

На правах рукописи



Злобин Николай Евгеньевич

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

Специальность: 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2019

Работа выполнена в лаборатории стрессоустойчивости растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», г. Москва

Научный руководитель: **Бабаков Алексей Владимирович**
доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории стрессоустойчивости растений ФГБНУ ВНИИСБ

Официальные оппоненты: **Северинов Константин Викторович**
доктор биологических наук, профессор, директор Центра наук о жизни Сколковского института науки и технологий

Рубцов Юрий Петрович
кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт белка Российской академии наук

Защита состоится «23» мая 2019 г. в «12-00» часов на заседании диссертационного совета Д 006.027.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ) по адресу: 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42, тел. +7(499) 976-65-44, E-mail: iab@iab.ac.ru; marat131084@rambler.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ ВНИИСБ

Автореферат разослан «20» марта 2019 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Халилуев
Марат Рушанович

Актуальность проблемы. 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. 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 сельскохозяйственных растений к неблагоприятным факторам окружающей среды является геновая инженерия. Однако, для эффективного использования генетической инженерии необходимо наличие глубоких фундаментальных знаний механизмов устойчивости растений к пониженной температуре. К настоящему моменту установлено, что снижение температуры окружающей среды вызывает изменение экспрессии сотен генов, однако роль большинства из них в стрессовом ответе неизвестна (Chinnusamy et al. 2006; Lee et al., 2005). Даже в том случае, когда значимость тех или иных генов была подтверждена прямыми методами, в частности путем анализа холодоустойчивости растений с нокаут-мутациями по этим генам, механизм функционирования соответствующих белков в процессе низкотемпературной адаптации может оставаться неизвестным (Shen et al., 2017).

К числу последних относятся и так называемые белки с доменом холодового шока. Они были обнаружены в различных организмах от прокариот до млекопитающих (Chaikam et al. 2010). Известные функции этих белков

определяются взаимодействием с нуклеиновыми кислотами. Гены, кодирующие белки с доменом холодового шока, обнаружены и в высших растениях; важная роль белков с доменом холодового шока в адаптации растений к низкотемпературному стрессу подтверждена рядом работ. Тем не менее, ряд значимых аспектов, связанных с функционированием этих белков в растительной клетке, остается практически неизученным. Наиболее критичным из них является молекулярный механизм, за счет которого белки с доменом холодового шока оказывают свое влияние на адаптацию растения к пониженным температурам. Определение механизма их действия на молекулярном уровне является ключевым шагом на пути построения целостной картины функционирования этих белков в клетке.

Цели и задачи исследования. 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 *E. salsugineum* EsCSDP1, EsCSDP2, EsCSDP3, 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-плавающую 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. В данной работе с применением различных модельных систем *in vitro* и *in vivo* было исследовано взаимодействие белков с доменом холодого шока EsCSDP1, EsCSDP2 и EsCSDP3 из растения *E. salsugineum* с нуклеиновыми кислотами. Каждый из этих белков содержит в своем составе несколько центров взаимодействия с нуклеиновыми кислотами – домен холодого шока в N-концевой части и несколько мотивов «цинковые пальцы» в C-концевой части (рис. 1).



Рис. 1. Схематическое изображение доменной структуры белков EsCSDP1, EsCSDP2, EsCSDP3 *E. salsugineum*.

Была показана способность этих белков 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 C-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 холодого 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.

Практическая ценность работы. 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 соответствующие 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-плавящая, 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 Пущинской 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.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и очистка рекомбинантных белков. Для получения очищенных препаратов белков с доменом холодового шока *E. 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, ковалентно связывающимся со смолой HaloLink Resin (Promega). Клетки *E. coli* штамма BL21 были трансформированы созданными генетическими конструкциями. Выделение и очистка белков осуществляли с помощью набора HaloTag Protein Purification Kit (Promega) в соответствии с методикой, рекомендованной производителем, с небольшими модификациями.

Измерение ДНК-плавящей и РНК-плавящей активности белков. Для измерения ДНК-плавящей и РНК-плавящей активности белков использовали молекулярные маяки с различной последовательностью нуклеотидов и пространственной структурой. Молекулы маяков представляли собой олигонуклеотиды с комплементарными участками, на концах которых имелись флуоресцентные красители и гасители флуоресценции, что позволяло судить о ДНК- или РНК-плавящей активности белков по измерению флуоресценции реакционной смеси. Измерение проводили как при постоянной температуре 4°C с помощью флуориметра LS55 (Perkin Elmer, США), так и в диапазоне температуре 4-92°C с помощью амплификатора с детекцией флуоресценции в режиме реального времени CFX-96 (BioRad, США).

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

Измерение РНК-шаперонной активности. Для измерения РНК-шаперонной активности белков применяли молекулярный маяк, образующий при отжиге в воде mQ неустойчивые вторичные структуры, которые при переносе этого маяка в буферный раствор постепенно переходят в устойчивую вторичную структуру, что выражается в падении флуоресценции реакционной смеси. Добавление в реакционную смесь белка, обладающего РНК-шаперонной активностью, способствует переходу неустойчивых вторичных структур в устойчивую, что проявляется в ускорении падения флуоресценции реакционной смеси. РНК-шаперонную активность белков оценивали путем сравнительного измерения падения флуоресценции реакционной смеси во времени в присутствии и в отсутствие белка.

