МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Толстыко Евгений Александрович

Связывание РНК *in vitro* серпинами растений

03.01.03 «Молекулярная биология»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2021

Работа выполнена на кафедре вирусологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Научный руководитель	Морозов Сергей Юрьевич, доктор биологических наук, профессор
Официальные оппоненты	Завриев Сергей Кириакович, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент Российской академии наук, заведующий отделом молекулярной биологии и биотехнологии растений ФГБУН «Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук
	Замятнин Андрей Александрович, доктор биологических наук, доцент, директор Института молекулярной медицины ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
	Брейгина Мария Александровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры физиологии растений биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»

Защита диссертации состоится «20» января 2022 г. в 14 часов на заседании диссертационного совета МГУ.03.01 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 12, Биологический факультет, ауд. М1.

E-mail: mgu.03.01.dissovet@gmail.com

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В.Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: http://istina.msu.ru/dissertations/412383462/

Автореферат разослан «9» декабря 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук Т.В. Комарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Понимание механизмов флоэмного транспорта различных классов РНК является одним из ключевых вопросов изучения регуляции роста и развития растений, их ответа на различные биотические и абиотические стрессы, а также изучения распространения вирусной инфекции. Поскольку считается, что РНК попадают во флоэму и находятся в ней в составе рибонуклеопротеидных комплексов (Kehr & Kragler, 2018; Tolstyko et al., 2020), одним из основных направлений изучения флоэмного транспорта РНК в растениях является поиск, выявление и характеризация таких комплексов и отдельных белков, их составляющих, а также выявление специфичности таких транспортных комплексов или отдельных белков по отношению к транспортируемой РНК.

Степень проработанности темы

К моменту написания данной работы в достаточной мере были охарактеризованы два флоэмных рибонуклеопротеидных комплекса, обнаруженных во флоэме *Cucurbita maxima*. Это многокомпонентный комплекс на основе белка CmRBP50 (Ham et al., 2009), ответственный за перенос ряда мРНК с полипиримидиновым трактом в своём составе, а также комплекс, включающий белок PSRP1, участвующий в транспорте коротких некодирующих РНК (Yoo et al., 2004). Очевидно, однако, что набор транспортируемых за счёт данных комплексов транскриптов является достаточно ограниченным, в то время как благодаря транскриптомным исследованиям известно о наличии во флоэме практически всех основных типов РНК (Kehr & Kragler, 2018; Tolstyko et al., 2020). Следовательно, состав комплексов, ответственных за попадание во флоэму и транспорт большей части присутствующих во флоэме РНК, ещё предстоит определить. Кроме того, известно несколько отдельных флоэмных белков, для которых показана способность связывать РНК (CmPP2, CmLec17, CmPP16, CmeIF5A), однако функциональное значение данного свойства этих белков ещё не установлено.

Цель данной работы – поиск и идентификация предполагаемых РНК-связывающих белков флоэмы *C. maxima*, а также экспериментальное подтверждение и анализ их способности к взаимодействию с нуклеиновыми кислотами.

Задачи работы:

1. Аффинная очистка РНК-связывающих белков из флоэмного экссудата *C. maxima*
2. Идентификация и клонирование последовательностей, кодирующих выявленные РНК-связывающие белки
3. Получение рекомбинантных белков и экспериментальное подтверждение их способности взаимодействовать с РНК

4. Исследование характера и эффективности взаимодействия белков с РНК-субстратами различных типов
5. Проверка потенциальной способности взаимодействовать с РНК у ортологов выявленных РНК-связывающих белков из других организмов
6. Поиск участков, ответственных за взаимодействие с РНК

Научная новизна

В данной работе выявлена неизвестная ранее способность взаимодействовать с РНК у флоэмного серпина *C. maxim*a (CmPS1) и его ортолога из *A. thaliana* (AtSerpin1), и таким образом впервые показано наличие способности связывать РНК у белков из суперсемейства серпинов. Впервые охарактеризована субстратная специфичность связывания РНК белком CmPS1 и показано эффективное взаимодействие CmPS1 с тРНК. Получены данные о субклеточной локализации CmPS1 в клетках *N. benthamiana*.

Научная значимость

Результаты данной работы имеют фундаментальное значение и позволяют пересмотреть функциональную роль флоэмных серпинов растений, предположить их возможное участие в регуляторных путях, связанных с фрагментацией тРНК, а также новый способ регуляции ингибиторной активности серпинов. Кроме того, отсутствие структурного сходства CmPS1 с какими-либо известными РНК-связывающими доменами белков вкупе с его подтверждённой способностью к РНК-связыванию создают основу для будущих исследований нового типа РНК-связывающего белкового домена.

