

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 холодового 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 холодового шока в N-концевой части и несколько мотивов «цинковые пальцы» в C-концевой части (рис. 1).

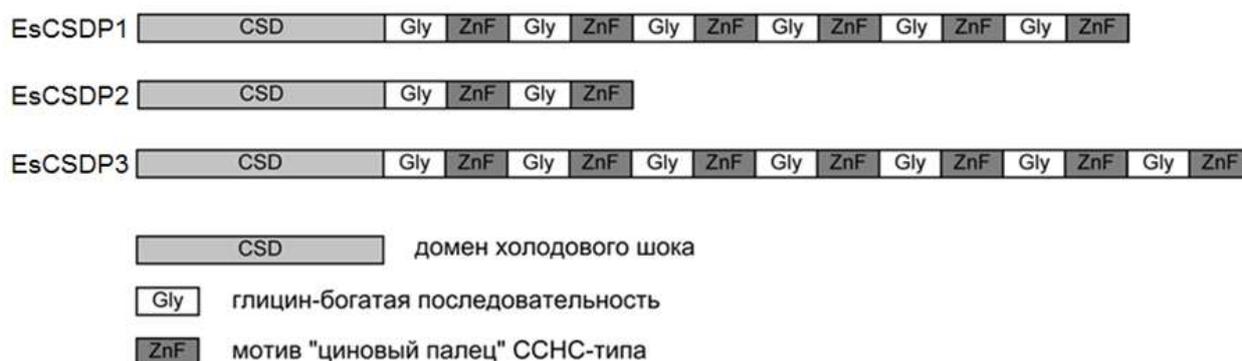


Рис. 1. Схематическое изображение доменной структуры белков EsCSDP1, EsCSDP2, EsCSDP3 *E. salsugineum*.

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 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.

**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).

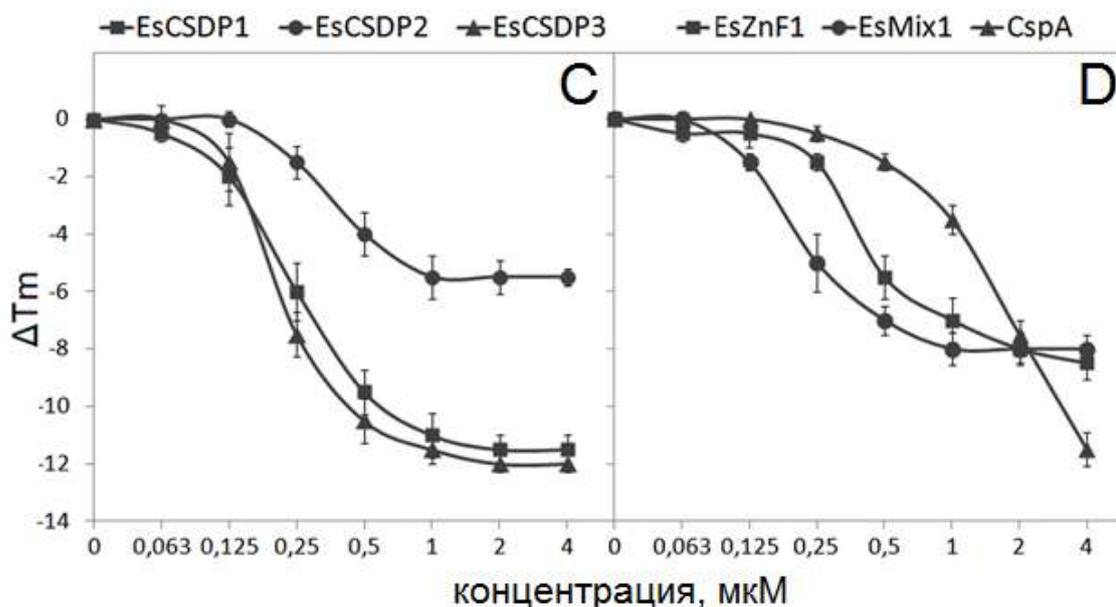
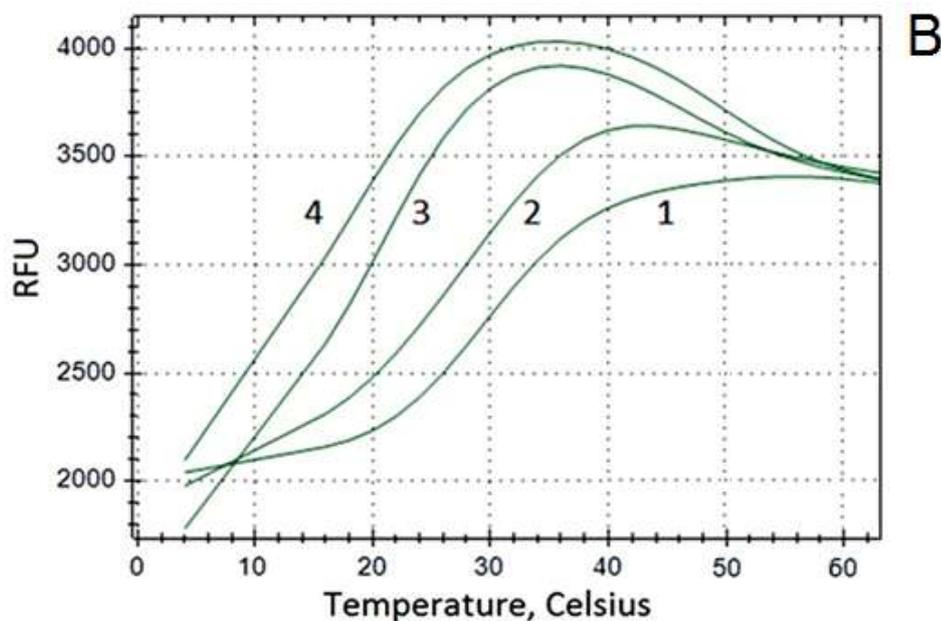


