами. Для белка AtCSDP2 была показана способность связывать поли(А), поли(Г), поли(У) и поли(С) с близкой аффинностью; белок взаимодействовал как одноцепочечными, так и двуцепочечными нуклеиновыми кислотами (Fusaro et al., 2007; Sasaki et al., 2007). В другом исследовании, белки AtCSDP1 и AtCSDP2 преимущественно связывали поли(Г)- и поли(У)-последовательности (Park et al., 2009). При этом в связывании поли(У) основная роль принадлежала N-концевой части белка, то есть домену холодового шока, а в связывании поли(Г) – С-концевая часть.

Помимо связывания с нуклеиновыми кислотами, для некоторых белков с доменом холодового шока арабидопсиса исследовалась способность плавить вторичные структуры в нуклеиновых кислотах. С применением флуоресцентно меченых олигонуклеотидов («молекулярных маяков») была показана ДНК-плавящая активность *in vitro* для различных CSDP

арабидопсиса (Kim et al., 2006; Kim et al., 2009). Исследование биологической активности белков с доменом холодого шока арабидопсиса велось также *in vivo* в клетках штамма ВХ04 бактерии *E. coli*, широко применявшегося для изучения РНК-шаперонной активности различных белков (Kim et al., 2006).

### 1.5.5 Белки с доменом холодого шока *Eutrema salsugineum*

В последние годы для изучения стрессоустойчивости растений в качестве модельного объекта вместо *A. thaliana* иногда используется его близкий родственник – *Eutrema salsugineum* (Inan et al., 2004). Схожесть геномов этого растения и арабидопсиса достигает 90%; при этом, *E. salsugineum* демонстрирует значительно более высокую устойчивость по отношению к таким абиотическим стрессорам, как пониженная температура окружающей среды или высокая концентрация солей (Amtmann, 2009; Inan et al., 2004).

В *E. salsugineum*, как и в *Arabidopsis thaliana*, было идентифицировано семейство генов, кодирующих белки с доменом холодого шока, состоящее из 4 представителей, получивших обозначения EsCSDP1, EsCSDP2, EsCSDP3 и EsCSDP4 (Таранов и др., 2009). Полная нуклеотидная последовательность в настоящий момент установлена для первых трех. Схематические изображения белков EsCSDP1-3 даны на Рисунке 1.1. Основные структурные характеристики этих белков приведены в Таблице 1.2.

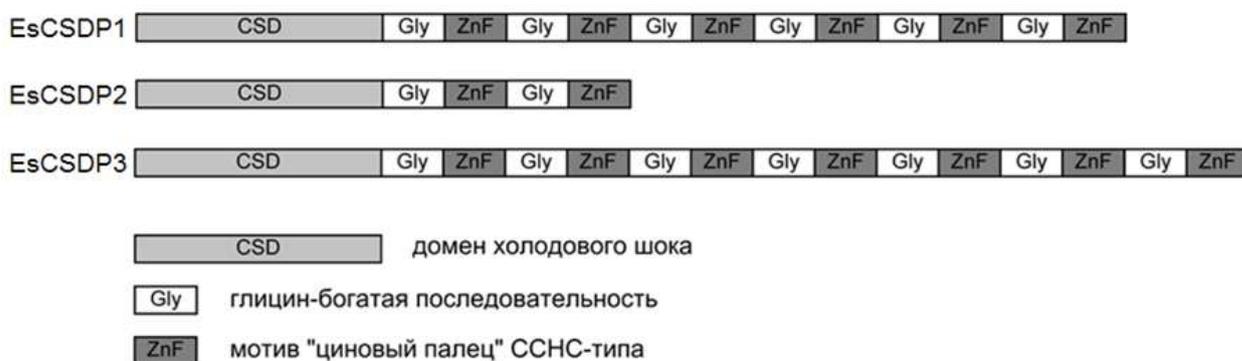


Рис. 1.2. Схематическое изображение доменной структуры белков EsCSDP1, EsCSDP2, EsCSDP3 *Eutrema salsugineum*.

Структурные характеристики белков с доменом холодового шока EsCSDP1, EsCSDP2, EsCSDP3 *Eutrema salsugineum*

Название белка	Общая длина, а.о.	Длина N-концевого фрагмента, а.о.	Длина C-концевой фрагмента, а. о.	Количество мотивов «цинковые пальцы»
EsCSDP1	264	78	186	6
EsCSDP2	202	78	124	2
EsCSDP3	296	78	218	7

Исследования, проведенные в лаборатории стрессоустойчивости растений Всероссийского Научно-исследовательского института Сельскохозяйственной Биотехнологии, свидетельствуют о вероятной роли белков с доменом холодового шока в низкотемпературной адаптации *Eutrema salsugineum*. Уровень мРНК всех четырех белков существенно возрастал после начала низкотемпературной (+4°C) обработки растений *Eutrema salsugineum*, хотя временная зависимость экспрессии от температуры различалась для каждого из четырех белков (Таранов, 2010). Примечательно, что профили экспрессии для генов *E. salsugineum* не были схожи и с профилями экспрессии генов-гомологов из *A. thaliana*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Создание генетических конструкций для наработки рекомбинантных белков в бактериальных клетках

Для получения очищенных препаратов белков с доменом холодового шока *Eutrema salsugineum* были созданы генетические конструкции на основе вектора pET28a+ для экспрессии белка в бактериальных клетках *E. coli*. Эти конструкции кодировали химерные белки, состоящие из белка с доменом холодового шока, соединенного через аминокислотный линкер с белком HaloTag. Белок HaloTag имеет свойство ковалентно связываться со смолой HaloLink Resin, что позволяет выделять химерный белок из бактериальных клеток и осуществлять его отмывку от загрязнений. В аминокислотном линкере, соединяющем HaloTag и белок интереса, находится сайт узнавания для высокоспецифичной протеазы TEV, что позволяло отделять белок интереса от смолы, переводя его в растворимую фракцию.

Нуклеотидные последовательности, кодирующие HaloTag и линкерную последовательность с сайтом для TEV, были амплифицированы с плазмидного вектора pFC20K HaloTag® T7 SP6Flexi® (Promega, США) с помощью праймеров P1 и P2 (Таблица 2.1). На 5'-конец праймера P1 были добавлены сайты рестрикции NcoI и EcoRI. На 5'-конец праймера P2 был добавлен сайт рестрикции XhoI после стоп-кодона. Амплифицированный ген HaloTag был клонирован в вектор pET28a+ по сайтам рестрикции NcoI и XhoI. Амплификация последовательностей генов, кодирующих полные белки EsCSDP1-3, укороченные варианты белка EsCSDP1 с четырьмя (Es1(4Z)) и двумя (Es1(2Z)) «цинковыми пальцами» в С-концевой части (добавить схему), отдельные домены холодового шока EsCSD1-3, отдельную С-концевую часть EsZnF1 из белка EsCSDP1, белок CspA осуществляли с помощью праймеров P3-P16 (Таблица 2.1) с генетических векторов, содержащих соответствующие последовательности.

На 5'-концы праймеров были добавлены сайты для следующих эндонуклеаз рестрикции: NcoI для генов EsCSDP1, EsCSDP3, EsCSD1, EsCSD3, EsZnF1; PstI для EsCSDP2 и EsCSD2; PciI для CspA. Амплифицированные гены встраивались в вектор pET28a+ со встроенным геном HaloTag по сайтам NcoI и EcoRI. Для создания генетической конструкции с мутантным геном белка EsCSDP3m, праймеры P10 и P11 применялись для амплификации последовательности ДНК, кодирующей белок EsCSDP3 со следующими аминокислотными заменами – W17A, F26A, F37A, C96A, C128A, C158A, C192A, C223A, C251A, C278A, – которые согласно опубликованным данным имеют критическое влияние на способность белков с доменом холодового шока взаимодействовать с нуклеиновыми кислотами (Balzer, Moss, 2007). Нуклеотидная последовательность гена EsCSDP3m была синтезирована «АТГ Сервис Ген» (Россия). Все встроенные в генетические конструкции нуклеотидные последовательности секвенированы.

Таблица 2.1.

Нуклеотидные последовательности праймеров, применявшихся при создании генетических конструкций для экспрессии рекомбинантных белков в бактериальных клетках.

P1	HALO F	5'- AAA CCA TGG GTG GTG GTG AAT TCG AGG ATC TGT ACT TTC AGA GCG ATA AC-3'
P2	HALO R	5'- TTT CTC GAG GAG CTC CTA TTA ACC GGA AAT CTC CAG AGT AGA-3'
P3	F T1	5'- AAA CCA TGGCG TTA GAG GAT CAA TTC GC-3'
P4	R T1F	5'- TTT GAA TTC GCC TCC AGC AAC AGA ACA TTC CCT CGC AA-3'
P5	R T1 CSD	5'- TTT GAA TTC GCC TCC GGG AGC CGT GAC ATT GAC G -3'

P6	F T1 Zn-F	5'- AAA CCA TG GGC GGT GCT CCT CTT CAC AG -3'
P7	F T2	5'- AAA TCA TGAGT GGC GAA AAC AAC AAC GG-3'
P8	R T2F	5'-TTT GAA TTC GCC TCC ACG TCC ACC GCT GGT GCA AT-3'
P9	R T2 CSD	5'- TTT GAA TTC GCC TCC GGG TCC GGA GAC CTC GAT G-3'
P10	F T3	5'- AAA CCA TGG CGC AAG AAG ATC AAT CGG -3'
P11	R T3F	5'-TTT GAA TTC GCC TCC AGC AAG CGA AGA ACA TTC CCT TGC -3'
P12	R T3CSD	5'- TTT GAA TTC GCC TCC GGG AGC AGT AAC CTC GAC G-3'
P13	CspA F	5'- AAA ACA TG TCC GGT AAA ATG ACT GGT ATC -3'
P14	CspA R	5'- TTT GAA TTC CAG GCT GGT TAC GTT ACC AGC -3'
P15	Es1(4Z) R	5'-GTTT GAA TTC GCC TCC AGC ACC AGG CTG TCT CTT AGT C-3'
P16	Es1(2Z) R	5'-GTTT GAA TTC GCC TCC TTC TCC TCC GGC TCC TCC G-3'

## 2.2 Выделение и очистка рекомбинантных белков

Клетки *E. coli* штамма BL21 были трансформированы созданными генетическими конструкциями. Выделение и очистку рекомбинантных белков осуществляли с помощью набора HaloTag Protein Purification Kit (Promega) в соответствии с методикой, рекомендованной производителем. Выделение белка производили из 50 мл ночной культуры клеток *E. coli*. Культуру клеток инкубировали при 37°C до достижения оптической

плотности 1,1-1,2 добавляли к ней IPTG до конечной концентрации 1,7 мМ и инкубировали далее при 27°C в течение ночи. Бактериальные клетки осаждали центрифугированием при 6000 g в течение 15 минут. Ресуспендирование осадка осуществляли на льду в 5 мл лизирующего буфера, содержащего 50 мМ HEPES (pH 7.5), 150 мМ NaCl, 1 мМ DTT, 10 мкМ ZnSO<sub>4</sub>, 10 мМ лизоцима (Sigma, USA), 50 мЛ ДНКазы RQ1 RNase-Free DNase (Promega), 50 мЛ смеси ингибиторов протеаз Protease Inhibitor Cocktail (Promega). Далее суспензию подвергали обработке ультразвуком на льду в течение 2 минут в режиме 5 секунд импульс/5 секунд пауза. После центрифугирования лизата в течение 30 минут при 10000 g собирали надосадочную жидкость и инкубировали ее с 1 мл осажденной смолы HaloLink Resin в течение 1 часа при комнатной температуре с непрерывным перемешиванием. После этого смолу HaloLink Resin со связавшемся химерным белком промывали последовательно промывочным буфером WB (50 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 1 мМ DTT, 10 мкМ ZnSO<sub>4</sub>, pH 7.5), WB + 0,5 М NaCl, WB + 2 мМ АТФ + 10 мМ MgSO<sub>4</sub> и четыре раза WB. При выделении отдельного С-концевого фрагмента EsCSDP1 в лизирующий буфер был добавлен аргинин до конечной концентрации 40 мМ, а в первый промывочный буфер был добавлен детергент IGEPAL (Promega) до концентрации 0,05%. Перевод белков из связанного со смолой состояния в водный раствор осуществляли с использованием протеазы TEV в соответствии с рекомендациями производителя. Очищенные белки в стандартном буфере SB (45 мМ HEPES, 135 мМ NaCl, 0,9 мМ DTT, 9 мМ ZnSO<sub>4</sub>, 10% глицерин, pH 7.5) были заморожены в жидком азоте и хранились при -70°C. Концентрацию выделенных белков измеряли по методу Бредфорд. Чистоту выделенных рекомбинантных белков оценивали посредством электрофореза в полиакриламидном геле по методике Laemmli. Белковые примеси в препаратах белков идентифицировали методом LC-MS/MS в ЦКП «Протеом человека» Института Биомедицинской Химии. Проведенный анализ показал высокую чистоту рекомбинантных белков.

## 2.3 Измерение ДНК-плавящей и РНК-плавящей активности

### белков

Для измерения ДНК-плавящей активности белков использовали флуоресцентно меченые молекулярные маяки с различной последовательностью нуклеотидов и пространственной структурой. Флуоресцентно меченые олигонуклеотиды были синтезированы компанией «Синтол» (Россия). Для мечения использовался источник флуоресценции 6-карбоксихлорофлуоресцеин-6G (R6G, Синтол) и гаситель флуоресценции ВНQ2 (Glen Research, США, кат. номер 20–5932). Для измерения были использованы два типа молекулярных маяков. Молекулярные маяки первого типа состояли из двух олигонуклеотидов, один из которых содержал источник флуоресценции на 5'-конце, а другой – гаситель флуоресценции на 3'-конце. Олигонуклеотиды были спроектированы таким образом, чтобы при их отжиге образовывалась шпильчатая структура и гаситель сближался с источником флуоресценции. При нагреве шпильчатая структура плавится и происходит разделение молекул источника и гасителя флуоресценции, что выражается в повышении уровня флуоресценции раствора, содержащего молекулярные маяки (рис. 2.1). Всего было синтезировано 24 ДНК-маяка и один РНК-маяк первого типа.

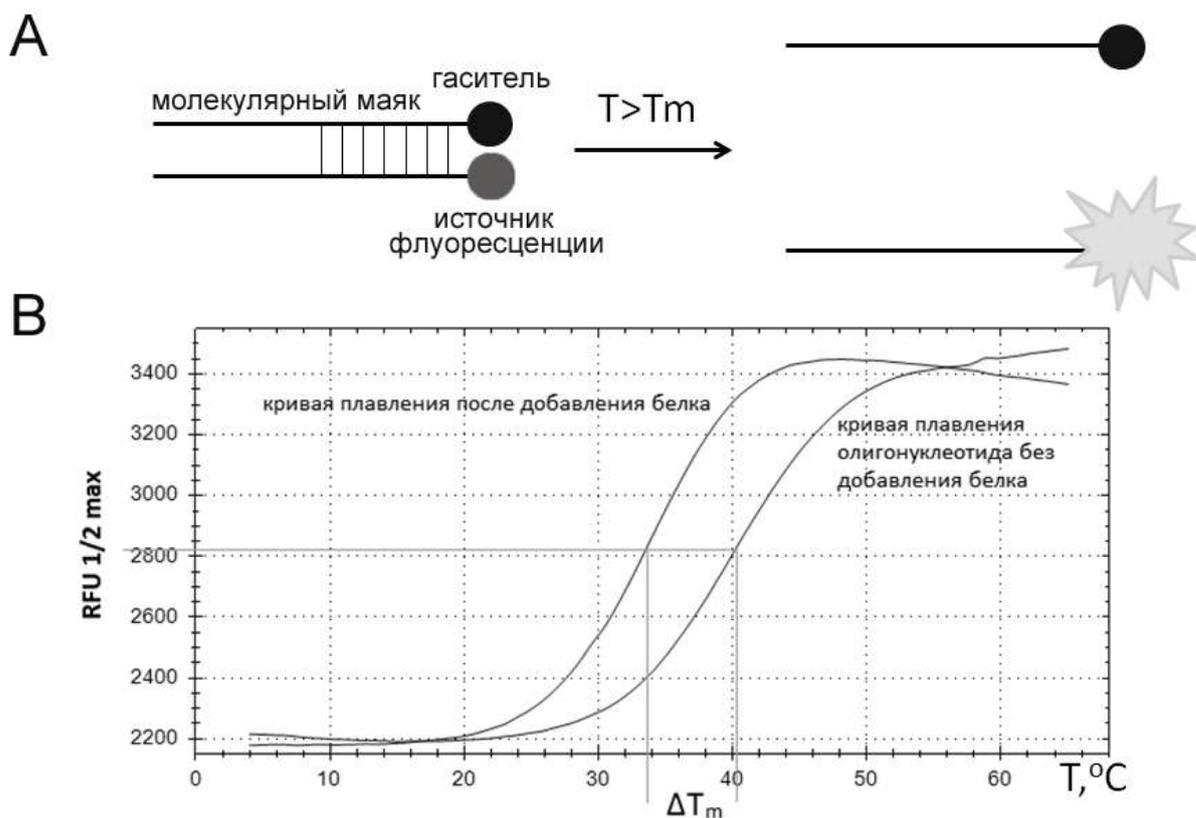


Рис. 2.1. **A.** Схема эксперимента по плавлению молекулярных маяков. **B.** Кривые плавления молекулярных маяков, полученные с помощью прибора Bio-Rad CFX-96 без белка и с белком в качестве дестабилизирующего агента.  $T_m$  – температура, при которой половина молекулярных маяков расплавлена. RFU – относительные единицы флуоресценции.

Молекулярные маяки второго типа состояли из единственного олигонуклеотида, который содержал источник флуоресценции на 5'-конце и гаситель флуоресценции на 3'-конце. Как и в маяках первого типа, при отжиге маяков второго типа происходило образование вторичной структуры и сближение источника и гасителя флуоресценции, однако вторичная структура была внутримолекулярной, а не межмолекулярной. Всего было синтезировано 3 РНК-маяка второго типа.

Нуклеотидные последовательности каждого из синтезированных молекулярных маяков приведены в главе «Результаты» при описании соответствующих экспериментов. Для приготовления молекулярных маяков

первого типа олигонуклеотиды, меченые R6G и BHQ2, смешивали в соотношении 1 к 1 в буфере SB, инкубировали в течение 4 минут при 95°C и помещали в лед для отжига. Для приготовления молекулярных маяков второго типа олигонуклеотид, меченый R6G и BHQ2, инкубировали в течение 4 минут при 95°C в буфере SB и помещали в лед для отжига.

Кривые плавления маяков были получены с помощью амплификатора с детекцией флуоресценции в режиме реального времени CFX-96 (BioRad, США) в трехкратной повторности (возбуждение 526 нм, излучение 555 нм, нагрев 0,4°C в секунду с 4°C до 92°C) для каждого маяка (рис. 2.1 В). Для приготовления образца, необходимое количество белка смешивали с буфером SB до объема 45 мкл. После этого, к образцу добавляли 5 мкл отожденного молекулярного маяка до итоговой концентрации 100 нМ.

Зависимость плавающей активности белков от их концентрации при фиксированной температуре 4°C измеряли при помощи флуориметра LS55 (Perkin Elmer, США), оснащенного термостатируемой ячейкой, подключенной к водяному термостату. В кювету объемом 100 мкл с длиной оптического пути 10 мм вносили образец белка в SB общим объемом 126 мкл и через 1 минуту молекулярный маяк объемом 14 мкл до конечной концентрации 50 нМ. Через 1 минуту после внесения всех компонентов в кювету измеряли флуоресценцию реакционной смеси при 526/555 нм. Все измерения проводили в трехкратной повторности.

## **2.4 Измерение связывания белков с олигонуклеотидами**

Эффективность связывания рекомбинантных белков с олигонуклеотидами оценивали путем измерения анизотропии флуоресценции, величина которой возрастает при связывания белка с флуоресцентно меченым олигонуклеотидом. Олигонуклеотиды имели на 5'-конце флуоресцентный краситель R6G.

Для проведения соответствующих измерений флуоресцентно меченый олигонуклеотид переносили в стандартный буфер SB, инкубировали в течение 4 минут при 95°C и после этого помещали в лед. Анизотропию флуоресценции измеряли при 4°C с помощью флуориметра LS55, укомплектованного устройством для измерения флуоресценции в поляризованном свете. В кювету для измерения последовательно вносили образец белка в буфере SB и меченый олигонуклеотид до конечной концентрации 50 нМ. Раствор перемешивали и измеряли величину анизотропии флуоресценции при 526/555 нм путем регистрации 10 последовательных измерений, осуществленных флуориметром, и последующего расчета среднего значения. Все измерения для каждой концентрации белка производили в трехкратной повторности. Константы диссоциации  $K_D$  между белком и олигонуклеотидом рассчитывали с помощью программного обеспечения Sigmaplot (версия 12) с использованием полученных экспериментальных данных по зависимости величин анизотропии от концентрации исследуемых рекомбинантных белков.

## **2.5 Измерение РНК-шаперонной активности**

Для измерения РНК-шаперонной активности белков применяли молекулярный маяк BC1rna(mQ). Этот маяк получали путем отжига тех же олигонуклеотидов, которые использовались для создания маяка BC1rna (см. раздел «Результаты», рис. 3.20А). Однако, эти олигонуклеотиды смешивали в соотношении 1:2 (олигонуклеотид с флуоресцентным красителем к олигонуклеотиду с гасителем флуоресценции) вместо 1:1 и отжигали в воде mQ вместо буфера SB. Для отжиг маяк BC1rna(mQ) инкубировали при 95°C в течение 4 минут и помещали в лед.

Такой способ приготовления молекулярного маяка BC1rna(mQ) приводил возникновению у него свойств, нехарактерных для маяка BC1rna. Во-первых, уровень флуоресценции маяка BC1rna(mQ) при 4°C во много раз

выше, чем маяк BC1rna, что говорит об отсутствии у BC1rna(mQ) вторичной структуры, сближающей краситель и гаситель флуоресценции, и формировании вместо нее каких-то альтернативных вторичных структур. Во-вторых, при переносе BC1rna(mQ) в буферный раствор SB постепенно происходит снижение флуоресценции, что говорит о переходе этих альтернативных вторичных структур в более устойчивую, характерную для BC1rna. Это снижение растянуто во времени, и ускорить его можно путем добавления к реакционной смеси белка с РНК-шаперонной активностью, способствующего более быстрому переходу вторичных структур.

Для измерения РНК-шаперонной активности белков маяк BC1rna(mQ) помещали в SB, содержащий белок в концентрации 4 мкМ, до конечной концентрации 50 нМ при температуре 4°C и измеряли изменение флуоресценции реакционной смеси во времени. РНК-шаперонная активность белка определялась по скорости падения интенсивности флуоресценции молекулярного маяка BC1rna(mQ) во времени в присутствии и в отсутствие белка; соответственно чем более ускоряется падение флуоресценции, тем выше РНК-шаперонная активность белка.

## **2.6 Комплементация роста бактерий *E. coli* штамма BX04**

Генетические конструкции для экспериментов по комплементации роста бактериальных клеток были созданы на основе вектора pINIII (Xia et al., 2001). Последовательности генов, кодирующих отдельные домены холодового шока EsCSD1-3 и AtCSD1-3, амплифицировали при помощи ПЦР с матрицы кДНК *E. salsgineum* и *A. thaliana* соответственно и встраивали в вектор pINIII по сайтам рестрикции BamHI и NdeI.

На основе вектора pINIII были также созданы генетические конструкции, кодирующие химерные домены холодового шока, представляющие собой комбинацию из фрагментов доменов холодового шока EsCSD1 и EsCSD3. Эти домены холодового шока были разделены на 3

фрагмента: N-фрагмент (от N-конца до мотива RNP1, 21 аминокислотный остаток), M-фрагмент (от начала мотива RNP1 до окончания мотива RNP2, 19 а. о.), C-фрагмент (от мотива RNP2 до окончания домена, 37 а. о.). Указанные части доменов EsCSD1 и EsCSD3 были соединены между собой во всех возможных комбинациях, образуя 6 вариантов химерных доменов. Нуклеотидные последовательности химерных доменов амплифицировали по общей схеме с помощью двух последовательных ПЦР. В ходе первой ПЦР нарабатывали отдельные N-, M- и C-фрагменты с перекрывающимися участками. В ходе второй ПЦР с использованием фланкирующих праймеров амплифицировали нуклеотидные последовательности, кодирующие полные химерные домены. Амплифицированные последовательности были клонированы в вектор pINIII и проверены секвенированием. Используемые для амплификации праймеры приведены в табл. 2.2.

Таблица 2.2.

Праймеры, применявшиеся для амплификации нуклеотидных последовательностей, кодирующих химерные домены холодового шока

F N1M3	5'-GTC AAT TGG TTC AAC GAT TCT AAA GGC TAT GGT TTC ATT AC-3'
F N3M1	5'-GTT AAT TGG TTT AGC GAT GGC AAG GGA TAT GGT TTC ATC AC-3'
R N1M3	5'-GTA ATG AAA CCA TAG CCT TTA GAA TCG TTG AAC CAA TTG AC-3'
R N3M1	5'-GTG ATG AAA CCA TAT CCC TTG CCA TCG CTA AAC CAA TTA AC-3'
F M1C3	5'-GAA GAG CTT TTC GTT CAT CAA TCT TCG ATC GTC TCC GAT GGT-3'
F M3C1	5'-GAT GAG CTT TTC GTT CAT CAG TCC GCA ATC CTC TCC GAA GGT-3'
R M1C3	5'-ACC ATC GGA GAC GAT CGA AGA TTG ATG AAC GAA AAG CTC TTC-3'
R M3C1	5'-ACC TTC GGA GAG GAT TGC GGA CTG ATG AAC GAA AAG CTC ATC-3'

Клетки бактерии *E. coli* штамма BX04, у которого делетированы 4 собственных гена белков холодового шока ( $\Delta cspA$ ,  $\Delta cspB$ ,  $\Delta cspE$ ,  $\Delta cspG$ ), были трансформированы созданными генетическими конструкциями и выращены в жидкой среде LB в присутствии антибиотиков ампициллина (0,2 мг/мл) и канамицина (0,05 мг/мл) до оптической плотности  $OD_{550}=800$ .