Комплементация роста бактерий *E. coli* штамма ВХ04. Генетическими конструкциями с генами, кодирующими отдельные домены холодового шока из белков CSDP1-3 *E. salsugineum* и *A. thaliana*, а также белок холодового шока CspA бактерии *E. coli*, были трансформированы бактерии *E. coli* штамма ВХ04. В этом штамме делетированы 4 собственных гена белков холодового шока ($\Delta cspA$, $\Delta cspB$, $\Delta cspE$, $\Delta cspG$), вследствие чего ВХ04 не способен расти при пониженной температуре (17°C). Восстановить (комплементировать) рост этого штамма можно путем сверхэкспрессии CspA либо другого белка, обладающего схожей биологической активностью.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение и очистка рекомбинантных белков. 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 позволяет отделять белок интереса от смолы, переводя его в растворимую фракцию. Были созданы генетические конструкции, кодирующие полные белки EsCSDP1-3, отдельные домены холодового шока из этих трех белков, отдельный С-концевой фрагмент EsCSDP1, а также CspA *E. coli*.

В процессе разработки процедуры выделения белков были оптимизированы условия отмывки смолы HaloLink Resin со связавшимся химерным белком от загрязнителей. Наиболее высокая чистота белков была получена в том случае, когда в процессе отмывок использовался раствор с высокой ионной силой (0,5 М NaCl), а также раствор с добавлением 2мМ АТФ. Чистоту выделенных рекомбинантных белков оценивали посредством электрофореза в полиакриламидном геле по методике Laemmli, а также LC-MS/MS в ЦКП «Протеом человека» Института Биомедицинской Химии. Проведенный анализ показал высокую чистоту препаратов белков. Выход белка из 50 мл бактериальной культуры составлял 0,2-1 мг.

ДНК-плавящая активность белков EsCSDP1-3. Исследование ДНК-плавящей активности *in vitro* белков EsCSDP1-3 было начато в отношении молекулярного маяка BC1 (рис.2А). Он состоял из двуцепочечного участка длиной 9 п.н. и двух одноцепочечных участков, на концах которых имелись молекулы флуоресцентного красителя и гасителя флуоресценции. При плавлении белком вторичной структуры происходит пространственное разделение красителя и гасителя, что выражается в возрастании флуоресценции реакционной смеси, содержащей молекулярный маяк. Измерение флуоресценции реакционной смеси велось при повышающейся температуре (4-92°C), ДНК-плавящую активность

белков оценивали по их способности понижать температуру плавления T_m , при которой значение флуоресценция достигает половины от максимального. Было исследовано снижение T_m BC1 в присутствие различных концентраций белков EsCSDP1-3 (рис. 2B,C), а также бактериального белка холодого шока CspA, отдельных доменов холодого шока из EsCSDP1-3 и отдельного С-концевого фрагмента EsCSDP1 (рис. 2D).

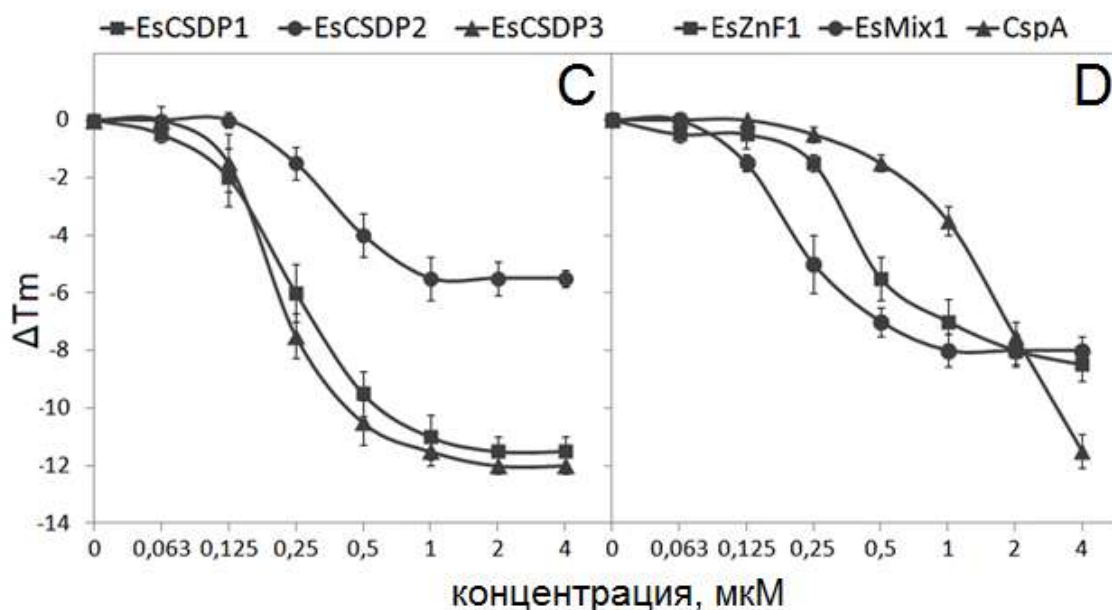
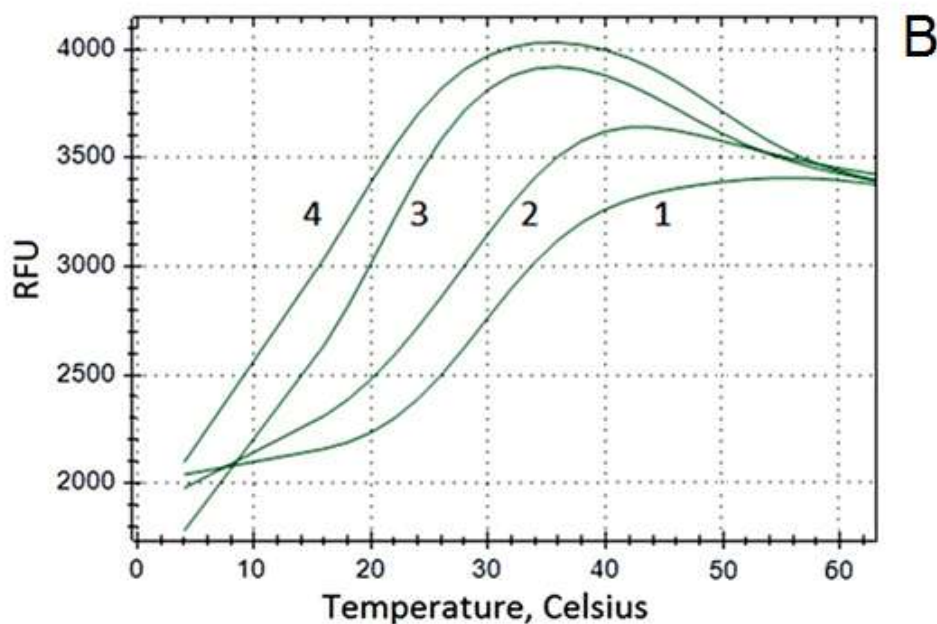