Рис. 2. **А.** Схематическое изображение молекулярного маяка BC1. **В.** Смещение кривой зависимости флуоресценции молекулярного маяка BC1 от температуры в присутствии различных концентраций белка EsCSDP1 (кривая 1 – 0 мкМ, кривая 2 – 0,25 мкМ, кривая 3 – 1 мкМ, кривая 4 – 4 мкМ); RFU – относительный 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  $\Delta T_m$  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.

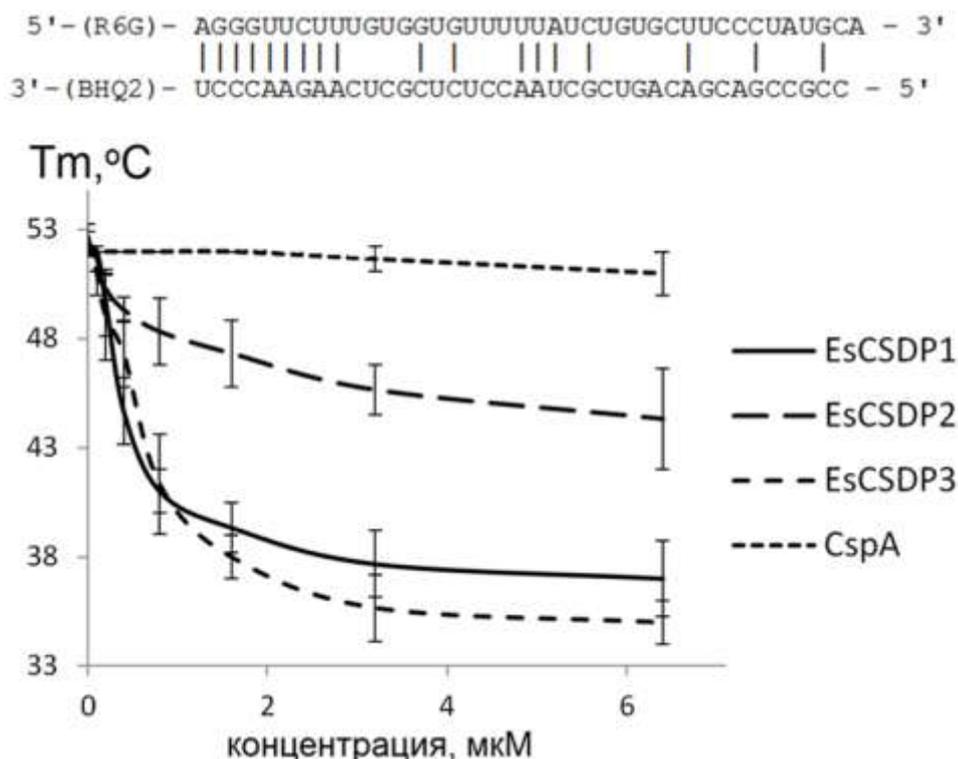


Рис. 3. Схематическое изображение молекулярного маяка BC1 и зависимость сдвига Tm этого маяка BC1 от концентраций белков EsCSDP1-3.