Бактериальную культуру, разбавленную в 10, 100, 1000, 10000, 100000 и 1000000 раз, наносили в количестве 7 мкл на поверхность твердой среды LB в чашке Петри, содержащей ампициллин (0,2 мг/мл), канамицин (0,05 мг/мл) и IPTG (0,2 ммоль/мл). Чашки инкубировали при температуре 17°C в течение 5 дней в темноте. Контрольные образцы чашек инкубировали при 37°C в течение ночи. В качестве отрицательного контроля использовали клетки *E. coli* штамма ВХ04, трансформированные пустым вектором рINIII. Положительным контролем служили клетки, трансформированные вектором рINIII с геном CspA основного белка холодового шока *E. coli*, сверхэкспрессия которого восстанавливает способность клеток штамма ВХ04 делиться при пониженной температуре.



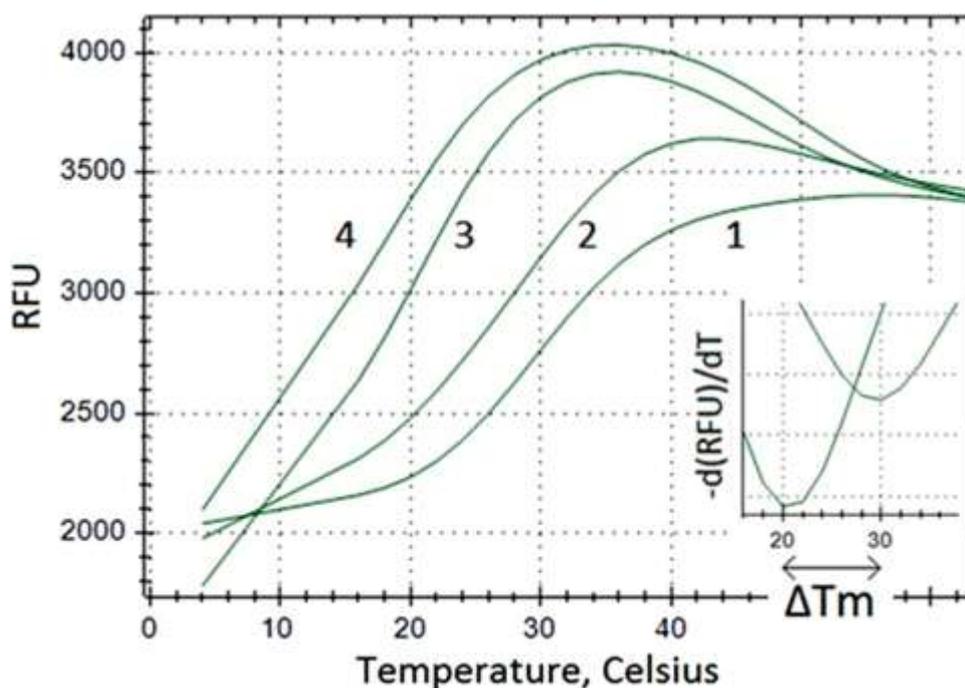


Рис. 3.2. Кривые плавления маяка BC1 в присутствии различных концентраций белка EsCSDP1: кривая 1 – 0  $\mu\text{M}$ , кривая 2 – 0,25  $\mu\text{M}$ , кривая 3 – 1  $\mu\text{M}$ , кривая 4 – 4  $\mu\text{M}$ . RFU – относительный уровень флуоресценции. На вставке в нижнем правом углу приведены смещения  $T_m$  в присутствии 1  $\mu\text{M}$  EsCSDP1. Смещение  $T_m$  оценивается как разница между максимумом производной  $-d(\text{RFU})/dT$  для кривых плавления без белка и с белком.

Эксперименты по плавлению маяка BC1 были также осуществлены с белками EsCSDP2 и EsCSDP3. На рис. 3.3 показаны зависимости  $T_m$  маяка BC1 от концентраций белков EsCSDP1-3. Из всех трех белков, наименьшую плавящую активность продемонстрировал EsCSDP2, в то время как плавящая активность белков EsCSDP1 и EsCSDP3 была приблизительно одинаковой и существенно более высокой, чем у EsCSDP2. Наибольшее различие между белками заключалось в максимальном значении сдвига  $T_m$ , которое превышало 10 $^\circ\text{C}$  для EsCSDP1 и EsCSDP3 и составляло 5 $^\circ\text{C}$  для EsCSDP2. В качестве контроля использовался мутантный вариант белка EsCSDP 3 – EsCSDP3M, содержащий мутации в основных ДНК-связывающих мотивах. В этом и последующих экспериментах EsCSDP3M был полностью неактивен.

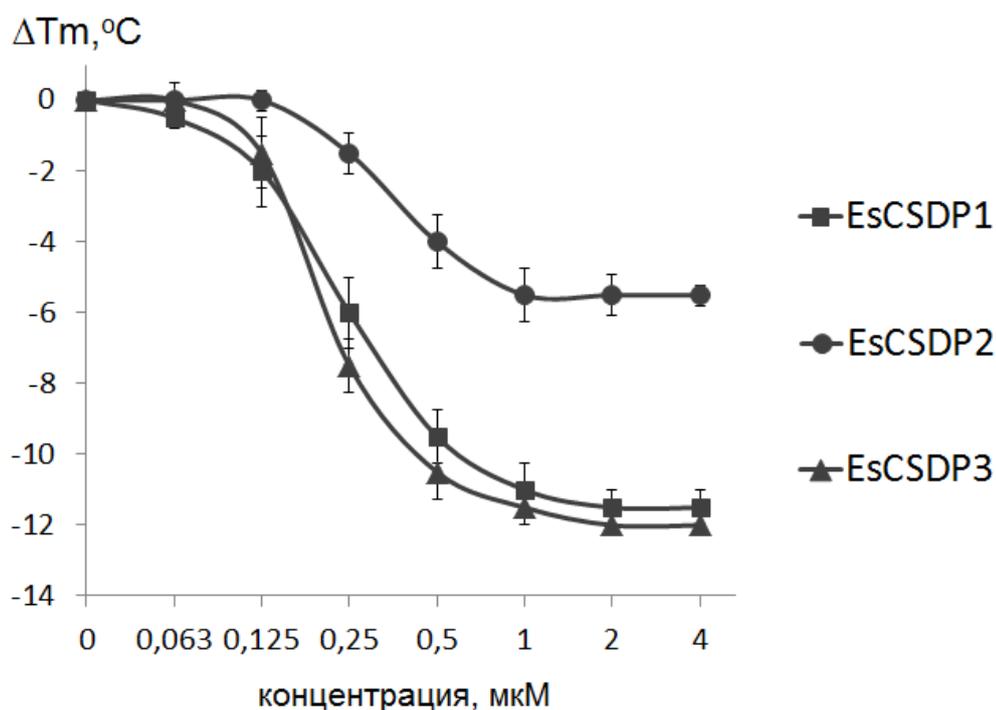


Рис. 3.3. Зависимость сдвига  $T_m$  маяка BC1 от концентраций белков EsCSDP1-3. Показатель  $\Delta T_m$  рассчитывается как различие между значениями  $T_m$  маяка в отсутствие белка и в присутствии белка в соответствующей концентрации.

Нами было исследовано, сохраняют ли белки EsCSDP1-3, подвергнутые высокотемпературной обработке, свою ДНК-плавящую активность. Кривые плавления молекулярного маяка BC1 в присутствии белков EsCSDP1-3, подвергнутых высокотемпературной обработке, приведены на рис. 3.4. Из этих данных видно, что температурная обработка не оказала существенного влияния на проявление белками EsCSDP1-3 ДНК-плавящей активности в отношении маяка BC1. Этот результат не является неожиданным, поскольку аналогичное свойство было обнаружено для белка с доменом холодового шока пшеницы WCSP1 (Nakaminami et al., 2005).

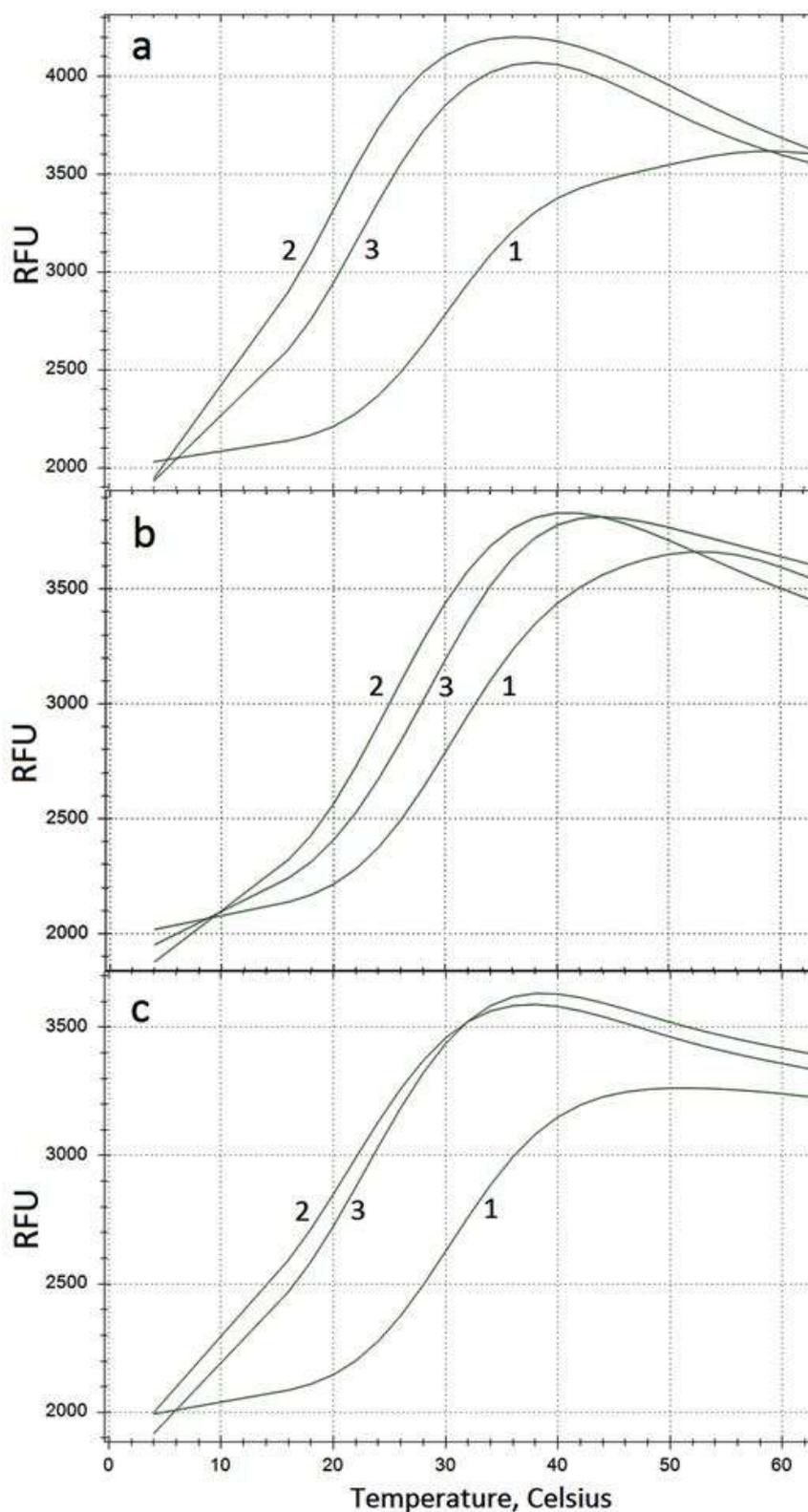


Рис. 3.4. Кривые плавления молекулярного маяка BC1 в присутствии белков, подвергнутых тепловой обработке (EsCSDP1 – a; EsCSDP2 – b; EsCSDP3 – c). 1 – маяк BC1, 2 – BC1 + белок (1 мкМ EsCSDP1 или EsCSDP3, 2 мкМ EsCSDP2), 3 – BC1 + белки после инкубирования при 95°C в течение 20 минут.

Помимо ДНК-плавающей активности полных белков EsCSDP1-3, нами также была исследована активность отдельных доменов холодового шока EsCSD1-3 из белков EsCSDP1-3, а также отдельного С-концевого фрагмента EsZnF1 из белка EsCSDP1, содержащего 6 мотивов «цинковый палец», и эквимольной смеси EsCSD1 и EsZnF1 (EsMix1). Для сравнения измерялась также плавающая активность белка CspA из бактерии *E. coli*. В исследованном диапазоне концентраций ни один из отдельных доменов холодового шока EsCSD1-3 не проявлял заметной ДНК-плавающей активности. В противоположность этому, EsZnF1, EsMix1 и CspA плавили маяк BC1 (рис. 3.5). Концентрации белков, необходимые для снижения  $T_m$  BC1 на значение, составляющее половину от максимального снижения  $T_m$  в присутствие этого белка, соотносились как 1:2:4 для EsCSDP1:EsMix1:EsZnF1 (сравнение рис. 3.3 и 3.5). Таким образом, наиболее высокую ДНК-плавающую активность проявлял полный белок EsCSDP1, а наименее высокую – отдельный С-концевой фрагмент из этого белка. Несмотря на то, что отдельный домен холодового шока EsCSD1 сам по себе не плавил маяк BC1, его добавление к EsZnF1 существенно повышало ДНК-плавающую активность последнего. В отличие от остальных белков, CspA проявлял существенную ДНК-плавающую активность при концентрациях выше 1  $\mu$ M.

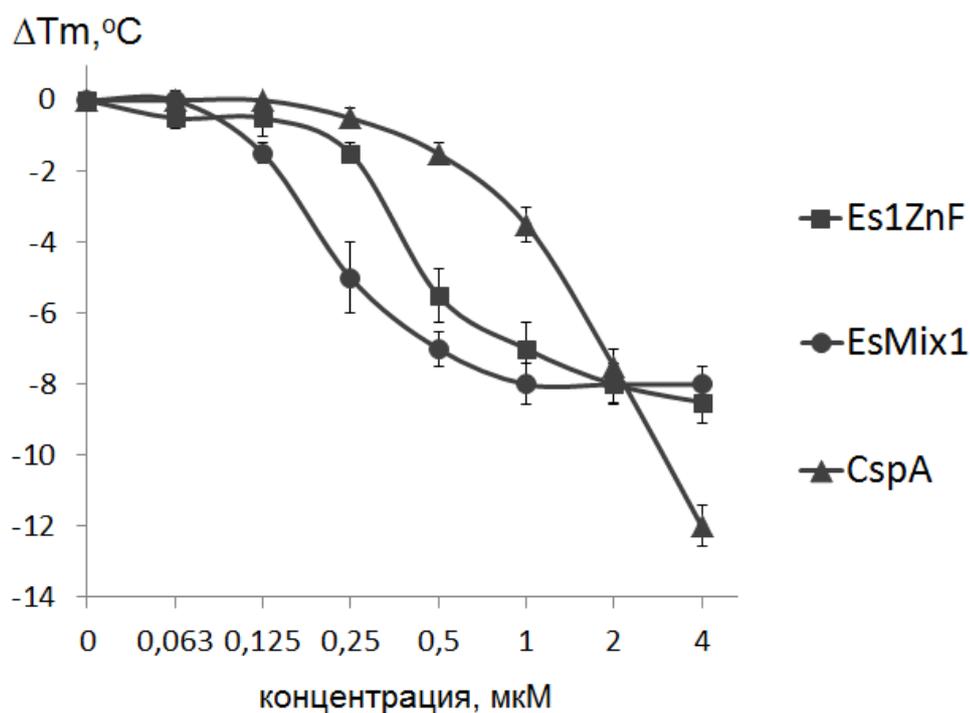


Рис. 3.5. Зависимость сдвига  $T_m$  маяка BC1 от концентраций белков EsZnF1, EsMix1 и CspA.

Для того, чтобы проверить, могут ли CSDP *E. salmugineum* плавить вторичные структуры в молекулах ДНК с различной последовательностью нуклеотидов, были синтезированы несколько молекулярных ДНК-маяков, отличающихся от BC1 нуклеотидными последовательностями одно- или двуцепочечных участков. Названия и схематические изображения ДНК-маяков приведены на рис. 3.6. Молекулярный маяк BC1f по сравнению с BC1 содержал несколько нуклеотидных замен в одноцепочечном участке, примыкающем к двуцепочечному с 3'-направления, а маяк BC1r – с 5'-направления. В молекулярном маяке BC1fr длина двуцепочечного участка составляла 10 п.н. вместо 9 п.н. в BC1, и помимо этого присутствовали нуклеотидные замены в одноцепочечных участках маяка. Молекулярный маяк BCnp состоял из вторичной структуры, аналогичной таковой в BC1, и двух одноцепочечных участков с вырожденной последовательностью нуклеотидов. Маяк BCmix содержал одноцепочечные участки, аналогичные таковым в BC1, однако двуцепочечные участки этих молекулярных маяках различались последовательностью нуклеотидов.



«Длинные» белки стабильно проявляли приблизительно одинаковую и существенно более высокую плавящую активность, чем «короткий» белок EsCSDP2. Особенно сильно указанное свойство проявлялось при измерении плавления молекулярного маяка BCnn, содержащего одноцепочечные участки с вырожденной последовательностью нуклеотидов, поскольку белок EsCSDP2, в отличие от EsCSDP1 и EsCSDP3, не плавил этот маяк.

Было также исследовано взаимодействие с маяком BCnn отдельных фрагментов белка EsCSDP1 (рис. 3.7). Отдельный С-концевой фрагмент белка EsCSDP1, в том числе в смеси с доменом холодового шока EsCSD1, плавил маяк BCnn. При этом, как и в эксперименте с маяком BC1, был выявлен некоторый синергический эффект в действии EsZnF1 и EsCSD1, поскольку плавящая активность смеси EsMix1 несколько превышала таковую для EsZnF1. Отмеченный синергический эффект наблюдался, однако, только при концентрации белков менее 1 мкМ и на более высоких концентрациях не детектировался.

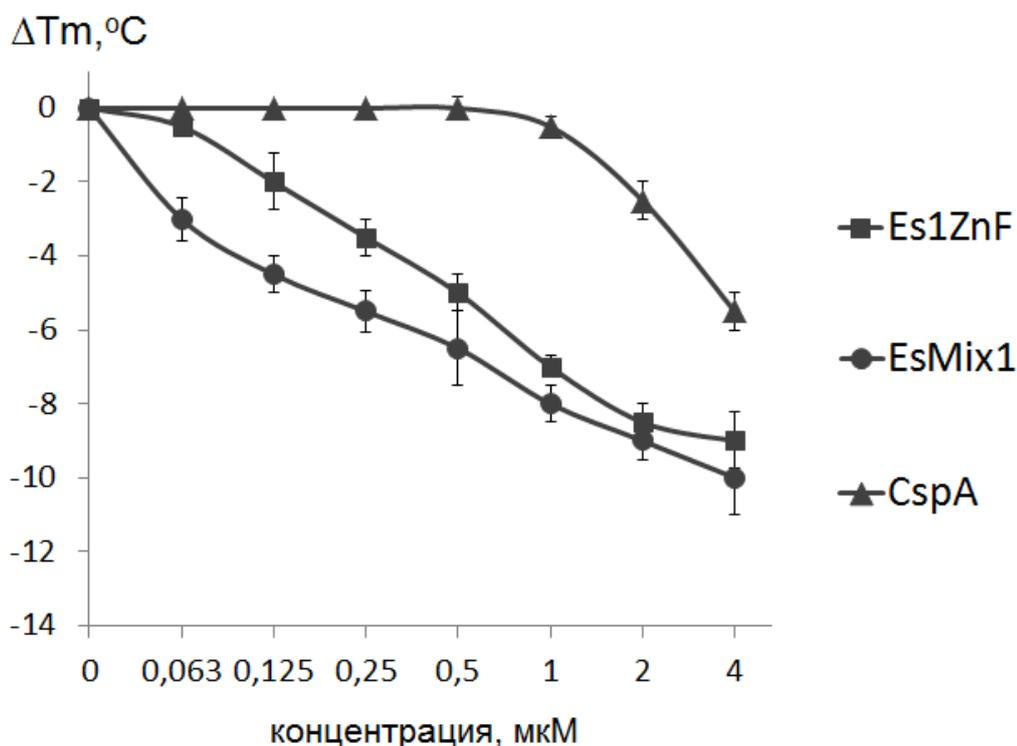


Рис. 3.7. Зависимость сдвига  $T_m$  маяка BCnn от концентраций белков EsZnF1, EsMix1 и CspA.

### 3.2 Одноцепочечные участки в молекулярных маяках необходимы для проявления белками EsCSDP1-EsCSDP3 ДНК-плавающей активности

Для того, чтобы исследовать значение одноцепочечных участков маяка BC1 для проявления белками с доменом холодового шока *Eutrema salsugineum* ДНК-плавающей активности, на основе последовательности BC1 были спроектированы и синтезированы маяки BCstem и BCfullstem (рис. 3.8А). Маяк BCstem представлял собой отдельную двуцепочечную шпильку из маяка BC1 длиной 9 пар нуклеотидов. Маяк BCfullstem состоял из двух полностью комплементарных нуклеотидных последовательностей длиной 40 пар оснований, при этом олигонуклеотид с присоединенным к 3'-концу гасителем флуоресценции содержал одноцепочечный разрыв между нуклеотидами 31 и 32. Благодаря наличию одноцепочечного разрыва,  $T_m$  маяка BCfullstem была равна  $T_m$  маяка BC1.

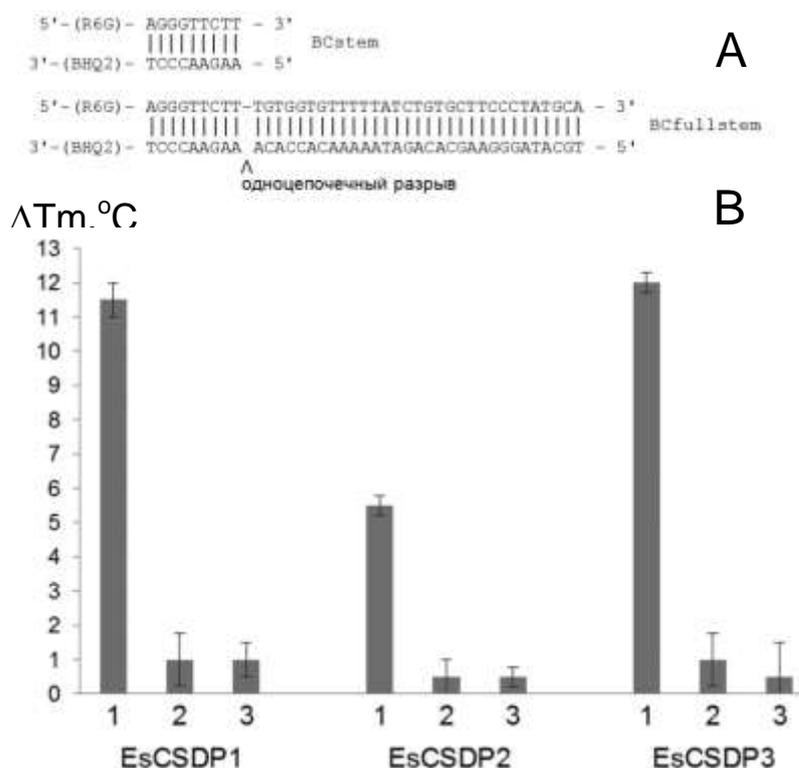


Рис. 3.8. **А.** Схематические изображения маяков BCstem и BCfullstem. **В.** Плавление маяков BC1 (1), BCstem (2), BCfullstem (3) в присутствии 8 мкМ белков EsCSDP1-3.

Было установлено, что белки EsCSDP1-3 в концентрации 8μM не плавят маяки BCstem и BCfullstem (Рис. 3.8В). Таким образом, была доказана необходимость наличия в молекулярном маяке одноцепочечных участков для проявления белками с доменом холодового шока плавающей активности. При этом, оставалось неясным, необходимы ли для этого оба одноцепочечных участка в 5'- и 3'-положении от вторичной структуры или только один из них. Чтобы выяснить это, были синтезированы маяки BC1-5 и BC1-3, каждый из которых содержал только один одноцепочечный участок в 5'- или в 3'-положении от двуцепочечного (рис. 3.9А). Из приведенного рисунка видно, что белки EsCSDP1 и EsCSDP3, а также отдельный С-концевой фрагмент из EsCSDP1 (EsZnF1) практически не плавили маяк BC1-5, содержащий одноцепочечный участок в 5'-положении от шпильки; при этом плавающая активность этих же белков в отношении маяка BC1-3 была значительной (рис. 9Б).