Личный вклад автора

Диссертационная работа основана на собственных данных, полученных соискателем в период с 2016 по 2021 гг. Соискатель проводил анализ имеющейся литературы, проводил эксперименты, обработку и интерпретацию полученных данных, принимал участие в подготовке статей к публикации, а также написал диссертационную работу.

Методология и методы исследования

Исследования выполнены с использованием современных методов молекулярной биологии и генетической инженерии в системах *in vitro* и *in vivo*. В ходе работы был создан ряд конструкций для получения рекомбинантных белков или использования в качестве матриц для транскрипции *in vitro*, с помощью чего, в свою очередь, были получены РНК-субстраты и биотинилированнный РНК-зонд для хроматографического выделения РНК-связывающих белков из флоэмы C. maxima. Выявление и анализ РНК-связывающей способности белков проводились с помощью экспериментов по связыванию *in vitro* и сдвигу в геле. Данные о субклеточной локализации CmPS1 в клетках *N. benthamiana* были получены с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии.

Масс-спектрометрический анализ был выполнен М.В. Серебряковой.

Микротермофорез проводился совместно с Петербургским институтом ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт».

Секвенирование плазмид для проверки генетических конструкций было выполнено в ЦКП «Геном».

Секвенирование (NGS) тРНК для анализа селективности связывания было выполнено в ЗАО «Геноаналитика».

Положения, выносимые на защиту

1. Впервые обнаружено, что флоэмные серпины тыквенных и капустных растений (CmPS1 и AtSerpin1) обладают способностью связывать *in vitro* РНК, имеющие выраженную вторичную структуру.
2. Оба белка обладают высоким сродством к молекулам тРНК и формируют с ними специфический комплекс.
3. Обнаружено высокоаффинное связывание предшественника растительной микро-РНК (pre-miR390) белком CmPS1
4. Образование специфических комплексов между РНК и белков серпинов зависит от наличия неспаренных нуклеотидных остатков в составе РНК-дуплекса

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность экспериментов подтверждается их воспроизводимостью в нескольких повторностях, использованием контролей, а также хорошей согласуемостью различных экспериментов между собой и с литературными данными. По теме диссертационной работы опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 96 страницах, содержит 2 таблицы и 16 рисунков и состоит из следующих разделов: список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, выводы, и список литературы.

РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

1. Аффинное выделение и идентификация флоэмных РНК-связывающих белков

Для поиска и идентификации новых флоэмных РНК-связывающих белков был применен следующий методический подход. Полученный путём Т7-транскрипции *in vitro* с добавлением модифицированного нуклеотид-трифосфата (biotin-11-CTP) биотинилированный РНК-зонд инкубировался со стрептавидин-агарозой. Далее, к стрептаведин-агарозе с иммобилизованными транскриптами был добавлен флоэмный экссудат *Cucurbita maxima*. Кроме того, в смесь также была введена небиотинилированная РНК для уменьшения доли неспецифических РНК-связывающих белков, связавшихся с РНК-зондом. После инкубации в сочетании с перемешиванием, стрептаведин-агароза была тщательно промыта, а затем ресуспендирована и прокипячена в Laemmli sample buffer для элюции белков и последующего электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях.

В качестве РНК-зонда использовался биотинилированный транскрипт гена трансляционно-контролируемого опухолевого белка растений (TCTP), полученный *in vitro* на матрице конструкции pBSCII-SK(+)[TCTP]. Такой выбор РНК-зонда обусловлен тем, что ранее было достоверно показано, что мРНК TCTP накапливается во флоэме и является транспортируемой (Thieme et al., 2015; Toscano-Morales et al., 2014). Для эксперимента был использован фрагмент с первого по 234-ый нуклеотид белок-кодирующей последовательности мРНК TCTP *A. thaliana* (Рис. 1A). Он включает в себя область, для которой показано содержание остатков 5-метилцитозина, а также необходимость её наличия для флоэмного транспорта (Yang et al., 2019). Для нуклеотидов 1-234 кодирующей области TCTP *A. thaliana* было предсказано образование стабильной вторичной структуры (Рис. 1B) (Lezzhov et al., 2019). Также, для частичного удаления неспецифических РНК-связывающих белков, путём транскрипции *in vitro* на матрице конструкции pBSCII-SK(+)[GFP] был получен небиотинилированный транскрипт гена зелёного флуоресцирующего белка, соответствующий его белок-кодирующей последовательности.

