

ПОИСК ОСНОВ СПЕЦИФИЧНОСТИ ОЛИГОМЕРИЗАЦИИ SM-ПОДОБНЫХ БЕЛКОВ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНИЗМОВ

Колесник В.В.¹, Леконцева Н.В.², Михайлина А.О.², Балобанов В.А.²

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

ул. Ленинские горы, д. 1, г. Москва, 119991, РФ

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт белка РАН

ул. Институтская, 4, г. Пуццоно, 142290, РФ; e-mail: uralm62@rambler.ru

Поступила в редакцию: 01.07.2018

Аннотация. Семейство термостабильных Sm-подобных олигомерных белков является чрезвычайно привлекательным объектом для белковой инженерии. Ранее нами была показана возможность их использования как носителя для снижения агрегационной способности и повышения термостабильности амилоидогенных пептидов. Для дальнейшей работы нам необходимо найти структурные основы стабильности и специфичности олигомеризации этих белков. Для поиска основ специфичности мы предложили новый подход. Первый шаг состоит в поиске среди разнообразных Sm-подобных белков таких пар, которые могут образовывать гетероолигомеры. В данной работе описан подход, разработанный нами для достижения этой цели. Полученный экспериментальный результат позволит нам перейти ко второму шагу – теоретическому анализу структур белков и выявлению структурных особенностей, определяющих межсубъединичное взаимодействие в олигомере.

Ключевые слова: белковая инженерия, Sm-подобные белки, сворачивание белков, олигомеризация, специфичность взаимодействия.

ВВЕДЕНИЕ

Объектом нашего исследования являются белки, принадлежащие к семейству Sm-подобных (или Lsm) белков. Белки этого семейства являются мультифункциональными регуляторами трансляции, процессинга и деградации РНК, что, впрочем, не имеет значения в данной работе. [1]. Для нас более важно то, что многие Lsm белки являются термостабильными, а это делает их перспективными объектами для белковой инженерии.

Для белков данного семейства характерно сходство первичной и третичной структур, но четвертичная структура белков из различных доменов жизни отличается разным количеством мономеров. Для бактериальных белков характерны пространственные структуры гомогексамерного типа, для архейных белков – гомогептамерного типа [2, 3] (рис. 1). Сравнение аминокислотных последовательностей бактериальных Lsm белков показало наличие консервативного центрального участка, который состоит из 80 аминокислотных остатков [4].

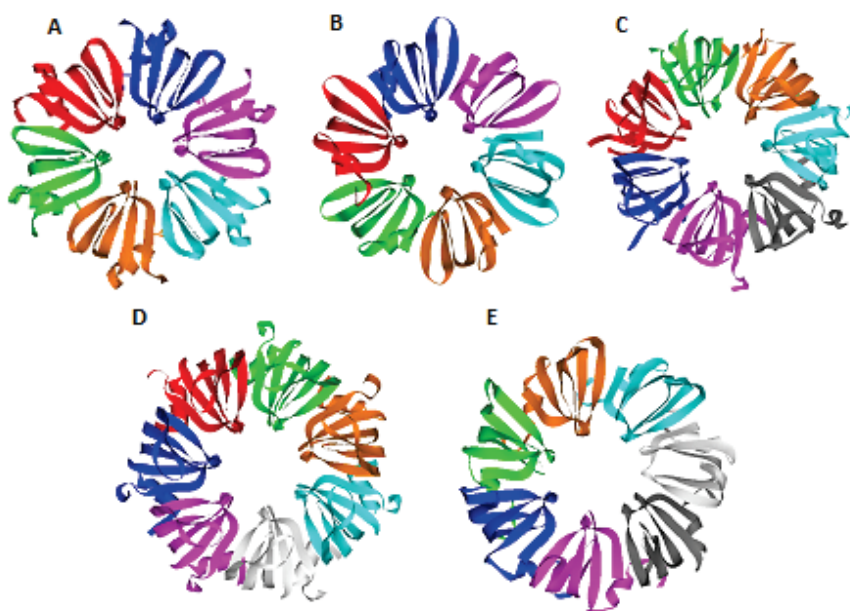


Рисунок 1. Пространственные структуры Sm-белков и Sm-подобных белков различной степени олигомеризации. А – гексамер белка Hfq *Pseudomonas aeruginosa* (PDB 1U1S), В – гексамер белка Mja SmAP *Methanococcus jannaschii* (PDB 4X9C), С – гептамер белка Sso SmAP *Sulfolobus solfataricus* (PDB 4XQ3), D – гептамер белка Sac SmAP *Sulfolobus acidocaldarius* (PDB 5MKL), E – гептамер белка Mva SmAP из *Methanococcus Vanniellii* (PDB 5MKN)