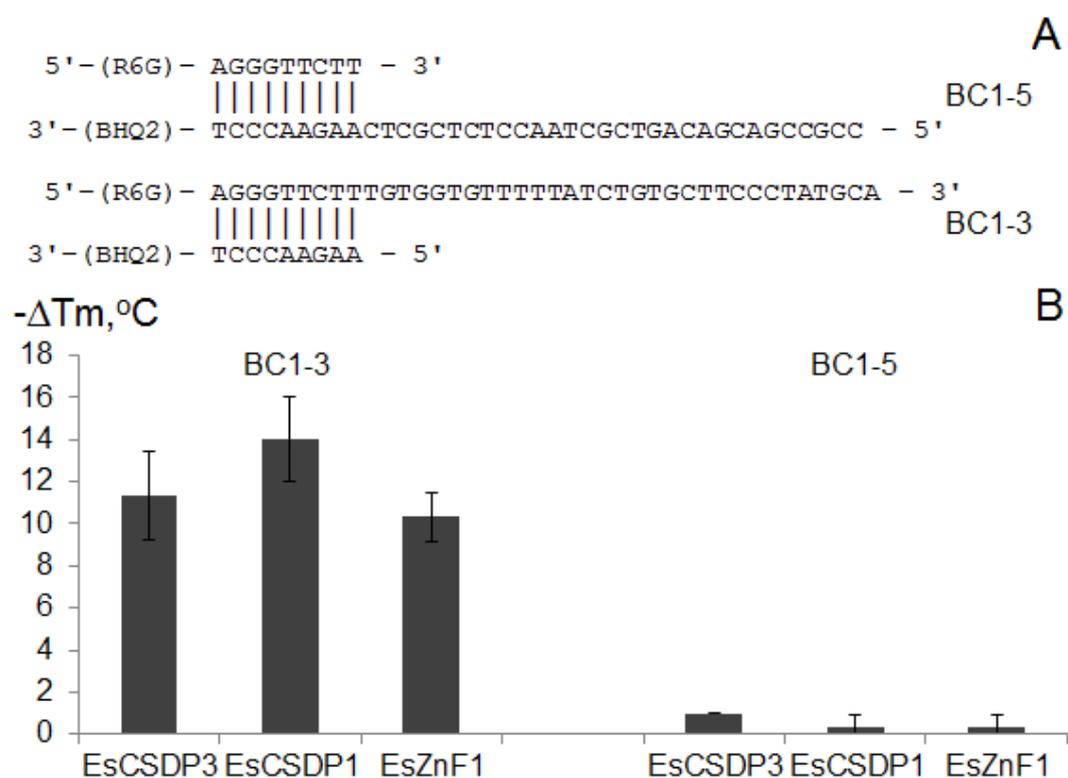


Рис. 3.9. **A.** Схематические изображения маяков BC1-3 и BC1-5. **B.** Плавление маяков BC1-3 и BC1-5 в присутствии белков EsCSDP1, EsCSDP3, EsZnF1. Концентрация каждого из белков была равна 4 мкМ.



дальнейшем его укорачивании резко снижалась, практически исчезая при длине одноцепочечного участка в 2 нуклеотида (рис. 3.11В). Схожая закономерность была обнаружена для отдельного С-концевого фрагмента белка EsCSDP1 (рис. 3.11С).

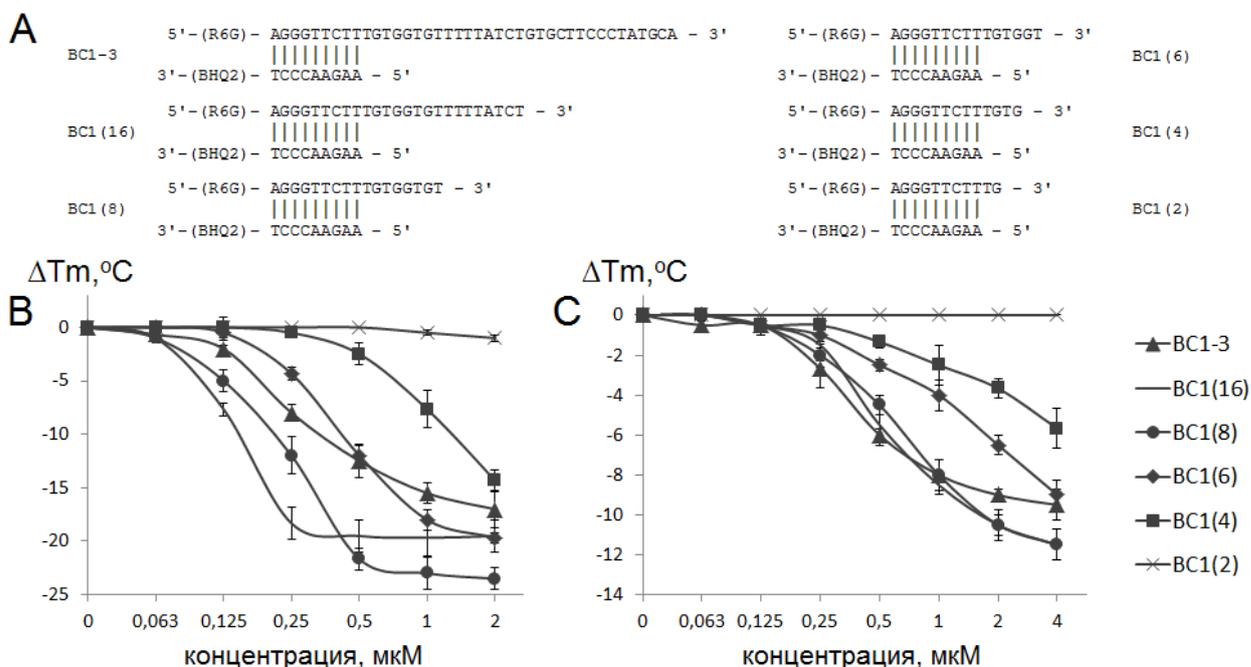


Рис. 3.11. **А.** Схематические изображения молекулярных маяков BC1-3, BC1(16), BC1(8), BC1(6), BC1(4), BC1(2). **В.** Плавление маяков в присутствии EsCSDP1. **С.** Плавление маяков в присутствии EsZnF1.

Для определения оптимальной длины одноцепочечного участка также были синтезированы молекулярные маяки – производные BCfullstem, однако содержавшие в одной из цепей не просто разрыв, а делецию участка размером 2, 4, 6, 8, 10, 12 нуклеотидов, примыкающую к вторичной структуре (рис. 3.12А). Было установлено, что плавающая активность белка EsCSDP1 последовательно повышалась при увеличении размера делеции в одной из цепей и, соответственно, удлинении одноцепочечного участка перед вторичной структурой (рис. 3.12В).



маяком. При этом, эффективно связываться CSDP могут по всей видимости только с одноцепочечными последовательностями нуклеотидов. Для проверки этого предположения было исследовано связывание EsCSDP1 с флуоресцентно мечеными олигонуклеотидами, которые по структуре одноцепочечных и двуцепочечных участков были идентичны использовавшимся ранее маякам BC1-3, BC1(16), BC1(8), BC1(6), BC1(4), BC1(2), BC1stem. На рис. 3.13 приведены кривые зависимости анизотропии флуоресценции олигонуклеотидов BCstem, BC1(4), BC1(8) от концентрации белка EsCSDP1.

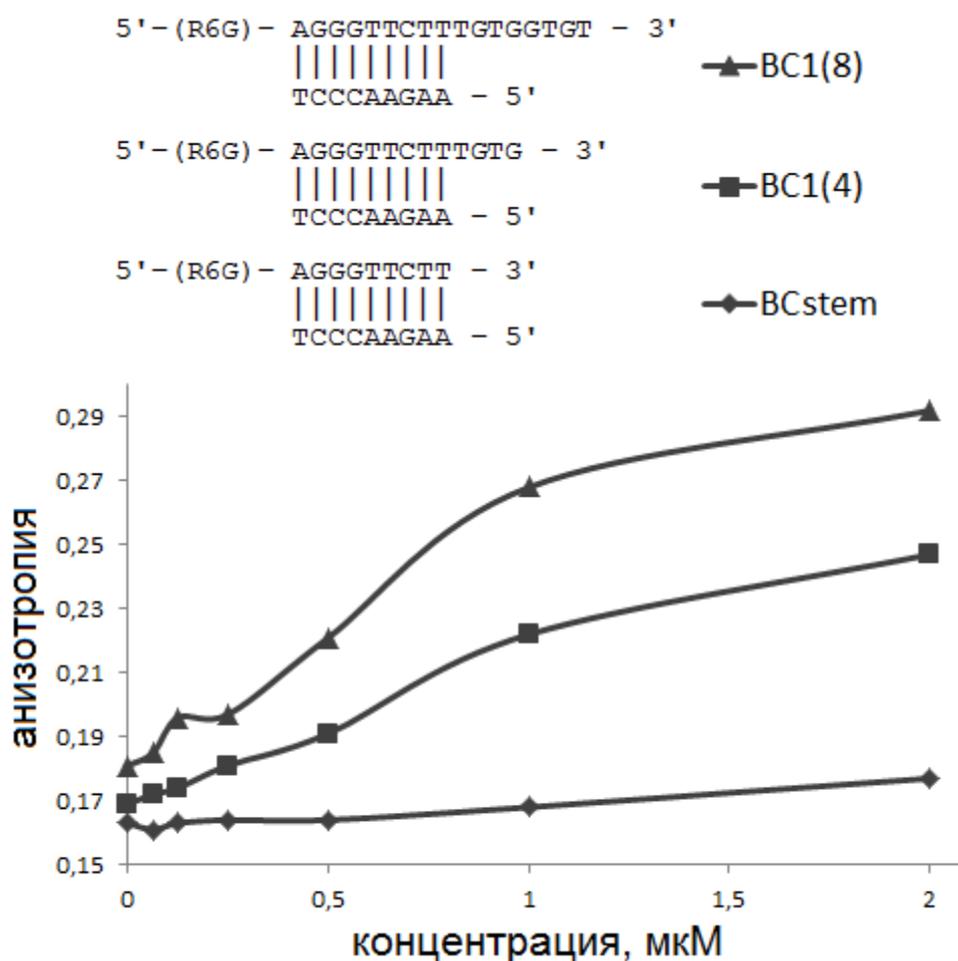


Рис. 3.13. Зависимость анизотропии флуоресценции флуоресцентно меченых олигонуклеотидов, аналогичных по структуре маякам BC1(8), BC1(4), BCstem, от концентрации белка EsCSDP1.

Аналогичные концентрационные зависимости были получены для флуоресцентно меченых олигонуклеотидов BC1-3, BC1(16), BC1(6), BC1(2), BC1stem и на основе всех данных были рассчитаны константы диссоциации  $K_D$  между белком EsCSDP1 и этими олигонуклеотидами (рис. 3.14). Расчет констант диссоциации позволил установить, что аффинность связывания белка EsCSDP1 практически не изменяется при длине одноцепочечного участка более 6 нуклеотидов, однако при дальнейшем его укорачивании резко снижается (рис. 3. 14). Параллельно исследовалось взаимодействие EsCSDP1 с одноцепочечными олигонуклеотидами, представлявшими собой отдельные меченые флуоресцентным красителем R6G цепи из маяков BC1-3, BC1(16), BC1(8), BC1(6), BC1(4), BC1(2), BC1stem. При снижении длины одноцепочечного олигонуклеотида с 40 до 9 нуклеотидов, наблюдался рост  $K_D$ , однако он был очень небольшим (рис. 3.14).

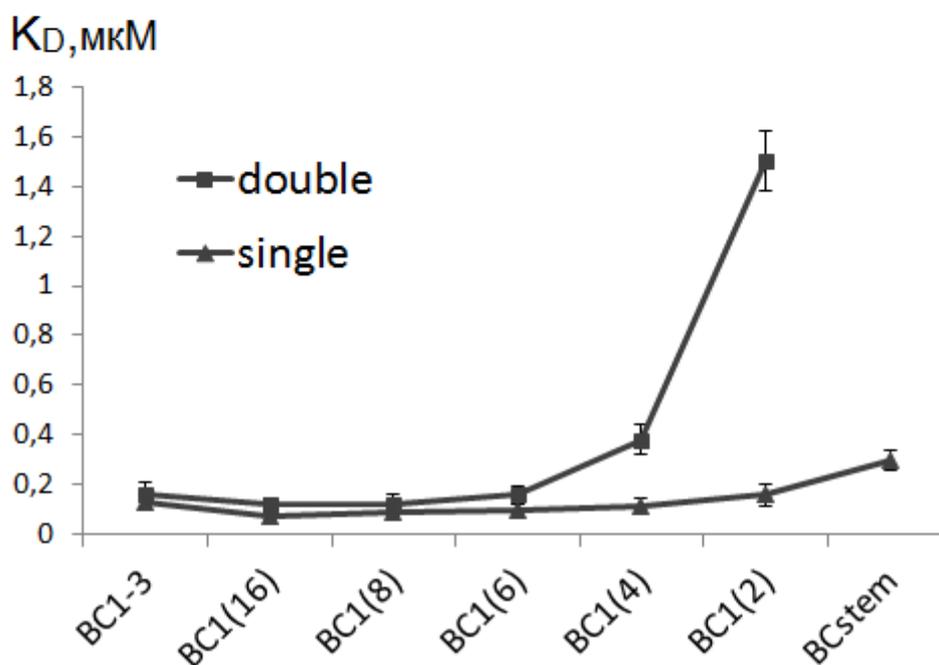
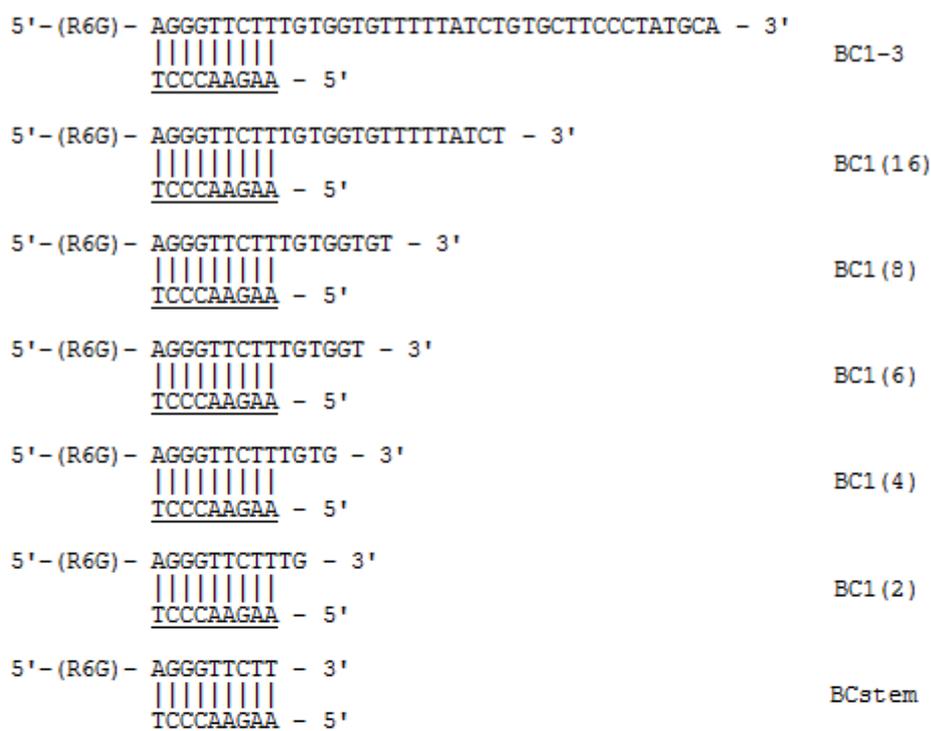


Рис. 3.14. Константы диссоциации между белком EsCSDP1 и флуоресцентно мечеными олигонуклеотидами с различной длиной одноцепочечных участков. Нуклеотидная цепь длиной 9 п.о. (подчеркнута на рисунке) присутствовала в олигонуклеотидах, содержавших вторичную структуру («double») и отсутствовала в олигонуклеотидах, не содержавших вторичной структуры («single»).

### 3.4 ДНК-плавающая активность белка EsCSDP1 зависит от длины его С-концевой части

ДНК-плавающая активность короткого белка EsCSDP2 в отношении большинства молекулярных маяков была существенно ниже, чем активности EsCSDP1 и EsCSDP3. Чтобы установить, объясняется ли различие в плавающей активности меньшей длиной С-концевой части и «цинковых пальцев», применялись варианты белка EsCSDP1 с укороченной С-концевой частью, содержащей 4 или 2 мотива «цинковые пальцы» (рис. 3.15А). В экспериментах с различными молекулярными маяками было установлено, что ДНК-плавающая активность EsCSDP1 последовательно снижается с укорачиванием С-концевой части (рис. 3.15В).

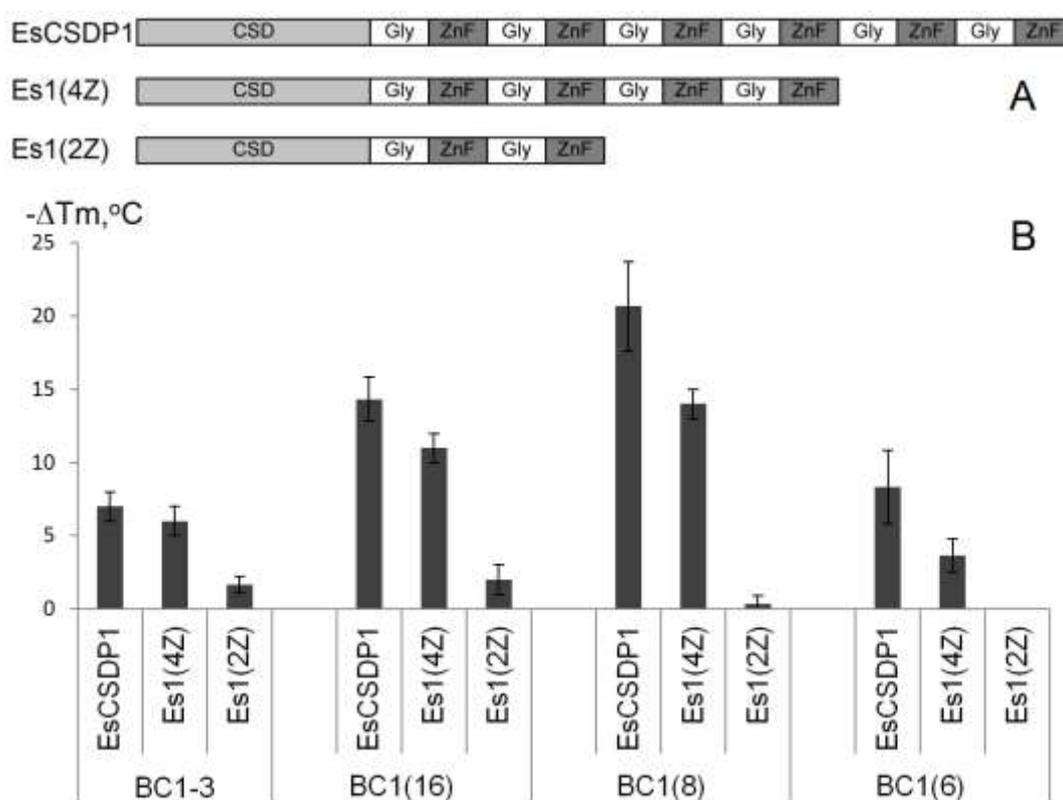


Рисунок 3.15. **А.** Схематическое изображение белка EsCSDP1 и его укороченных вариантов с укороченной С-концевой частью, содержащей четыре (Es1(4Z)) или два (Es1(2Z)) мотива «цинковый палец» в С-концевой части. **В.** Плавление маяков BC1-3, BC1(16), BC1(8), BC1(6) в присутствии белков Es1(4Z) и Es1(2Z).

Таким образом, было установлено, что для плавления вторичных структур в ДНК белком EsCSDP1 и предположительно другими CSDP растений требуется связывание с одноцепочечным участком, примыкающим к двуцепочечному участку с 3'-направления. При этом размер необходимого одноцепочечного участка составляет не менее 6 нуклеотидов. По имеющимся литературным данным, домены холодового шока из различных CSDP взаимодействуют с нуклеотидными последовательностями длиной 6-9 (оптимально 7-8) нуклеотидов (Mayr et al., 2012; Sawyer et al., 2015; Zeeb et al., 2006).

Исходя из этого, нами было высказано предположение, что CSDP растений связываются с одноцепочечной последовательностью в ДНК-маяках с помощью домена холодового шока, после чего С-концевая часть белка может взаимодействовать со вторичной структурой и расплавить ее. При взаимодействии с ДНК-маяками отдельного С-концевого фрагмента из EsCSDP1, связывание может происходить посредством мотивов «цинковые пальцы», находящихся в составе С-концевого фрагмента.

Для проверки этого предположения применялся маяк BC2 (Рисунок 3.16А). Этот маяк был спроектирован с помощью программного обеспечения NUPACK (Zadeh et al., 2011) таким образом, чтобы, как и BC1, содержать двуцепочечный участок длиной 9 пар оснований и два одноцепочечных участка длиной 31 и 30 пар оснований. При этом, какая-либо гомология нуклеотидных последовательностей между маяками BC1 и BC2 отсутствовала. Особенностью одноцепочечных участков молекулярного маяка BC2 является отсутствие в них гуанина. Сравнительное исследование плавления маяка BC2 полным белком EsCSDP1 и его отдельным С-концевым фрагментом показало, что полный EsCSDP1 проявляет существенную плавящую активность уже при концентрации 0,5 мкМ, в то время как С-концевой фрагмент практически не плавит BC2 во всем диапазоне исследованных концентраций. Вероятно,

этот эффект объясняется невозможностью эффективного связывания «цинковых пальцев» с одноцепочечными участками, не содержащими гуанин. Этот результат не является неожиданным, поскольку гуанин был обнаружен в мотивах связывания «цинковых пальцев» ССНС-типа из различных белков (Guerrero et al., 2010).

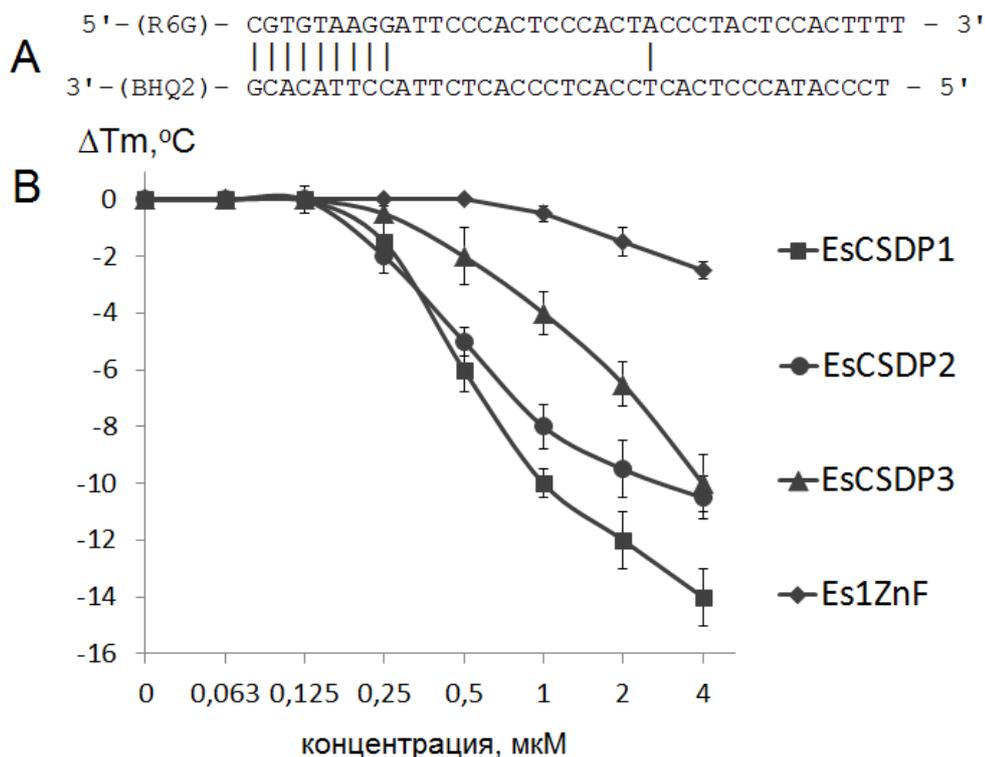


Рис. 3.16. **A.** Схематическое изображение молекулярного маяка BC2. **B.** Плавление BC2 в присутствии EsCSDP1, EsCSDP2, EsCSDP3, EsZnF1.

### 3.5 ДНК-плавящая активность белков EsCSDP1-3 при 4°C

Исследование плавящей активности белков EsCSDP1-3 проводилось не только при повышающейся температуре, но и при постоянной температуре 4°C. В этих условиях, флуоресценция маяка BC1 в присутствии белков EsCSDP1 и EsCSDP3 быстро увеличивалась при повышении молярного соотношения белка к маяку более чем к 10:1, то есть в диапазоне концентраций белка, при которых значение Tm уже выходило на плато (рис. 3.17 в сравнении с рис. 3.3).

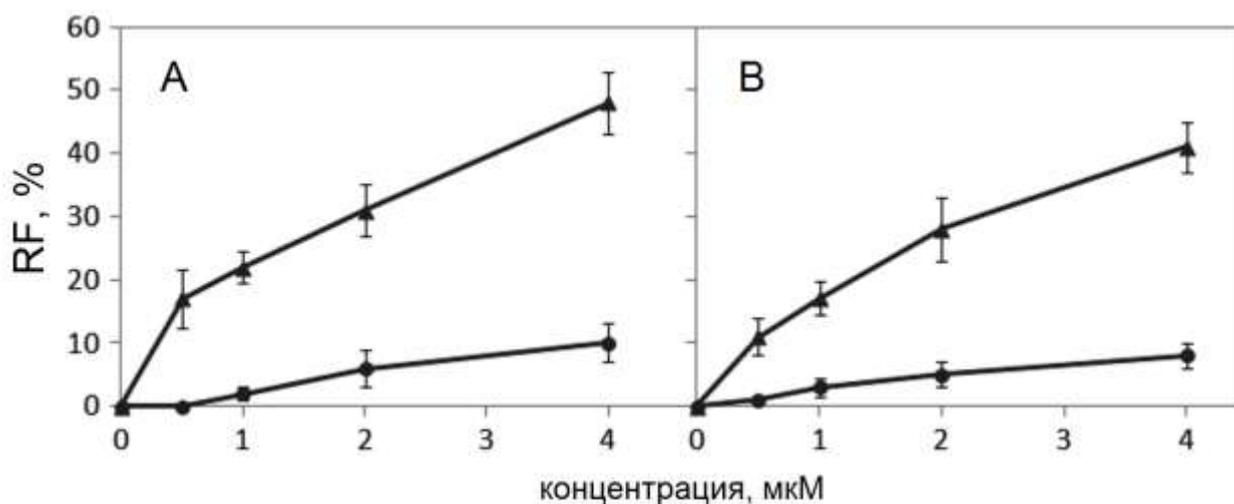


Рис. 3.17. ДНК-плавящая активность белков EsCSDP1 и EsCSDP3 при 4°C. Зависимость флуоресценции маяков BC1(▲) и BCnn(●) при 4°C от концентрации белков EsCSDP1 (A) и EsCSDP3 (B). Ось Y – относительная флуоресценция в присутствии белка в процентах от флуоресценции полностью расплавленного ДНК-маяка при 95°C.