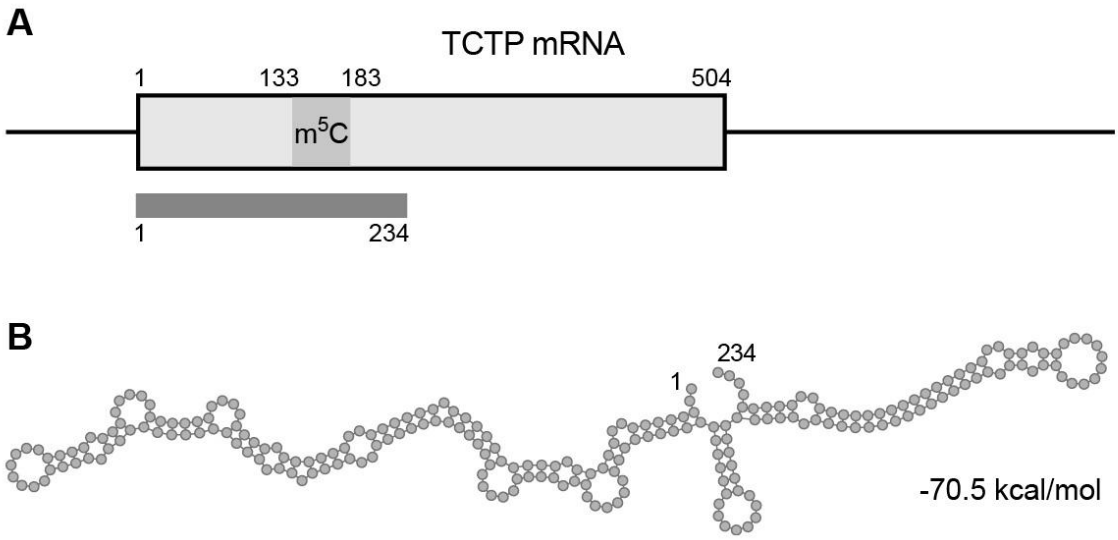

Рисунок 1. (А) Положение участка 1-234 мРНК TCTP. Белок-кодирующая область обозначена светло-серым прямоугольником, внутри которого серым цветом отмечена содержащая остатки 5-метилцитозина область 133-183. Сам участок 1-234 TCTP обозначен тёмно-серым прямоугольником. Некодирующие области обозначены линиями. (В). Предсказанная вторичная структура транскрипта 1-234 TCTP.

Таким образом, при инкубации с экссудатом опытный образец содержал смесь биотинилированного транскрипта 1-234 TCTP и небиотинилированного транскрипта GFP. В качестве контроля использовалась аналогичная смесь, где оба варианта транскриптов были небиотинилированы. При анализе полученных белков с помощью денатурирующего ПААГ, в дорожке контрольного образца не было обнаружено белковых полос, тогда как в случае присутствия биотинилированных РНК было замечено семь дискретных полос (Рис. 2). Каждая из полос была проанализирована с помощью масс-спектрометрии. Две из семи полос соответствовали флоэмному белку *C. maxima* PP2, ранее охарактеризованному как неспецифический РНК-связывающий белок (Fierro-Monti & Mathews, 2000; Gómez et al., 2005; Gomez & Pallas, 2004; Gómez & Pallás, 2001; Owens et al., 2001; Pallas & Gómez, 2013; Walia et al., 2015). Анализ других трёх полос выявил, что они соответствуют флоэмному серпину-1 *C. maxima* (CmPS1, номер NCBI AF284038). Наконец, две последние полосы соответствовали не охарактеризованному ранее белку *C. maxima* с молекулярной массой 12 кДа (NCBI FG227449), которому было дано название CmPP12. CmPS1 был ранее описан как ингибитор сериновых протеаз (Yoo et al., 2000), также было показано, что его ортолог из огурца (*Cucumis sativus*) способен к дальнему транспорту по флоэме (Petersen et al., 2005). В свою очередь, CmPP12 демонстрирует сходство последовательностей с цистатинами, ингибиторами цистеиновой протеазы (данные не приведены).