Рис. 2. **А.** Схематическое изображение молекулярного маяка BC1. **В.** Смещение кривой зависимости флуоресценции молекулярного маяка BC1 от температуры в присутствии различных концентраций белка EsCSDP1 (кривая 1 – 0 мкМ, кривая 2 – 0,25 мкМ, кривая 3 – 1 мкМ, кривая 4 – 4 мкМ); RFU – относительный уровень флуоресценции. **С.** Зависимость сдвига T_m маяка BC1 от концентраций белков EsCSDP1-3, CspA, отдельного C-концевого фрагмента из EsCSDP1 (EsZnF1) и эквимольной смеси EsZnF1 с отдельным доменом холодового шока из EsCSDP1. Показатель ΔT_m рассчитывается как различие между значениями T_m маяка в отсутствие белка и в присутствии белка в соответствующей концентрации.

По результатам проведенных экспериментов были установлены следующие закономерности:

- белки EsCSDP1, EsCSDP2 и EsCSDP3 проявляют ДНК-плавящую активность; при этом активность белков EsCSDP1 и EsCSDP3 была приблизительно одинаковой и проявлялась при концентрации белка выше 0,25 мкМ, активность EsCSDP2 была существенно ниже и проявлялась при концентрации более 0,5 мкМ. ДНК-плавящая активность белков EsCSDP1-3 существенно превышала таковую для белка CspA;

- домены холодового шока из всех трех белков в изученном диапазоне концентраций оказались не активны (на графике не представлены);

- С-концевой фрагмент белка EsCSDP1 показал достаточно существенную ДНК-плавящую активность;

- активность эквимольной смеси С-концевого фрагмента и домена холодового шока из EsCSDP1 несколько превышала таковую для С-концевого фрагмента;

- активность полного белка EsCSDP1 была существенно выше активности С-концевого фрагмента, в том числе в эквимольной смеси с доменом холодового шока из этого белка.

Помимо BC1, ДНК-плавящая активность белков EsCSDP1-3 была исследована в отношении ряда других молекулярных маяков, отличавшихся от BC1 последовательностью одноцепочечных и/или двуцепочечных участков. Белки EsCSDP1-3 плавил молекулярные маяки с различной последовательностью нуклеотидов; при этом закономерности, установленные при измерении плавления BC1, были в общем справедливы и для других молекулярных маяков. Кроме того, в экспериментах с молекулярными маяками, не содержащими одноцепочечных участков или содержащих только один одноцепочечный участок, было обнаружено, что для плавления вторичной структуры требуется взаимодействие белков с одноцепочечным участком, находящимся в 3'-положении от этой вторичной структуры. Укорачивание этого одноцепочечного участка не

оказывало негативного влияния на эффективность плавления вторичной структуры, пока его размер был не менее 8 нуклеотидов, после чего происходило резкое снижение эффективности плавления вторичной структуры. На основании всех полученных данных была построена модель взаимодействия между растительным белком с доменом холодового шока и молекулярным маяком, согласно которой связывание с одноцепочечным участком в молекулярном маяке происходит главным образом посредством домена холодового шока, в то время как плавление вторичной структуры осуществляется С-концевой частью белка и зависит от количества содержащихся в ней мотивов «цинковые пальцы».

РНК-плавающая активность белков EsCSDP1-3. Исследование РНК-плавающей активности белков EsCSDP1-3 также осуществлялось с использованием молекулярных маяков. На начальном этапе работы использовали РНК-маяк BC1rna, который по своей нуклеотидной последовательности был идентичен BC1, но в отличие от него состоял из рибонуклеотидов и содержал урацил вместо тимина. Было установлено, что все три белка EsCSDP1-3 способны плавить вторичную структуру в молекулярном маяке BC1rna, при этом, как и в случае с BC1, РНК-плавающая активность EsCSDP2 существенно уступала активностям двух других белков (рис. 3).

Впоследствии для исследования взаимодействия белков EsCSDP1-3 с РНК был синтезирован молекулярный маяк let-7, который по структуре повторяет пре-микроРНК let-7 из *Xenopus tropicalis*. Эта пре-микроРНК является клеточной мишенью белка lin-28. Этот белок по своей доменной организации наиболее близок CSDP растений: он содержит CSD в N-концевой части и два «цинковых пальца» ZnF CCHC-типа в С-концевой части.

