

13. Саломатин Е.М. Токсическое действие производных феноптиазина и методы их определения в биологических жидкостях. *Судебно-медицинская экспертиза*, 1966, № 1, с. 18-21. [Salomatin E.M. Toxic effect of phenothiazine derivatives and methods for their determination in biological fluids. *Forensic medical examination*, 1966, no. 1, pp. 18-21. (In Russ.)]
14. Ashford R.D. *Ashford's Dictionary of Industrial Chemicals*. 3rd. 2011, P. 9362.
15. Кацев А.М., Шандровская А.С., Абдураманова Э.Р. Оптимизация выбора органических растворителей для проведения скринингового биотестирования лекарственных веществ. *Запорожский медицинский журнал*, 2011, т. 13, № 1, с. 083-086. [Katsev A.M., Shandrovskaia A.S., Abduramanova E.R. Optimization of the choice of organic solvents for screening biotesting of drugs. *Zaporozhye Medical Journal*, 2011, vol. 13, no. 1, pp. 083-086. (In Russ.)]
16. Nosulenko I.S., Voskoboynik Y.U., Berest G.G., Safronyuk S.L., Kovalenko S.I., Kamyshnyi O.M., Polishchuk N.M., Sinyak R.S., Katsev A.V. Synthesis and antimicrobial activity of 6-Thioxo-6,7-dihydro-2H-[1,2,4]triazino [2,3-c]-quinazolin-2-one derivatives. *Scientia Pharmaceutica*, 2014, vol. 82, iss. 3, pp. 483-500.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ТРОЙНОЙ ЗАМЕНЫ ASP9ALA/VAL43ARG/TYR55TRP В БЕЛКЕ HFQ НА ЕГО СТРУКТУРУ И ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ

Леконцева Н.В., Кутузова К.А., Филимонов В.В., Балобанов В.А., Никулин А.Д.

Институт белка РАН

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

e-mail: natalja-lekontseva@rambler.ru

Аннотация. Белок Hfq из *Pseudomonas aeruginosa* является РНК-связывающим белком, принимающим участие во многих процессах, связанных с транскрипцией и трансляцией РНК. Он принадлежит к структурному семейству Sm-подобных белков (Sm-like proteins – Lsm) и формирует в растворе и кристаллах гомогексамеры. Несмотря на то, что белок выделен из мезофильной бактерии, он обладает экстремальной термостабильностью. Методом микрокалориметрии показано, что Hfq начинает плавиться при температурах выше 120°C при нейтральных значениях pH и предложена схема плавления белка с промежуточным состоянием в виде мономера белка. Для подтверждения этой гипотезы решено получить белок в мономерной форме, внося существенное изменение в межсубъединичный интерфейс посредством комплексной замены аминокислотных остатков Asp9, Val43 и Tyr55. Степень олигомеризации полученного белка оценена методами динамического рассеяния света, «околонативного» электрофореза и гель-фильтрацией.

Ключевые слова: Hfq, Sm-подобные белки, олигомеризация, динамическое рассеяние света.

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF SUBSTITUTION ASP9ALA/VAL43ARG/TYR55TRP ON HFQ PROTEIN STRUCTURE AND STABILITY

Lekontseva N.V., Kutuzova K.A., Filimonov V.V., Balobanov V.A., Nikulin A.D.

Institute of protein research RAS

Institutskaya Str., 4, Pushchino, 142290, Russia

e-mail: natalja-lekontseva@rambler.ru

Abstract. Hfq from *Pseudomonas aeruginosa* is a posttranslational regulator of gene expression that binds small noncoding RNAs (sRNA) and promotes their interaction with mRNAs. It belongs to the widespread Sm/Lsm (Sm-like) protein family and forms hexamers in crystals and solution. In spite of the mesophilic source Hfq possess extremely high thermostability. Measurements of the protein stability by microcalorimetry showed the transition midpoint for Hfq was about 120°C at neutral pH. A model for a temperature-induced unfolding of the Hfq hexamers which includes dissociation to monomers and their subsequent unfolding was suggested. To confirm this hypothesis it was necessary to obtain Hfq monomer by complex substitution of amino acids Asp9, Val43 and Tyr55, which organized inter-monomer hydrogen bonds in the protein hexamer. The obtained mutant form of the Hfq was studied by semi-native electrophoresis, size-exclusion chromatography and dynamic light scattering.