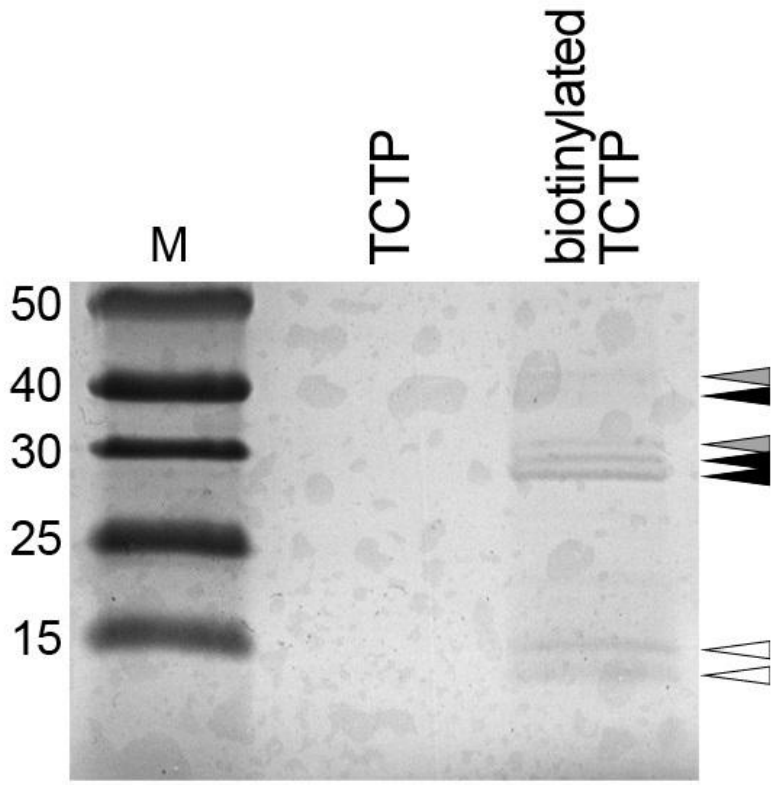

Рисунок 2. Аффинное выделение РНК-связывающих белков из флоэмного сока *C. maxima*. Полосы, соответствующие CmPP2, CmPS1 и CmPP12 обозначены треугольниками серого, чёрного и белого цветов, соответственно. Значения молекулярных масс полос маркёра выражены в кДА.

2. Способность CmPS1 и CmPP12 к связыванию РНК

Для проверки способности CmPS1 и CmPP12 к связыванию РНК в экспериментах *in vitro* кодирующие последовательности обоих генов были подвергнуты обратной транскрипции на тотальной РНК *C. maxima*, амплифицированы и клонированы в плазмидные векторы для экспрессии в *Escherichia coli* (конструкции pET33b(+)[CmPS1] и pQE30[CmPP12]). Далее, рекомбинантные белки, несущие дополнительную последовательность из шести остатков гистидина, были выделены из лизатов бактериальных клеток на Ni-NTA агарозе и ренатурированы с помощью диализа. Способность белков к связыванию РНК была проверена в экспериментах по сдвигу в геле с использованием небиотинилированных транскриптов 1-234 TCTP. РНК инкубировались с варьируемыми количествами рекомбинантного белка, после чего образцы анализировались с помощью электрофореза в неденатурирующем агарозном геле с добавлением бромида этидия для визуализации РНК.

Инкубация транскриптов 1-234 TCTP с CmPP12 не привела к каким-либо изменениям в подвижности РНК даже при молярном соотношении белок:РНК 200:1 (Рис. 3А), что свидетельствует о вероятном отсутствии способности к связыванию РНК у рекомбинантного

CmPP12. Инкубация тех же транскриптов с CmPS1, напротив, привела к постепенному (градиентному) снижению подвижности РНК в геле, а также к появлению РНК-содержащих комплексов, неспособных войти в гель (Рис. 3B). Образование таких малоподвижных комплексов можно объяснить способностью анализируемого белка кооперативно связывать РНК, что подразумевает под собой его гомологические взаимодействия. В случае CmPS1 появление таких комплексов согласуется с известной способностью серпинов к образованию мультимеров (Chang et al., 2008; Devlin et al., 2002; Huntington et al., 2009; Kim & Yu, 1996; Yamasaki et al., 2008, 2011), что может происходить при увеличении концентрации белка в образцах. Таким образом, можно заключить, что в использованных для эксперимента условиях CmPS1 (но не CmPP12), способен связывать РНК 1-234 TCTP. При этом, поскольку у CmPP12 не было выявлено способности к связыванию РНК, можно предположить, что он мог быть детектирован как составляющий элемент связанного с биотинилированной РНК комплекса.