Диаграммы на рис. 3.18 отображают флуоресценцию молекулярных маяков BC1 и BCnn при постоянной температуре 4°C и соотношении белок:маяк 80:1 (4 мкМ белка : 50 нМ маяка). Очевидно, что наибольшую ДНК-плавящую активность в этих условиях проявляли белки EsCSDP1 и EsCSDP3, в то время как EsCSDP2 характеризовался наименьшей активностью. Отдельный С-концевой фрагмент EsZnF1 проявлял существенно меньшую плавящую активность, чем полный белок EsCSDP1. Плавящая активность белков EsCSDP1 и EsCSDP3 была существенно выше в отношении маяка BC1 по сравнению с BCnn.

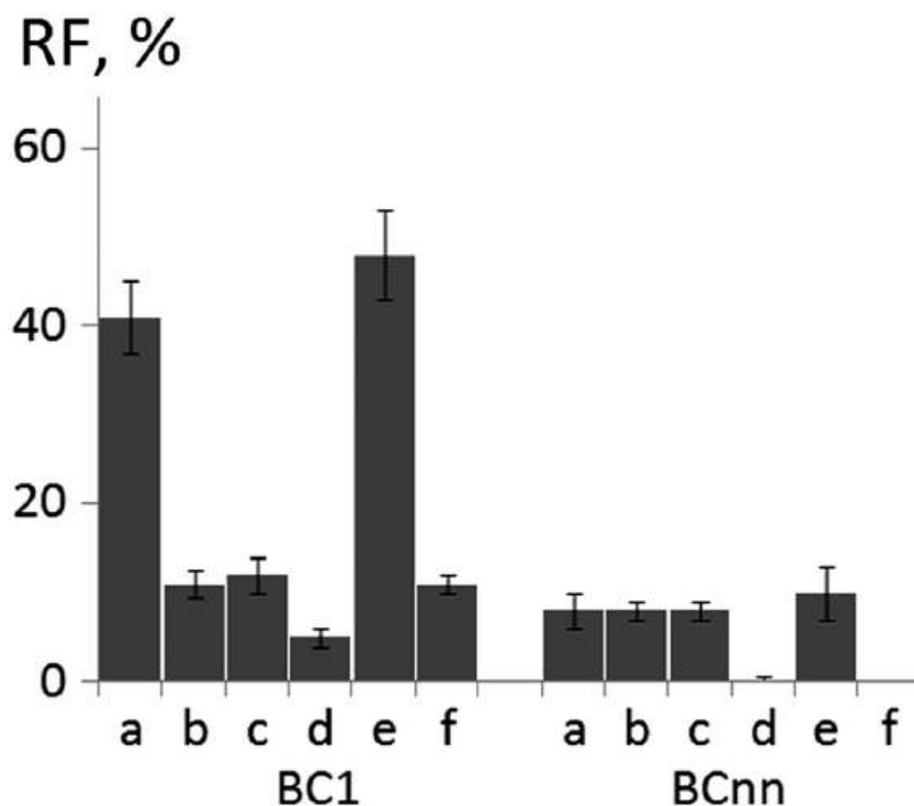


Рис. 3.18. Эффект белков на флуоресценцию маяков BC1 и BCnn при 4°C. а – EsCSDP1, b – EsZnF1, с – EsMix1, d – EsCSDP2, e – EsCSDP3, f – CspA. Концентрация белков составляла 4μM. RF – относительная флуоресценция в присутствии белка в процентах от флуоресценции полностью расплавленного ДНК-маяка при 95°C.

В ходе измерения ДНК-плавящей активности при 4°C было замечено, что после смешивания белков с маяком BC1 в кювете для измерения флуоресценции, уровень флуоресценции не устанавливался мгновенно, но достигал равновесия в течение более чем 5 минут (рис. 3.19). С повышением температуры задержка снижалась, составляя при 15°C около 1 минуты.

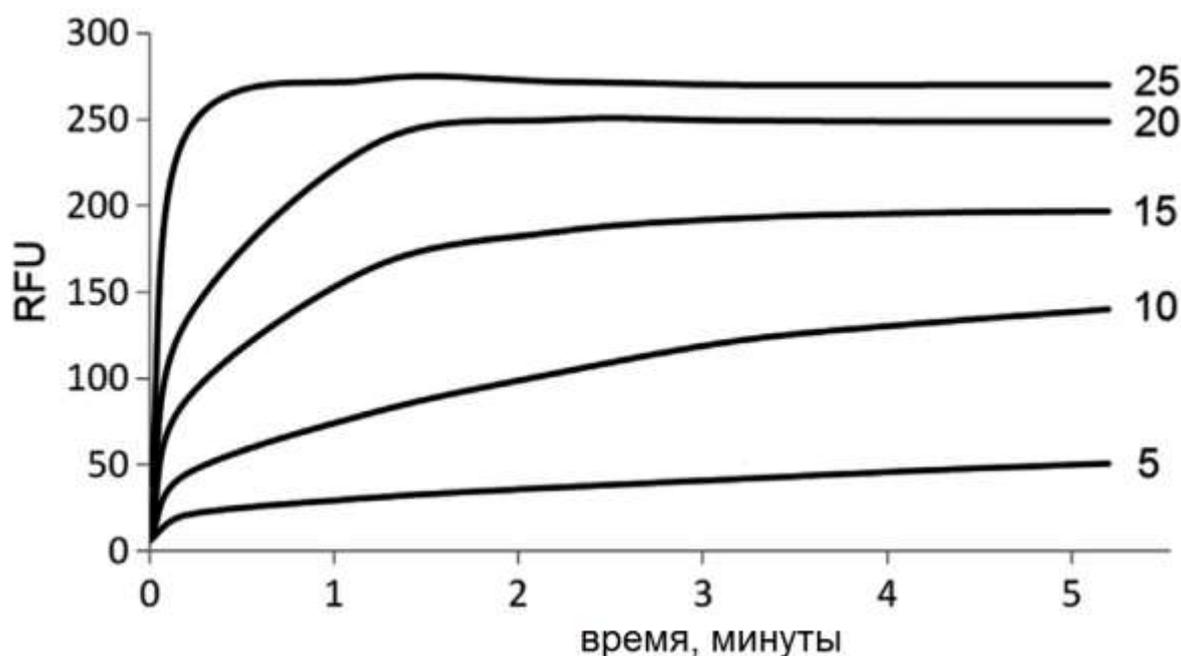


Рис. 3.19. Зависимость флуоресценции маяка BC1 от времени в присутствии белка EsCSDP1 в концентрации 1 мкМ при различной температуре инкубирования (5, 10, 15, 20, 25°C).

### 3.6 РНК-плавающая активность белков с доменом холодового шока *Eutrema salsugineum*

Ранее, плавающая активность CSDP растений *in vitro* исследовалась только в отношении олигодезоксирибонуклеотидов. Для того, чтобы исследовать РНК-плавающую активность белков EsCSDP1-3 в отношении вторичных структур в РНК, было синтезировано несколько молекулярных маяков с различной структурой. РНК-маяк BC1<sub>rna</sub> был структурно идентичен ДНК-маяку BC1, однако состоял из рибонуклеотидов, а не дезоксирибонуклеотидов, и содержал урацил вместо тимина (рис. 3.20А). РНК-маяк let7 (рис. 3.20В) по своей структуре идентичен фрагменту пре-микроРНК let-7, являющейся специфичной мишенью для CSDP животных Lin-28, который по своей доменной организации наиболее близок CSDP растений, поскольку так же содержит домен холодового шока в N-концевой части и два мотива «цинковые пальцы» CCHC-типа в С-концевой части. Молекулярный маяк let7-4А вместо мотива GGAG в let7 содержит мотив

АААА (рис. 3.20С). Молекулярный маяк let7dis по своей нуклеотидной последовательности практически идентичен маяку let7 (имеет переставленные местами А37 и U38), однако его предсказанная вторичная структура отличается очень сильно (рис.3.20D).

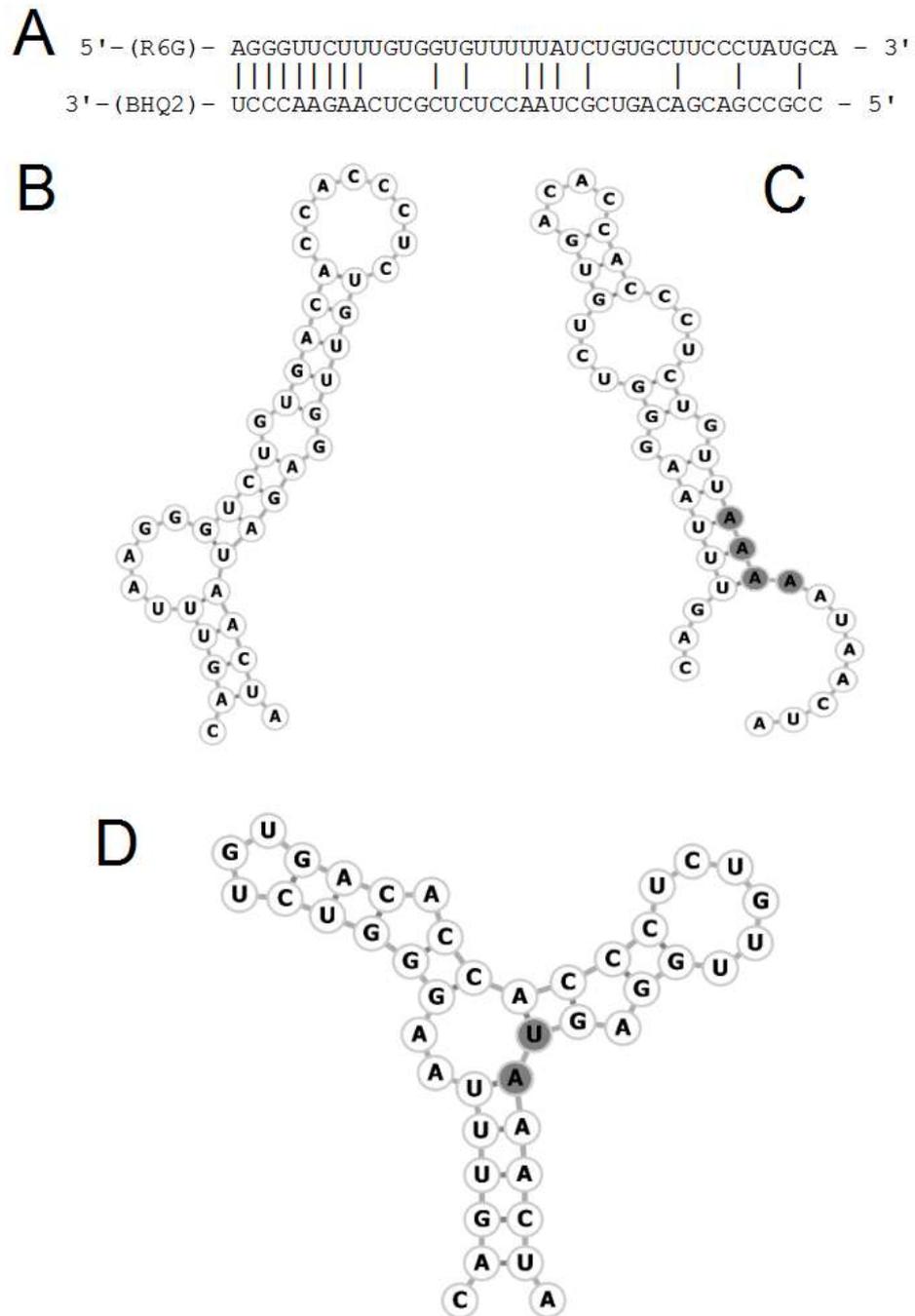


Рис. 3.20. Пространственные структуры молекулярных маяков BC1rna (A), let7 (B), let7-4A (C), let7dis (D). В let7-4A и let7dis выделены серым цветом нуклеотиды, измененные по сравнению с маяком let7.

Исследование плавающей активности белков EsCSDP1-3 в отношении молекулярного маяка BC1rna показало, что EsCSDP1 и EsCSDP3 проявляли высокую и схожую РНК-плавающую активность, в то время как активность EsCSDP2 была существенно ниже (рис. 3.21). Добавление в реакционную смесь 3 мМ аденозинтрифосфата АТФ не влияло на РНК-плавающую активность белков EsCSDP1-3. Белок EsCSDP3mut не плавил BC1rna, белок CspA также не проявлял существенной плавающей активности (рис. 3.21). Учитывая то, что CspA плавил маяк BC1, низкая плавающая активность этого белка в отношении BC1rna может объясняться более высокой  $T_m$  BC1rna – 52°C по сравнению с 30°C у BC1, соответственно.

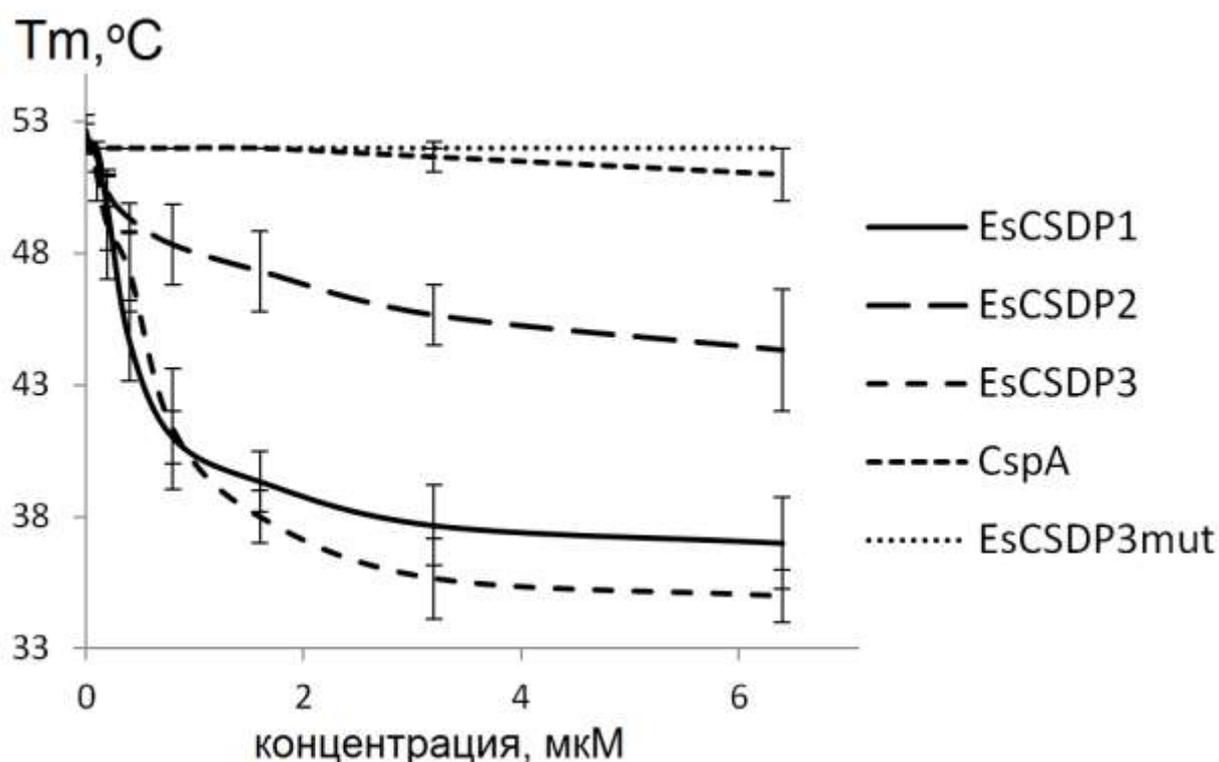


Рис. 3.21. Плавление молекулярного маяка BC1rna в присутствии белков EsCSDP1, EsCSDP2, EsCSDP3, CspA, EsCSDP3mut.

Для того, чтобы установить, плавят ли белки EsCSDP1-3 вторичные структуры в молекулярных РНК-маяках с различной последовательностью нуклеотидов и пространственной структурой, был синтезирован маяк let7 (рис. 3.20B). Аналогичный маяк использовался ранее для изучения РНК-плавающей активности белка lin-28 (Mayr et al., 2012).

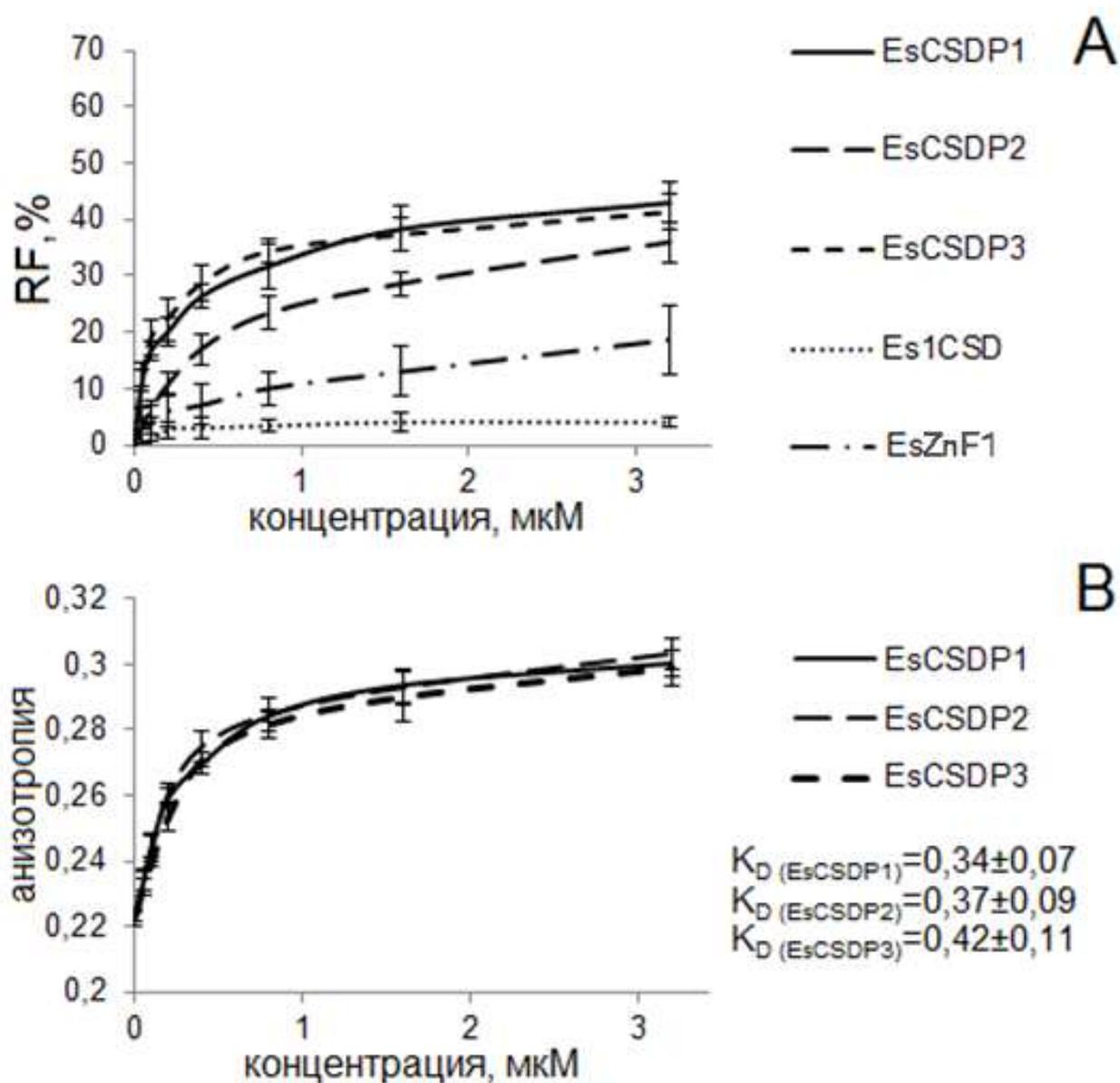


Рис. 3.22. А. Плавление маяка let7-FQ в присутствии различных концентраций белков EsCSDP1-3, отдельного домена холодого шока из белка EsCSDP1 (Es1CSD) и отдельного С-концевого фрагмента EsCSDP1 (EsZnF1). RF – относительная флуоресценция в процентах от флуоресценции полностью расплавленного молекулярного маяка при 90°C. В. Анизотропия let7-F в присутствии белков EsCSDP1-3. Для измерения РНК-плавящей активности белков применялись маяки, меченные флуоресцентным красителем и гасителем флуоресценции (let7-FQ), для измерения связывания белков с олигорибонуклеотидами – только красителем (let7-F).

На рис. 3.22А представлены изменения флуоресценции маяка let7-FQ, на рис. 3.22В – изменения анизотропии флуоресценции олигонуклеотида let7-F, в зависимости от концентраций белков EsCSDP1-3. Из этих данных следует, что разница в аффинности связывания всех трех белков с let7-F была несущественной, тогда как РНК-плавающая активность белков EsCSDP1 и EsCSDP3 намного превышала таковую для EsCSDP2. Следует отметить, что абсолютные значения анизотропии флуоресценции let-7F были практически идентичны для всех белков, несмотря на существенно меньшую молекулярную массу EsCSDP2 по сравнению с EsCSDP1 и EsCSDP3, что свидетельствует о связывании с let7-F большего количества молекул EsCSDP2 по сравнению с EsCSDP1 и EsCSDP3.

Основным структурным различием между EsCSDP1/EsCSDP3 и EsCSDP2 является длина С-концевой части и количество мотивов «цинковые пальцы» в ней (186 аминокислотных остатков и шесть «цинковых пальцев» в EsCSDP1, 218 аминокислотных остатков и семь цинковых пальцев в EsCSDP3, 122 аминокислотных остатка и два «цинковых пальца» в EsCSDP2). Для того, чтобы установить, определяется ли меньшая РНК-плавающая активность белка EsCSDP2 меньшей длиной С-концевой части, исследовалось плавление маяка let7-FQ укороченными вариантами белка EsCSDP1, содержащими четыре (Es1(4Z)) или два (Es1(2Z)) «цинковых пальца» в С-концевой части. Было установлено, что РНК-плавающая активность белка EsCSDP1 последовательно снижалась с укорочением его С-концевой части, так же как и аффинность связывания с олигонуклеотидом let7-F (рис. 3.23А,В).

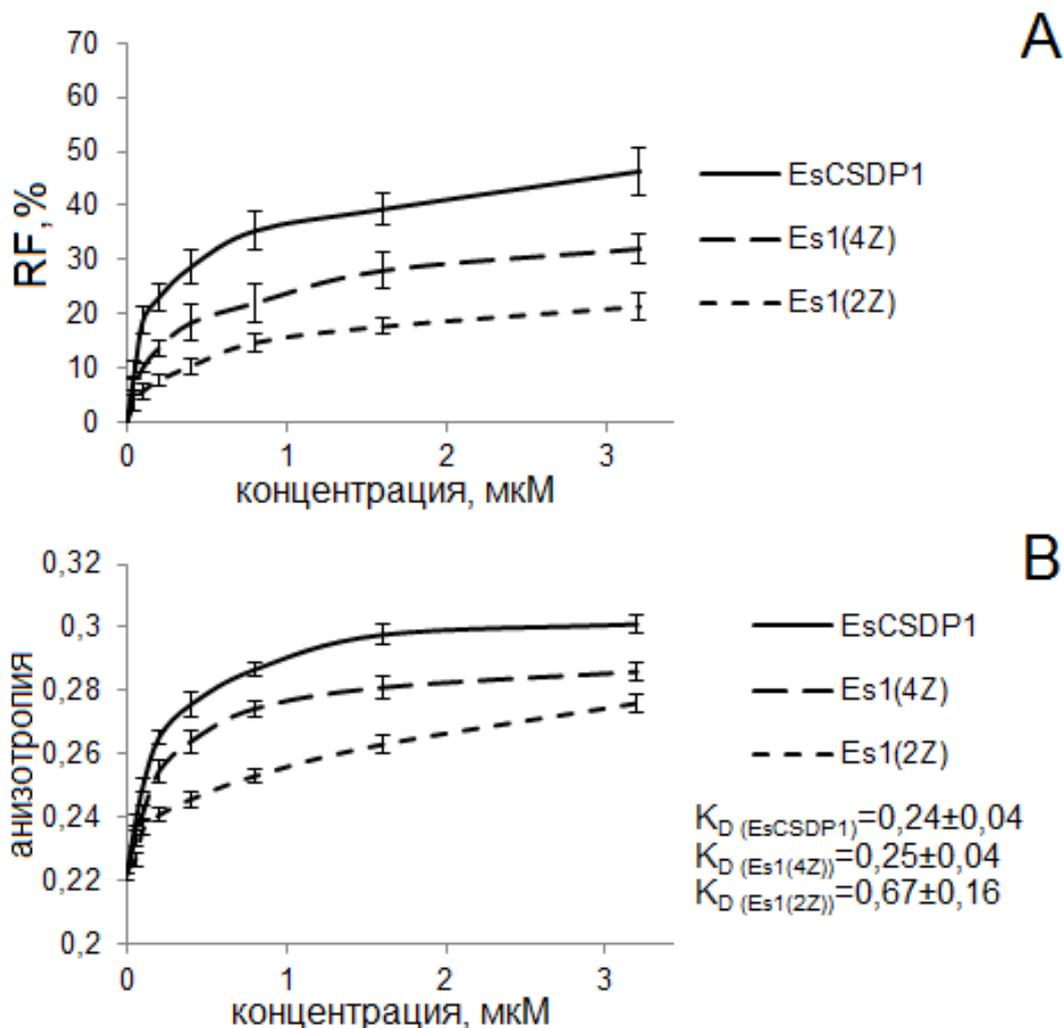


Рис. 3.23. **A.** Плавление маяка let7-FQ в присутствии различных концентраций белков EsCSDP1, Es1(4Z) и Es1(2Z). RF – относительная флуоресценция в процентах от флуоресценции полностью расплавленного молекулярного маяка при 90°C. **B.** Анизотропия let7-F в присутствии белков EsCSDP1, Es1(4Z) и Es1(2Z).