Key words: Hfq, Sm-like proteins, oligomerization, semi-native electrophoresis, dynamic light scattering

Белок Hfq является высококонсервативным экстремально термостабильным белком с молекулярной массой около 10 кДа. Впервые был обнаружен в 1968 году как клеточный белок *Escherichia coli* HF-I (Host factor I), участвующий в репликативном цикле бактериофага Q β [1]. Последующие 20 лет работы с белком Hfq были направлены на исследование его РНК-связывающих свойств [2]. И только в 1990-х годах стала понятна его роль в экспрессии генов: он принимает участие во многих процессах, связанных с транскрипцией и трансляцией РНК. Структурно белок Hfq принадлежит к семейству Sm-подобных (или Lsm) белков, которые были обнаружены во всех доменах жизни [3]. Представители данного семейства имеют сходную первичную и третичную структуры, 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, а эукариотические в основном представлены гетерогептамерами [4]. Формирование четвертичной структуры происходит за счет образования “сквозного” β -листа, благодаря объединению β 4- и β 5-

тяжей соседних мономеров. Причины формирования частиц с различным количеством мономеров не известны. Предполагается, что небольшие вариации во взаимодействиях боковых остатков между мономерами белка могут влиять на его четвертичную структуру [5].

Белок Hfq обладает уникально высокой термостабильностью. Ранее при проведении исследований его термостабильности было обнаружено, что температура плавления белка Hfq при pH 7,0 выше 100 градусов. При pH 2,0, получилась кривая, которую можно было аппроксимировать двумя моделями – равновесного плавления белка Hfq или первоначальной диссоциацией до мономеров, а затем полное разворачивание. В итоге, была предложена схема плавления белка, в которой предполагается, что переходная форма находится в виде мономеров, после чего происходит его полное разворачивание. Для подтверждения данной гипотезы было необходимо получить белок в мономерной форме. Анализируя пространственные структуры известных белков Hfq, было показано, что пять консервативных аминокислотных остатков Gln8, Asn28, Asp40, Tyr55 и His57, расположенных на межсубъединичном интерфейсе, формируют недоступные растворителю водородные связи между соседними мономерами. Единичные замены данных аминокислотных остатков на аланин не привели к изменению четвертичной структуры белка, только уменьшилась их термостабильность [6].

Для существенного изменения межсубъединичного интерфейса предложено произвести комплексную замену аминокислотных остатков Val43, Asp9 и Tyr55. Определяющую роль должна играть замена Val43Arg, которая внесет длинную заряженную аминокислоту в гидрофобную область между мономерами. Замена Tyr55Trp будет способствовать изменению межсубъединичного интерфейса, а также внесение триптофана можно использовать для оценки изменения структуры белка по изменению флуоресценции. Замена Asp9Ala предназначена для подавления гидролиза белка при низких значениях pH (пара Asp-Pro), при которых проводились термодинамические измерения стабильности белка и его олигомеров.

Методы исследования.

Клонирование генов белка Hfq из P. aeruginosa с заменами Asp9Ala, Asp9Ala/Tyr55Trp и Asp9Ala/Val43Arg/Tyr55Trp.

Генетические конструкции с необходимыми мутациями получали методом сайт-направленного мутагенеза (QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit), по рекомендуемой фирмой методике. Матрицей служила плазида pET22b, несущая ген белка дикого типа. Для улучшения выделения и очистки белка в генетическую конструкцию, несущую ген с тремя мутациями, ввели шесть гистидинов (His)₆ на C-конец белка.

Выделение белков Hfq дикого типа и с заменами Asp9Ala, Asp9Ala/Tyr55Trp и Asp9Ala/Val43Arg/Tyr55Trp.

Экспрессию гена и очистку белка РаеHfq дикого типа, а также мутантных белков (за исключением белка с тройной мутацией) проводили, как описано ранее [7]. Выделение белка с заменами Asp9Ala/Val43Arg/Tyr55Trp (DVY-His₆) производилось из клеток *E. coli* BL21(DE3), трансформированными полученной плазмидой. После разрушения клеток ультразвуком клеточный дебрис и рибосомы осаждали последовательным 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, 20мМ имидазола, 20 мМ Na₂HPO₄ и NaH₂PO₄, pH 6,0. Для элюции белка использовали линейный градиент имидазола от стартового буфера до 250 мМ. Препарат белка после хроматографии на носителе Ni-NTA agarose концентрировали до 1 мл, затем диализовали против буфера 200 мМ NaCl, 50 мМ Tris HCl, pH 8,0.

