

1. Skálová T., Dohnálek J., Østergaard L.H., Østergaard P.R., Kolenko P., Dušková J., Štěpánková A., Hašek J. The structure of the small laccase from *Streptomyces coelicolor* reveals a link between laccases and nitrite reductases. *J Mol Biol.*, 2009. vol. 385, pp. 1165-1178.
2. Trubitsina L.I., Tishchenko S.V., Gabdulkhakov A.G., Lisov A.V., Zakharova M.V., Leontievsky A.A. Structural and functional characterization of two-domain laccase from *Streptomyces viridochromogenes*. *Biochimie*, 2015, vol. 112, pp. 151-159.
3. Tishchenko S., Gabdulkhakov A., Trubitsina L., Lisov A., Zakharova M., Leontievsky A. Crystallization and X-ray diffraction studies of a two-domain laccase from *Streptomyces griseoflavus*. *Acta Crystallogr. Sect. F Biol. Commun.*, 2015, vol. 71, pp.1200-1204.
4. Kabsch W. Integration, Scaling, Space-Group Assignment and Post-Refinement. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2010, vol. 66 (2), pp. 133-144.
5. McCoy A.J., Grosse-Kunstleve R.W., Adams P.D., Winn M.D., Storoni L.C., Read R.J. Phaser crystallographic software. *J. Appl. Cryst.*, 2007, vol. 40, pp. 658-674.
6. Murshudov G.N. [et al.] REFMAC5 for the Refinement of Macromolecular Crystal Structures. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2011, vol. 67 (4), pp. 355-367.
7. Adams P.D. [et al.] PHENIX: A Comprehensive Python-Based System for Macromolecular Structure Solution. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2010, vol. 66 (2), pp. 213-221.
8. Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G., Cowtan K. Features and Development of Coot. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2010, vol. 66 (4), pp. 486-501.
9. Ducros V., Brzozowski A.M., Wilson K.S., Brown S.H., Ostergaard P., Schneider P., Yaver D.S., Pedersen A.H., Davies G.J. *Nat Struct Biol.*, 1998, vol. 5, pp. 310-316.
10. Galhaup C., Haltrich D. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, vol. 56, pp. 225-232.

АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДОМЕНА I АРХЕЙНОГО РИБОСОМНОГО БЕЛКА L1 СО СПЕЦИФИЧЕСКИМИ ФРАГМЕНТАМИ РНК

Михайлина А.О., Костарева О.С., Никонова Е.Ю., Тищенко С.В.

ФГБУН Институт белка РАН

ул. Институтская, 4, г. Пущино, 142290, РФ

e-mail: alisamikhaylina15@gmail.com

Аннотация. Двухдоменный рибосомный белок L1 является составной частью L1-выступа рибосомы и регулятором собственного синтеза и синтеза рибосомных белков, гены которых находятся в том же опероне, что и собственный ген белка L1. Хорошо изучена регуляция L11 оперона *Escherichia coli* (включает гены рибосомных белков L11 и L1) и L1 оперона архей рода *Methanococcus* (включает гены рибосомных белков L1, L10 и L12). Ранее нами было показано, что домен I бактериального рибосомного белка L1 *Thermus thermophilus* (TthL1dI) обладает регуляторными свойствами целого белка и взаимодействует с рибосомной РНК прочнее, чем с мРНК. В данной работе получена генетическая конструкция, выделен и очищен изолированный домен I рибосомного белка L1 археи *Methanococcus jannaschii* (MjaL1dI). Методом поверхностного плазмонного резонанса определены кинетические константы взаимодействия MjaL1dI со специфическими фрагментами рибосомной и матричной РНК. Показано, что домен I архейного рибосомного белка L1, также как целый белок, взаимодействует с рРНК прочнее, чем с мРНК. В сопряженной системе транскрипции-трансляции *E.coli in vitro* MjaL1dI ингибирует синтез рибосомного белка L1. Сделан вывод, что MjaL1dI, также как TthL1dI, может обладать регуляторными свойствами целого белка L1. Таким образом, полученные данные позволяют предположить консервативность регуляторных свойств домена I рибосомного белка L1 как в бактериях, так и в археях.

Ключевые слова: рибосомный белок L1, регуляция трансляции, РНК-белковые взаимодействия, поверхностный плазмонный резонанс.

ANALYSIS OF THE DOMAIN I OF ARCHAEAAL RIBOSOMAL PROTEIN L1 INTERACTION WITH SPECIFIC RNA FRAGMENTS

Mikhaylina A.O., Kostareva O.S., Nikonova E.Y., Tishchenko S.V.

Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences

Institutskaya st., 4, Pushchino, 142290, Russia

e-mail: alisamikhaylina15@gmail.com

Abstract. The two-domain ribosomal protein L1 is a structural part of L1 stalk in ribosome and a translational repressor of protein synthesis of its own operon. The regulation of the L11 operon *Escherichia coli* (consists of genes of proteins L11 and L1) and L1 operon of Archaea from *Methanococcus* (includes genes of proteins L1, L10 and L12) is well-studied. Previously we have shown that domain I of ribosomal protein L1 *Thermus thermophilus* (TthL1dI) can regulate expression of L1 gene as an intact protein TthL1. Plasmid construct carrying the gene of truncation mutant of L1 from *Methanococcus jannaschii* was obtained in this study and the isolated domain I of *M. jannaschii* (MjaL1dI) was overproduced and purified. Kinetic analysis of MjaL1dI interaction with specific 23S rRNA and mRNA fragments was performed by surface plasmon resonance technique. Here it was shown that domain I of archaeal ribosomal protein L1 binds with rRNA with higher affinity than with mRNA as an intact protein L1. In a coupled transcription-translation system *E.coli in vitro* MjaL1dI inhibits synthesis of ribosomal protein L1. We conclude that MjaL1dI, as a TthL1dI, may have regulatory properties as an intact protein. Thus, these data suggest conservative regulatory properties of the domain I of L1 ribosomal protein as in Bacteria, and in the Archaea.

Key words: ribosomal protein L1, regulation of translation, RNA-protein interactions, surface plasmon resonance.

Введение.

Рибосомный белок (р-белок) L1 в составе L1-выступа участвует в удалении транспортной РНК из E-сайта рибосомы. Кроме того, он является регулятором трансляции белков своего оперона по принципу обратной связи. При недостатке рибосомной 23S РНК белок L1 связывается со специфическим участком в последовательности своей мРНК и мешает ее трансляции. Наиболее подробно изучена регуляция L11 оперона *E. coli* [1] и L1 оперона архей рода *Methanococcus* [2]. В *E. coli* белок L1 связывается с участком перед первым геном L11 оперона, а в археях *Methanococcus vannielii* и *M. jannaschii* регуляторный участок на мРНК располагается в начале кодирующей последовательности первого гена L1 оперона. Участки связывания белка L1 на мРНК и рРНК похожи по первичной и по вторичной структуре, однако сродство белка к рРНК значительно выше, чем к мРНК [3], что обеспечивает ингибирование трансляции соответствующей мРНК при избыточной продукции белка L1.

Положение участка, соответствующего месту связывания рибосомного белка L1 на регуляторной РНК, в разных родах эубактерий варьирует. Биоинформатический анализ оперонов, кодирующих рибосомные белки в геномах различных эубактерий [4], показал, что в родах *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Thermotoga* и *Tenericutes* предполагаемый L1-связывающий участок располагается перед геном белка L11 (как в *E. coli*), однако, у других бактерий он расположен перед геном белка L1 (*Cyanobacteria*, *Actinobacteria* и *Chloroflexi*). Более чем в 40 % геномов эубактерий потенциальный участок связывания белка L1 располагается как перед геном белка L1, так и перед геном белка L11.

Ранее мы детально исследовали взаимодействие р-белка L1 *T. thermophilus* (TthL1) со специфическим участком связывания на 23S рРНК из того же организма и провели сравнительный структурно-кинетический анализ взаимодействий белка TthL1 в комплексах со специфическими фрагментами рРНК и мРНК [5, 6]. Был получен белок TthL1dI в изолированном виде и исследованы его РНК-связывающие свойства. Недавно мы показали, что TthL1dI, как и целый белок TthL1, ингибирует экспрессию белков L1-оперона архей [7] и, следовательно, может обладать регуляторными свойствами целого белка.

В данной работе описано получение домена I белка L1 из термофильной археи *M. jannaschii* и кинетический анализ его взаимодействия со специфическими фрагментами мРНК и рРНК из архей. Показано, что MjaL1dI взаимодействует с рибосомной РНК прочнее, чем с матричной РНК и способен ингибировать синтез архейного рибосомного белка L1 в сопряженной системе транскрипции-трансляции *E. coli in vitro*. Данные исследования позволяют предположить универсальность ведущей роли домена I белка L1 в регуляторных свойствах целого рибосомного белка L1 как в бактериях, так и в археях.