Также, было исследовано плавление молекулярного РНК-маяка let7 белками в виде отдельного домена холодового шока и отдельной С-концевой части EsCSDP1 (рис. 3.22А). Отдельный CSD из белка EsCSDP1, как и CSD из EsCSDP2 и EsCSDP3 (данные не приведены) практически не плавили маяк let7-FQ, в то время как отдельная С-концевая часть из белка EsCSDP1 проявляла достаточно существенную плавящую активность, хотя и меньшую, чем полный белок EsCSDP1. При этом, имеющиеся литературные данные свидетельствуют о том, что при плавлении пре-

микроРНК let-7 белком lin-28 наблюдалась обратная закономерность: отдельный домен холодового шока плавил вторичные структуры в let7, хотя и существенно хуже, чем полный белок lin-28, в то время как отдельная С-концевая часть практически не проявляла РНК-плавящей активности (Maug et al., 2012).

Для «цинковых пальцев» ССНС-типа было показано предпочтительное связывание с нуклеотидными последовательностями, обогащенными гуанином. Например, предпочтительным мотивом для взаимодействия «цинковых пальцев» из С-концевой части белка lin-28 является GGAG. Для того, чтобы определить необходимость этого мотива для взаимодействия белков EsCSDP1-3 с let7, был синтезирован олигонуклеотид let7-4A, в котором мотив GGAG был заменен на AAAA (рис. 3.20С). Замена GGAG на AAAA оказала существенное влияние на связывание и плавящую активность белков EsCSDP1 и EsCSDP3, однако практически не сказалась на взаимодействии с EsCSDP2 (рис. 3.24А,В).

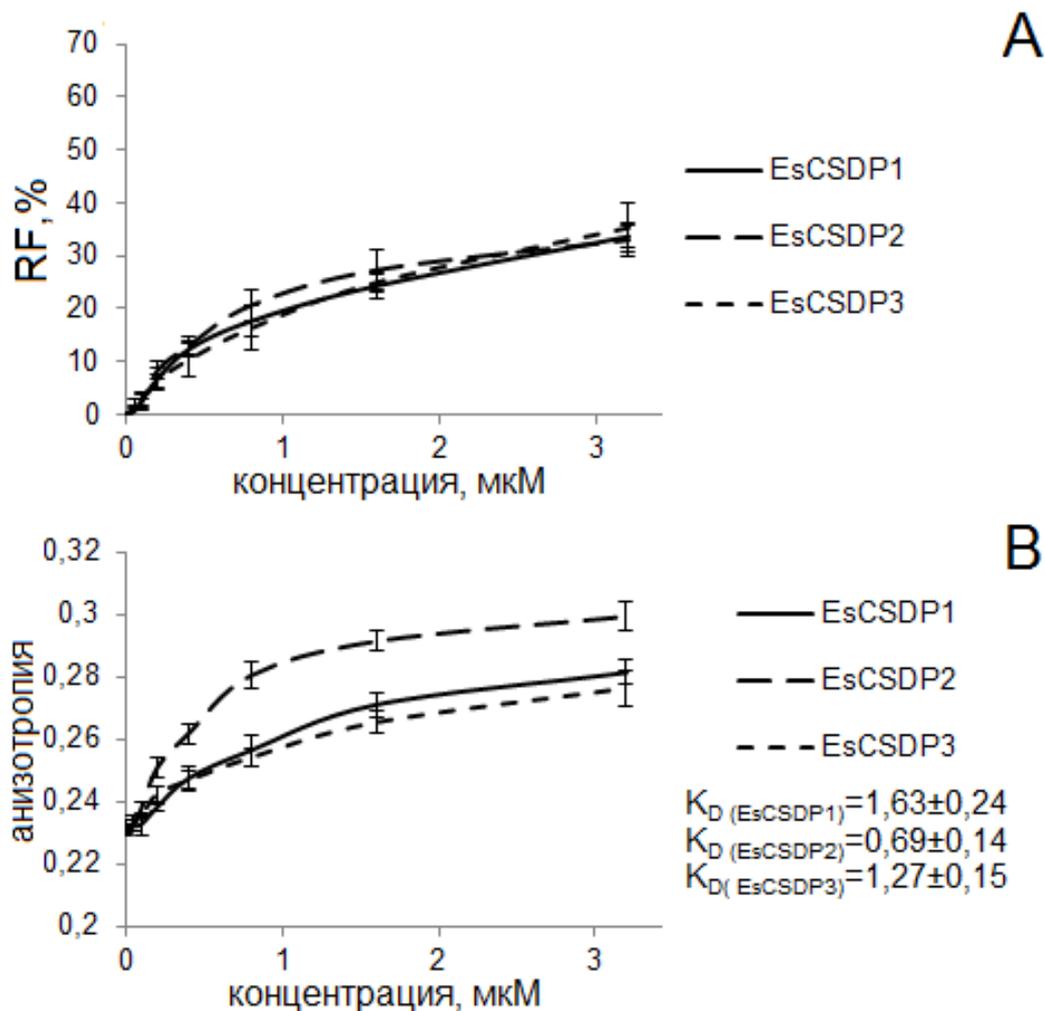


Рис. 3.24. А. Плавление маяка let7-4A-FQ в присутствии различных концентраций белков EsCSDP1-3. RF – относительная флуоресценция в процентах от флуоресценции полностью расплавленного молекулярного маяка при 90°C. В. Анизотропия let7-4A-F в присутствии белков EsCSDP1-3.

Для того, чтобы установить, каким образом изменение пространственной структуры молекулярного маяка let7 повлияет на взаимодействие с ним белков EsCSDP1-3, с помощью приложения RNAfold был спроектирован олигонуклеотид let7dis. С помощью этого приложения было установлено, что незначительная модификация нуклеотидной последовательности let7, выражающейся в замене местами остатка аденина в положении 37 и остатка урацила в положении 38, приводит к существенному изменению предсказанной пространственной структуры этого олигонуклеотида (рис. 3.20D). Было установлено, что белки EsCSDP1-

3 способны как связываться с олигонуклеотидом let7dis, так и плавить находящиеся в нем вторичные структуры (рис. 3.25А,В).

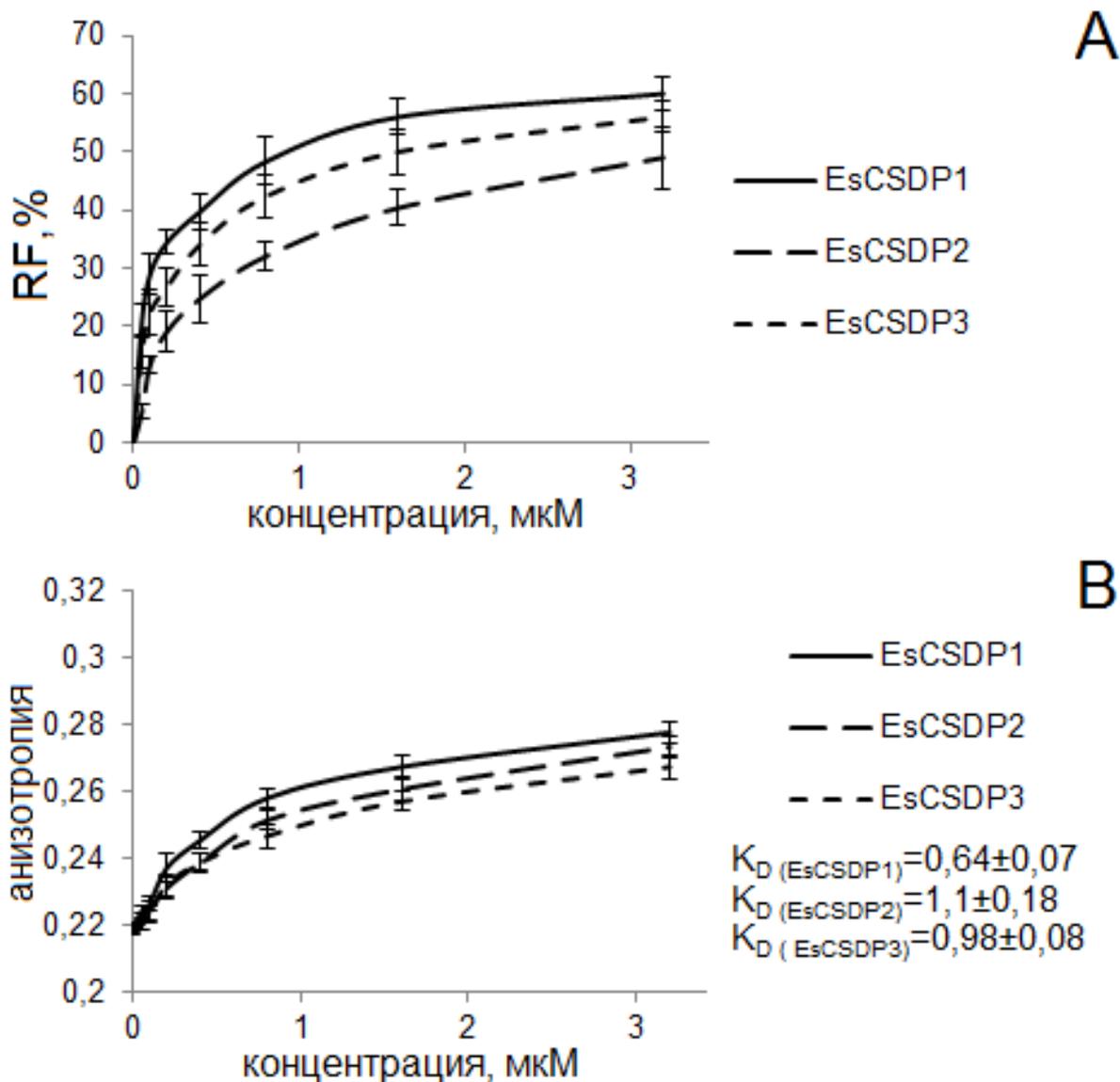


Рис. 3.25. А. Плавление маяка let7dis-FQ в присутствии различных концентраций белков EsCSDP1-3. RF – относительная флуоресценция в процентах от флуоресценции полностью расплавленного молекулярного маяка при 90°C. В. Анизотропия let7dis-F в присутствии белков EsCSDP1-3.

### 3.7 РНК-шаперонная активность белков с доменом холодового шока *Eutrema salsugineum*

Для непосредственного измерения РНК-шаперонной активности белков *in vitro* нами был разработан новый метод, с помощью которого об РНК-шаперонных свойствах белка можно судить по изменению флуоресценции реакционной смеси, содержащей белок и молекулярный маяк BC1rna(mQ). Для приготовления этого маяка используются те же олигорибонуклеотиды, что и для BC1rna, однако их отжиг производится в воде mQ, а не в стандартном буфере SB. Маяк BC1rna при низких температурах реакционной смеси характеризуется низкой флуоресценцией, которая возрастает при повышении температуры реакционной смеси (рис. 3.26), что объясняется плавлением вторичной шпилечной структуры размером 9 пар оснований (рис. 3.20A) и пространственным разделением флуоресцентного красителя и гасителя флуоресценции. Напротив, для маяка BC1rna(mQ) характерна высокая флуоресценция на низких температурах, которая существенно снижается при повышении температуры и при дальнейшем нагреве вновь возрастает (рис. 3.26). Высокий начальный уровень флуоресценции говорит о формировании альтернативных вторичных структур при отжиге в mQ, в которых краситель и гаситель изначально пространственно разделены. При нагреве, эти нестабильные вторичные структуры дестабилизируются, и вместо них образуется стабильная вторичная структура, характерная для маяка BC1rna. При наличии этой вторичной структуры краситель и гаситель сближены, и уровень флуоресценции очень низок. Дальнейший нагрев вызывает плавление образовавшейся шпилечной структуры, что выражается в росте флуоресценции. При переносе молекулярного маяка BC1rna(mQ) в буфер при 4°C наблюдается медленное падение флуоресценции (рис. 3.27), свидетельствующее о плавном переходе BC1rna(mQ) в конформацию, соответствующую таковой при отжиге в буферном растворе. Добавление белка, обладающего РНК-шаперонной активностью, приводит к ускорению

падения флуоресценции маяка BC1rna(mQ) при 4°C из-за ускорения плавления нестабильных вторичных структур и образования стабильной шпилечной структуры, характерной для маяка BC1rna.

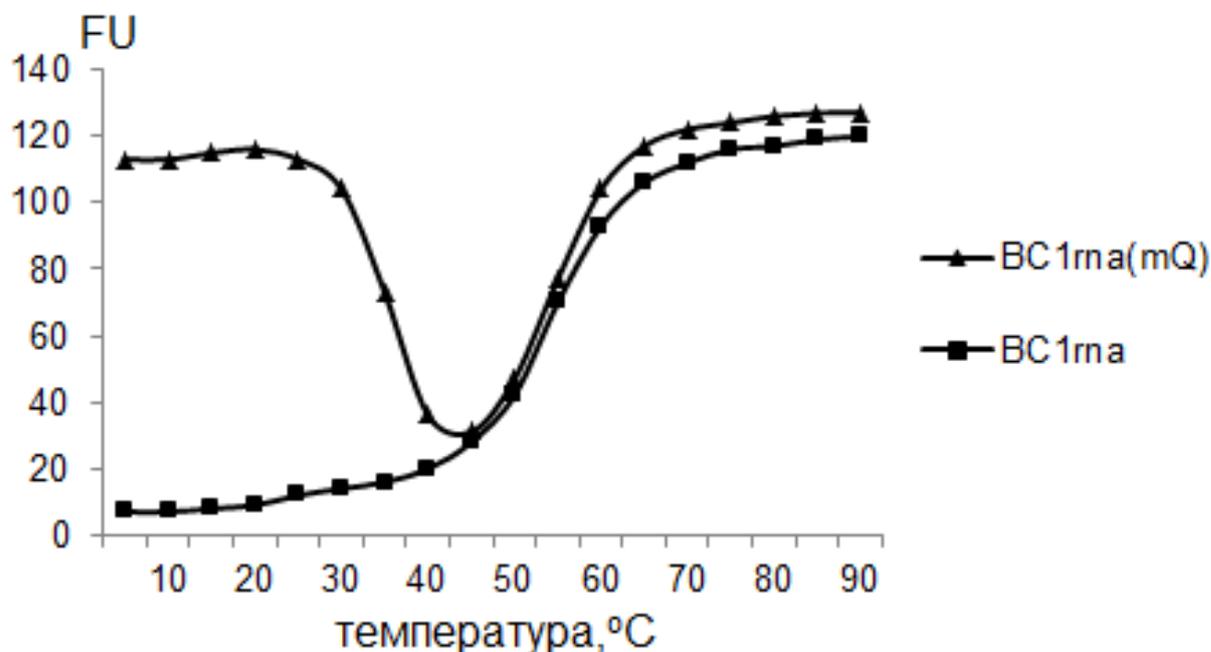


Рис. 3.26. Зависимость флуоресценции молекулярных маяков BC1rna и BC1rna(mQ) от температуры. FU – единицы флуоресценции.

Из данных на рис. 3.27 видно, что при инкубировании молекулярного маяка BC1rna(mQ) в стандартном буфере при 4°C, наблюдается медленное падение флуоресценции, свидетельствующее о плавном переходе BC1rna(mQ) в конформацию, характерную для BC1rna. При этом, добавление белков EsCSDP1-3 или CspA вызывало намного более быстрое падение флуоресценции, что свидетельствует о наличии у этих белков РНК-шаперонной активности, выражающейся в способности плавить нестабильные вторичные структуры с образованием стабильной шпилечной структуры. При этом, наблюдаемый эффект не изменялся при добавлении к реакционной смеси 3 мМ АТФ (данные не приведены).

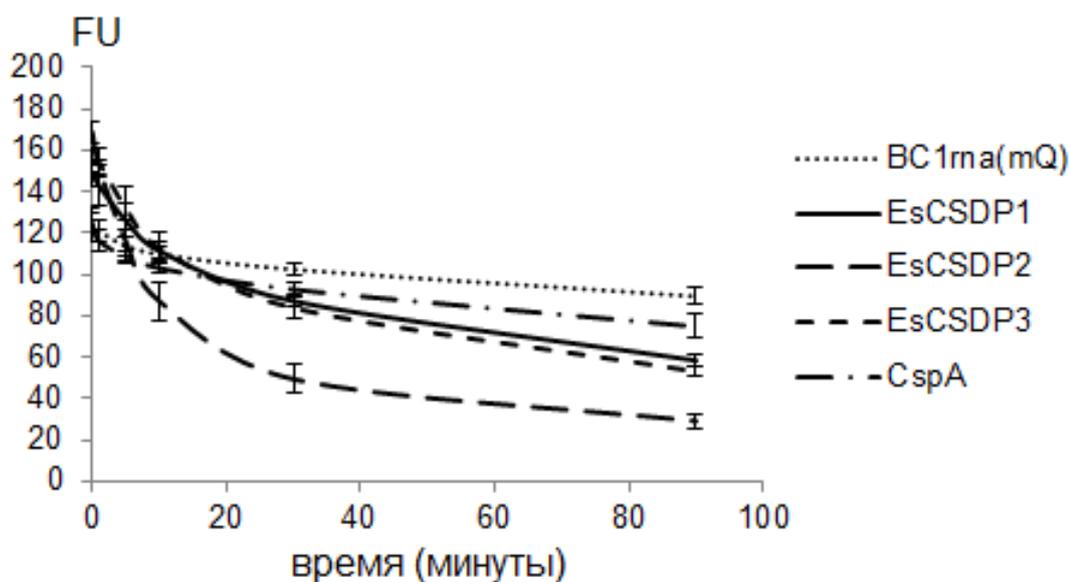


Рис. 3.27. Изменение во времени флуоресценции маяка BC1rna(mQ) в присутствии белков EsCSDP1-3 и CspA. FU – единицы флуоресценции.

Как следует из рис. 3.27, наиболее быстрое падение флуоресценции наблюдалось в присутствии белка EsCSDP2. Для того, чтобы установить, определяется ли высокая РНК-шаперонная активность EsCSDP2 более короткой С-концевой частью по сравнению с EsCSDP1 и EsCSDP3, применялись укороченные варианты белка EsCSDP1(рис. 3.28).

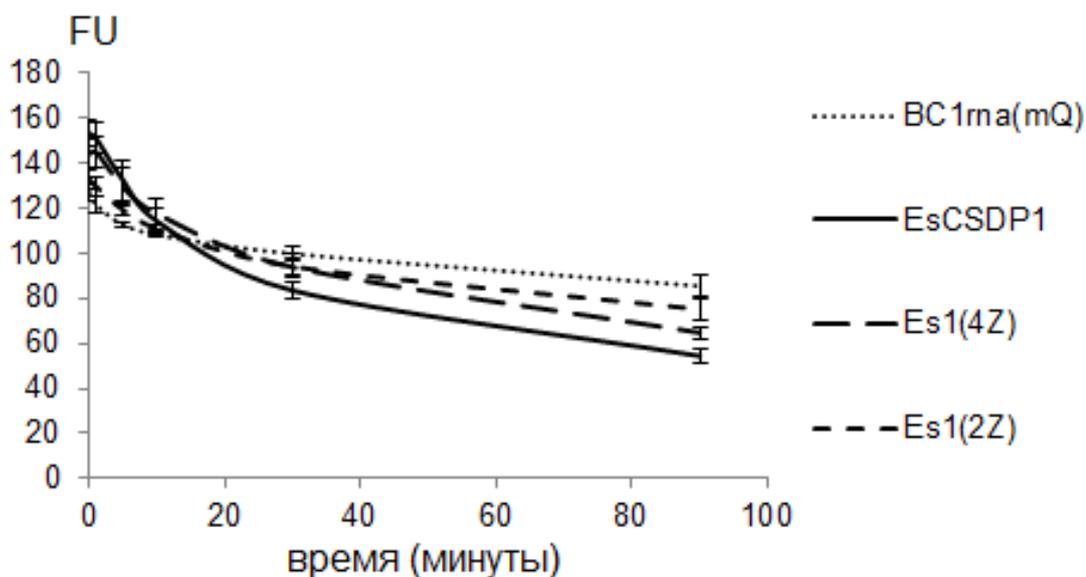


Рис. 3.28. Изменение во времени флуоресценции маяка BC1rna(mQ) в присутствии белков EsCSDP1, Es1(4Z) и Es1(2Z). FU – единицы флуоресценции.

Было установлено, что активность EsCSDP1 падает с укорачиванием С-концевой части. Это свидетельствует в пользу того, что высокая РНК-шаперонная активность EsCSDP2 определяется не более короткой С-концевой частью с меньшим количеством «цинковых пальцев», а какими-то иными структурными особенностями этого белка. Такими особенностями могут быть высокое содержание глицина в С-концевой части EsCSDP2 и наличие в ней двух RGG-повторов (рис. 3.29). RGG повторы способны связываться с нуклеиновыми кислотами, а остатки глицина, как известно, повышают гибкость полипептидных цепей, что может иметь очень большое значение для РНК-шаперонной активности белков (Rajuaguru et al., 2012; Woodson 2010).

Es1C-end (186 a.a, Gly 28.0%)  
GGAPLHRKEISSRNGARRGGSCYHCGEVGHMAKDCSSSDRGDRSSGGCYTCGDTGHFARDCVQKSSGNGGGGGGGERGG  
AGGECYNCNGTGHFARDCVQKSVGNVGDRSGGGGVCYNCGGAGHMARDCTPKRQPGACYECGGTGHMARDCDRR  
GSGGGRGNAGGGGGGNCFKCGQGGHFARECSVA

Es2C-end (122 a.a, Gly 53.3%)  
DGAPVQGTSGSSGG~~RGFGGGRRGG~~RGSGGGFGGG~~RGGGGGRRGG~~ND~~CYKCGEPGHMARD~~CSEGGGGYGGGGGGY  
GGGGYGGDRGGGSYGGGGRYGGGGGGGGSCYSCGESGHFARDCTSGG

Es3C-end (218 a.a, Gly 33.0%)  
GGGSLKNKEISSRNGGGGCFNCGEIGHMAKDCVGGKSFGGGRRSGGEGSCYNCGNVGHFARDCRQNAGGNSVGGG  
GGGACYNCGEVGHMAKDCRGGSGGNRYGGGGRRSGGEGCYMCGDVGHFARDCRQNVGGDVGGGGGGGNTCYTC  
GGFGHMARVCTSKRPSGGGGGVGACYECGGIGHLARDCDRRGSGGGSGSSKCFTCGKEGHFARECSLA

Рис. 3.29. Аминокислотные последовательности С-концевых частей из белков EsCSDP1-3. Gly, содержание глицина; темно-серым отмечены повторы RGG, светло-серым – «цинковые пальцы» CCHC-типа.

Одним из основных признаков РНК-шаперонной активности является отсутствие необходимости в присоединенном белке после приобретения молекулой РНК стабильной конформации. Для проверки этого, в реакционную смесь, содержащую молекулярный маяк BC1rna(mQ) и белки EsCSDP1 или EsCSDP2, добавляли протеиназу К. Из данных на рис. 3.30 видно, что добавление протеиназы К приводило к понижению флуоресценции реакционной смеси, особенно для EsCSDP1.

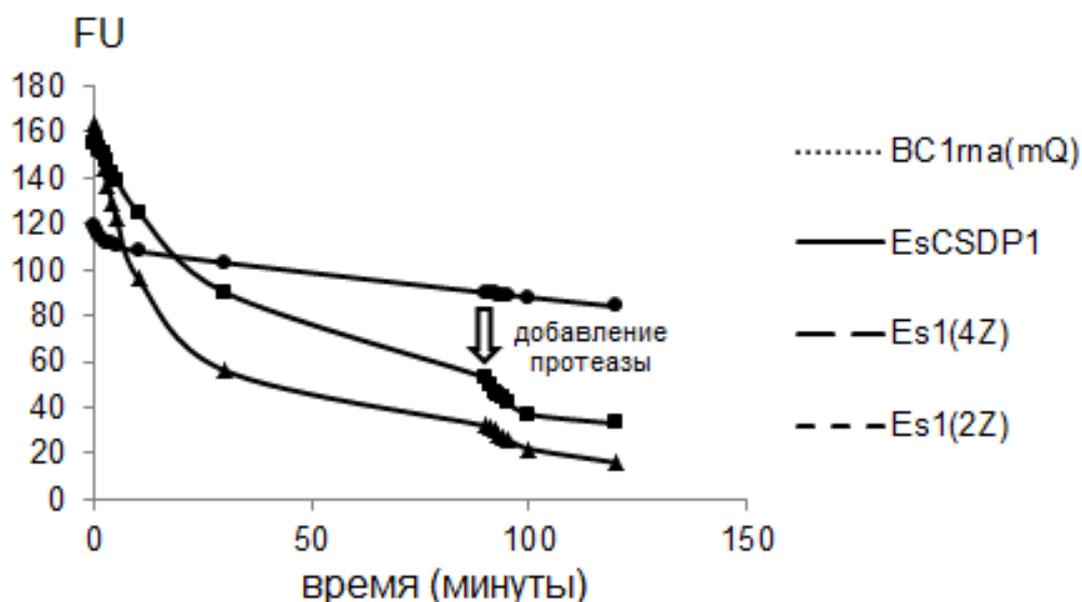


Рис. 3.30. Изменение во времени флуоресценции маяка BC1rna(mQ) в присутствии белков EsCSDP1 и EsCSDP2 после добавления протеиназы K.