Анализ размера частиц белка с помощью гель-фильтрации.

Хроматографию проводили на системе Acta basic (Amersham, Швеция) с колонкой Superdex 75 объемом 24 мл. Для проведения хроматографии использовали буфер 200 мМ NaCl, 50 мМ Tris HCl, pH 8,0. Образец наносили на колонку со скоростью 0,5 мл/мин в объеме 100 мкл с концентрацией белка 1 мг/мл. Калибровочная кривая была построена по образцам белков БСА, овальбумин, рибонуклеаза А и аprotинин.

Электрофорез белков в ПААГ в «околонативных» условиях.

Эксперименты проводили в 15% ПААГ с содержанием 0.1% ДСН по процедуре, описанной ранее для белка Hfq из *E. coli* [8]. Аликвоты белков по 20 мкг в присутствии 0.5% ДСН были помещены на 15% ПААГ без стадии прогрева. ДСН был добавлен к образцам белков непосредственно перед нанесением образцов на гель.

Определение размера и молекулярной массы частиц белков методом динамического рассеяния света.

Эксперименты по динамическому светорассеянию проводились на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd.). Рассеянный назад свет от 4 мВт He/Ne лазера (длина волны 632,8 нм.) собирался под углом 173°. Образцы белков были с концентрацией 1 мг/мл. в буфере 200 мМ NaCl, 50 мМ TrisHCl, pH 8,0. Температура измерения была равна 25°C. Время накопления автокорреляционной функции составляло 100 сек. Конечная автокорреляционная функция являлась средним из 10 измерений. Распределение радиусов от интенсивности светорассеяния рассчитывалось при следующих параметрах: коэффициент преломления 1,330 и вязкость раствора 0,8882 сПа. Распределение молекулярной массы от интенсивности светорассеяния рассчитывалось исходя из уравнения Марк-Хаувинка в стандартном программном обеспечении для прибора (Malvern Zetasizer Software):

$$D=K*M^{-a},$$

где D – коэффициент диффузии; K и a – константы (использовались значения константы a, равное 0,428 см²/с и K равное 7,67E-05); M – молекулярная масса в кДа.

Результаты и обсуждение.

Влияние произведенных замен на степень олигомеризации белка Hfq оценивалось тремя методами – электрофорезом в “околонативных” условиях, гель-фильтрацией и методом динамического рассеяния света.

Электрофорез в “околонативных” условиях производился с добавлением 0,5% процентного ДСН к образцу непосредственно перед нанесением образца на гель, нанесение осуществлялось без предварительного прогрева препарата. Ранее этим методом оценивалось влияние замены ряда аминокислотных остатков в межсубъединичной области белка Hfq из *E.coli* на степень диссоциации олигомеров белка (см. рис. 1) [8]. Считается, что в данных условиях разворачивание белка не происходит, однако фиксируется равновесное олигомерное состояние белка в растворе. Было показано, что для белка дикого типа и белка с заменой Y25D наблюдается мультимерная, гексамерная и мономерная степени олигомеризации. Замены Q8A, Y55A и K56A привела к диссоциации до мономеров, замена R16A - к диссоциации мультимеров до гексамеров.