Белки EsCSDP1-3 оказались способны плавить имеющиеся в let-7 вторичные структуры при 4°C (рис. 4А). Для выяснения роли ZnF в плавлении нами были получены рекомбинантные белки EsCSDP1 с укороченной С-концевой областью, содержащие 2 и 4 «цинковых пальца», и при сравнении их с нативным EsCSDP1 было показано, что РНК-плавающая активность EsCSDP1 резко снижается при

уменьшении количества ZnF в С-концевой части. Этот факт вероятно объясняет более низкую РНК-плавящую активность EsCSDP2 по сравнению с таковой у EsCSDP1 и у EsCSDP3. Отдельные домены холодового шока из белков EsCSDP1-3 не плавили let-7, в то время как отдельный С-концевой фрагмент EsCSDP1 проявлял РНК-плавящую активность, хотя и существенно меньшую, чем полный белок EsCSDP1.

Известно, что «цинковые пальцы» белка lin-28 взаимодействуют с мотивом GGAG в молекуле let-7 (Mayr et al., 2012). Нами был синтезирован вариант молекулярного маяка let-7, содержащий последовательность AAAA вместо GGAG. В отсутствие мотива GGAG в let-7 РНК-плавящая активность белков EsCSDP1-3 сравнивалась между собой (Рис. 4В). Это было обусловлено существенно снизившейся эффективностью связывания с модифицированным let-7 белков EsCSDP1 и EsCSDP3, но не EsCSDP2, что было показано нами путем измерения анизотропии флуоресценции этого маяка при связывании с ним белков EsCSDP1-3.

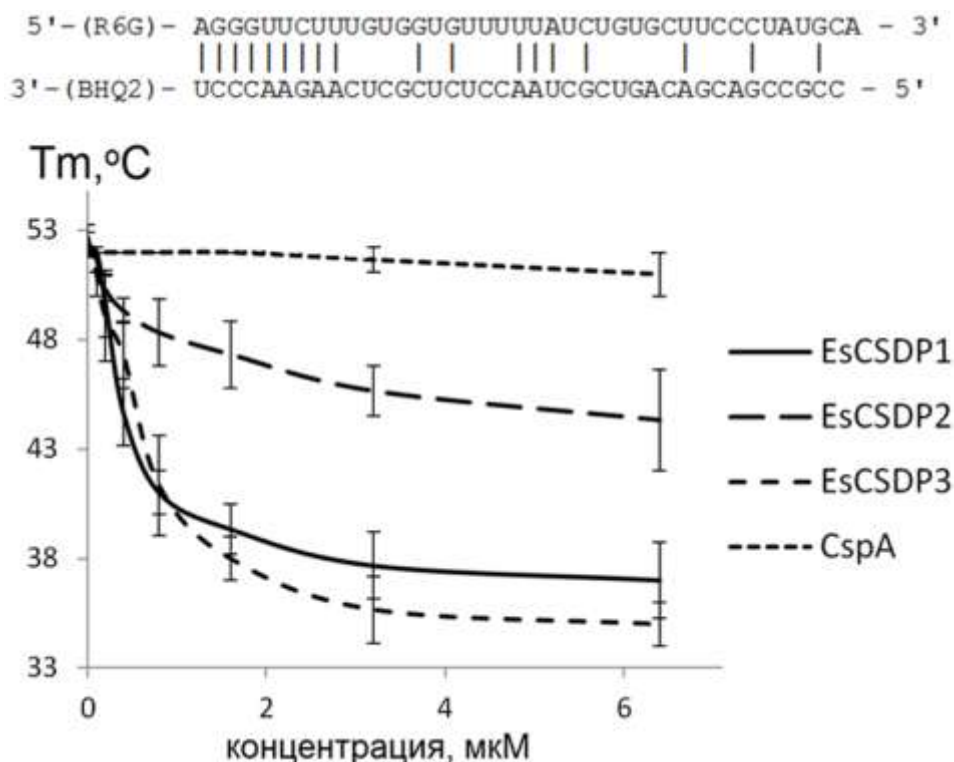


Рис. 3. Схематическое изображение молекулярного маяка BC1 и зависимость сдвига Tm этого маяка BC1 от концентраций белков EsCSDP1-3.

