

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РНК-ШАПЕРОНА PROQ ИЗ *ESCHERICHIA COLI* И ЕГО ДОМЕНОВ С МАЛОЙ РЕГУЛЯТОРНОЙ РНК *rdlD*

Леконцева Н.В., Фандо М.С., Михайлина А.О., Коробейникова А.В., Никулин А.Д.

Институт белка РАН

ул. Институтская, 4, г. Пушкино, 142290, РФ; e-mail: natalja-lekontseva@rambler.ru

Поступила в редакцию: 02.07.2018.

Аннотация. Для поддержания стабильности и правильного функционирования мРНК часто необходимы РНК-шапероны – РНК-связывающие белки, способные плавить вторичную структуру РНК. Недавние исследования показали, что белки, содержащие домен ProQ/FinO, можно выделить в новый класс РНК-шаперонов, которые могут играть ключевую роль в регуляции трансляции ряда генов. Для исследования механизмов РНК-белкового узнавания данным классом белков нами выбран белок ProQ из *Escherichia coli*. Мы показали, что он способен специфически взаимодействовать с мРНК *rdlD*, причем N- и C-концевые домены белка имеют разное сродство к исследуемой РНК.

Ключевые слова: ProQ, малые регуляторные РНК, РНК-шапероны, регуляция трансляции.

Более двух десятилетий белок Hfq был единственным известным белком, способствующим взаимодействию малых регуляторных РНК (мРНК) с мРНК в бактериях. Некоторые мРНК не требуют присутствия Hfq для взаимодействия со своими мишенями, что указывает на возможность существования других бактериальных РНК-шаперонов [1]. Недавно был идентифицирован новый класс подобных белков, названный FinO, который может выполнять аналогичную Hfq роль в посттранскрипционной регуляции генов [2-4]. Белок ProQ, представитель семейства FinO, первоначально обнаружен как фактор осморегуляции, необходимый для оптимальной экспрессии белка пролинового канала ProP [5-7]. В 2016 году проведены исследования, направленные на поиск мРНК, взаимодействующие с ProQ из *Salmonella enterica* [3]. В ходе данного исследования обнаружен обширный класс малых регуляторных РНК, которые связываются с ProQ, а также показано, что уровень экспрессии и время полужизни этих мРНК напрямую зависит от присутствия или отсутствия данного белка [4]. Для *Legionella pneumophila* показано, что белок, гомологичный ProQ, необходим для функционирования мРНК, участвующей в регуляции естественной компетентности бактериальных клеток [2]. Наше исследование направлено на поиск и идентификацию РНК-мишеней ProQ в *Escherichia coli*, и изучение их взаимодействия с белком ProQ.

ProQ из *E. coli* – это цитоплазматический белок, состоящий из двух доменов, соединенных длинным гибким линкером. Идентичность аминокислотной последовательности между N-концевым доменом ProQ и белком FinO из *E. coli* составляет 35% [6], а C-концевой домен гомологичен домену Тюдора [8]. На сегодняшний день получена структура целого белка с помощью метода ЯМР, однако структура комплекса белка с РНК неизвестна [8]. Основываясь на данных малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (SAXS) для комплекса ProQ и малой регуляторной РНК SraB, авторы предложили модель взаимодействия ProQ-РНК, в которой оба белковых домена связывают РНК. По предложенной модели, N-концевой FinO-подобный домен белка ProQ является РНК-узнающим доменом, различающим РНК-мишени, а C-концевой домен помогает в связывании РНК [8]. Предложенная модель не раскрывает подробности РНК-белкового взаимодействия и специфичности ProQ к молекулам РНК из-за низкого разрешения исходных данных.

Одной из РНК-мишеней белка ProQ из *Salmonella enterica* является малая регуляторная РНК *rdlD*. Она принадлежит к системе токсин-антитоксин I типа и ингибирует трансляцию белка-токсина за счет комплементарного взаимодействия с целевой мРНК [9]. Наличие *rdlD* РНК характерно для всех энтеробактерий, поэтому мы решили проверить, является ли данная мРНК целевой для ProQ в клетках *Escherichia coli*, а также изучить вклад каждого из доменов в РНК-белковое взаимодействие.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клонирование генов изолированных доменов белка ProQ из E. coli.