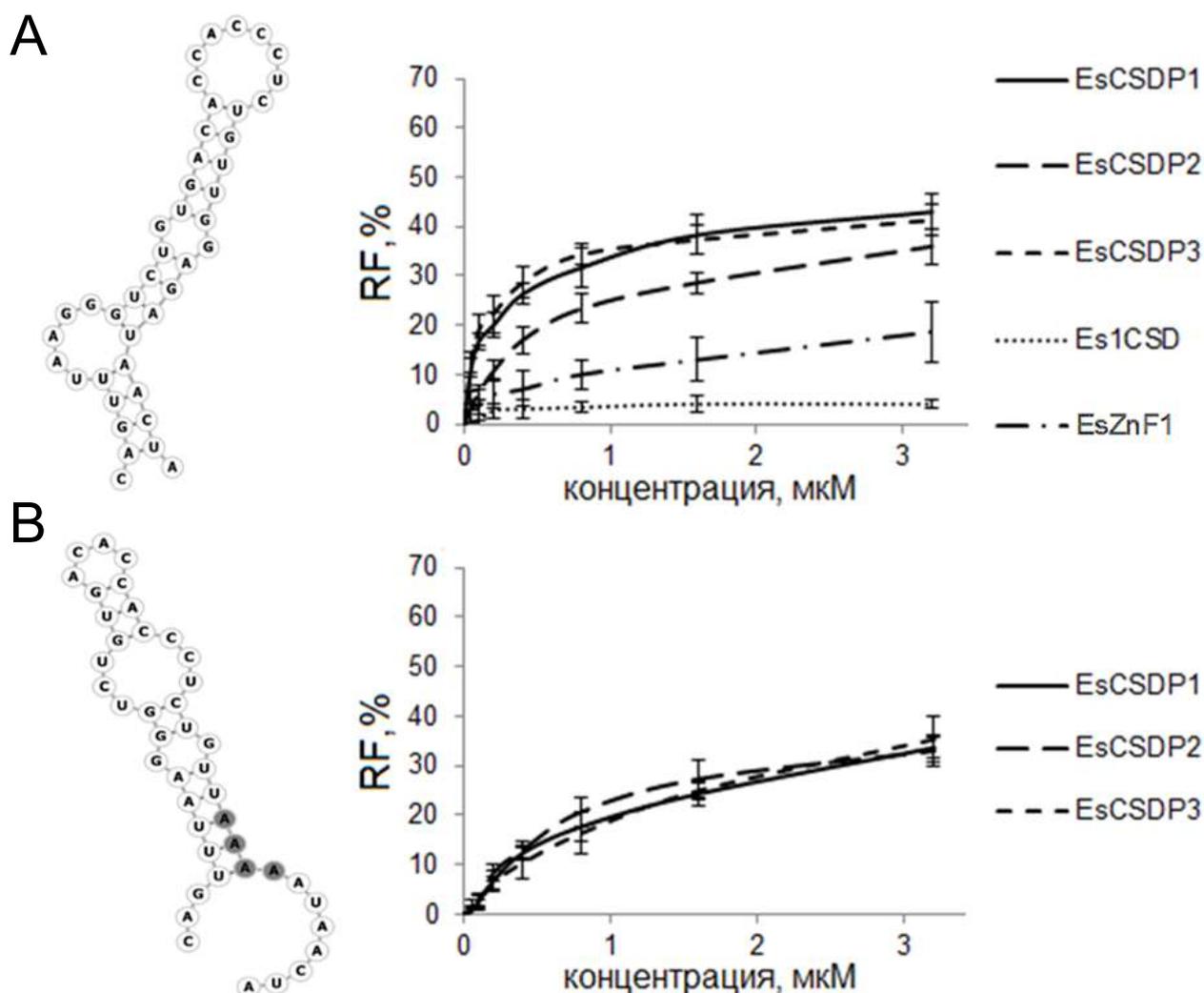


Рис. 4. **А.** Схематическое изображение молекулярного маяка let-7 и плавление этого маяка в присутствии различных концентраций белков EsCSDP1-3, EsZnF1, Es1CSD. **В.** Схематическое изображение молекулярного маяка let-7 с заменой мотива GGAG на AAAA (выделен серым цветом) и плавление этого маяка в присутствии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