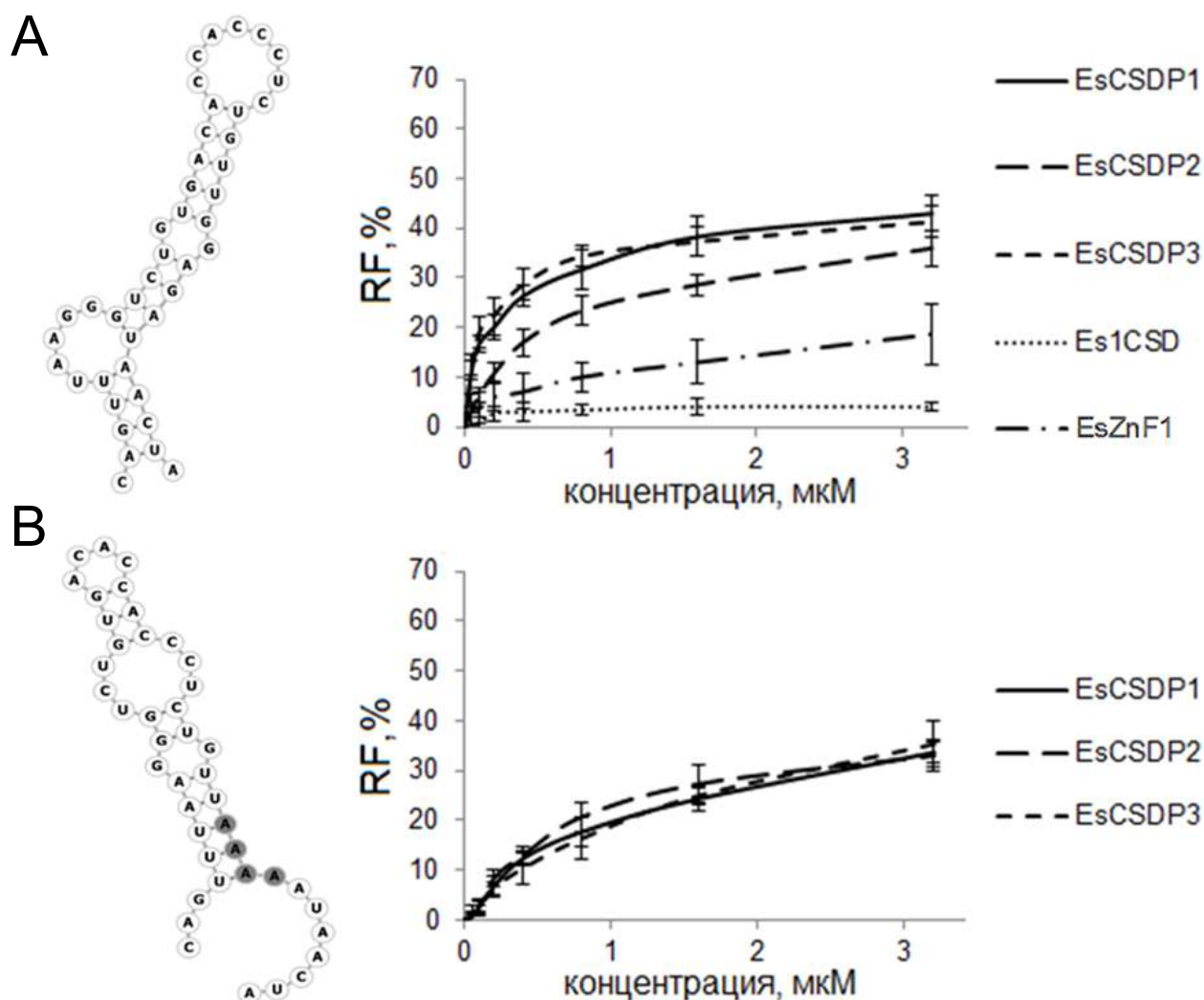


Рис. 4. **А.** Схематическое изображение молекулярного маяка let-7 и плавление этого маяка в присутствии различных концентраций белков EsCSDP1-3, EsZnF1, Es1CSD. **В.** Схематическое изображение молекулярного маяка let-7 с заменой мотива GGAG на AAAA (выделен серым цветом) и плавление этого маяка в присутствии различных концентраций белков EsCSDP1-3. RF – относительная флуоресценция.

РНК-шаперонная активность белков EsCSDP1-3 *in vitro*. Для непосредственного исследования РНК-шаперонной активности белков EsCSDP1-3 *in vitro* была разработана система, позволяющая судить об РНК-шаперонной активности белка по ускорению падения флуоресценции реакционной смеси, содержащей молекулярный маяк (Рис.5).

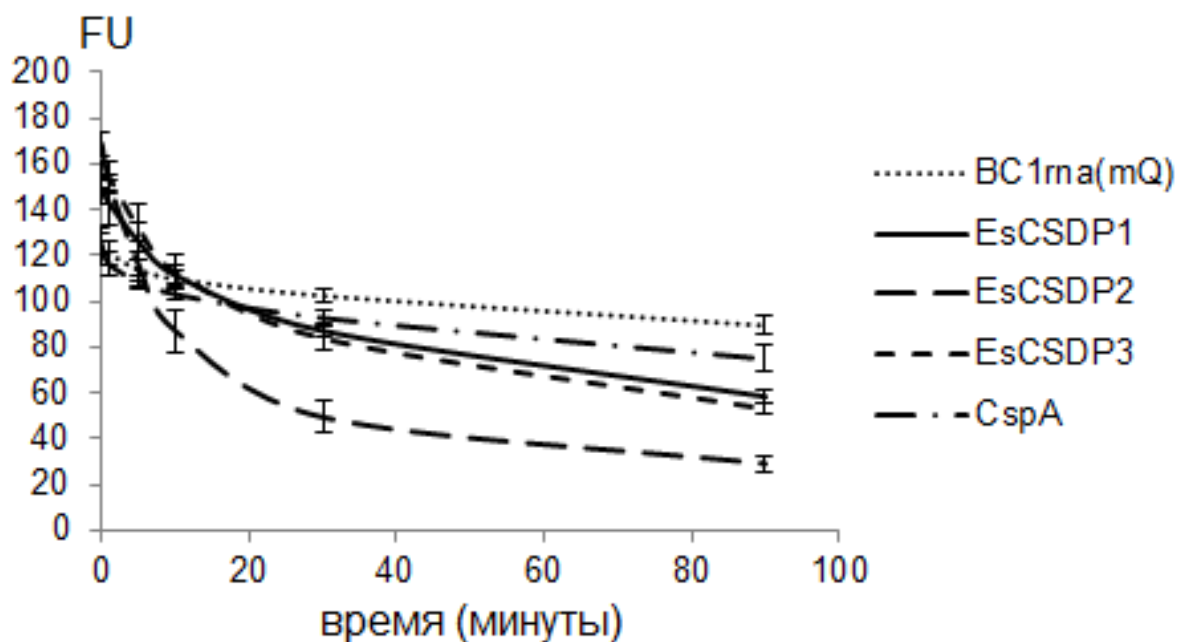


Рис. 5. Изменение во времени флуоресценции маяка BC1rna(mQ) в присутствии белков EsCSDP1-3 и CspA. FU – единицы флуоресценции.