Гены изолированных доменов белка ProQ были амплифицированы с помощью метода ПЦР. Матрицей служила плаزمида pET22b, несущая ген белка дикого типа. Гены изолированных доменов были встроены в плазмиду pProExHTb (Invitrogen, США), которая несет последовательность из 6 гистидинов и сайт TEV протеазы для ее удаления. Нуклеотидные последовательности полученных конструкций были проверены секвенированием.

Выделение белка ProQ и его изолированных доменов.

Экспрессию гена и очистку белка ProQ дикого типа проводили, как описано ранее [10]. Выделение N- и C-концевых доменов белка производилось из клеток *E. coli* BL21(DE3), трансформированных полученными плазмидами. После разрушения клеток ультразвуком клеточный дебрис осаждали центрифугированием. К супернатанту добавляли имидазол до конечной концентрации 20 мМ и наносили на колонку со смолой Ni-NTA agarose, уравновешенную буфером 0,2 М NaCl, 20 мМ имидазола, 20 мМ Na₂HPO₄ и NaH₂PO₄, pH 8,0. Для элюции

доменов белков использовали линейный градиент имидазола от стартового буфера до 200 мМ. Препараты белка после хроматографии на носителе Ni-NTA agarose концентрировали до 1 мл, затем наносили на колонку со смолой Superdex G75 (объем колонки 120 мл), уравновешенную буфером 200 мМ NaCl, 50 мМ Трис-НСl, рН 8,0.

Клонирование гена rdlD мРНК из Escherichia coli и ее выделение.

Нуклеотидная последовательность малой регуляторной РНК *rdlD* была клонирована в вектор рUC18. Для ПЦР были использованы перекрывающиеся олигонуклеотиды-праймеры, один из которых содержал сайт для эндонуклеазы рестрикции HindIII и последовательность Т7-промотора, а второй – сайт для эндонуклеазы рестрикции SmaI. Нуклеотидные последовательности полученных конструкций были проверены секвенированием. РНК была получена с линейаризованной плазмиды транскрипцией *in vitro* с помощью Т7 РНК полимеразы. Анализ и очистку РНК транскрипта проводили с помощью электрофореза в 10 % ПААГ в присутствии 8 М мочевины. Дальнейшую очистку РНК проводили с помощью элюции из геля и анионообменной хроматографии на смоле DEAE-Sepharose.

Электрофорез РНК-белковых комплексов в ПААГ.

К раствору РНК добавляли MgCl₂ до конечной концентрации 10 мМ, прогревали в течение 10 мин при 60 °С, после чего охлаждали во льду. Затем добавляли белки в буфере 50 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 10 мМ MgCl₂, 200 мМ NaCl в молярном соотношении с РНК 1:1. Полученный раствор выдерживали в течение получаса при комнатной температуре. Для анализа изменения подвижности РНК-белковых комплексов в геле проводили электрофорез в 10% ПААГ, который окрашивали красителем толуидин (рис. 1).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие белка ProQ и его изолированных доменов с мРНК *rdlD* исследовано методом гель-шифта. На рисунке 1 видно, что ProQ специфически взаимодействует с *rdlD*, однако не вся РНК находится в комплексе с белком.

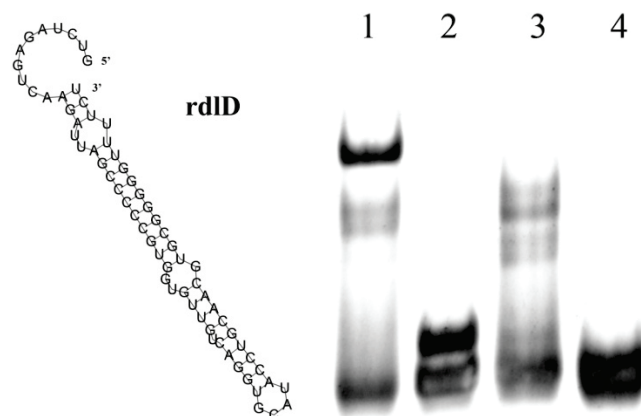


Рисунок 1. Вторичная структура мРНК *rdlD* и электрофоретический анализ связывания *rdlD* с белком ProQ и его изолированными доменами в неденатурирующих условиях (дорожка 1 – РНК+ProQ, дорожка 2 – РНК, дорожка 3 – РНК + N-концевой домен ProQ, дорожка 4 – РНК + С-концевой домен ProQ)