### 3.8. Биологическая активность доменов холодого шока *in vivo*

Для оценки биологической активности отдельных доменов холодого шока из белков EsCSDP1-3 нами применялся альтернативный подход, заключающийся в исследовании способности этих белков восстанавливать рост клеток *E. coli* штамма BX04 при пониженной температуре. В этом штамме делетированы 4 собственных гена, кодирующих белки холодого шока ( $\Delta cspA$ ,  $\Delta cspB$ ,  $\Delta cspE$ ,  $\Delta cspG$ ), благодаря чему BX04 не способен расти при температуре менее 20°C. Восстановить способность этого штамма к низкотемпературному росту можно путем сверхэкспрессии бактериального белка холодого шока или гетерологичной экспрессии какого-либо другого белка, обладающего схожей биологической активностью.

Нами сравнивалась активность трех доменов холодого шока EsCSD1-3 из белков EsCSDP1-3 *E. salsgineum*, а также гомологичных им доменов холодого шока AtCSD1-3 из белков AtCSDP1-3 *A. thaliana*. Гены, кодирующие эти белки, были клонированы в вектор pINIII для экспрессии белка в бактериальных клетках; полученным вектором трансформировали

клетки *E. coli* штамма VX04 и далее исследовали рост трансформированных клеток при 17°C. В ходе экспериментов было выявлено (см. рис. 3.31), что все домены холодого шока проявили активность в тесте по комплементации роста VX04, однако активность большинства из них была гораздо ниже, чем у бактериального белка холодого шока CspA, использованного нами в качестве положительного контроля. Единственным белком, активность которого в тесте по комплементации была сопоставима с CspA, был домен холодого шока EsCSD3.

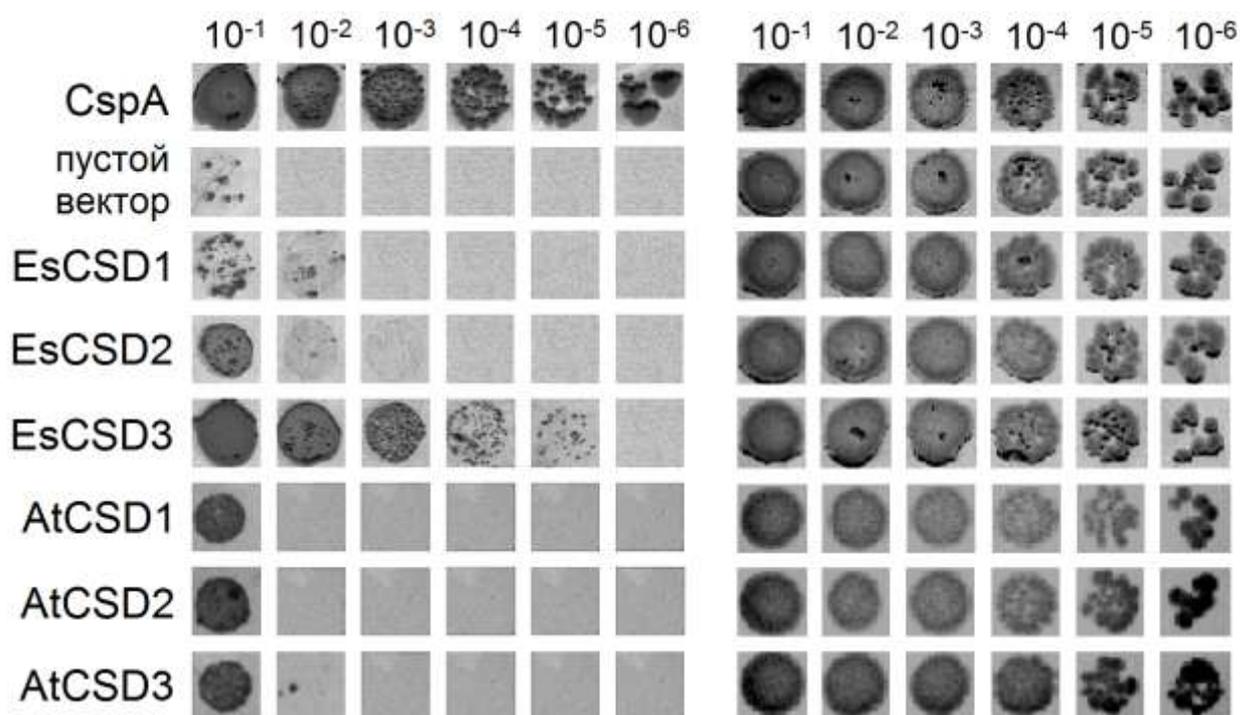


Рис. 3.31. Влияние доменов холодого шока белков EsCSDP1–3 и AtCSDP1–3 на рост мутантных клеток *E. coli* VX04: левая часть – 17 °С , правая – 37 °С. Цифры в верхней части рисунка обозначают разведения бактериальной культуры.

Следует отметить, что, несмотря на значительные отличия в функциональной активности, домены холодого шока из различных белков обладают существенным структурным сходством. Так, уровень гомологии аминокислотных последовательностей доменов холодого шока EsCSDP1 и EsCSDP3 достигал 79,2%, при учете же только неконсервативных замен

этот показатель возростал до 90,9%. 5 негомологичных аминокислотных замен находились в области от начала домена до мотива RNP1, 1 замена – между мотивами RNP1 и RNP2 и 2 замены в последовательности после RNP2 (рис. 3.32).

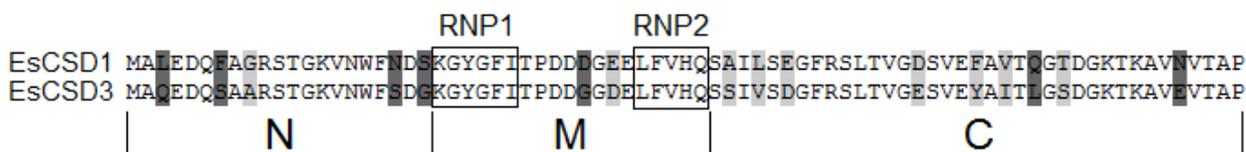


Рис. 3.32. Выравнивание аминокислотных последовательностей доменов холодового шока из белков EsCSDP1 и EsCSDP3. Прямоугольниками обозначены консервативные РНК-связывающие мотивы RNP1 и RNP2, светло-серым выделены консервативные аминокислотные замены, темно-серым – неконсервативные аминокислотные замены.

Чтобы установить, какие из аминокислотных замен ответственны за различия в активности доменов холодового шока в тесте по комплементации, гены, кодирующие домены холодового шока из этих двух белков, были разделены на 3 фрагмента – N-концевой (N, 21 а.о.) от старт-кодона до мотива RNP1, центральный (M, 19 а.о.), включающий мотивы RNP1 и RNP2, и C-концевой (C, 37 а.о.) от мотива RNP2 до стоп-кодона (рис. 3.32). Эти фрагменты путем последовательных ПЦР были перекомбинированы между собой во всех возможных сочетаниях с образованием химерных доменов (рис. 3.33).

Испытание химерных доменов в тесте по комплементации роста клеток штамма VX04 показало, что наиболее значимым с точки зрения влияния на различие в активности между EsCSD3 и AtCSD3 является N-концевой фрагмент. Все варианты клеток, экспрессирующие химерные домены с N-концевым фрагментом из EsCSD3 росли при пониженной температуре значительно быстрее, чем с N-концевым фрагментом из EsCSD1, вне зависимости от происхождения M- и C-фрагментов.

Следующим по значимости проявил себя центральный фрагмент домена холодового шока, при этом центральный фрагмент из EsCSD3 придавал белку существенно большую активность, чем центральный фрагмент из EsCSD1, хотя эти фрагменты отличались между собой неконсервативной заменой всего одного аминокислотного остатка: глицина на аспарагин (рис.3.33 ). Замена между собой С-концевых фрагментов оказало минимальное влияние на активность, хотя в отличие от N- и М-фрагментов, более благоприятным для функционирования оказался С-концевой фрагмент из EsCSD1, а не из EsCSD3.

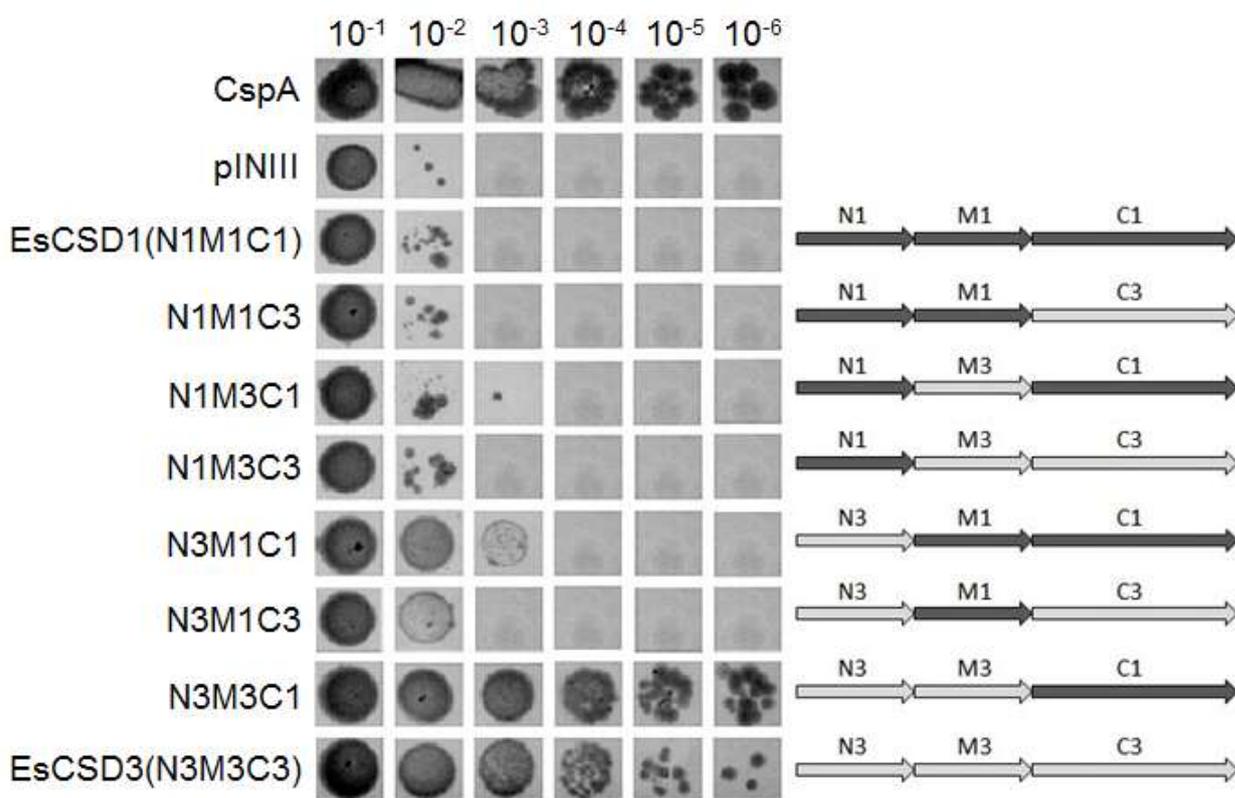


Рис.3.33. Эффект химерных доменов холодового шока, полученных путем рекомбинации отдельных фрагментов EsCSD1 и EsCSD3, на рост мутантных клеток *E. coli* штамма BX04 при 17 °C: цифры в верхней части рисунка обозначают разведения бактериальной культуры.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Для белков с доменом холодого шока *E. salsugineum* нами была показана высокая ДНК-плавящая активность. Следует отметить, что ДНК-плавящая активность белков с доменом холодого шока растений демонстрировалась и ранее, однако в этих работах измерения осуществлялись при фиксированной температуре и высокой концентрации белка (до 20 мкМ). В этих условиях измеренная ДНК-плавящая активность белков с доменом холодого шока растений была существенно ниже, чем активность белка холодого шока CspA из *E. coli*. ДНК-плавящая активность белков с доменом холодого шока EsCSDP1-3 из *E. salsugineum*, исследованная нами в широком диапазоне различных концентраций белка и при меняющейся температуре, существенно превышала таковую активность CspA, что особенно ярко проявлялось при концентрациях белка менее 1 мкМ.

Снижение  $T_m$  молекулярных маяков, наблюдаемое под действием белков EsCSDP1-3, говорит о том, что, во-первых, изучаемые белки взаимодействуют с ДНК-маяками и, во-вторых, что это взаимодействие приводит к ослаблению водородных связей между комплементарными нуклеотидами в двуцепочечном регионе маяков. Необходимо отметить, что белок EsCSDP3m, содержащий точечные мутации в мотивах, ответственных за взаимодействие с нуклеиновыми кислотами, не проявлял заметной ДНК-плавящей активности. Это подтверждает, что наблюдаемое плавление ДНК-маяков является не артефактом, но следствием взаимодействия с ними белков EsCSDP1-3.

Одной из характерных особенностей кривых плавления ДНК-маяков в присутствии EsCSDP1-3 является повышенный уровень флуоресценции по сравнению с полностью расплавленным ДНК-маяком в отсутствие белка (рис. 3.2). Этот факт указывает на то, что белок остается в связанном состоянии по крайней мере с одной из цепей, составляющих молекулярный

маяк, при повышении температуры. Вероятно, это приводит к возникновению структурных ограничений взаимодействия между флуоресцентным красителем R6G и гасителем флуоресценции BNQ2, которые отсутствуют в полностью расплавленном молекулярном маяке.

Диапазон эффективных концентраций белков, в котором наблюдается снижение  $T_m$ , для всех трех белков, а также отдельной С-концевой части из EsCSDP1, был практически одинаков и составлял 0,1-2 мкМ. Эффективные концентрации EsCSDP1 и его отдельного С-концевого фрагмента EsZnF1 одинаковы, в то время как отдельный домен холодового шока EsCSD1 не проявлял какой-либо существенной ДНК-плавящей активности. Этот факт свидетельствует в пользу того, что снижение  $T_m$  маяка BC1 в значительной степени обусловлено взаимодействием EsZnF1 с олигодезоксирибонуклеотидами, составляющими этот молекулярный маяк. Поскольку отдельные домены холодового шока из белков EsCSDP2 и EsCSDP3 также не проявляли ДНК-плавящей активности, сделанное выше заключение относительно роли С-концевой части EsCSDP1 в плавлении ДНК вероятнее всего справедливо и для двух других белков – EsCSDP2 и EsCSDP3.

При анализе данных, представленных на рис. 3.5, был обнаружен примечательный синергический эффект EsZnF1 и EsCSD1 в составе эквимольной смеси на эффективность плавления молекулярного маяка. Сравнивая между собой величины снижения  $T_m$  в зависимости от концентрации EsZnF1 или смеси EsMix1, можно заметить, что добавление EsCSD1 к EsZnF1 вызывает сдвиг кривой  $T_m$  в область меньших концентраций. При этом, максимальные величины сдвига  $T_m$  были близки между собой, что особенно заметно в случае маяка BC1. Исходя из этого следует, что EsCSD1 способен взаимодействовать с молекулярными ДНК-маяками. При этом, однако, ДНК-плавящая активность полного белка

EsCSDP1 оставалась существенно выше, чем ДНК-плавящая активность смеси EsCSD1 и EsZnF1.

Намного большее различие в плавящих активностях EsCSDP1, EsZnF1 и EsMix1 наблюдалось при плавлении BC1 при 4°C (рис. 3.18). Сравнение плавления ДНК-маяка BC1 белком EsCSDP1 и его отдельными доменами говорит о том, что для проявления высокой ДНК-плавящей активности требуется присутствие домена холодового шока и С-концевой части с мотивами «цинковые пальцы» в составе единой белковой молекулы. Учитывая, что способность связываться с нуклеиновыми кислотами характерна как для домена холодового шока CSD, так и для «цинковых пальцев» ZnF, можно предположить, что высокая плавящая активность полного белка EsCSDP1 определяется совместным взаимодействием CSD и ZnF с ДНК-маяками. Это предположение согласуется с наблюдаемой зависимостью флуоресценции от времени (рис. 3.19), особенно заметной при низких температурах (5-10°C). Возможно, этот эффект определяется структурной подвижностью доменной структуры белка EsCSDP1, который содержит по меньшей мере два центра связывания с нуклеиновыми кислотами.

Полученные нами данные свидетельствуют о существенно более высокой ДНК-плавящей активности белков EsCSDP1 и EsCSDP3 по сравнению с EsCSDP2. Ранее, для белка с доменом холодового шока пшеницы WCSP1 с тремя мотивами «цинковый палец» в С-концевой части была продемонстрирована достаточно слабая ДНК-плавящая активность по сравнению с бактериальным белком CspA. Белок AtCSDP2 с двумя «цинковыми пальцами» не проявлял ДНК-плавящей активности, в то время как активность белка AtCSDP1 с семью «цинковыми пальцами» была сопоставимой с активностью CspA. Таким образом, ДНК-плавящая активность не одинакова для белков с различной длиной и количеством

«цинковых пальцев» в С-концевой части, и судя по литературным и полученным нами данным возрастает с увеличением их количества.

Ни один из изученных CSDP *E. salisugineum* не был способен плавить молекулярные ДНК-маяки BCstem и BCfullstem, которые представляют собой полностью двуцепочечные последовательности и не содержат одноцепочечных участков (рис. 3.8). Из этого следует, что для плавления вторичных структур в ДНК-маяках требуется взаимодействие EsCSDP1-3 с одноцепочечными последовательностями ДНК. С-концевая часть EsCSDP1 содержит 6 мотивов «цинковые пальцы» ZnF CCHC-типа. Способность С-концевой части EsCSDP1 плавить BC1, но не BCstem или BCfullstem говорит о том, что один или более мотив ZnF могут взаимодействовать с одноцепочечными последовательностями в маяках.

Замена одноцепочечных участков в BC1 на цепи с вырожденной последовательностью нуклеотидов не привела к исчезновению ДНК-плавящей активности белков EsCSDP1, EsCSDP3 или отдельной С-концевой части из EsCSDP1. Однако, наблюдаемые различия в снижении белками Tm молекулярных маяков BC1 и BCnp могут объясняться наличием некоторых предпочтений белков к определенным нуклеотидным последовательностям.

Для плавления вторичной структуры белкам с доменом холодового шока требовался одноцепочечный участок, находящийся в 3'-положении от этой структуры. Эксперименты с молекулярным маяком BC2, не содержащим гуанина в одноцепочечных участках, говорят в пользу того, что связывание CSDP с одноцепочечными последовательностями происходит преимущественно посредством домена холодового шока. Это согласуется с оптимальной длиной этого участка – не менее 8 нуклеотидов, поскольку для доменов холодового шока из различных белков показано связывание с нуклеотидными последовательностями длиной 7-8 нуклеотидов. Связывание домена холодового шока с одноцепочечным участком означает, что плавление вторичной структуры осуществляется

главным образом С-концевой частью CSDP. Укорачивание С-концевой части приводило к снижению плавающей активности белка EsCSDP1, что вероятно объясняется снижением количества мотивов «цинковые пальцы», взаимодействующих с нуклеиновыми кислотами.

На основании обобщенных экспериментальных данных была построена модель, описывающая взаимодействие между CSDP растений и ДНК-маяком. Белок располагается на молекуле олигонуклеотида в месте соединения одно- и двуцепочечного участков. При этом белковая молекула ориентирована на ДНК в направлении 3'-5'. Плавление вторичной структуры осуществляется «цинковыми пальцами», находящимися в С-концевой части белковой молекулы. Однако для того, чтобы цинковые пальцы эффективно расплавили вторичную структуру, белковая молекула должна связаться с одноцепочечным участком, как бы заякорившись на молекуле ДНК. Связывание с одноцепочечным участком в принципе может происходить за счет самих «цинковых пальцев», однако, судя по всему более эффективное связывание обеспечивает домен холодового шока. Эффективность плавления вторичной структуры при этом зависит от количества «цинковых пальцев» в С-концевой части CSDP.

Таким образом, EsCSDP1, EsCSDP2 и EsCSDP3 способны плавить вторичные структуры в ДНК посредством связывания с расположенными рядом одноцепочечными участками. Участки, содержащие чередующиеся одноцепочечные и двуцепочечные последовательности, достаточно распространены в геномной ДНК живых клеток, где они образуются благодаря дестабилизации двойной спирали ДНК в процессе транскрипции или репарации. EsCSDP1, EsCSDP2 и EsCSDP3 являются относительно небольшими белками с молекулярными массами 28, 20 и 31 кДа соответственно, и должны без затруднений попадать в клеточное ядро. Ядерная локализация была продемонстрирована для гомологичных белков AtCSDP1, AtCSDP2 и AtCSDP3 из *A. thaliana* (Fusaro et al., 2007; Kim et al.,

2009; Yang et al., 2013). ДНК-плавящая активность EsCSDP1-3 наряду с их вероятной ядерной локализацией свидетельствуют в пользу вовлеченности этих белков и их гомологов из других растений в процессы, сопровождающиеся дестабилизацией двойной спирали ДНК, таких как транскрипция и репарация.

Следует заметить, что взаимодействие CSDP из *E. salsugineum* с ДНК имеет определенное сходство с таковым для белка с доменом холодового шока животных YB-1. Как и CSDP растений, белок YB-1 животных содержит домен холодового шока в N-концевой части и протяженную C-концевую часть. Однако, в отличие от C-концевых частей растительных белков, она состоит из чередующихся групп положительно и отрицательно заряженных аминокислотных остатков. Для YB-1 было показано связывание с молекулами ДНК, предпочтительно с одноцепочечными участками, а также ДНК-плавящая активность (Gaudreault et al., 2004; Hasegawa et al., 1991). Обсуждалась роль YB-1 в ДНК-ассоциированных процессах, таких как транскрипция и репарация. Сходство структурной организации и особенностей взаимодействия с ДНК позволяют предположить, что белки с доменом холодового шока растений, подобно YB-1, могут быть вовлечены в различные аспекты биологии ДНК.

Помимо взаимодействия белков EsCSDP1-3 с ДНК, нами также было исследовано их взаимодействие с РНК. В ходе изучения взаимодействия EsCSDP1-3 с модельными олигорибонуклеотидами *in vitro* было установлено, что белки EsCSDP1-3 обладают всеми основными свойствами РНК-шаперонных белков. Эти белки взаимодействовали с олигорибонуклеотидами, имеющими различную последовательность нуклеотидов и пространственную структуру, приводя к независимому от наличия АТФ плавлению вторичных структур в этих олигорибонуклеотидах.

РНК-шаперонная активность EsCSDP1-3 была также показана напрямую с помощью предложенной нами системы для измерения РНК-шаперонной активности белков *in vitro*. Было доказано, что белки EsCSDP1-3 дестабилизируют неустойчивые вторичные структуры в молекулярных РНК-маяках и не требуются для поддержания возникающих более устойчивых вторичных структур. Это следует из повышения начального уровня флуоресценции этого маяка в присутствии белков EsCSDP1-3, а также из ускорения падения флуоресценции маяка BC1rna(mQ) после добавления протеиназы К. Вероятно, EsCSDP1-3 плавят нестабильные вторичные структуры в маяках и связываются с одноцепочечными участками, в некоторой степени затрудняя их повторный отжиг. Этот эффект РНК-шаперонных белков описан в научной литературе под термином «overcrowding» (Cristofari, Darlix, 2002).

Нами было обнаружено, что РНК-плавящая и РНК-шаперонная активности «короткого» белка EsCSDP2 существенно отличались от таковых для «длинных» белков EsCSDP1 и EsCSDP3. Активности EsCSDP1 и EsCSDP3 были приблизительно одинаковы, в то время как EsCSDP2 обладал меньшей РНК-плавящей, но большей РНК-шаперонной активностью. По литературным данным, в большинстве растений были обнаружены CSDP с различной длиной С-концевой части и разным количеством мотивов «цинковые пальцы» в ней – от одного до семи. Можно предположить, что в растительной клетке функции белков с доменом холодового шока с различным строением С-концевой части могут различаться. Основной функцией белков с малым количеством «цинковых пальцев» в С-концевой части может быть РНК-шаперонная активность, в то время как для белков с большим количеством «цинковых пальцев» – РНК-плавящая. Белок с доменом холодового шока арабидопсиса AtCSP1 с семью «цинковыми пальцами» в клетке взаимодействует главным образом с мРНК, склонными к формированию прочных (с низким  $\Delta G$ ) G/C богатых вторичных структур в 5'-нетранслируемой области. Предполагается, что

AtCSP1 дестабилизирует эти вторичные структуры, способствуя взаимодействию 5'-нетранслируемых областей с 43S преинициаторным комплексом и в конечном счете делая трансляцию мРНК более эффективной (Juntawong, 2013). Обнаруженная нами высокая РНК-плавающая активность EsCSDP1 и EsCSDP3 свидетельствует в пользу того, что одной из основных функций «длинных» CSDP растений является дестабилизация прочных G/C богатых вторичных структур в мРНК, склонных к их образованию. Полученные нами экспериментальные данные говорят в пользу предпочтения белков EsCSDP1 и EsCSDP3 к GC-богатым последовательностям, поскольку аффинность связывания этих белков с РНК-маяком *let7* снижается при замене в этом маяке мотива GGAG на AAAA (рис. 3.24B).