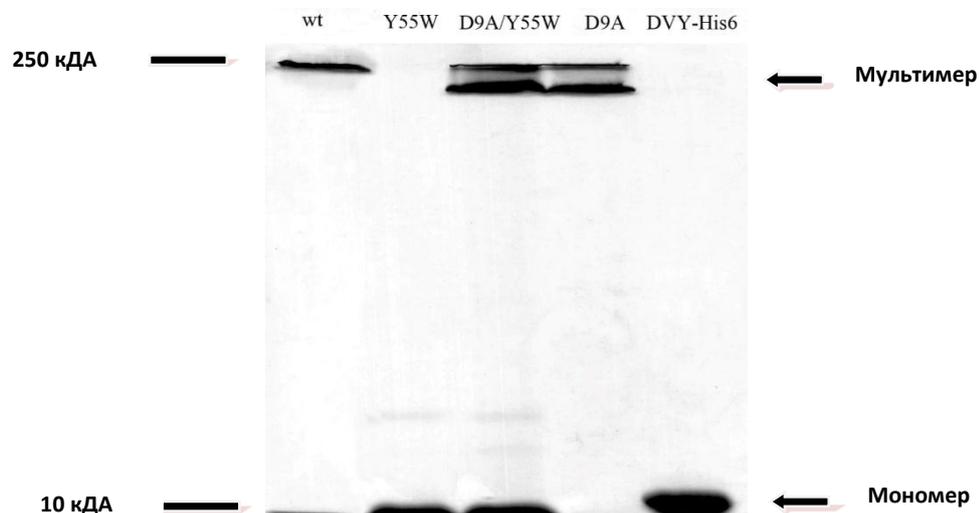


Рисунок 1 – Электрофорез в “околонативных” условиях мутантных форм белка Hfq из *P. aeruginosa*. Приведена оценка степени олигомеризации белка. Отмечены дорожки, соответствующие белку дикого типа и белкам с соответствующими заменами

Для оценки влияния произведенных нами мутаций в белке Hfq из *P. aeruginosa* на степень его олигомеризации, мы повторили условия “околонативного” электрофореза. Оказалось, что замена Asp9Ala (D9A) не повлияла на степень олигомеризации белка Hfq (рис. 1). Замена Tyr55Trp (Y55W) и тройная замена привели к полной диссоциации олигомеров до мономеров в условиях данного метода, отсюда можно сделать вывод, что сделанные замены привели к дестабилизации гексамерной структуры белка. Однако анализ кристаллической структуры белка с заменой Tyr55Trp показал, что в кристаллах белок формирует гексамер (PDB 5I21). Поэтому мы решили провести анализ размера частиц исследуемых белков с помощью гель-фильтрации и динамического рассеяния света.

С помощью гель-фильтрации был проведен анализ олигомерного состояния для следующих вариантов белков Hfq – дикий тип, Asp9Ala, Tyr55Trp, двойной мутант Asp9Ala/Tyr55Trp и тройной мутант DVY-His6. Для разделения возможных устойчивых высокомолекулярных агрегатных состояний была использована колонка с носителем Superdex G75. По результатам хроматограмм видно, что у белка Hfq дикого типа, одиночных мутантов и двойного мутанта пик располагается в районе гексамера. Только для тройного мутанта была выявлена фракция, которая может соответствовать мономерной форме белка (см. рис. 2).

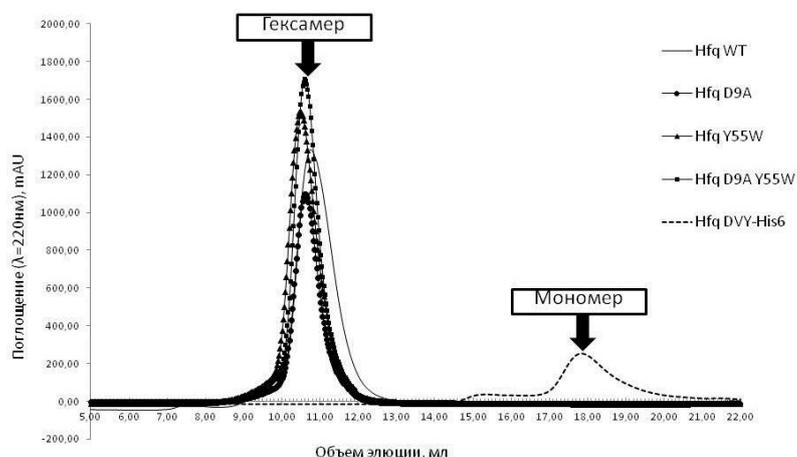


Рисунок 2 – Профили элюции аналитической гель-фильтрации на колонке с носителем Superdex G75. Стрелками обозначены распределение мономеров и мультимеров

Измерение гидродинамического радиуса мутантных белков в растворе методом динамического рассеяния света показало, что все исследуемые белки (кроме тройного мутанта Hfq DVY-His₆) имеют расчетную молекулярную массу, характерную для гексамера, а молекулярная масса Hfq Asp9Ala/Val43Arg/Tyr55Trp оказалась около 20 кДа, что говорит о нарушении структуры гексамера (см. табл. 1, рис. 3).