Измерения показали, что РНК-шаперонная активность всех трех белков превышала активность бактериального белка CspA. Из трех белков EsCSDP1-3 наиболее сильную РНК-шаперонную активность продемонстрировал белок EsCSDP2 (Рис. 5). Для того чтобы установить, определяется ли более сильная РНК-шаперонная активность EsCSDP2 по сравнению с EsCSDP1 и EsCSDP3 меньшей длиной С-концевой части, использовали укороченные варианты белка EsCSDP1 с 2 или 4 ZnF в С-концевой части. Было установлено, что РНК-шаперонная активность EsCSDP1 последовательно снижается при укорачивании его С-концевой части. Таким образом, более высокая РНК-шаперонная активность EsCSDP2 по сравнению с EsCSDP1 и EsCSDP3 объясняется какими-то иными структурными особенностями этого белка. Такими особенностями могут быть наличие в С-концевой части EsCSDP2 двух RGG-повторов, взаимодействующих с нуклеиновыми кислотами, а также высокое содержание глицина, способствующее повышению гибкости белковой молекулы, которая может быть очень важна для выполнения РНК-шаперонными белками их функций.

Комплементация низкотемпературного роста штамма BX04 бактерии *E. coli* доменами холодого шока из белков EsCSDP1-3. Для оценки взаимодействия отдельных доменов холодого шока из белков EsCSDP1-3 с РНК нами применялся подход, заключающийся в исследовании способности этих белков восстанавливать способность клеток *E. coli* штамма BX04, в котором делетированы 4 собственных гена белков холодого шока ($\Delta cspA$, $\Delta cspB$, $\Delta cspE$, $\Delta cspG$), расти при пониженной температуре. Нами сравнивались три домена холодого шока EsCSD1-3 из белков EsCSDP1-3 *E. salsugineum*, а также гомологичные им домены холодого шока AtCSD1-3 из белков AtCSDP1-3 *A. thaliana*. Гены, кодирующие эти белки, были клонированы в вектор pINIII; полученными генетическими конструкциями трансформировали клетки *E. coli* штамма BX04 и далее исследовали рост трансформированных клеток при 17°C. В ходе экспериментов было выявлено, что все исследованные домены холодого шока проявили активность в тесте по комплементации роста BX04 (Рис. 6), однако единственным белком, активность которого в тесте по комплементации была сопоставима с CspA, был домен холодого шока EsCSD3.

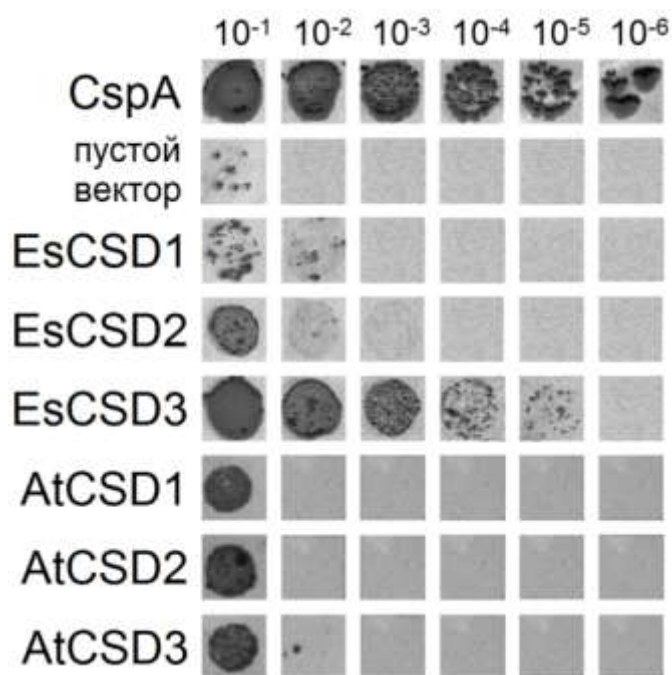


Рис. 6. Влияние доменов холодого шока белков EsCSDP1-3 и AtCSDP1-3 на рост клеток *E. coli* штамма BX04 при 17°C. Цифры в верхней части рисунка обозначают разведения бактериальной культуры.

Интересно, что несмотря на различие в активности, домены холодого шока из разных белков имеют сходную первичную структуру. Так, между EsCSD3 и EsCSD1 имеется всего 7 неконсервативных аминокислотных замен. Путем создания и исследования химерных доменов, состоящих из частей EsCSD3 и EsCSD1, было установлено, что наибольшее влияние на различие в активности этих доменов оказывали аминокислотные замены, расположенные в N-концевой части доменов до мотива RNP1 (Рис. 7).