Методы исследования.**Получение MjaL1dI.**

Генетическая конструкция, содержащая ген белка MjaL1dI, была получена на основе плазмиды pET-11a, несущей ген целого белка MjaL1. Для получения штамма-суперпродуцента использовали систему Штудьера. Во избежание ошибочного включения аминокислот в архейные белки (лизина вместо аргинина) клетки штамма BL21(DE3) были котрансформированы плазмидой pUBS 520. Эта плаزمида несет ген аргининовой тРНК (тРНК^{Arg}_{AGA/AGG}), узнающей редкие для *E. coli* кодоны аргинина AGA и AGG. Клетки разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе. Клеточный дебрис, из разрушенной биомассы, удаляли низкоскоростным центрифугированием (14000g, 30 мин, 4 °C). Из полученного супернатанта рибосомы осаждали высокоскоростным центрифугированием (90000g, 1 ч, 4 °C). С помощью стадии прогрева лизата при 60 °C избавлялись от термоллабильных белков. Дальнейшую очистку белка MjaL1dI проводили с помощью хроматографий на CM-Sepharose и Heparin-Sepharose.

Кинетический анализ взаимодействия белков MjaL1, MjaL1dI со специфическими фрагментами мРНК и рРНК.

Кинетический анализ взаимодействия между белками и специфическими фрагментами 23S рРНК и мРНК проводился с использованием метода поверхностного плазмонного резонанса (ППР) на системе ProteOn XPR36 (Bio-Rad, USA). Биотинилированные фрагменты мРНК *M. jannaschii* [8] или 23S рРНК *M. vannielii* [9] наносили на сенсорные NLS чипы с иммобилизованным авидином (Bio-Rad). Кинетический анализ проводили, как описано ранее [9]. Набор из 5 сенсограмм обчитывался в программе BIAEvaluation с использованием простой бимолекулярной модели (1:1).

Анализ ингибирования синтеза белка MvaL1 в сопряженной системе транскрипции-трансляции in vitro.

Для эксперимента в сопряженной системе транскрипции-трансляции *in vitro* использовали набор RTS 100 *E. coli* NY Kit (Roche, США). Исследования проводились как описано в работе 7.

Результаты и их обсуждение.

Домен I рибосомного белка I объединяет N- и C-концевые части белка L1, домен II является вставкой в домен I (см. рис. 1).

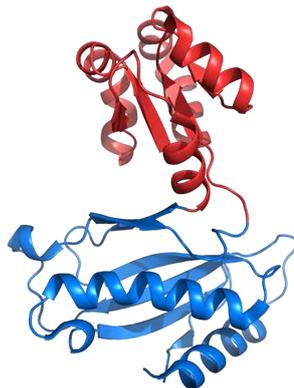


Рисунок 1 – Модель структуры белка MjaL1. Синим показан домен I белка, красным – домен II

Был получен очищенный препарат белка MjaL1dI (см. рис. 2), который использовался нами в ППР экспериментах и в системе транскрипции-трансляции *in vitro*.



Рисунок 2 – Электрофореграмма очищенного препарата MjaL1dI (15% ПААГ в присутствии ДСН)

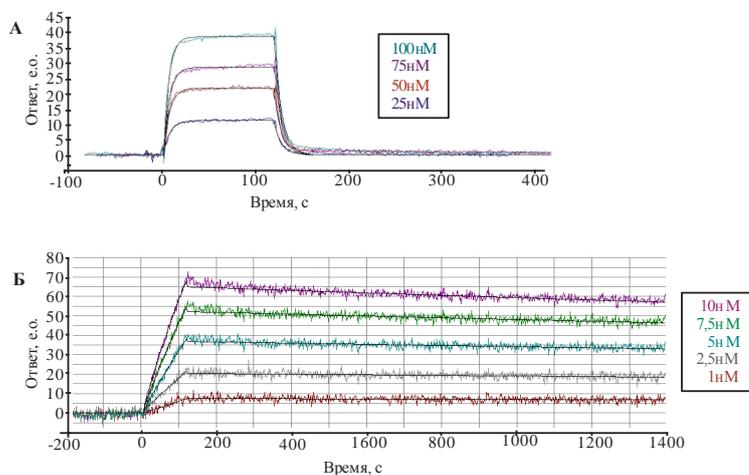


Рисунок 3 – Сенсограммы взаимодействия MjaL1dI со специфическими фрагментами мРНК (А) и рРНК (Б)

Кинетический анализ взаимодействия MjaL1dI со специфическими фрагментами мРНК (см. рис. 3А) и рРНК (см. рис. 3Б) показал, что домен I архейного рибосомного белка L1, также как и целый белок, взаимодействует с матричной РНК слабее, чем с рибосомной РНК (см. табл. 1), что позволяет предположить, что MjaL1dI может обладать регуляторными свойствами.