Таблица 1 – Результаты исследования белков Hfq из *P. aeruginosa* методом динамического рассеяния света

	Hfq wt	Hfq D9A	Hfq D9A/Y55W	Hfq DVY His ₆
Размер, нм	6,45 ± 0,54	7,07 ± 0,65	7,07 ± 0,54	4,25 ± 0,19
Масса, кДа	51,8 ± 5,9	62,9 ± 5,8	63,3 ± 4,6	20,2 ± 0,2

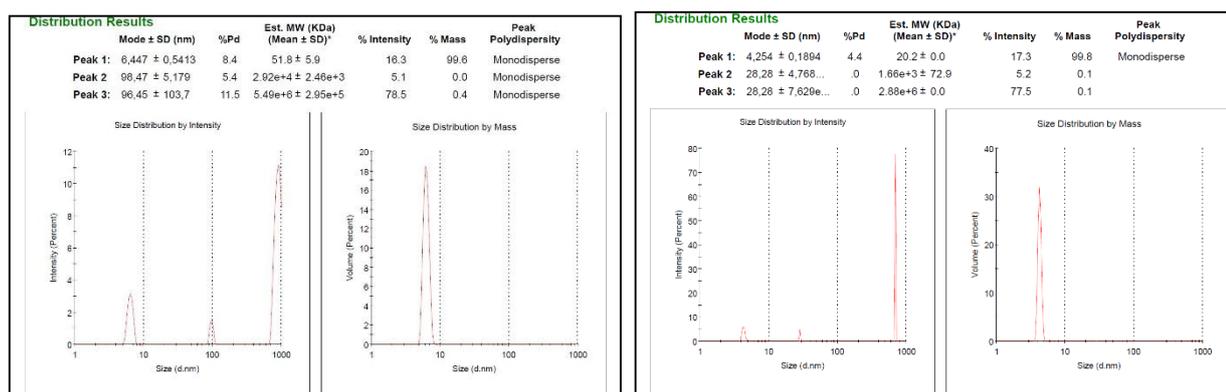


Рисунок 3 – Результаты анализа распределения частиц по размеру и по массе для белка РаеНfq дикого типа (слева) и РаеНfq DVY His₆ (справа), полученные методом динамического рассеяния света

Таким образом, с помощью «околонативного» электрофореза, аналитической гель-фильтрации и динамического рассеяния света показано, что внесенные мутации Asp9Ala/Val43Arg/Tyr55Trp нарушили гексамерную организацию белка Hfq.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 14-04-31215-мол_а.

Список литературы / References:

1. Shapiro L., Franze de Fernandez M.T., August J.T. Resolution of two factors required in the Q-beta-RNA polymerase reaction. *Nature*, 1968, vol. 220, pp. 478-480.
2. de Haseth P.L., Uhlenbeck O.C. Interaction of Escherichia coli host factor protein with Q beta ribonucleic acid. *Biochemistry*, 1980, vol. 19, no. 26, pp. 6146-51.
3. Valentin-Hansen P., Eriksen M. The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions. *Mol. Microbiol.*, 2004, vol. 51, pp. 1525-1533.
4. Achsel T., Stark H., Lührmann R. The Sm domain is an ancient RNA-binding motif with oligo(U) specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001, vol. 98, pp. 3685-3689.
5. Shikama N., Lutz W., Kretschmar R., Sauter N., Roth J.F., Marino S., Wittwer J., Scheidweiler A., Eckner R. Essential function of p300 acetyltransferase activity in heart, lung and small intestine formation. *EMBO J.*, 2003, vol. 22, pp. 5175-5185.
6. Murina V.N., Melnik B.S., Filimonov V.V., Ühlein M., Weiss M.S., Müller U., Nikulin A.D. Effect of conserved intersubunit amino acid substitutions on Hfq protein structure and stability. *Biochem.*, 2014, vol. 79, pp. 469-477.
7. Nikulin A., Stolboushkina E., Perederina A., Vassilieva I., Blaesi U., Moll I., Kachalova G., Yokoyama S., Vassylyev D., Garber M. [et al.] Structure of Pseudomonas aeruginosa Hfq protein. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 2005, vol. 61, pp. 141-146.
8. Panja S., Woodson S. Hexamer to monomer equilibrium of E. coli Hfq in solution and its impact on RNA annealing. *J. Mol. Biol.*, 2012, vol. 417, pp. 406-412.