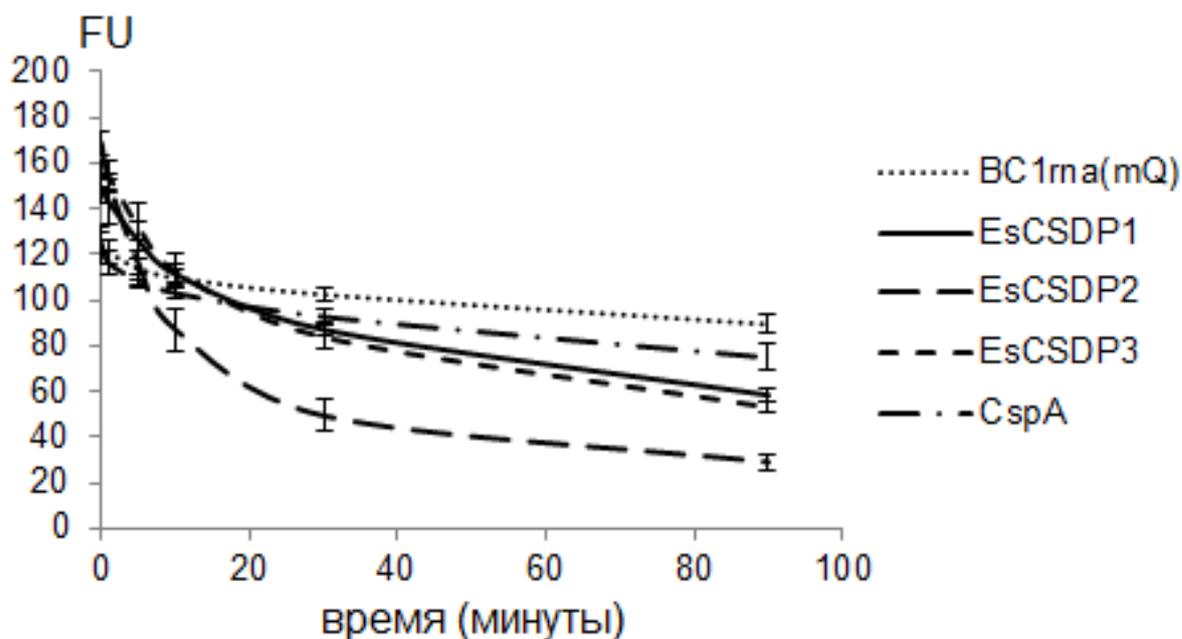


Рис. 5. Изменение во времени флуоресценции маяка BC1rna(mQ) в присутствии белков EsCSDP1-3 и CspA. FU – единицы флуоресценции.

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.

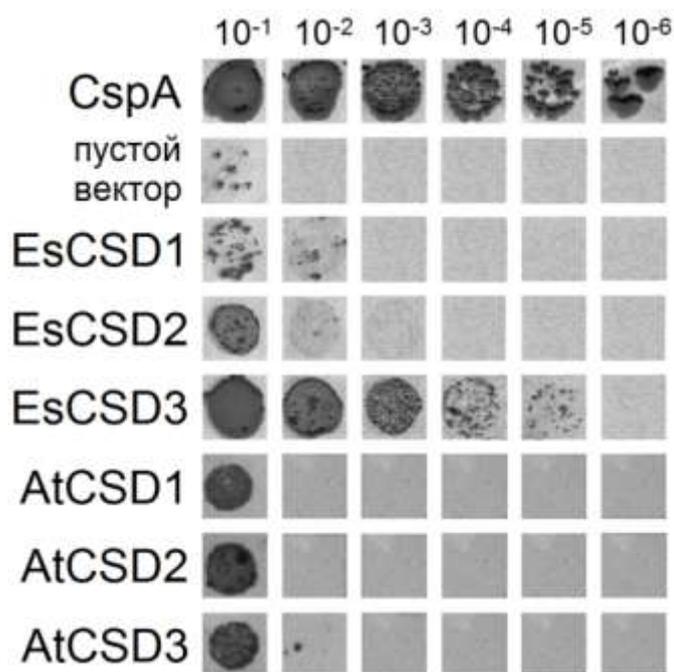


Рис. 6. Влияние доменов холодого шока белков EsCSDP1-3 и AtCSDP1-3 на рост клеток *E. coli* штамма BX04 при 17°C. Цифры в верхней части рисунка обозначают разведения бактериальной культуры.