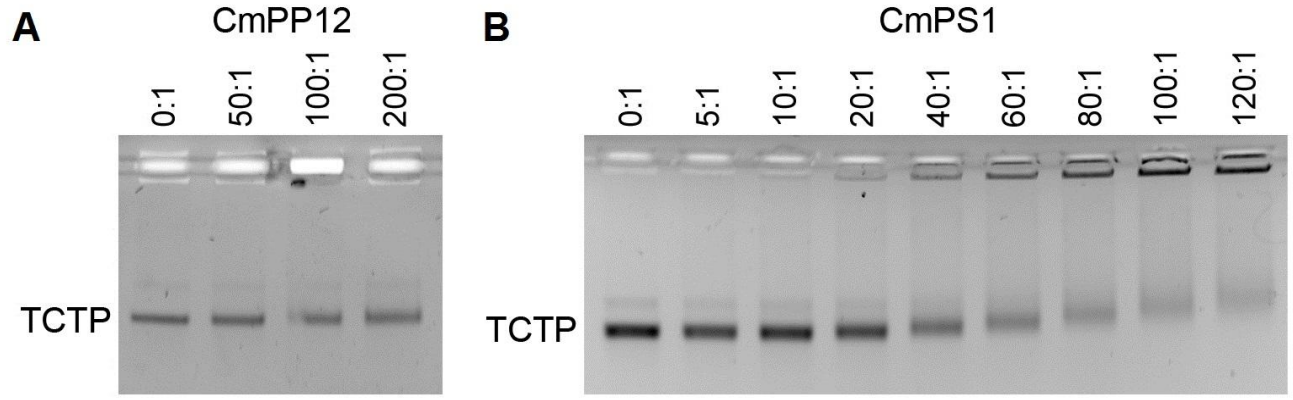

Рисунок 3. Анализ РНК-связывающей активности белков CmPP12 и CmPS1 методом сдвига в геле. Рекомбинантные белки CmPP12 (A) и CmPS1 (B) инкубировали с транскриптом 1-234 TCTP. Молярные соотношения белок:РНК показаны над снимками гелей.

3. Связывание CmPS1 с различными субстратами

Для исследования специфичности связывания РНК рекомбинантным CmPS1 были проведены эксперименты по сдвигу в геле с использованием ряда различных субстратов, которые включали транскрипт кодирующей области мРНК зеленого флуоресцирующего белка (GFP) (одноцепочечная РНК GFP); двуцепочечная РНК фрагмента кодирующей области GFP длиной 570 нуклеотидов (двуцепочечная РНК GFP), а так же ПЦР-продукт фрагмента GFP длиной 620 пар оснований (двуцепочечная ДНК GFP). Инкубация CmPS1 с одноцепочечной РНК GFP привела к образованию неспособных войти в гель комплексов, появившихся в образцах с молярным соотношением белок:РНК 20:1 и выше. Однако даже при соотношении 200:1 большая часть РНК сохраняла свою подвижность в геле (Рис. 4A). Аналогичная картина взаимодействия наблюдалась и для двуцепочечной РНК GFP с единственным отличием в

появлении подвижных в геле комплексов, которые наблюдались при бóльших (по сравнению с транскриптом 1-234 TCTP) молярных соотношениях белок:РНК, а также в меньшей степени теряли подвижность в геле (Рис. 4B). Наконец, взаимодействие CmPS1 с дцДНК проявилось достаточно слабо, с образованием лишь небольших количеств неспособных войти в гель комплексов при соотношениях белок: РНК 100:1 и 200:1 (Рис. 4C).

Поскольку для одноцепочечного транскрипта GFP (Рис. 4A) не наблюдалось такого градиентного снижения подвижности РНК, как в случае транскрипта TCTP (Рис. 3B), можно было предположить, что образование подвижных в геле комплексов зависит от отсутствующих в транскрипте GFP специфических особенностей РНК TCTP, таких как, например, выраженная протяженная шпилечная вторичная структура (Рис. 1B). При рассмотрении результатов эксперимента с двуцепочечными РНК, следует учитывать, что такие субстраты являются искусственными для CmPS1, поскольку полные РНК-дуплексы большой длины отсутствуют в растительных клетках по причине их фрагментации системой РНК-сайленсинга (Brodersen & Voinnet, 2006). Тем не менее, различия между паттернами связывания в экспериментах с двуцепочечной РНК и ДНК GFP позволяют предполагать, что CmPS1 обладает неспецифическим сродством именно к РНК, а не к ДНК-субстратам. Такое неспецифическое связывание может быть ответственно за образование неспособных проникнуть в гель массивных РНК-белковых комплексов.