Общей структурной особенностью всех Lsm белков является наличие структурного Sm-фолда, который состоит из двух консервативных элементов - Sm1- и Sm2-мотивов, связанных между собой петлей различной длины. Первый мотив включает в себя β 1-, β 2-, β 3-тяжи, а второй – β 5- и β 4-тяжи [5]. С N-конца Sm1 мотива располагается α -спираль [6]. Четвертичная структура всех Sm-подобных белков представляет собой тороид. В образовании кольца участвуют β 4- и β 5-тяжи Sm2 мотива, которые взаимодействуют с O и N атомами главной цепи с образованием трех водородных связей между мономерами. Это взаимодействие дополнительно стабилизировано контактами между консервативными аминокислотными остатками [7, 8].

Несмотря на значительные усилия в изучении процесса самоорганизации Lsm белков пока не были выявлены ключевые особенности, определяющие их высокую стабильность. Несомненно, не последнюю роль в стабилизации структуры играют межсубъединичные контакты. Анализ первичных и известных пространственных структур Sm-подобных белков показал, что пять консервативных аминокислотных остатков - Gln8, Asn28, Asp40, Tyr55 и His57 (нумерация соответствует белку Hfq из *E.coli*) - образуют недоступные растворителю водородные связи между соседними мономерами. Остаток Asp40 инвариантен во всех Lsm белках, а остатки Gln8, Asn28, Tyr55 и His57 инвариантны в олигомерах гексамерного типа, но отличаются от соответствующих аминокислотных остатков в белках, образующих гептамеры.

В группе структурных исследований рибосомных белков Института белка РАН было изучено влияние замен консервативных аминокислотных остатков Gln8, Asn28, Asp40, Tyr55 и His57 на четвертичную структуру олигомера и его термостабильность. Полученные данные показали, что ни одна из произведенных замен не влияет на четвертичную структуру белка, но уменьшают его термостабильность. Наиболее сильный дестабилизирующий эффект произвели замены His57Ala и Tyr55Ala, как предполагается за счет увеличения экспонированности гидрофобных участков белка и открытия доступа молекулам растворителя к ранее закрытым водородным связям [9, 10].

Нами был предложен новый подход для определения структурных элементов, определяющих специфичность олигомеризации Lsm белков. В нашем распоряжении имеется коллекция бактериальных и архейных Lsm белков. На первом этапе мы определим возможность образовывать ими гетероолигомеры при совместной ренатурации (чему и посвящена данная работа). Далее анализ структур пар белков, которые взаимодействуют или не взаимодействуют, позволит выявить ключевые элементы структуры, определяющие стабильность взаимодействия между субъединицами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и очистка белков с 6xHis. Целевые белки были наработаны в клетках *E.coli* штамма BL21(DE3). Для выделения и очистки белка клетки ресуспендировали на льду в буфере, содержащем 20 мМ Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 pH 8,0, 0,1 % Triton-X-100, 10мМ имидазол, 1 М NaCl, 1мМ ДТТ, 1мМ ПМСФ. Клетки разрушались ультразвуковым дезинтегратором. Клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 30000 об/мин в течение 30 минут. Супернатант прогревали при 82 °С в течение 20 минут. Денатурированные белки осаждали центрифугированием при 30000 об/мин в течение 30 минут.

Очистку белка производили на колонке для металл-хелатной хроматографии Ni-NTA агароза, уравновешенной стартовым буфером содержащим: 20мМ Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 pH 8,0, 300 мМ NaCl. Элюцию белка проводили буфером, содержащим 20 мМ Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 pH 8,0, 300 мМ NaCl, 500мМ имидазол. Фракции анализировали методом гель-электрофореза в ПААГ в присутствии ДСН.