Таблица 1 – Кинетические константы взаимодействия белков со специфическими фрагментами мРНК и рРНК

Белок	Константа скорости ассоциации ($\times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)		Константа скорости диссоциации ($\times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$)		Равновесная константа диссоциации (нМ)	
	мРНК	рРНК	мРНК	рРНК	мРНК	рРНК
MjaL1	280	797	2,4000	0,0200	0,0600	0,0003
MjaL1dI	52	102	1280	1,6200	248	0,1580

Для проверки регуляторных свойств белка MjaL1dI была использована сопряженная система транскрипции-трансляции *E. coli in vitro* в присутствии меченого [^{35}S] метионина и плазмиды, несущей ген белка L1 *M. vannielii* (MvaL1). Участок мРНК, с которым связывается белок L1 (L1-специфичный участок), располагается в ОПС примерно в 30 нуклеотидах от инициаторного кодона. Таким образом, по интенсивности синтеза полноразмерного белка MvaL1 можно определить способность белка L1 или его домена I регулировать трансляцию соответствующей мРНК. Ранее нами было показано, что домен I бактериального белка L1 *T. thermophilus* ингибирует синтез MvaL1 доз-зависимым образом [7]. Мы показали, что MjaL1dI также способен осуществлять ингибирование синтеза белка MvaL1, хотя и в меньшей степени, чем целый белок (см. рис. 4).

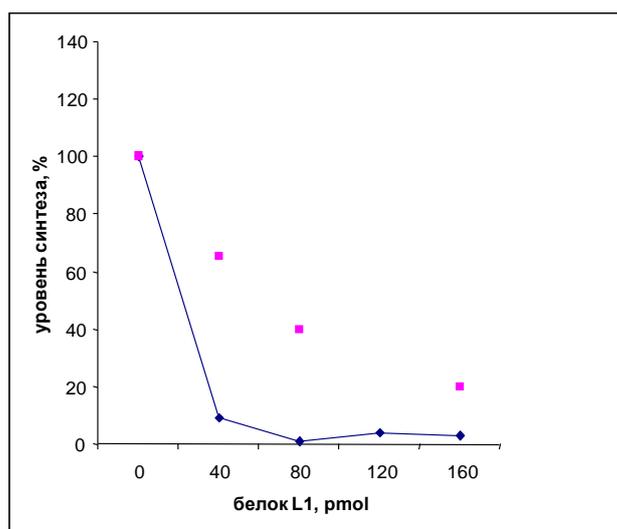


Рисунок 4 – График зависимости уровня синтеза белка MvaL1 от количества добавляемых белков MjaL1 (синие точки) и MjaL1dI (малиновые точки)

Таким образом, полученные данные о РНК-связывающих свойствах MjaL1dI позволяют предположить консервативность регуляторных свойств домена I рибосомного белка L1 как в бактериях, так и в археях. В домене II архейных рибосомных белков L1, в отличие от бактериальных рибосомных белков L1, имеется консервативная спираль, положительно заряженные аминокислотные остатки которой образуют водородные связи с сахаро-фосфатным остовом РНК. Отсутствие этих контактов приводит к довольно значительному понижению сродства MjaL1dI к рРНК и мРНК по сравнению с целым белком MjaL1.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-34-01056 мол_а) и Программы МКБ Президиума РАН.

Список литературы / References:

1. Gourse R., Sharrock R., Nomura M. Control of ribosome synthesis in *Escherichia coli*. In *Structure, function and genetics in ribosomes*, ed. B. Hardesty, G. Kramer. New York: SpringerVerlag, 1986, pp. 766-788.
2. Hanner M., Mayer C., Köhrer C., Golderer G., Gröbner P., Piendl W. Autogenous translational regulation of the ribosomal MvaL1 operon in the archaeobacterium *Methanococcus vannielii*. *Journal of bacteriology*, 1994, vol. 176 (2), pp. 409-418.