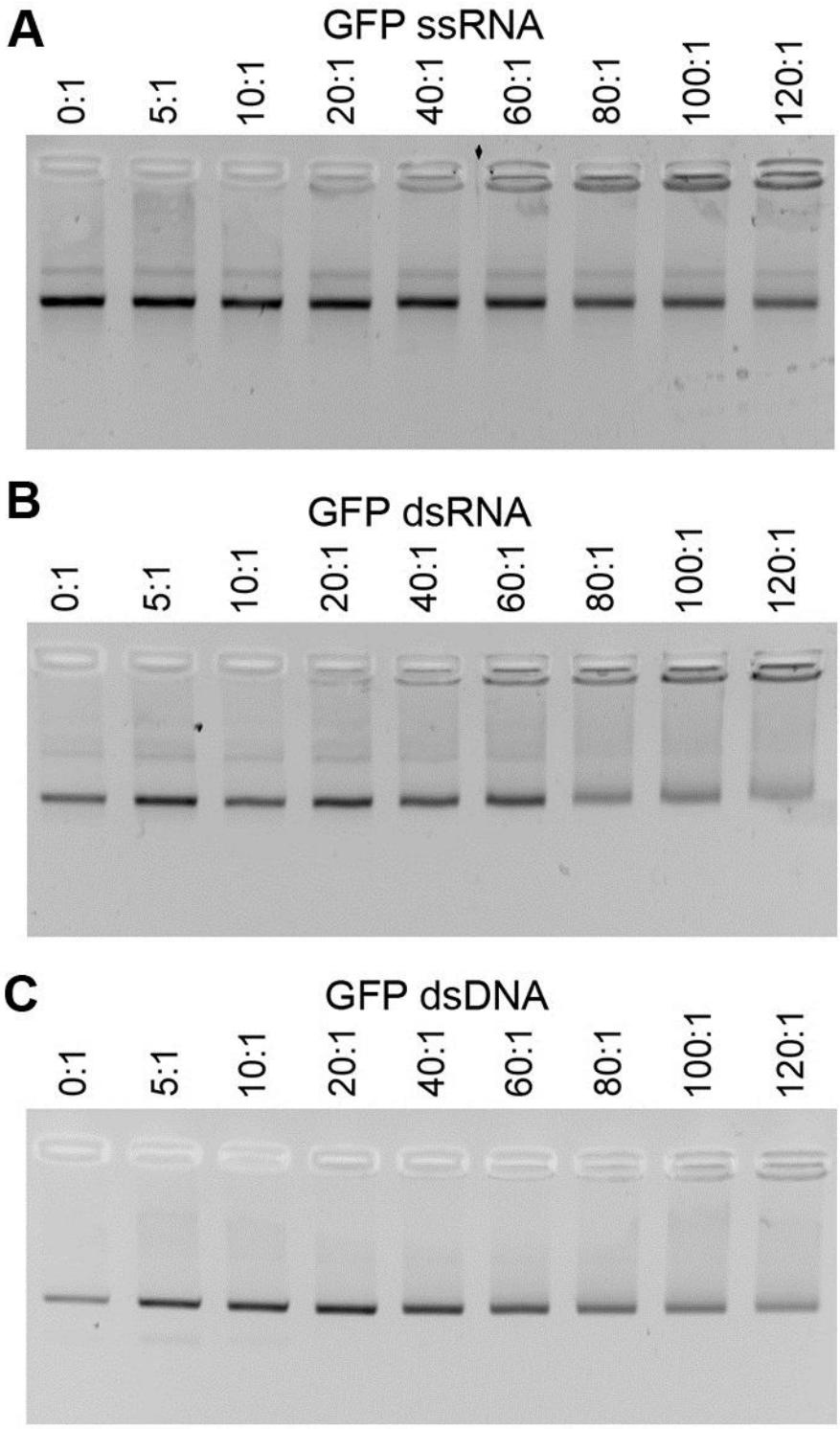

Рисунок 4. Анализ взаимодействия CmPS1 с различными субстратами методом сдвига в геле. Одноцепочечный (A) и двуцепочечный (B) транскрипты GFP, а также ПЦР-продукт последовательности GFP (C) инкубировали с CmPS1. Молярные соотношения белок:РНК показаны над снимками гелей.

Для проверки гипотезы о зависимости образования подвижных в геле комплексов от вторичной структуры РНК были проведены эксперименты по сдвигу в геле с использованием высокоструктурированных РНК: транскрипта PSTVd (Ding, 2010) и препарата тотальной

дрожжевой тРНК. Как и в случае инкубации с 1-234 TCTP, взаимодействие CmPS1 с транскриптом вироида и препаратом тРНК привело к образованию как неподвижных комплексов, так и мигрирующих в геле, наблюдаемых в виде диффузных зон с подвижностью, уменьшающейся при увеличении соотношения белок:РНК (Рис. 5). Следует отметить, что, как отмечалось выше (см. Обзор литературы) тРНК, РНК TCTP и PSTVd способны к транспорту по флоэме (Ding, 2010; Kehr & Kragler, 2018)