Полученные результаты подтверждают выдвинутую ранее гипотезу о том, что N-концевой домен необходим для специфического узнавания РНК, а С-концевой домен лишь способствует правильной ориентации РНК в пространстве и не обладает специфическим сродством к РНК. Известно, что домен Тюдора в других белках часто задействован в связывании белков-партнеров, поэтому вполне возможно, что С-концевой домен ProQ выполняет аналогичную функцию взаимодействия с белками-регуляторами. Количественную оценку сродства ProQ и его изолированных доменов к *rdlD* мы планируем измерить, используя метод поверхностного резонанса плазмонов.

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

Список литературы / References:

1. De Lay N., Schu D., Gottesman S. Bacterial small RNA-based negative regulation: Hfq and its accomplices. *J. Biol. Chem.*, 2013, vol. 288, pp. 7996-8003.
2. Attaiech L., Boughammoura A., Brochier-Armanet C., Allatif O., Peillard-Fiorente F., Edwards R.A., Omar A.R., MacMillan A.M., Glover M., Charpentier X. Silencing of natural transformation by an RNA chaperone and a multitarget small RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2016, vol. 113, pp. 8813-818.
3. Smirnov A., Forstner K.U., Homqvist E., Otto A., Gunster R., Becher D., Reinhardt R., Vogel J. Grad-seq guides the discovery of ProQ as a major small RNA-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2016, vol. 113, pp. 11591-11596.
4. Smirnov A., Wang C., Drewry L.L., Vogel J. Molecular mechanism of mRNA repression in trans by a ProQ-dependent small RNA. *EMBO J.*, 2017, vol. 36, pp. 1029-1045.

5. Kunte H.J., Crane R.A., Culham D.E., Richmond D., Wood J.M. Protein ProQ influences osmotic activation of compatible solute transporter ProP in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 1999, vol. 81, pp. 1537-1543.
6. Chaulk S.G., Smith Frieday M.N., Arthur D.C., Culham D.E., Edwards R.A., Soo P., Frost L.S., Keates R.A.B., Glover J.N.M., Wood J.M. ProQ is an RNA chaperone that controls ProP levels in *Escherichia coli*. *BioChemistry*, 2011, vol. 50, pp. 3095-3106.
7. Kerr C.H., Culham D.E., Marom D., Wood J.M. Salinity-dependent impacts of ProQ, Prc, and Spr deficiencies on *Escherichia coli* cell structure. *J. Bacteriol.*, 2014, vol. 196, pp. 1286-1296.
8. Gonzales G.M., Hardwick S.W., Maslen S.L., Skehel J.M., Holmqvist E., Vogel J., Bateman A., Luisi B.F., Broadhurst R.W. Structure of the *Escherichia coli* ProQ RNA-binding protein. *RNA*, 2017, vol. 23, pp. 696-711.
9. Gottesman S. The small RNA regulators of *Escherichia coli*: roles and mechanisms. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2004, vol. 58, pp. 303-328.
10. Nemchinova M., Balobanov V., Nikonova E., Lekontseva N., Mikhaylina A., Tishchenko S., Nikulin A. An experimental tool to estimate the probability of a nucleotide presence in the crystal structures of the nucleotide-protein complexes. *Protein J.*, 2017, vol. 36, pp. 157-165.

INVESTIGATION OF RNA-PROTEIN INTERACTION BETWEEN sRNA rdID AND THE ESCHERICHIA COLI RNA CHAPERONE PROQ AS WELL AS ITS ISOLATED DOMAINS

Lekontseva N.V., Fando M.S., Mikhailina A.O., Korobeinikova A.V. and Nikulin A.D.

Institute of protein research RAS

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

Abstract. The stability and function of sRNAs are often determined by specialized RNA-binding proteins called «RNA chaperones» which can melt RNA secondary structure. Recently has been found ProQ/FinO domain constitute a new class of RNA chaperones that can play key roles in post-transcriptional gene regulation. To study molecular mechanisms of the RNA-protein interactions carried out by this class of proteins, ProQ from *Escherichia coli* has been chosen. We have shown that the protein can specifically interact with *rdID* sRNA and its N- and C-terminal domains possess different affinity to the sRNA.

Key words: *ProQ, sRNAs, RNA chaperones, translation regulation.*