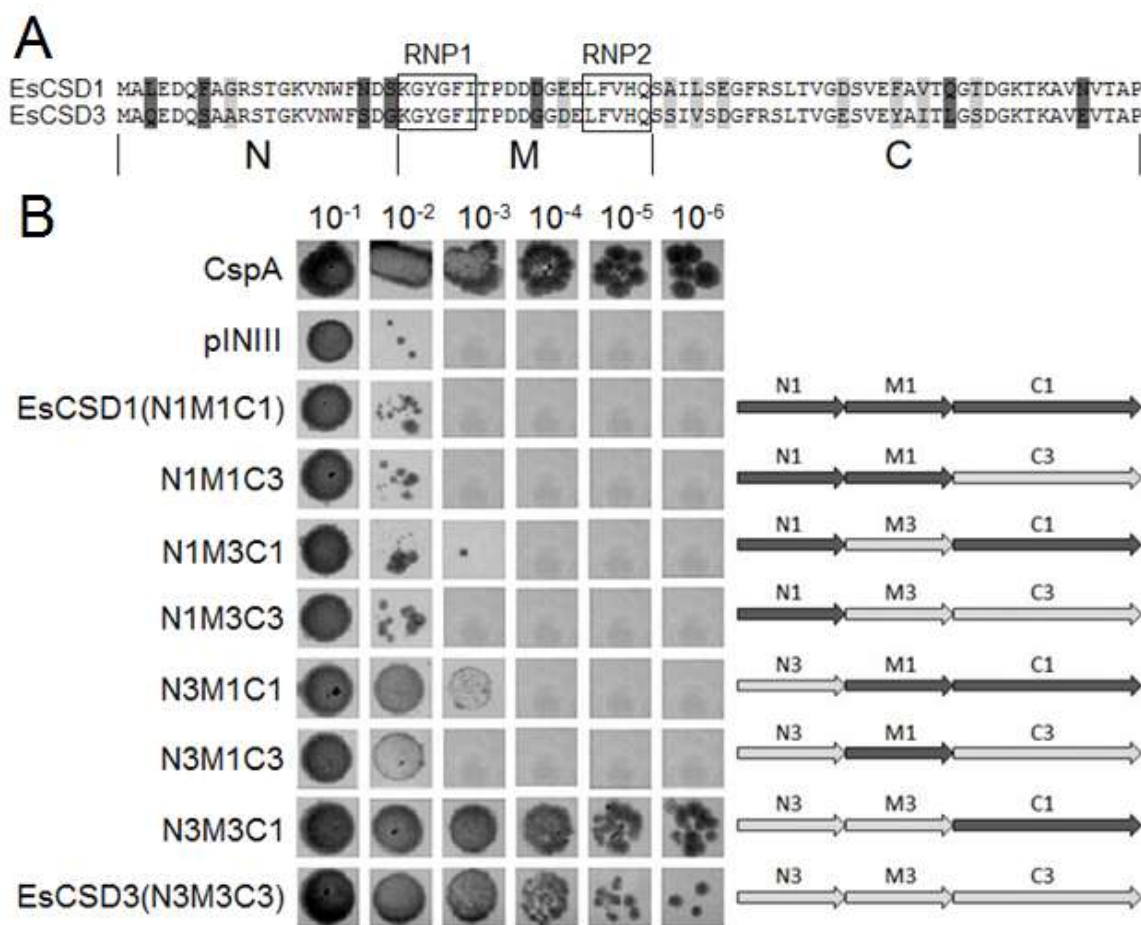


Рис. 7. **A.** Выравнивание аминокислотных последовательностей доменов холодого шока из белков EsCSDP1 и EsCSDP3. Прямоугольниками обозначены консервативные РНК-связывающие мотивы RNP1 и RNP2, светло-серым выделены консервативные аминокислотные замены, темно-серым – неконсервативные аминокислотные замены. Каждый из доменов был разделен на три части – N-концевую (N), центральную (M) и C-концевую (C), которые были перекомбинированы между собой с образованием 6 химерных доменов. **B.** Влияние химерных доменов холодого шока на рост клеток *E. coli* штамма VX04 при 17 °C.

Каким образом небольшое количество аминокислотных замен, находящихся вне консервативных мотивов RNP1 и RNP2, определяют радикальное отличие активности разных доменов в тесте по комплементации роста бактерий, к настоящему моменту не установлено. Основываясь на полученных данных, можно предположить, что эти аминокислотные замены оказывают существенное влияние на специфичность взаимодействия CSD с нуклеиновыми кислотами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований с помощью различных модельных систем было охарактеризовано взаимодействие белков с доменом холодового шока EsCSDP1, EsCSDP2, EsCSDP3 из растения-экстремофита *E. salisugineum* с нуклеиновыми кислотами. Было установлено, что белки EsCSDP1-3 проявляют ДНК-плавящую активность в широком диапазоне концентраций. Анализ экспериментальных данных, полученных при плавлении ДНК-олигонуклеотидов с различной структурой белками EsCSDP1-3, а также фрагментами этих белков, позволил создать модель плавления вторичных структур в ДНК. Согласно этой модели белок связывается с одноцепочечным участком ДНК, примыкающим к вторичной структуре с 3'-направления, и плавит вторичную структуру. При этом, связывание с одноцепочечным участком происходит преимущественно за счет домена холодового шока, в то время как плавление вторичной структуры осуществляется С-концевой частью и находится в положительной зависимости от ее длины и содержания ZnF в ней.

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 способны без затруднений попадать в клеточное ядро. 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.

Помимо взаимодействия с ДНК, нами также исследовано взаимодействие белков EsCSDP1-3 с РНК. Было установлено, что все три белка плавят вторичные структуры в РНК *in vitro*, при этом более сильной РНК-плавящей активностью обладали белки EsCSDP1 и EsCSDP3. Наличие РНК-плавящей активности является одним из основных признаков РНК-шаперонных белков. Однако, при исследовании РНК-шаперонной активности EsCSDP1-3 в системе *in vitro* было установлено, что прямая корреляция между РНК-плавящей и РНК-шаперонной функцией отсутствует, поскольку наиболее сильная РНК-шаперонная активность была обнаружена у EsCSDP2, обладающего наименьшей РНК-плавящей активностью. Вероятно, РНК-шаперонная активность EsCSDP2 обусловлена особенностями аминокислотной последовательности С-концевой части этого белка, богатой глицином и имеющей в своем составе RGG-повторы.