Напротив, основной функцией CSDP с малым количеством «цинковых пальцев» в С-концевой части и более слабой РНК-плавающей активностью может быть именно РНК-шаперонная функция. Потребность в РНК-шаперонных белках вероятно особенно высока в активно делящихся клетках, в которых идет быстрый синтез белка. Например, было обнаружено накопление белка CspA в культуре *E. coli*, находящейся на ранней стадии экспоненциального роста (Brandi et al., 1999). Также, повышенная экспрессия ряда белков с доменом холодового шока растений наблюдалась в эмбрионах, молодых растениях, а также меристемах взрослых растений (Chaikam et al., 2008; Nakaminami et al., 2009; Radkova et al., 2014). Белок животных *lin-28* также накапливался в активно делящихся клетках, включая стволовые клетки (Tzialikas et al., 2015). Предполагается, что этот белок выполняет РНК-шаперонную функцию в клетках, индуцируя экспрессию генов, вовлеченных в активацию клеточного метаболизма, роста и деления клеток (Mayr, Heinemann; 2013; Polesskaya et al., 2007). Для белка PpCSP1 из *Physcomitrella patens* были показаны схожие с *lin-28* функции (Li et al., 2017). Обобщение вышеперечисленных фактов указывает на то, что CSDP растений вовлечены в активацию роста и деления клеток, и что эти функции

могут быть по крайней мере частично обусловлены их РНК-шаперонной активностью.

Отдельные домены холодового шока из белков EsCSDP1-3 в нашем исследовании не проявляли существенной плавающей активности в отношении РНК-олигонуклеотидов, однако полный белок EsCSDP1 обладал намного более высокой РНК-плавающей активностью по отношению к молекулярному маяку let7-FQ по сравнению с отдельным С-концевым фрагментом этого белка. Возможно, домен холодового шока принимает участие в связывании EsCSDP1 с let7 и за счет этого повышает РНК-плавающую активность полного белка. Другим объяснением может быть то, что прочность связывания CSD из EsCSDP1 с let7 слишком низкая, однако в том случае, если полный белок EsCSDP1 уже связался с let7 посредством С-концевого фрагмента, локальная концентрация CSD возрастает, что позволяет ему взаимодействовать с маяком и усиливать тем самым РНК-плавающую активность полного белка.

Олигонуклеотид let7 не является естественной клеточной мишенью для белка EsCSDP1, соответственно взаимодействие между ними неспецифично. Исходя из полученных нами экспериментальных данных, низкоспецифичное взаимодействие CSDP растений с РНК определяется их С-концевой частью.

Способность к низкоспецифичному взаимодействию с РНК не означает отсутствия у белков с доменом холодового шока или каких-либо других РНК-связывающих белков функций, определяемых специфичным взаимодействием с нуклеиновыми кислотами (Hudson et al., 2014; Mayr et al., 2013). Полученный нами результат о второстепенном значении домена холодового шока для плавления вторичных структур в ДНК или РНК находится в противоречии с данными, полученными для белка lin-28 в отношении его клеточной мишени – пре-микроРНК let7, во взаимодействии с которой белка lin-28 наибольшую роль играет именно домен холодового

шока (Mayr et al., 2012). Можно предположить, что активность доменов холодового шока из белков EsCSDP1-3 также может проявляться в отношении специфичных РНК- или ДНК-мишеней, в то время как С-концевая часть белка требуется для усиления этого специфичного взаимодействия, как это было показано для lin-28 (Mayr et al., 2012).

На основании данных, полученных в экспериментах по комплементации низкотемпературного роста бактерий *E. coli* штамма BX04, также можно предположить, что специфическое взаимодействие с нуклеиновыми кислотами CSDP растений, если таковое существует, в большей степени обуславливается доменами холодового шока. Во-первых, на это указывает обнаруженная нами уникальная способность домена холодового шока белка EsCSDP3 растения *E. salsugineum* восстанавливать рост клеток штамма BX04 при пониженной температуре. Из 6 исследованных доменов холодового шока белков *A. thaliana* и *E. salsugineum* только один, EsCSD3, показал активность в тесте по комплементации, сравнимую с активностью бактериального белка CspA. И во-вторых, путем исследования химерных доменов холодового шока, состоящих из соединенных частей EsCSD1 и EsCSD3, нами было показано, что активность EsCSD3 в комплементационном тесте тесно связана с первичной структурой участка EsCSD3 до мотива RNP2. Домены EsCSD1 и EsCSD3 до мотива RNP1 различаются всего лишь пятью неконсервативными аминокислотными заменами, а между мотивами RNP1 и RNP2 – всего одной. Единственная замена аспартата D32 на глицин приводит к радикальному возрастанию активности химерного домена N3M3C3 по сравнению с доменом N3M1C3 в тесте по комплементации (рис. 3.33). Домены EsCSD3 и AtCSD3, проявившие резко различную активность, отличаются всего семью аминокислотными заменами, из которых пять являются неконсервативными, при этом две из них находятся в С-концевой части домена после мотива RNP2 и вероятно не оказывают

определяющего влияния на активность домена в тесте по комплементации (рис. 4.1).

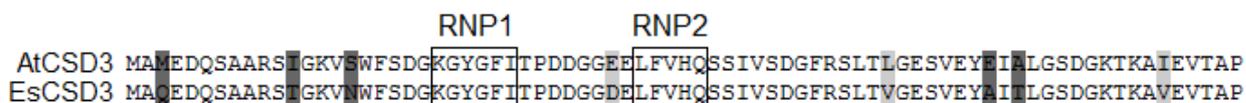


Рис. 4.1. Выравнивание аминокислотных последовательностей доменов холодого шока из белков EsCSDP3 и AtCSDP3. Прямоугольниками обозначены консервативные РНК-связывающие мотивы RNP1 и RNP2, светло-серым выделены консервативные аминокислотные замены, темно-серым – неконсервативные аминокислотные замены.

Следует подчеркнуть, что все указанные выше аминокислотные замены расположены вне консервативных мотивов RNP1 и RNP2, которые являются участками домена холодого шока, вовлеченными в непосредственное взаимодействие с нуклеиновыми кислотами. Маловероятно, что наличие тех или иных аминокислотных замен в доменах EsCSD1 или AtCSD3 по сравнению с EsCSD3 приводит к полной потере этими двумя доменами способности взаимодействовать с нуклеиновыми кислотами. Скорее, замены каким-то образом модулируют их активность путем непосредственного взаимодействия с нуклеиновыми кислотами или влияния на функционирование мотивов RNP, что приводит к снижению активности EsCSD1 или AtCSD3 по сравнению с EsCSD3 в тесте по комплементации.

В штамме BX04 удалены 4 белка холодого шока, для которых характерно в целом низкоспецифичное взаимодействие с РНК. Представляется логичным, что наиболее эффективную комплементацию роста можно получить путем экспрессии в клетках этого штамма белка, также способного к неспецифичному взаимодействию с РНК. Это подтверждается высокой активностью в тесте белка CspA, для которого характерно неспецифичное взаимодействие с РНК. Можно предположить,

что обнаруженные нами аминокислотные замены, которые приводили к снижению активности нативных или химерных CSD в тесте по комплементации по сравнению с EsCSD3, приводят к повышению специфичности взаимодействия этих CSD с РНК. Если это предположение верно, то домен холодового шока из белка EsCSDP3 взаимодействует с РНК наименее специфично, и аминокислотные замены, наблюдаемые по сравнению с ним в доменах холодового шока из других белков *A. thaliana* или *E. salisugineum*, повышают специфичность их взаимодействия с РНК.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения диссертационной работы с помощью различных методик *in vitro* и *in vivo* было достаточно подробно исследовано взаимодействие CSDP растений на примере трех белков из *E. salsugineum* с нуклеиновыми кислотами. При этом был установлен ряд деталей этого взаимодействия, а также выдвинуты предположения относительно функций этих белков в растительной клетке. Ввиду того, что CSDP из различных растений обладают в целом схожим строением, обнаруженные закономерности вероятно имеют универсальный характер.

Исходя из полученных нами результатов, белки с доменом холодого шока растений обладают выраженной способностью к неспецифичному взаимодействию с нуклеиновыми кислотами. При этом, однако, получены данные, косвенно указывающие на возможность более специфичного взаимодействия между ними. Для поиска специфичных клеточных мишеней белков с доменом холодого шока растений, если таковые имеются, потребуется использовать высокопроизводительные экспериментальные подходы.

Обнаруженные нами ДНК- и РНК-плавающие активности белков EsCSDP1-3 могут представлять определенный интерес с точки зрения практического применения этих белков в биотехнологии. Ранее было показано, что белки холодого шока *E. coli* CspA и CspE могут быть с успехом использованы для увеличения эффективности различных молекулярно-биологических реакций *in vitro* (Phadtare et al., 2009), что обуславливается, по всей видимости, способностью дестабилизировать вторичные структуры, препятствующие взаимодействию ферментов с нуклеиновыми кислотами. Есть основания полагать, что белки с доменом холодого шока EsCSDP1-3 могут оказывать аналогичное действие с еще большей эффективностью, поскольку по нашим данным их плавающая активность существенно превышала такую активность CspA.

## ВЫВОДЫ

1. Показано с использованием системы *in vitro*, что белки с доменом холодого шока EsCSDP1-3 из растения-экстремофита *E. salsugineum* способны плавить вторичные структуры в молекулах ДНК и РНК с различной последовательностью нуклеотидов и пространственной структурой и эта активность определяется главным образом С-концевой частью EsCSDP1-3, содержащей мотивы «цинковые пальцы», и коррелирует с их количеством.

2. Предложена модель плавления ДНК белками с доменом холодого шока, основанная на экспериментально установленных особенностях структуры ДНК-олигонуклеотидов, необходимых для их взаимодействия с EsCSDP1-3:

3. Разработан новый метод оценки РНК-шаперонной активности белков в системе *in vitro* и с его использованием показано, что из трех белков EsCSDP1-3 наибольшей РНК-шаперонной активностью обладает EsCSDP2 и что эта активность определяется не длиной С-концевой части белка, а, по-видимому, обусловлена особенностями ее аминокислотной последовательности.

4. В тесте по комплементации роста мутантных клеток *E. coli* ВХ04 доменами холодого шока EsCSD1-3 при пониженной температуре с использованием комбинаторики показано, что биологическая активность доменов холодого шока чувствительна к одиночным заменам аминокислотных остатков в N-концевой и центральной части домена.

5. Обнаруженная способность белков с доменом холодого шока *E. salsugineum* плавить нуклеиновые кислоты может быть использована при постановке различных молекулярно-биологических реакций *in vitro* с целью повышения их эффективности.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Колесниченко, А. В. Белки низкотемпературного стресса растений/ А. В. Колесниченко, В. К. Войников // – Арт-Пресс, 2003.
2. Кошкин, Е.И. Физиология устойчивости сельскохозяйственных культур: учебник/ Е. И. Кошкин. – М.: Дрофа, 2010. – 638с (2).
3. Кудряшова, Е. В. Белки в надмолекулярных ансамблях: исследование структуры методом разрешенно–временной флуоресцентной анизотропии/ Е. В. Кудряшова, А. К. Гладилин, А. В. Левашов //Успехи биологической химии. – 2002. – Т. 42. – С. 257-294.
4. Скабкин, М.А. Мультифункциональные белки с доменом холодового шока в регуляции экспрессии генов/ М. А. Скабкин, О. В. Скабкина, Л. П. Овчинников //Успехи биологической химии. – 2004. – Т. 44. – №. 4. – С. 3-52.
5. Таранов, В.В. Белки с доменом холодового шока в растении-экстремофите *Thellungiella salsuginea*: структура генов и их дифференцированная экспрессия при холодовой адаптации/ В.В. Таранов, М. . Бердникова, А.В. Носов, А.В. Галкин, А.В. Бабаков// Молекулярная биология. – 2010. – Т. 44. – №. 5. – С. 889-897
6. Якушкина, Н.И.. Физиология растений. Учебник для студентов вузов, обучающихся по специальности 032400 «Биология»/ Н.И. Якушкина, Е.Ю. Бахтенко / Гуманитарный издательский центр «Владос», М., 2004. - 446 с.
7. Amtmann, A. Learning from evolution: *Thellungiella* generates new knowledge on essential and critical components of abiotic stress tolerance in plants/ A. Amtmann // *Molecular Plant*. – 2009. – Т. 2. – №. 1. – С. 3-12.
8. Arcus, V. OB-fold domains: a snapshot of the evolution of sequence, structure and function/ V. Arcus // *Current opinion in structural biology*. – 2002. – Т. 12. – №. 6. – С. 794-801.
9. Bae, W. Characterization of *Escherichia coli* cspE, whose product negatively regulates transcription of cspA, the gene for the major cold shock protein/ W. Bae, S.

- Phadtare, K. Severinov, M. Inouye // *Molecular microbiology*. – 1999. – T. 31. – №. 5. – C. 1429-1441.
10. Bae, W. Escherichia coli CspA family RNA chaperones are transcription antiterminators/ W. Bae, B. Xia, M. Inouye, K. Severinov // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2000. – T. 97. – №. 14. – C. 7784-7789.
11. Balzer, E. Localization of the developmental timing regulator Lin28 to mRNP complexes, P-bodies and stress granules/ E. Balzer, E. G. Moss // *RNA biology*. – 2007. – T. 4. – №. 1. – C. 16-25.
12. Barria, C. Bacterial adaptation to cold/ C. Barria, M. Malecki, C. M. Arraiano // *Microbiology*. – 2013. – T. 159. – №. 12. – C. 2437-2443.
13. Bateman, A. The Pfam protein families database/ A. Bateman, L. Coin, R. Durbin, R. D. Finn, V. Hollich, S. Griffiths-Jones, K. Ajay, M. Mhairi, S. Moxon, E. L. L. Sonnhammer, Y. Corin, E. R. Sean, D. J. Studholme // *Nucleic acids research*. – 2004. – T. 32. – №. suppl\_1. – C. D138-D141.
14. Brandi, A. Interaction of the main cold shock protein CS7. 4 (CspA) of Escherichia coli with the promoter region of hns/ A. Brandi, C. L. Pon, C. O. Gualerzi // *Biochimie*. – 1994. – T. 76. – №. 10-11. – C. 1090-1098.
15. Brandi, A. Massive presence of the Escherichia coli ‘major cold-shock protein’ CspA under non-stress conditions/ A. Brandi, R. Spurio, C.O. Gualerzi, C.L. Pon // *The EMBO journal*. – 1999. – T. 18. – №. 6. – C. 1653-1659.
16. Bycroft, M. The solution structure of the S1 RNA binding domain: a member of an ancient nucleic acid-binding fold/ M. Bycroft, T. J. Hubbard, M. Proctor, S.M.V. Freund, A.G. Murzin // *Cell*. – 1997. – T. 88. – №. 2. – C. 235-242.
17. Chaikam, V. Comparison of structure, function and regulation of plant cold shock domain proteins to bacterial and animal cold shock domain proteins/ V. Chaikam, D. T. Karlson // *BMB reports*. – 2010. – T. 43. – №. 1. – C. 1-8.
18. Chaikam, V. Functional characterization of two cold shock domain proteins from Oryza sativa/ V. Chaikam, D. Karlson // *Plant, cell & environment*. – 2008. – T. 31. – №. 7. – C. 995-1006.

19. Chang, B. Molecular Cloning of a Cold-Shock Domain Protein, zfY1, in Zebrafish Embryo/ B. Chang, C. Lin, C. Kuo // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. – 1999. – T. 1433. – №. 1-2. – C. 343-349.
20. Coetzee, T. Escherichia coli proteins, including ribosomal protein S12, facilitate in vitro splicing of phage T4 introns by acting as RNA chaperones/ T. Coetzee, D. Herschlag, M. Belfort // *Genes & development*. – 1994. – T. 8. – №. 13. – C. 1575-1588.
21. Company, M. Requirement of the RNA helicase-like protein PRP22 for release of messenger RNA from spliceosomes/ M. Company, J. Arenas, J. Abelson // *Nature*. – 1991. – T. 349. – №. 6309. – C. 487.
22. Cristofari, G. The Ubiquitous Nature of RNA Chaperone Proteins/ G. Cristofari, J.-L. Darlix // *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. – 2002. – № 72. – C. 223-268.
23. Deo, R. C. Recognition of polyadenylate RNA by the poly(A)-binding protein/ R. C. Deo, J. B. Bonanno, N. Sonenberg, S.K. Burley // *Cell*. – 1999. – T. 98. – №. 6. – C. 835-845.
24. Didier, D. K. Characterization of the cDNA encoding a protein binding to the major histocompatibility complex class II Y box/ D. K. Didier, J. Schiffenbauer, S. L. Woulfe, M. Zacheis, B. D. Schwartz // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1988. – T. 85. – №. 19. – C. 7322-7326.
25. Eliseeva, I. A. Y-box-binding protein 1 (YB-1) and its functions/ I. A. Eliseeva, E. R. Kim, S. G. Guryanov, L. P. Ovchinnikov, D. N. Lyabin // *Biochemistry (Moscow)*. – 2011. – T. 76. – №. 13. – C. 1402-1433.
26. Ermolenko, D. N. Bacterial cold-shock proteins/ D. N. Ermolenko, G. I. Makhatadze // *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. – 2002. – T. 59. – №. 11. – C. 1902-1913.
27. Etchegaray, J.P. CspA, CspB, and CspG, major cold shock proteins of Escherichia coli, are induced at low temperature under conditions that completely

- block protein synthesis/ J.P. Etchegaray, M. Inouye // *Journal of bacteriology*. – 1999. – T. 181. – №. 6. – C. 1827-1830.
28. Etchegaray, J.P. Differential thermoregulation of two highly homologous cold-shock genes, *cspA* and *cspB*, of *Escherichia coli*/ J.P. Etchegaray, P.G. Jones, M. Inouye // *Genes to cells*. – 1996. – T. 1. – №. 2. – C. 171-178.
29. Evdokimova, V. M. The major protein of messenger ribonucleoprotein particles in somatic cells is a member of the Y-box binding transcription factor family/ V.M. Evdokimova, C.L. Wei, A.S. Sitikov, P.N. Simonenko, O.A. Lazarev, K.S. Vasilenko, V.A. Ustinov, J.W. Hershey, L.P. Ovchinnikov // *Journal of Biological Chemistry*. – 1995. – T. 270. – №. 7. – C. 3186-3192.
30. Falsone, S. F. Unfolding and double-stranded DNA binding of the cold shock protein homologue *Clh 8* from *Cladosporium herbarum*/ S. F. Falsone, M. Weichel, R. Cramer, M. Breitenbach, A. J. Kungl // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – T. 277. – №. 19. – C. 16512-16516.
31. Feng, Y. *Escherichia coli* poly (A)-binding proteins that interact with components of degradosomes or impede RNA decay mediated by polynucleotide phosphorylase and RNase E/ Y. Feng, H. Huang, J. Liao, S. N. Cohen // *Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – T. 276. – №. 34. – C. 31651-31656.
32. Ferrer, N. The *unr* gene: evolutionary considerations and nucleic acid-binding properties of its long isoform product/ N. Ferrer, A. Garcia-Espana, M. Jeffers // *DNA and cell biology*. – 1999. – T. 18. – №. 3. – C. 209-218.
33. Fowler, S. *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway/ S. Fowler, M. F. Thomashow // *The Plant Cell*. – 2002. – T. 14. – №. 8. – C. 1675-1690.
34. Fusaro, A. F. *AtGRP2*, a cold-induced nucleocytoplasmic RNA-binding protein, has a role in flower and seed development/ A. F. Fusaro, S. N. Bocca, R. L. Ramos, R. M. Barroco, C. Magioli, V. C. Jorge, T. C. Coutinho, C. M. Rangel-Lima, R. De Rycke, D. Inze, G. Engler, G. Sachetto-Martins // *Planta*. – 2007. – T. 225. – №. 6. – C. 1339-1351.

35. Gaudreault, I. YB-1 promotes strand separation in vitro of duplex DNA containing either mispaired bases or cisplatin modifications, exhibits endonucleolytic activities and binds several DNA repair proteins/ I. Gaudreault, D. Guay, M. Lebel // *Nucleic acids research*. – 2004. – T. 32. – №. 1. – C. 316-327.
36. Goldstein, J. Major cold shock protein of *Escherichia coli*/ J. Goldstein, N. S. Pollitt, M. Inouye // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1990. – T. 87. – №. 1. – C. 283-287.
37. Graumann, P. A case of convergent evolution of nucleic acid binding modules/ P. Graumann, M. A. Marahiel // *Bioessays*. – 1996. – T. 18. – №. 4. – C. 309-315.
38. Graumann, P. A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures/ P. Graumann, T.M. Wendrich, M.H. Weber, K. Schröder, M.A. Marahiel // *Molecular microbiology*. – 1997. – T. 25. – №. 4. – C. 741-756.
39. Graumann, P. A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain/ P. L. Graumann, M. A. Marahiel // *Trends in biochemical sciences*. – 1998. – T. 23. – №. 8. – C. 286-290.
40. Gualerzi, C. O. Transcriptional and post-transcriptional control of cold-shock genes/ C. O. Gualerzi, A. M. Giuliodori, C. L. Pon // *Journal of molecular biology*. – 2003. – T. 331. – №. 3. – C. 527-539.
41. Guerrerio, A. L. Design of single-stranded nucleic acid binding peptides based on nucleocapsid CCHC-box zinc-binding domains/ A. L. Guerrerio, J. M. Berg // *Journal of the American Chemical Society*. – 2010. – T. 132. – №. 28. – C. 9638-9643.
42. Hamano, R. High expression of Lin28 is associated with tumour aggressiveness and poor prognosis of patients in oesophagus cancer/ R. Hamano, H. Miyata, M. Yamasaki, K. Sugimura, K. Tanaka, Y. Kurokawa, K. Nakajima, S. Takiguchi, Y. Fujiwara, M. Mori, Y. Doki // *British journal of cancer*. – 2012. – T. 106. – №. 8. – C. 1415.

43. Handa, N. Structural basis for recognition of the tra mRNA precursor by the Sex-lethal protein/ N. Handa, O. Nureki, K. Kurimoto, I. Kim, H. Sakamoto, Y. Shimura, Y. Muto, S. Yokoyama // *Nature*. – 1999. – T. 398. – №. 6728. – C. 579.
44. Hannah, M.A. A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*/ M. A. Hannah, A. G. Heyer, D. K. Hinch // *PLoS genetics*. – 2005. – T. 1. – №. 2. – C. e26.
45. Hasegawa, S. L. DNA binding properties of YB-1 and dbpA: binding to doublestranded, single-stranded, and abasic site containing DNAs / S. L. Hasegawa, P. W. Doetsch, K. K. Hamilton, A. M. Martin, S. A. Okenquist, J. Lenz, J. M. Boss, // *Nucleic acids research*. – 1991. – T. 19. – №. 18. – C. 4915-4920.
46. Heo, I. Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA/ I. Heo, C. Joo, J. Cho, M. Ha, J. Han, V. N. Kim // *Molecular cell*. – 2008. – T. 32. – №. 2. – C. 276-284.
47. Herschlag, D. RNA Chaperones and the RNA Folding Problem / D. Herschlag // *Journal of Biological Chemistry*. – 1995. – T. 270. – №. 36. – C. 20871-20874.
48. Horn, G. Structure and function of bacterial cold shock proteins/ G. Horn, R. Hofweber, W. Kremer, H. R. Kalbitzer // *Cellular and molecular life sciences*. – 2007. – T. 64. – №. 12. – C. 1457.
49. Hsu, K. F. Overexpression of the RNA-binding proteins Lin28B and IGF2BP3 (IMP3) is associated with chemoresistance and poor disease outcome in ovarian cancer / K.F. Hsu, M.R. Shen, Y. F. Huang, Y. M. Cheng, S. H. Lin, N. H. Chow, S.W. Cheng, C.Y. Chou, C. L. Ho // *British journal of cancer*. – 2015. – T. 113. – №. 3. – C. 414.
50. Hu, K.H. Overproduction of three genes leads to camphor resistance and chromosome condensation in *Escherichia coli*/ K. H. Hu, E. Liu, K. Dean, M. Gingas, W. DeGraff, N. J. Trun // *Genetics*. – 1996. – T. 143. – №. 4. – C. 1521-1532.
51. Hudson, W.H., Ortlund E.A. The structure, function and evolution of proteins that bind DNA and RNA/ W.H. Hudson, E.A. Ortlund // *Nature reviews Molecular cell biology*. – 2014. – T. 15. – №. 11. – C. 749.

52. Hunseung, K. Plant RNA chaperones in stress response/ K. Hunseung, S. J. Park, K. J. Kwak // Trends in plant science. – 2013. – T. 18. – №. 2. – C. 100-106.
53. Inan, G. Salt Cress. A Halophyte and Cryophyte Arabidopsis Relative Model System and Its Applicability to Molecular Genetic Analyses of Growth and Development of Extremophiles/ G. Inan, Q. Zhang, P. Li, Z. Wang, Z. Cao, H. Zhang, C. Zhang, T. M. Quist, S. M. Goodwin, J. Zhu, H. Shi, B. Damsz, T. Charbaji, Q. Gong, S. Ma, M. Fredricksen, D. W. Galbraith, M. A. Jenks, D. Rhodes, P. M. Hasegawa, H. J. Bohnert, R. J. Joly, R. A. Bressan, J.-K. Zhu // Plant physiology. – 2004. – T. 135. – №. 3. – C. 1718-1737.
54. Ise, T. Transcription factor Y-box binding protein 1 binds preferentially to cisplatin-modified DNA and interacts with proliferating cell nuclear antigen/ T. Ise, G. Nagatani, T. Imamura, K. Kato, H. Takano, M. Nomoto, H. Izumi, H. Ohmori, T. Okamoto, T. Ohga, T. Uchiumi, M. Kuwano, K. Kohno // Cancer research. – 1999. – T. 59. – №. 2. – C. 342-346.
55. Ivanyi-Nagy, R. Disordered RNA chaperone proteins: from functions to disease/ R. Ivanyi-Nagy, L. Davidovic, E. W. Khandjian, J. L. Darlix, // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2005. – T. 62. – №. 13. – C. 1409-1417.
56. Jaglo-Ottosen, K. Arabidopsis CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance/ K. R. Jaglo-Ottosen, S. J. Gilmour, D. G. Zarka, O. Schabenberger, M. F. Thomashow // Science. – 1998. – T. 280. – №. 5360. – C. 104-106.
57. Jiang, W. CspA, the major cold-shock protein of Escherichia coli, is an RNA chaperone/ W. Jiang, Y. Hou, M. Inouye // Journal of Biological Chemistry. – 1997. – T. 272. – №. 1. – C. 196-202.
58. Jones, P. G. Induction of proteins in response to low temperature in Escherichia coli/ P. G. Jones, R. A. Van Bogelen, F. C. Neidhardt // Journal of bacteriology. – 1987. – T. 169. – №. 5. – C. 2092-2095.
59. Juntawong, P. Cold shock protein 1 chaperones mRNAs during translation in Arabidopsis thaliana / P. Juntawong, R. Sorenson, J. Bailey-Serres //The Plant Journal. – 2013. – T. 74. – №. 6. – C. 1016-1028.