Выделение и очистка белков, не имеющих 6xHis. Целевые белки были наработаны в клетках *E.coli* штамма BL21(DE3). Клетки ресуспендировали на льду в буфере для разрушения, содержащем 50мМ Tris-HCl pH 8,0, 250 мМ MgCl_2 , 1 М NaCl, 5мМ ЭДТА. Клетки разрушались ультразвуковым дезинтегратором. Клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 30000 об/мин в течение 30 минут. Супернатант прогревали при 82 °С в течение 20 минут. Денатурированные белки осаждали центрифугированием при 30000 об/мин в течение 30 минут.

После прогрева в полученный супернатант добавляли сухой сульфат аммония до концентрации 1,5 М. Выделение и очистку белка производили на колонке для хроматографии гидрофобных взаимодействий с носителем Butyl-Sepharose, уравновешенной стартовым буфером содержащим: 50мМ Tris-HCl pH 8,0, 1,5 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 М NaCl. Элюцию белка проводили градиентом 1,5 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 М NaCl до 200 мМ NaCl в буфере 50 мМ Tris-HCl pH 8,0. Фракции анализировали методом гель-электрофореза в ПААГ в присутствии ДСН. Белок диализовали в буфере, содержащем 200 мМ NaCl и 50 мМ Tris-HCl pH 8,0.

Анализ взаимодействия белков. Отбирали аликвоты, содержащие по 0,5 мг белков с 6xHis и без 6xHis, смешивали, добавляли гуанидин гидрохлорид до 6М и инкубировали 15 минут. Полученную смесь белков разбавляли буфером 20мМ Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 pH 8,0, 300мМ NaCl в 6 раз и наносили на колонку для металл-хелатной хроматографии с сорбентом Ni-NTA агароза, предварительно уравновешенную стартовым буфером. Элюцию белковой фракции осуществляли буфером, содержащим 20мМ Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 pH 8,0, 300 мМ NaCl, 500 мМ имидазол. Собранные фракции анализировали методом гель-электрофореза в ПААГ в присутствии ДСН.