В большинстве исследованных геномов растений имеется несколько (до семи) генов, кодирующих белки с доменом холодового шока. Обнаруженное нами преобладание РНК-плавящей или РНК-шаперонной активности у различных белков говорит в пользу того, что CSDP растений с различной структурой вероятно выполняют в растительной клетке перекрывающиеся, но не идентичные функции. Основной функцией белков с преобладающей РНК-плавящей активностью может являться дестабилизация прочных GC-богатых вторичных структур, образующихся у многих мРНК как при обычных температурах, так особенно в условиях низкотемпературного стресса. Напротив, функционирование белков с преобладающей РНК-шаперонной активностью может иметь особенно большое значение в быстро делящихся клетках, характеризующихся повышенной потребностью в таких белках. Это подтверждается высокой экспрессией ряда CSDP растений в меристематических тканях (Chaikam et al., 2008; Nakaminami et al., 2009; Radkova et al., 2014).

Вопрос о том, способны ли белки EsCSDP1-3, как и другие подобные им белки с доменом холодого шока, к специфическому взаимодействию с нуклеиновыми кислотами в клетках растений, остается открытым. В ходе выполнения работы нами получены некоторые косвенные данные, свидетельствующие в пользу возможного специфического взаимодействия белков EsCSDP с ДНК или РНК. В частности, полученный нами результат о второстепенном значении домена холодого 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 let-7, во взаимодействии с которой белка lin-28 основная роль отводится именно домену холодого шока (Maug et al., 2012). Можно предположить, что активность доменов холодого шока из белков EsCSDP1-3 также проявляется в отношении специфических РНК- или ДНК-мишеней. О наличии предпочтений при взаимодействии с нуклеиновыми кислотами растительных CSDP может говорить также и обнаруженное нами различие в активности доменов холодого шока в тесте по комплементации роста *E.coli* штамма BX04. Очевидно, что для поиска специфических мишеней белков с доменом холодого шока растений, если таковые имеются, потребуются новые подходы с использованием высокопроизводительного секвенирования.

Обнаруженные нами ДНК- и РНК-плавящие 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). Такое действие бактериальных белков холодого шока обуславливается, по всей видимости, способностью дестабилизировать вторичные структуры, которые могут препятствовать 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 плавящая 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 *Eutrema 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 *Eutrema salsugineum* плавить нуклеиновые кислоты может быть использована при постановке различных молекулярно-биологических реакций *in vitro* с целью повышения их эффективности.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Zlobin, N.E. High DNA melting activity of extremophyte *Eutrema salsugineum* cold shock domain proteins EsCSDP1 and EsCSDP3. / N.E. Zlobin, K.I. Evlakov, Y.I. Alekseev, K.A. Blagodatskikh, A.V. Babakov, V.V. Taranov // *Biochem. Biophys. Rep.* – 2016. – Т. 5. – С. 502-508. – DOI: 10.1016/j.bbrep.2016.02.004.
2. Zlobin, N.E. RNA melting and RNA chaperone activities of plant cold shock domain proteins are not correlated. / N.E. Zlobin, K.I. Evlakov, O.V. Tikhonova, A.V. Babakov, V.V. Taranov // *RNA Biol.* – 2018. – №. 8(15). – С. 1040-1046. DOI: 10.1080/15476286.2018.1506681.
3. Taranov, V.V. Contribution of *Eutrema salsugineum* Cold Shock Domain Structure to the Interaction with RNA. / V.V. Taranov, N.E. Zlobin, K. I. Evlakov, A.O. Shamustakimova, A. V. Babakov // *Biochemistry (Mosc).* – 2018. – №11(83). – С. 1688 – 1699. DOI: 10.1134/S000629791811007X.
4. Злобин, Н.Е. РНК-шаперонная активность белков с доменом холодового шока из растений *Eutrema salsugineum*. / Н.Е. Злобин, В.В. Таранов, К.И. Евлаков // 20-ая Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых "БИОЛОГИЯ — НАУКА XXI ВЕКА". – г. Пушино. – 2016. – С. 121.
5. Злобин, Н.Е. ДНК-плавящая активность белков с доменом холодового шока EsCSDP1 и EsCSDP3 из растения-экстремофита *Eutrema salsugineum*. / Н. Е. Злобин, К.И. Евлаков, А.В. Бабаков // Научная конференция "Фундаментальные и прикладные проблемы современной экспериментальной биологии растений. – г. Москва. – 2015. – С. 265-269.
6. Злобин Н. Е. ДНК-плавящая активность белков с доменом холодового шока EsCSDP1 и EsCSDP3 из растения-экстремофита *Eutrema salsugineum*. / Н.Е. Злобин // Научная конференция молодых ученых "Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии". – г. Москва. – 2015. – С. 46-47.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую признательность научному руководителю Бабакову А.В., а также сотрудникам ФГБНУ ВНИИСБ и компании ООО «СИНТОЛ» Таранову В.В., Алексееву Я.И. и Евлакову К.И. за помощь в проведении исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (проект №14.579.21.0012 от 05 июня 2014 г., ID RFMEFI57914X0012) с использованием дорогостоящего научного оборудования ЦКП «Биотехнология» ФГБНУ ВНИИСБ.