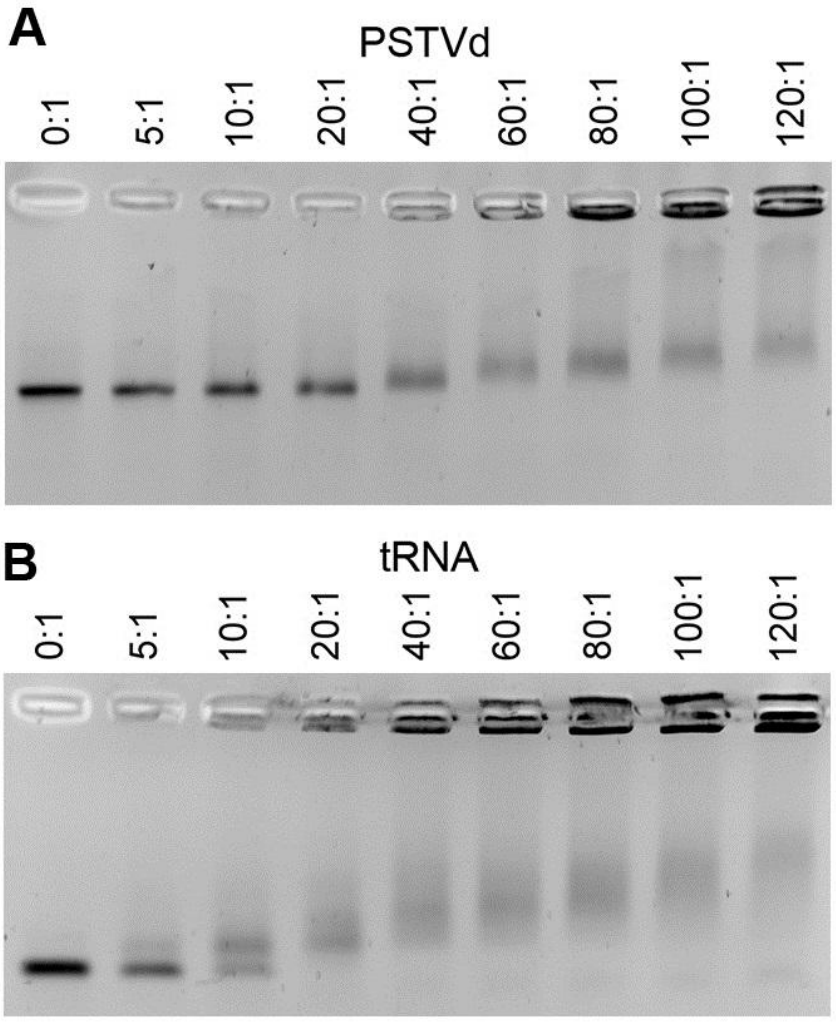

Рисунок 5. Анализ взаимодействия CmPS1 с высокоструктурированными РНК методом сдвига в геле. Транскрипт PSTVd (A) и препарат тотальной дрожжевой тРНК (B) инкубировали с CmPS1. Молярные соотношения белок:РНК показаны над снимками гелей.

Важно отметить, что только в случае тРНК, помимо наблюдаемых как диффузные зоны комплексов, также был обнаружен и комплекс, двигающийся в геле в виде отдельной дискретной полосы. Такой комплекс впервые появлялся при соотношении белок:РНК 5:1, был наиболее заметен при соотношениях 10:1 и 20:1, и исчезал при более высоких соотношениях (Рис. 5B). Можно предположить, что он представляет собой результат специфического

взаимодействия CmPS1 с тРНК, а дискретный размер комплекса отражает наличие определённого стехиометрического соотношения его компонентов. Следует также отметить, что CmPS1 обладает значительно большей аффинностью к тРНК по сравнению с другими использованными РНК-субстратами. В совокупности эти данные указывают на то, что CmPS1: (1) может неспецифично связывать РНК с образованием неспособных войти в гель массивных комплексов; (2) взаимодействует со структурированными РНК с образованием подвижных в геле комплексов; и (3) вероятно, образует специфический комплекс с тРНК.

4. Взаимодействие CmPS1 с растительной тРНК

Для изучения взаимодействия CmPS1 с растительной тРНК, из препарата тотальной РНК *C. maxima* была выделена фракция, обогащённая тРНК. Для её получения к препарату тотальной РНК *C. maxima* был добавлен раствор LiCl до конечной концентрации 2 М. Смесь инкубировалась в течение ночи при 4°C с последующим центрифугированием при 20000 g в течение 15 мин при 4°C для осаждения фракции длинных РНК. После этого к супернатанту был добавлен этанол для последующего осаждения обогащенной тРНК фракции (Рис. 6). Эксперименты по сдвигу в геле с таким субстратом продемонстрировали изменения подвижности, сходные с таковыми для случая дрожжевой тРНК, а именно наличие комплексов, неспособных проникнуть в гель, подвижных комплексы в виде диффузной зоны, а также представленного в виде отдельной полосы комплекса (Рис. 7A). Таким образом, предположительно специфический комплекс CmPS1 с тРНК может быть образован также и с тРНК *C. maxima*. В качестве альтернативного подхода было проанализировано взаимодействие CmPS1 с синтезированным *in vitro* транскриптом тРНК аспарагиновой кислоты *A. thaliana*. Сходным образом, эксперимент по сдвигу в геле выявил наличие характерной дискретной полосы (Рис. 7B) наряду с присутствием других типов комплексов. Это, в свою очередь, показывает, что образование такого предположительно специфического комплекса не требует наличия посттранскрипционных модификаций тРНК, таких как, например, метилирование цитозина.