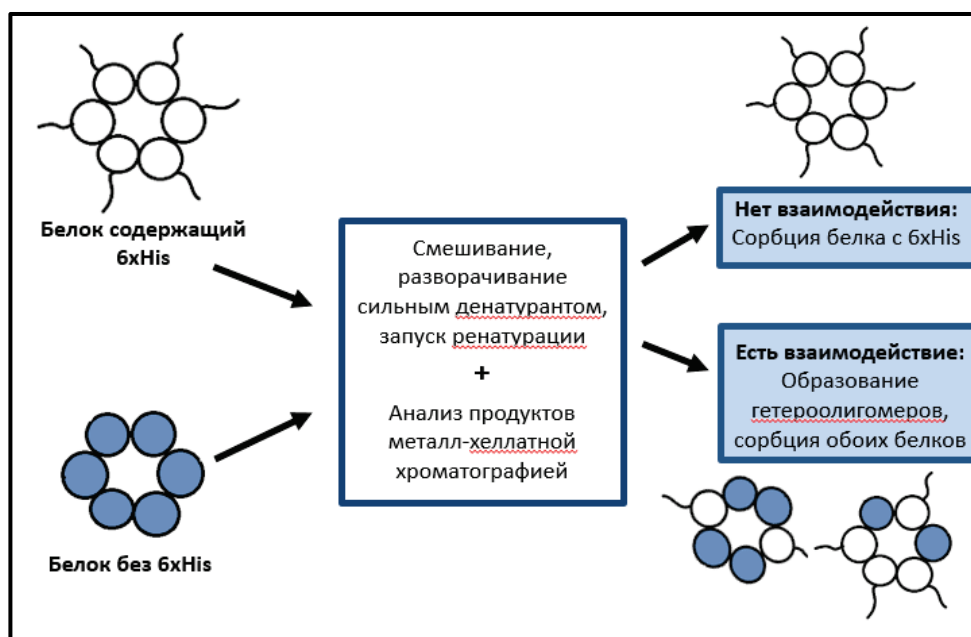


Рисунок 2. Схема метода анализа взаимодействия Lsm белков.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Планирование эксперимента. Для анализа взаимодействия белков нами был разработан метод, который позволяет оценить возможность взаимодействия бактериальных и архейных Lsm белков. Схема эксперимента представлена на рисунке 2. Суть метода заключается в том, что один из исследуемой пары белков имеет в своей последовательности 6xHis, а другой нет. Исследуемая пара белков смешивалась и производилось разрушение их третичной и четвертичной структуры сильным денатурантом. Затем при разбавлении образцов, концентрация денатуранта уменьшалась, что инициировало процесс ренатурации. Продукты ренатурации анализируются с помощью металл-хелатной хроматографии. Проводя совместную ренатурацию пары белков, один из которых имеет 6xHis, мы предполагаем, что если мономеры этих белков способны взаимодействовать друг с другом, то они образуют гетероолигомер, который специфически свяжется с носителем на колонке металл-хелатной хроматографии теми субъединицами, которые имеют 6xHis. О успешном взаимодействии можно судить если в результате на электрофореграмме мы увидим две полосы, соответствующие молекулярным весам обоих исследуемых белков.

При анализе планируемого эксперимента мы выявили критические моменты, которые, как мы предполагаем, в ходе эксперимента могут привести к ошибкам и артефактам. Например, если Lsm белок, не имеющий в своей последовательности 6xHis, будет неспецифично взаимодействовать с носителем металл-хелатной хроматографии. Поэтому прежде чем мы приступили к основному эксперименту, мы провели отрицательный контроль. Был взят белок Pae Hfq не содержащий 6xHis, образец наносили в присутствии 50мМ имидазола. В полученных после хроматографии фракциях искомым белок не наблюдался. Таким образом нами были выбраны условия исключающие появления ложноположительного результата.

Также, мы провели положительный контроль, была взята пара белков Mva SmAP-6xHis и Mva SmAP. Для них была проведена процедура, описанная выше. На колонку образец наносили в присутствии 50мМ имидазола. На электрофореграмме можно наблюдать две фракции, соответствующие обоим вариантам белка (рис. 3(4)). Так мы показали, что мономеры белка после денатурации взаимодействуют и способны к олигомеризации, а также что 6xHis и линкер, привязывающий его к белку, не препятствуют процессу ренатурации.

Результаты исследования взаимодействия различных Lsm белков. В качестве белков, содержащих 6xHis были взяты следующие белки: Sac SmAP из *Sulfolobus acidocaldarius*, Sso SmAP из *Sulfolobus solfataricus*, Mva SmAP из *Methanococcus Vannielii*. Также были выделены и очищены белки, не имеющие 6xHis: Pae Hfq из *Pseudomonas aeruginosa*, Mja SmAP из *Methanococcus jannaschii*, Mva SmAP из *Methanococcus Vannielii*.

Для пар этих белков в соответствии с нашей методикой была проведена денатурация и совместная ренатурация. Анализ продуктов ренатурации при помощи металл-хелатной хроматографии и геле-электрофореза в ПААГ в присутствии ДСН показал, какие из пар Lsm белков способны взаимодействовать (рис. 3).

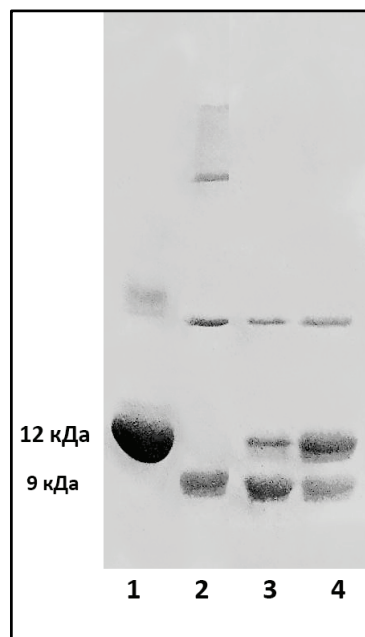


Рисунок 3. Электрофореграмма (15 % ПААГ в присутствии ДСН) исследуемой пары белков. 1 – очищенный препарат Sac SmAP-6xHis, 2 – очищенный препарат Paе Hfq, 3,4 – фракции Sac SmAP-6xHis и Paе Hfq

На основании полученных результатов мы сделали вывод, что белок Paе Hfq взаимодействует с Sac SmAP. На электрофореграмме видно, что полученная фракция содержит как белок с 6xHis, так и без него (рис. 3(3, 4)). На основании такого результата был сделан вывод, что эта пара белков способна к образованию гетероолигомера.