60. Karlson, D. A cold-regulated nucleic acid-binding protein of winter wheat shares a domain with bacterial cold shock proteins/ D. Karlson, K. Nakaminami, T. Toyomasu, R. Imai // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – T. 277. – №. 38. – C. 35248-35256.
61. Karlson, D. Conservation of the Cold Shock Domain Protein Family in Plants/ D. Karlson, Imai R. // *Plant Physiology*. – 2003. – T. 131. – №. 1. – C. 12-15.
62. Karlson, D. Plant cold shock domain proteins: on the tip of an iceberg/ D. Karlson, K. Nakaminami, K. Thompson, Y. Yang, V. Chaikam, P. Mulinti, L. V. Gusta, M. E. Wisniewski, K. K. Tanino // *Plant cold hardiness: from the laboratory to the field*. – 2009. – C. 43-54.
63. Kawaguchi, R. mRNA sequence features that contribute to translational regulation in Arabidopsis/ R. Kawaguchi, J. Bailey-Serres // *Nucleic Acids Research*. – 2005. – T. 33. – №. 3. – C. 955-965
64. Kim, J. S. Cold shock domain proteins and glycine-rich RNA-binding proteins from Arabidopsis thaliana can promote the cold adaptation process in Escherichia coli/ J. S. Kim, S. J. Park, K. J. Kwak, Y. O. Kim, J. Y. Kim, J. S. Boseung, J. C.-H. Jung, H. Kang // *Nucleic Acids Research*. – 2006. – T. 35. – №. 2. – C. 506-516.
65. Kim, M.-H. Arabidopsis cold shock domain protein 3 is involved in salt and drought stress tolerance in Arabidopsis/ M.-H. Kim, S. Sato, K. Sasaki, W. Saburi, Matsui, H., Imai, R. // *FEBS Open Bio*, 2013. - №3. – P.438-442.
66. Kim, M.-H. Interactome analysis reveals versatile functions of Arabidopsis Cold Shock Domain Protein 3 in RNA processing within the nucleus and cytoplasm/ M.-H. Kim, Y. Sonoda, K. Sasaki, H. Kaminaka, R. Imai // *Cell Stress and Chaperones*. – 2013. – T. 18. – №. 4. – C. 517-525.
67. Kim, M. H. Cold shock domain protein 3 regulates freezing tolerance in Arabidopsis thaliana/ Kim, M. H., Sasaki, K., Imai, R. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2009. – C. jbc. M109. 025791.
68. Kohno, K. The pleiotropic functions of the Y-box binding protein, YB-1/ K. Kohno, H. Izumi, T. Uchiumi, M. Ashizuka, M. Kuwano // *Bioessays*. – 2003. – T. 25. – №. 7. – C. 691-698.

69. Kremer, W. Solution NMR structure of the cold-shock protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*/ W. Kremer, B. Schuler, S. Harrieder, M. Geyer, W. Gronwald, C. Welker // *European journal of biochemistry*. – 2001. – T. 268. – №. 9. – C. 2527-2539.
70. Lamond, A. I. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles/ A. I. Lamond, D. L. Spector // *Nature reviews Molecular cell biology*. – 2003. – T. 4. – №. 8. – C. 605.
71. Lee, B. The Arabidopsis cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1/ B. H. Lee, D. A. Henderson, J. K. Zhu // *The Plant Cell*. – 2005. – T. 17. – №. 11. – C. 3155-3175.
72. Lee, H. Biogenesis and regulation of the let-7 miRNAs and their functional implications/ H. Lee, S. Han, C. S. Kwon, D. Lee // *Protein & cell*. – 2016. – T. 7. – №. 2. – C. 100-113.
73. Li, C. A Lin28 homologue reprograms differentiated cells to stem cells in the moss *Physcomitrella patens*/ C. Li, Y. Sako, A. Imai, T. Nishiyama, K. Thompson, M. Kubo, Y. Hiwatashi, Y. Kabeya, D. Karlson, S.-H. Wu, M. Ishikawa, T. Murata, P. N. Benfey, Y. Sato, Y. Tamada, M. Hasebe // *Nature Communications*. – 2017. – T. 8. – C. 14242.
74. Liphardt, J. Reversible Unfolding of Single RNA Molecules by Mechanical Force/ J. Liphardt, B. Onoa, S. Smith, I. Tinoco, C. Bustamante // *Science*. – 2001. – T. 292. – №. 5517. – C. 733-737.
75. Littauer, U. The unfolding of our understanding of RNA structure: a personal reflection/ U. Littauer // *Biophysical chemistry*. – 2000. – T. 86. – №. 2-3. – C. 259-266.
76. Liu, Q. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis/ Q. Liu, M. Kasuga, Y. Sakuma, H. Abe, S. Miura, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki // *Plant Cell*, 1998. -№10(8). – P. 1391-1406.

77. Lopez, M. M. Interactions of the Cold Shock Protein CspB from *Bacillus subtilis* with single-stranded dna. Importance of the t base content and position within the template/ M. M. Lopez, K. Yutani, G. I. Makhatadze //Journal of Biological Chemistry. – 2001. – T. 276. – №. 18. – C. 15511-15518.
78. Lopez, M. M. Interactions of the major cold shock protein of *Bacillus subtilis* CspB with single-stranded DNA templates of different base composition/ Lopez, M.M., Yutani, K., Makhatadze, G.I. //Journal of Biological Chemistry. – 1999. – T. 274. – №. 47. – C. 33601-33608.
79. Maris, C. The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression/ C. Maris, C. Dominguez, F. H. T. Allain //The FEBS journal. – 2005. – T. 272. – №. 9. – C. 2118-2131.
80. Mascarenhas, J. Specific polar localization of ribosomes in *Bacillus subtilis* depends on active transcription/ J. Mascarenhas, M. H. W. Weber, P. L. Graumann //EMBO reports. – 2001. – T. 2. – №. 8. – C. 685-689.
81. Matsumoto, K. An acidic protein, YBAP1, mediates the release of YB-1 from mRNA and relieves the translational repression activity of YB-1/ K. Matsumoto, K. J. Tanaka, M. Tsujimoto //Molecular and cellular biology. – 2005. – T. 25. – №. 5. – C. 1779-1792.
82. Mayer, O. RNA chaperone activity and RNA-binding properties of the *E. coli* protein StpA/ O. Mayer, L. Rajkowitsch, C. Lorenz, R. Konrat, R. Schroeder // Nucleic Acids Res., 2007. - №35. – P. 1257-1269.
83. Mayr, F. Mechanisms of Lin28-mediated miRNA and mRNA regulation — a structural and functional perspective/ F. Mayr, U. Heinemann // International journal of molecular sciences. – 2013. – T. 14. – №. 8. – C. 16532-16553.
84. Mayr, F. The Lin28 cold-shock domain remodels pre-let-7 microRNA/ F. Mayr, A. Schütz, N. Döge, U. Heinemann //Nucleic acids research. – 2012. – T. 40. – №. 15. – C. 7492-7506.
85. Mihailovich, M. Eukaryotic cold shock domain proteins: highly versatile regulators of gene expression/ M. Mihailovich, C. Militti, T. Gabaldon, F. Gebauer // Bioessays. – 2010. – T. 32. – №. 2. – C. 109-118.

86. Mueller, U. Thermal stability and atomic-resolution crystal structure of the *Bacillus caldolyticus* cold shock protein/ U. Mueller, D. Perl, F. X. Schmid, U. Heinemann // *Journal of molecular biology*. – 2000. – T. 297. – №. 4. – C. 975-988.
87. Murzin, A. G. OB (oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences/ A. G. Murzin // *The EMBO journal*. – 1993. – T. 12. – №. 3. – C. 861-867.
88. Nakaminami, K. Arabidopsis cold shock domain proteins: relationships to floral and silique development/ K. Nakaminami, K. Hill, S. E. Perry, N. Sentoku, J. A. Long, D. T. Karlson // *Journal of experimental botany*. – 2009. – T. 60. – №. 3. – C. 1047-1062.
89. Nakaminami, K. Functional conservation of cold shock domains in bacteria and higher plants / K. Nakaminami, D. T. Karlson, R. Imai // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2006. – T. 103. – №. 26. – C. 10122-10127.
90. Nakaminami, K. Heat stable ssDNA/RNA-binding activity of a wheat cold shock domain protein/ K. Nakaminami, K. Sasaki, S. Kajita, H. Takeda, D. Karlson, K. Ohgi, R. Imai // *FEBS letters*. – 2005. – T. 579. – №. 21. – C. 4887-4891.
91. Nam, Y. Molecular basis for interaction of let-7 microRNAs with Lin28/ Y. Nam, C. Chen, R. I. Gregory, J. J. Chou, P. Sliz // *Cell*. – 2011. – T. 147. – №. 5. – C. 1080-1091.
92. Newkirk, K. Solution NMR structure of the major cold shock protein (CspA) from *Escherichia coli*: identification of a binding epitope for DNA/ K. Newkirk, W. Feng, W. Jiang, R. Tejero, S.D. Emerson, M. Inouye, G. T. Montelione // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1994. – T. 91. – №. 11. – C. 5114-5118.
93. Pan, J. Folding of RNA involves parallel pathways/ J. Pan, D. Thirumalai, S.A. Woodson // *Journal of molecular biology*. – 1997. – T. 273. – №. 1. – C. 7-13.
94. Park, S. J. Cold Shock Domain Proteins Affect Seed Germination and Growth of *Arabidopsis thaliana* Under Abiotic Stress Conditions/ S. J. Park , K. J. Kwak, T. R. Oh, Y. O. Kim, H. Kang // *Plant and Cell Physiology*. – 2009. – T. 50. – №. 4. – C. 869-878.

95. Peng, S. Genome-wide studies reveal that Lin28 enhances the translation of genes important for growth and survival of human embryonic stem cells/ S. Peng, L. L. Chen, X. X. Lei, L. Yang, H. Lin, G. G. Carmichael, Y. Huang //Stem Cells. – 2011. – T. 29. – №. 3. – C. 496-504.
96. Peng, S. Genome-wide studies reveal that Lin28 enhances the translation of genes important for growth and survival of human embryonic stem cells/ S. Peng, L. L. Chen, X. X. Lei, L. Yang, H. Lin, G. G. Carmichael, Y. Huang //Stem Cells. – 2011. – T. 29. – №. 3. – C. 496-504.
97. Phadtare, S. Applications of nucleic acid chaperone activity of CspA and its homologues/ S. Phadtare, L. Zhu, T. Uemori, H. Mukai, I. Kato, M. Inouye //Journal of molecular microbiology and biotechnology. – 2009. – T. 17. – №. 3. – C. 110-117.
98. Phadtare, S. Cold-shock response and cold-shock proteins/ S. Phadtare, J. Alsina, M. Inouye //Current opinion in microbiology. – 1999. – T. 2. – №. 2. – C. 175-180.
99. Phadtare, S. RNA remodeling and gene regulation by cold shock proteins/ S. Phadtare, K. Severinov //RNA biology. – 2010. – T. 7. – №. 6. – C. 788-795.
100. Phadtare, S. Role of CspC and CspE in regulation of expression of RpoS and UspA, the stress response proteins in Escherichia coli/ Phadtare S., Inouye M. //Journal of bacteriology. – 2001. – T. 183. – №. 4. – C. 1205-1214.
101. Phadtare, S. Sequence-selective interactions with RNA by CspB, CspC and CspE, members of the CspA family of Escherichia coli/ S. Phadtare, M. Inouye// Molecular microbiology. – 1999. – T. 33. – №. 5. – C. 1004-1014.
102. Phadtare, S. The mechanism of nucleic acid melting by a CspA family protein/ S. Phadtare, M. Inouye, K. Severinov //Journal of molecular biology. – 2004. – T. 337. – №. 1. – C. 147-155.
103. Phadtare, S. The nucleic acid melting activity of Escherichia coli CspE is critical for transcription antitermination and cold acclimation of cells/ S. Phadtare, M. Inouye, K. Severinov // Journal of Biological Chemistry. – 2002. – T. 277. – №. 9. – C. 7239-7245.

104. Phadtare, S. Three amino acids in Escherichia coli CspE surface-exposed aromatic patch are critical for nucleic acid melting activity leading to transcription antitermination and cold acclimation of cells/ S. Phadtare, S. Tyagi, M. Inouye, K. Severinov //Journal of Biological Chemistry. – 2002. – T. 277. – №. 48. – C. 46706-46711.
105. Poleskaya, A. Lin-28 binds IGF-2 mRNA and participates in skeletal myogenesis by increasing translation efficiency/ A. Poleskaya, S. Cuvellier, I. Naguibneva, A. Duquet, E. G. Moss, A. Harel-Bellan //Genes & development. – 2007. – T. 21. – №. 9. – C. 1125-1138.
106. Puckette, M. Differential mRNA translation in Medicago truncatula accessions with contrasting responses to ozone-induced oxidative stress/ M. Puckette, N. J. Iyer, Y. Tang, X. B. Dai, P. Zhao, R. Mahalingam //Molecular plant. – 2012. – T. 5. – №. 1. – C. 187-204.
107. Radkova, M. Development- and cold-regulated accumulation of cold shock domain proteins in wheat / M. Radkova, P. Vítámvás, K. Sasaki, R. Imai //Plant physiology and biochemistry. – 2014. – T. 77. – C. 44-48.
108. Rajkowitsch, L. RNA Chaperones, RNA Annealers and RNA Helicases/ L. Rajkowitsch, D. Chen, S. Stampfl, K. Semrad, C. Waldsich, O. Mayer, M. Jantsch, R. Konrat, U. Bläsi, R. Schroeder // RNA biology. – 2007. – T. 4. – №. 3. – C. 118-130.
109. Rajyaguru, P. RGG motif proteins: modulators of mRNA functional states/ P. Rajyaguru, R. Parker //Cell Cycle. – 2012. – T. 11. – №. 14. – C. 2594-2599.
110. Ruelland, E. How plants sense temperature/ E. Ruelland, A. Zachowski //Environmental and Experimental Botany. – 2010. – T. 69. – №. 3. – C. 225-232.
111. Russell, R. New pathways in folding of the Tetrahymena group I RNA enzyme/ R. Russell, D. Herschlag //Journal of molecular biology. – 1999. – T. 291. – №. 5. – C. 1155-1167.
112. Russell, R. Probing the folding landscape of the Tetrahymena ribozyme: commitment to form the native conformation is late in the folding pathway/ R. Russell, D. Herschlag, //Journal of molecular biology. – 2001. – T. 308. – №. 5. – C. 839-851.

113. Sanghera, G. S. Engineering cold stress tolerance in crop plants/ G. S. Sanghera, S. H. Wani, W. Hussain, N. B. Singh //Current genomics. – 2011. – T. 12. – №. 1. – C. 30-43.
114. Sasaki, K. Pleiotropic roles of cold shock domain proteins in plants/ Sasaki, K., Imai, R.//Frontiers in plant science. – 2012. – T. 2. – C. 116.
115. Sasaki, K. Arabidopsis Cold Shock Domain Protein 2 is a RNA chaperone that is regulated by cold and developmental signals/ K. Sasaki, M. H. Kim, R. Imai //Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2007. – T. 364. – №. 3. – C. 633-638.
116. Sawyer, A. L. Solution structure of the RNA-binding cold shock domain of the Chlamydomonas reinhardtii NAB1 protein and insights into RNA recognition/ A. L. Sawyer, M. J. Landsberg, I. L. Ross, O. Kruse, M. Mobli, B. Hankamer // Biochemical Journal. – 2015. – C. BJ20150217.
117. Schindelin, H. Crystal structure of CspA, the major cold shock protein of Escherichia coli/ H. Schindelin, W. Jiang, M. Inouye, U. Heinemann //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1994. – T. 91. – №. 11. – C. 5119-5123.
118. Schindelin, H. Universal nucleic acid-binding domain revealed by crystal structure of the B. subtilis major cold-shock protein/ H. Schindelin, M. A. Marahiel, U. Heinemann// Nature. – 1993. – T. 364. – №. 6433. – C. 164.
119. Schnuchel, A. Structure in solution of the major cold-shock protein from Bacillus subtilis/ A. Schnuchel, R. Wiltscheck, M. Czisch, M. Herrler, G. Willimsky, P. Graumann, M.A. Marahiel, T.A. Holak //Nature. – 1993. – T. 364. – №. 6433. – C. 169-171.
120. Schroder, K. Mutational analysis of the putative nucleic acid-binding surface of the cold-shock domain, CspB, revealed an essential role of aromatic and basic residues in binding of single-stranded DNA containing the Y-box motif/ K. Schroder, P. Graumann, A. Schnuchel, T. A. Holak, M. A. Marahiel //Molecular microbiology. – 1995. – T. 16. – №. 4. – C. 699-708.

121. Schroeder, R. Strategies for RNA folding and assembly/ R. Schroeder, A. Barta, K. Semrad // Nature reviews Molecular cell biology. – 2004. – T. 5. – №. 11. – C. 908.
122. Shen, C. Knock out of the annexin gene OsAnn3 via CRISPR/Cas9-mediated genome editing decreased cold tolerance in rice/ C. Shen, Z. Que, Y. Xia, N. Tang, D. Li, R. He, M. Cao //Journal of Plant Biology. – 2017. – T. 60. – №. 6. – C. 539-547.
123. Skabkin, M. A. Nonspecific and specific interactions of Y-box-binding protein 1 (YB-1) with mRNA and posttranscriptional regulation of protein synthesis in animal cells/ M. A. Skabkin, D. N. Lyabin, L. P. Ovchinnikov // Molecular Biology. – 2006. – T. 40. – №. 4. – C. 551-563.
124. Sommerville, J. Activities of cold-shock domain proteins in translation control/ J. Sommerville //Bioessays. – 1999. – T. 21. – №. 4. – C. 319-325.
125. Soop, T. A p50-like Y-box protein with a putative translational role becomes associated with pre-mRNA concomitant with transcription/ T. Soop, D. Nashchekin, J. Zhao, X. Sun, A. T. Alzhanova-Ericsson, B. Bjorkroth, L. Ovchinnikov, B. Daneholt // Journal of cell science. – 2003. – T. 116. – №. 8. – C. 1493-1503.
126. Sosnick, T.R. Getting hotter with RNA/ T.R. Sosnick, T. Pan // Nature Structural and Molecular Biology. – 2002. – T. 9. – №. 11. – C. 795.
127. Thieringer, H. A. Cold shock and adaptation/ H. A. Thieringer, P. G. Jones, M. Inouye //Bioessays. – 1998. – T. 20. – №. 1. – C. 49-57.
128. Thirumalai, D. RNA and Protein Folding: Common Themes and Variations/ D. Thirumalai, Hyeon, C. // Biochem J., 2005. - № 44. – P. 4957-4970.
129. Tzialikas, J. LIN28: roles and regulation in development and beyond / J. Tzialikas, J. Romer-Seibert //Development. – 2015. – T. 142. – №. 14. – C. 2397-2404.
130. Varani, G. RNA recognition by RNP proteins during RNA processing/ G. Varani, K. Nagai // Annual review of biophysics and biomolecular structure. – 1998. – T. 27. – №. 1. – C. 407-445.

131. Wada, M. R. An alternatively spliced gene encoding a Y-box protein showing maternal expression and tissue-specific zygotic expression in the ascidian embryo/ M. R. Wada, Y. Ohtani, Y. Shibata, K. J. Tanaka, N. Tanimoto, T. Nishikata //Development, growth & differentiation. – 1998. – T. 40. – №. 6. – C. 631-640.
132. Wan, Y. Understanding the transcriptome through RNA structure/ Y. Wan, M. Kertesz, R. C. Spitale, E. Segal, H. Y. Chang //Nature Reviews Genetics. – 2011. – T. 12. – №. 9. – C. 641.
133. Wang, D. The pluripotency factor LIN28B is involved in oral carcinogenesis and associates with tumor aggressiveness and unfavorable prognosis/ D. Wang, Y. Zhu, Y. Wang, Z. Li, W. Zhang, C. Yuan, H. Yuan, J. Ye, J. Yang, H. Jiang, J. Cheng //Cancer cell international. – 2015. – T. 15. – №. 1. – C. 99.
134. Wang, N. CspI, the Ninth Member of the CspA Family of Escherichia coli, Is Induced upon Cold Shock/ N. Wang, K. Yamanaka, M. Inouye //Journal of bacteriology. – 1999. – T. 181. – №. 5. – C. 1603-1609.
135. Weber, M. H. W. Complementation of cold shock proteins by translation initiation factor IF1 in vivo/ M. H. W. Weber, C. L. Beckering, M. A. Marahiel //Journal of bacteriology. – 2001. – T. 183. – №. 24. – C. 7381-7386.
136. Weber, M. H. W. Localization of Cold Shock Proteins to Cytosolic Spaces Surrounding Nucleoids in Bacillus subtilis Depends on Active Transcription/ M. H. W. Weber, A. V. Volkov, I. Fricke, M. A. Marahiel, P. L. Grauman // Journal of bacteriology. – 2001. – T. 183. – №. 21. – C. 6435-6443.
137. Weeks, K. M. Protein-facilitated RNA folding/ K. M. Weeks //Current opinion in structural biology. – 1997. – T. 7. – №. 3. – C. 336-342.
138. Williams, M. C. Mechanism for nucleic acid chaperone activity of HIV-1 nucleocapsid protein revealed by single molecule stretching/ M. C. Williams, I. Rouzina, J. R. Wenner, R. J. Gorelick, K. Musier-Forsyth, V. A. Bloomfield // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2001. – T. 98. – №. 11. – C. 6121-6126.
139. Williamson, J. Induced fit in RNA – protein recognition/ J. Williamson // Nature Structural and Molecular Biology. – 2000. – T. 7. – №. 10. – C. 834.

140. Wolffe, A. P. Structural and functional properties of the evolutionarily ancient Y-box family of nucleic acid binding proteins/ A. P. Wolffe //Bioessays. – 1994. – T. 16. – №. 4. – C. 245-251.
141. Woodson, S.A. Taming free energy landscapes with RNA chaperones/ S.A. Woodson // RNA biology. – 2010. – T. 7. – №. 6. – C. 677-686.
142. Xia, B. Acquirement of cold sensitivity by quadruple deletion of the cspA family and its suppression by PNPase S1 domain in Escherichia coli/ B. Xia, H. Ke, M. Inouye //Molecular microbiology. – 2001. – T. 40. – №. 1. – C. 179-188.
143. Yamanaka, K. Cloning, sequencing, and characterization of multicopy suppressors of a mukB mutation in Escherichia coli/ K. Yamanaka, T. Mitani, T. Ogura, H. Niki, S. Hiraga //Molecular microbiology. – 1994. – T. 13. – №. 2. – C. 301-312.
144. Yamanaka, K. Cloning, sequencing, and characterization of multicopy suppressors of a mukB mutation in Escherichia coli/ K. Yamanaka, T. Mitani, T. Ogura, H. Niki, S. Hiraga //Molecular microbiology. – 1994. – T. 13. – №. 2. – C. 301-312.
145. Yamanaka, K. Cold shock response in Escherichia coli/ K. Yamanaka//Journal of molecular microbiology and biotechnology. – 1999. – T. 1. – №. 2. – C. 193-202.
146. Yamanaka, K. CspD, a novel DNA replication inhibitor induced during the stationary phase in Escherichia coli/ K. Yamanaka, W. Zheng, E.Crooke, Y. H. Wang, M. Inouye //Molecular microbiology. – 2001. – T. 39. – №. 6. – C. 1572-1584.
147. Yang, Y. AtCSP1 regulates germination timing promoted by low temperature/ Y. Yang, D. Karlson //FEBS letters. – 2013. – T. 587. – №. 14. – C. 2186-2192.
148. Yu, J. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells/ J. Yu, M.A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J. L. Frane, S. Tian, J. Nie, G. A. Jonsdottir, V. Ruotti, R. Stewart, I. I. Slukvin, J. A. Thomson //Science. – 2007. – T. 318. – №. 5858. – C. 1917-1920.
149. Zadeh, J. N. NUPACK: analysis and design of nucleic acid systems/ J. N. Zadeh, C. D. Steenberg J. S. Bois, B. R. Wolfe, M. B. Pierce, A. R. Khan, R. M.

Dirks, N. A. Pierce //Journal of computational chemistry. – 2011. – T. 32. – №. 1. – C. 170-173.

150. Zeeb, M. Recognition of T-rich single-stranded DNA by the cold shock protein Bs-CspB in solution/ M. Zeeb, K. E.Max, U. Weininger, C. Löw, H. Sticht, J. Balbach //Nucleic acids research. – 2006. – T. 34. – №. 16. – C. 4561-4571.

151. Zeeb, M. Single-stranded DNA binding of the cold-shock protein CspB from Bacillus subtilis: NMR mapping and mutational characterization/ M. Zeeb, J. Balbach //Protein science. – 2003. – T. 12. – №. 1. – C. 112-123.