3. Kraft A., Lutz C., Lingenhel A., Gröbner P., Piendl W. Control of ribosomal protein L1 synthesis in mesophilic and thermophilic archaea. *Genetics*, 1999, vol. 152 (4), pp. 1363-1372.
4. Fu Y., Deiorio-Haggar K., Anthony J., Meyer M.M. Most RNAs regulating ribosomal protein biosynthesis in *Escherichia coli* are narrowly distributed to Gammaproteobacteria. *Nucleic Acids Res*, 2013, vol. 41, no. 6, p. 3491-3503.
5. Tishchenko S., Gabdulkhakov A., Nevskaya N., Sarskikh A., Kostareva O., Nikonova E., Sycheva A., Moshkovskii S., Garber M., Nikonov S. High-resolution crystal structure of the isolated ribosomal L1 stalk. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*, 2012, vol. 68, pp. 1051-1057.
6. Tishchenko S., Kostareva O., Gabdulkhakov A., Mikhaylina A., Nikonova E., Nevskaya N., Sarskikh A., Piendl W., Garber M., Nikonov S. Protein-RNA affinity of ribosomal protein L1 mutants does not correlate with the number of intermolecular interactions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*, 2015, vol. 71, pp. 376-386.
7. Korepanov A.P., Kostareva O.S., Bazhenova M.V., Bubunenko M.G., Garber M.B., Tishchenko S.V. Studying the properties of domain I of the ribosomal protein L1: incorporation into ribosome and regulation of the L1 operon expression. *Protein J.*, 2015, vol. 34 (2), pp.103-110.
8. Tishchenko S., Kljashtorny V., Kostareva O., Nevskaya N., Nikulin A., Gulak P., Piendl W., Garber M., Nikonov S. Domain II of *Thermus thermophilus* ribosomal protein L1 hinders recognition of its mRNA. *J. Mol. Biol.*, 2008, vol. 383, pp. 301-305.
9. Kostareva O., Tishchenko S., Nikonova E., Kljashtorny V., Nevskaya N., Nikulin A., Sycheva A., Moshkovskii S., Piendl W., Garber M., Nikonov S. Disruption of shape complementarity in the ribosomal protein L1-RNA contact region does not hinder specific recognition of the RNA target site. *J. Mol. Recognit.*, 2011, vol. 24, pp. 524-532.

N-КОНЦЕВОЙ МУЛЬТИМЕРИЗУЮЩИЙ ДОМЕН ИНСУЛЯТОРНОГО БЕЛКА CTCF DROSOPHILA MELANOGASTER ИМЕЕТ КОМПАКТНУЮ ПРОСТРАНСТВЕННУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ ПРИ ОТСУТСТВИИ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ

Бончук А.Н.¹, Качалова Г.С.², Бойко К.М.², Максименко О.Г.¹, Георгиев П.Г.¹

¹ Институт биологии гена РАН

ул. Вавилова, 34/5, г. Москва, 119334, РФ

² Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

Ленинский пр., 33, г. Москва, 119071, РФ

e-mail: errinaceus@rambler.ru

Аннотация. При помощи методов кругового дихроизма и малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (SAXS) получены данные о пространственной структуре мультимеризующего N-концевого домена инсуляторного белка CTCF *Drosophila melanogaster*. По аминокислотной последовательности данный домен не имеет гомологии ни с одним известным белковым доменом. По данным кругового дихроизма N-концевой домен белка CTCF *Drosophila* практически не имеет вторичной структуры. По данным SAXS этот домен имеет стабильную компактную структуру в растворе и является тетрамером. Получены модели низкого разрешения структуры тетрамера в растворе. Формирование тетрамеров также подтверждается при помощи методов динамического рассеяния света (DLS) и гель-фильтрации.

Ключевые слова: мультимеризация, малоугловое рассеяние рентгеновских лучей, круговой дихроизм, хроматин.

N-TERMINAL MULTIMERIZATION DAMAIN OF DROSOPHILA MELANOGASTER CTCF PROTEIN HAS COMPACT SPATIAL ORGANIZATION BUT LACKS SECONDARY STRUCTURE

Bonchuk A.N.¹, Kachalova G.S.², Boyko K.M.², Maksimenko O.G.¹, Georgiev P.G.¹

¹ Institute of gene biology RAS

Vavilova st., 34/5, Moscow, 119334, Russia

² A.N. Bach Institute of biochemistry of RAS,

Leninsky pr., 33, Moscow, 119071, Russia

e-mail: errinaceus@rambler.ru

Abstract. Spatial structure of N-terminal multimerization domain from *Drosophila melanogaster* CTCF insulator protein was studied using circular dichroism and small-angle X-ray scattering (SAXS). This domain has no significant homology in amino acid sequence with any other known protein domain. Circular dichroism spectra revealed that N-terminal domain of *Drosophila* CTCF protein almost completely lacks secondary structure. SAXS data indicated that domain possess a stable compact conformation in solution and exists as a tetramer. Low-resolution models of spatial structure of the tetramer were built. Tetramer formation is also supported by dynamic light scattering (DLS) and size-exclusion chromatography.

Keywords: multimerization, small-angle X-ray scattering, circular dichroism, chromatin.

Инсуляторы – геномные элементы, участвующие в разобщении независимых хроматиновых доменов, обладающие способностью блокировать энхансер-промоторные взаимодействия и препятствовать распространению гетерохроматина. При этом инсуляторы способны взаимодействовать между собой на больших