Остальные пары исследуемых белков как видно по результатам, представленным на рисунке 4, слабо взаимодействуют или же не взаимодействуют вовсе. Полученные результаты исследования взаимодействия Lsm белков сведены в таблице 1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в данной работе, с помощью предложенного нами метода мы показали возможность образовывать бактериальными и архейными Lsm белками смешанные гетероолигомеры. Для дальнейшего исследования на основе экспериментальных данных будут отобраны Lsm белки для выявления структурных элементов, отвечающих за стабильность и специфичность олигомеризации.

Работа поддержана грантом РФФ 14-24-00157.

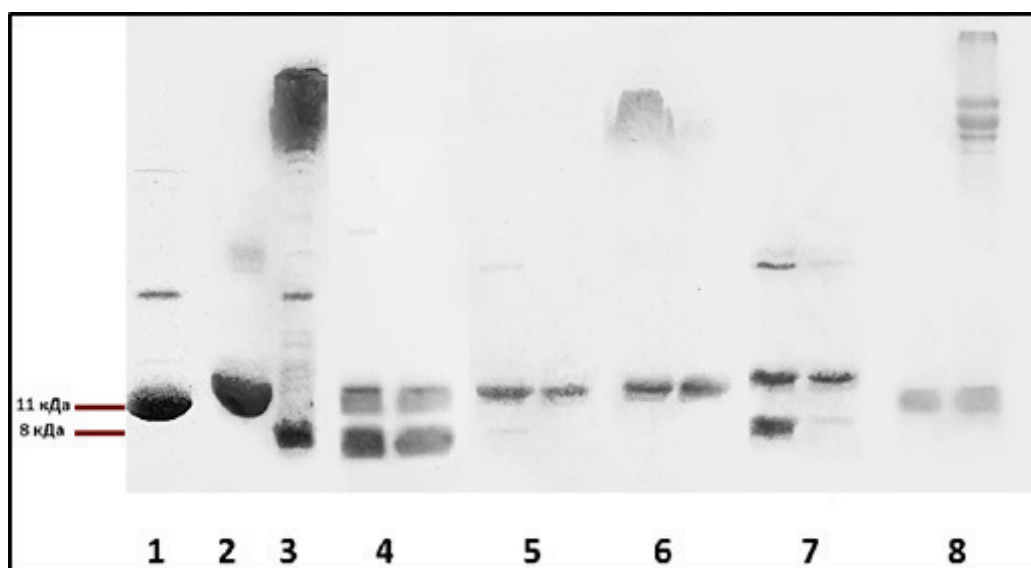


Рисунок 4. Электрофореграмма (15 % ПААГ в присутствии ДСН) исследуемых пар белков. 1 – очищенный препарат Sac SmAP-6xHis, 2 – очищенный препарат Mva SmAP-6xHis, 3 – очищенный препарат Mja SmAP, 4 – контроль Mva SmAP-6xHis и Mva SmAP, 5 – Sso SmAP-6xHis и Mja SmAP, 6 – Sac SmAP-6xHis и Mja SmAP, 7 – Sso SmAP-6xHis и Paе Hfq, 8 – Mva SmAP-6xHis и Mja SmAP

Таблица 1. Образование/необразование гетероолигомеров исследуемыми парами Lsm белков

Белок	Sso-His-6xHis	Sac-His-6xHis	Mva-His-6xHis
Мја 49 кДа	-	-	-
Мва 67кДа			+
Рае 54 кДа	+	+	-

Список литературы / References:

1. Achsel T., Brahm H., Kastner B., Bachi A., Wilm M., Lührmann R. A doughnut-shaped heteromer of human Sm-like proteins binds to the 3' end of U6 snRNA, thereby facilitating U4/U6 duplex formation in vitro. *EMBO J.*, 1999, vol. 18, pp. 5789-5802.
2. Мурина В.Н., Никулин А.Д. РНК-связывающие Sm-подобные белки бактерий и архей: сходство и различия структур и функций. *Успехи биологической химии*, 2011, т. 51, с. 133-164. [Murina V.N., Nikulin A.D. RNA-binding bacterial and archaeal Sm-like proteins, common and differs of structure and functions. *Bio. Chem. Succ.*, 2011, vol. 51, pp. 133-164. (In Russ.)]
3. Toro I., Basquin J., Teo-Dreher H., Suck D. Archaeal Sm proteins form heptameric and hexameric complexes: crystal structures of the Sm1 and Sm2 proteins from the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*. *J. Mol. Biol.*, 2002, vol. 320, pp. 129-42.
4. Zhang A., Wassarman K.M., Ortega J., Steven A.C., Storz G. The Sm-like Hfq protein increases OxyS RNA interaction with target mRNAs. *Molecular cell.*, 2002, vol. 9, pp. 11-22.
5. Seraphin B. Sm and Sm-like proteins belong to a large family: identification of proteins of the U6 as well as the U1, U2, U4 and U5 snRNPs. *EMBO J.*, 1995, vol. 14, pp. 2089-2098.
6. Link T.M., Valentin-Hansen P., Brennan R.G. Structure of *Escherichia coli* Hfq bound to polyribadenylate RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2009, vol. 106, pp. 19292-19297.
7. Nikulin A., Stolboushkina E., Perederina A., Vassilieva I., Blaesi U., Moll I., Kachalova G., Yokoyama S., Vassilyev D., Garber M., Nikonov S. Structure of *Pseudomonas aeruginosa* Hfq protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*, 2005, vol. 61, pp. 141-146.
8. Brennan R.G., Link T.M. Hfq structure, function and ligand binding. *Curr Opin Microbiol.*, 2007, vol. 10, pp. 125-133.
9. Мурина В.Н., Мельник Б.С., Филимонов В.В., Улайн М., Вейсс М.С., Мюллер У., Никулин А.Д. Влияние замен консервативных аминокислотных остатков на структуру и стабильность белка Hfq. *Биохимия*, 2014, т. 79, вып. 5, с. 595-604. [Murina V.N., Melnik B.S., Filimonov V.V., Ulane M., Vase M.S., Muller U., Nikulin A.D. Influence of conservative aminoacids changes on the structure and stability of Hfq protein. *Biochemistry*, 2014, vol. 79, iss. 5, pp.595-604. (In Russ.)]
10. Moskaleva O., Melnik B., Gabdulkhakov A., Garber M., Nikonov S., Stolboushkina E., Nikulin A. The structures of mutant forms of Hfq from *Pseudomonas aeruginosa* reveal the importance of the conserved His57 for the protein hexamer organization. *Structural Biology and Crystallization Communication*, 2010, vol. 66, pp. 760-764.

SEARCH FOR STRUCTURAL BASICS OF THE OLIGOMERIZATION SPECIFICITY OF LSM PROTEINS FROM VARIOUS ORGANISMS.Kolesnik V.V.¹, Leontceva N.V.², Mikhailina A.O.², Balobanov V.A.²¹Moscow State University

Leninskie gory str., 1, Moscow, 119991, Russia

²Institute of protein research RAS

Institutskaya str., 4, Pushchino, 142290, Russia; e-mail: uralm62@rambler.ru

Abstract. A family of thermal stable Sm-like oligomeric proteins is an extremely attractive object for protein engineering. Earlier, we demonstrated the possibility of using them as a carrier for reducing the aggregation ability and increasing the thermal stability of amyloidogenic peptides. For further work, we need to find the structural basis for the stability and specificity of oligomerization of these proteins. To find the basis for specificity, we proposed a new approach. The first step is to find such pairs of Sm-like proteins that can form hetero-oligomers. In this paper, we describe the approach we have developed to achieve this goal. The obtained experimental result will allow us to proceed to the second step - the theoretical analysis of protein structures and the identification of structural features that determine the intersubunit interaction in the oligomer.

Key words: protein engineering, Sm-like proteins, protein folding, oligomerization, interaction specificity.