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).

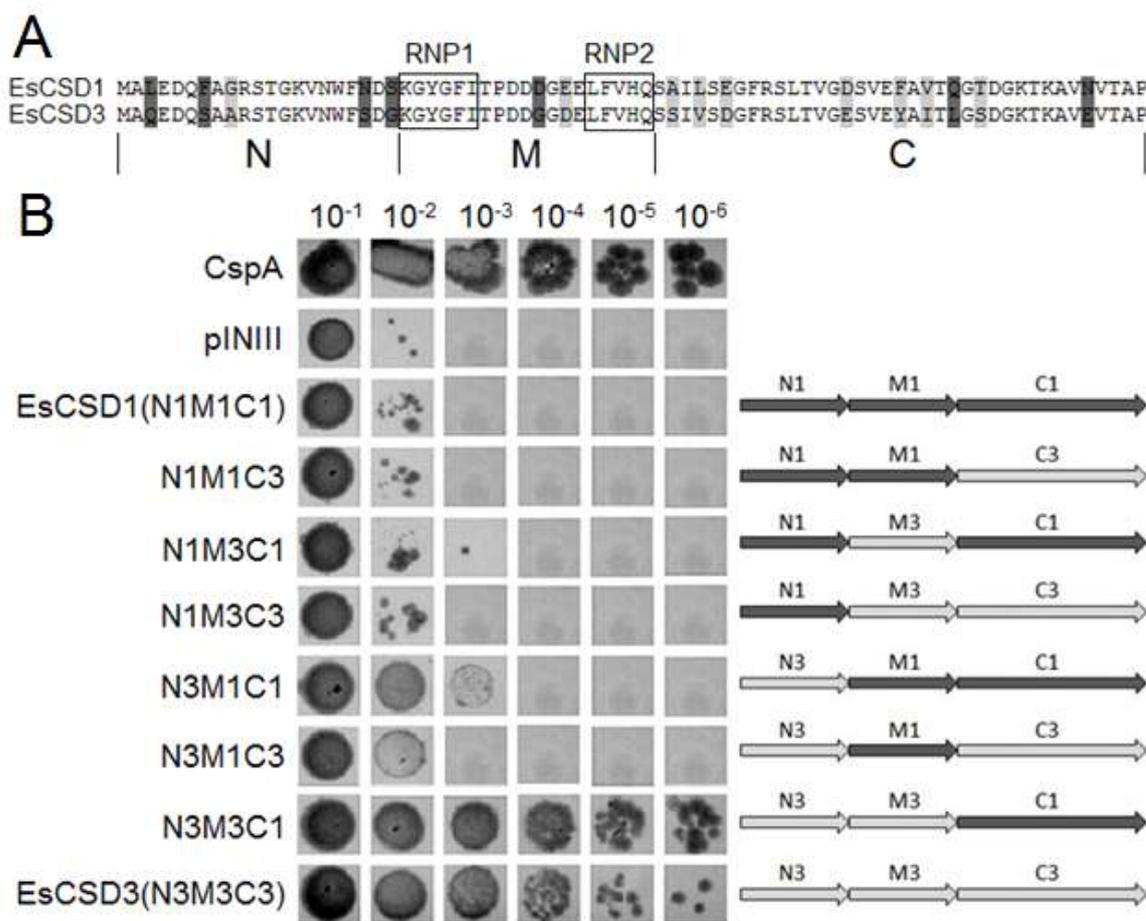


Рис. 7. **A.** Выравнивание аминокислотных последовательностей доменов холодого шока из белков EsCSDP1 и EsCSDP3. Прямоугольниками обозначены консервативные РНК-связывающие мотивы RNP1 и RNP2, светло-серым выделены консервативные аминокислотные замены, темно-серым – неконсервативные аминокислотные замены. 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.