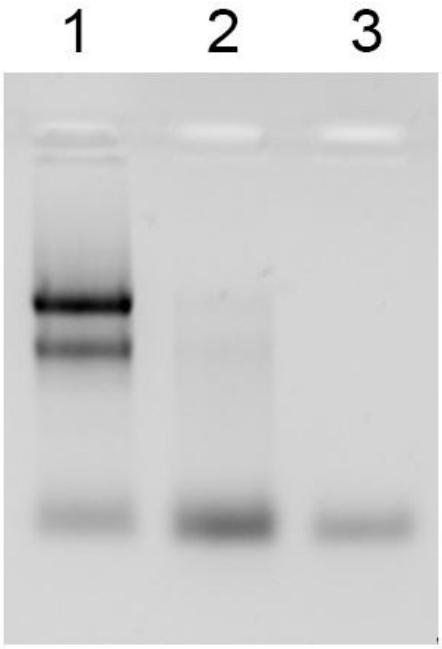

Рисунок 6: Результат получения обогащённой тРНК фракции (2) из препарата тотальной РНК *C. maxima* (1) в сравнении с коммерческим препаратом дрожжевой тРНК (3).

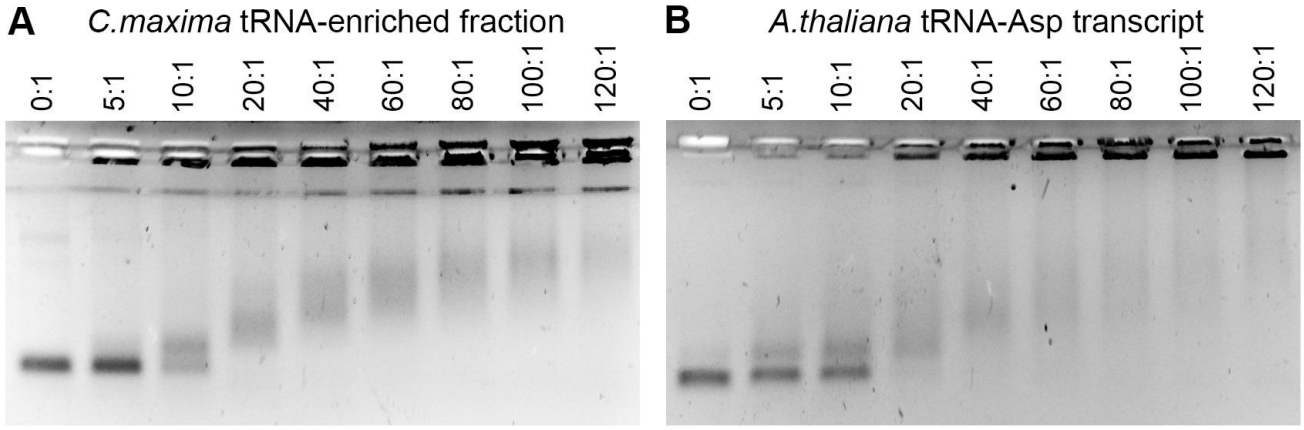

Рисунок 7. Анализ взаимодействия CmPS1 с тРНК растений методом сдвига в геле. тРНК-обогащённый препарат *C. maxima* (A) и транскрипт tRNA-Asp *A.thaliana* (B) инкубировали с CmPS1. Молярные соотношения белок:РНК показаны над снимками гелей.

5. Связывание CmPS1 с вирусными тРНК-подобными структурами

Геномные РНК некоторых вирусов растений имеют 3'-концевые тРНК-подобные структуры (TLS), которые, хотя и достаточно отдалённо структурно схожи с истинными тРНК, способны взаимодействовать с рядом клеточных тРНК-связывающих белков и подвергаться аминоацилированию (Dreher, 2010). Также было показано, что TLS трех вирусов содержат сигналы, обеспечивающие флоэмный транспорт гетерологичной РНК (Lezzhov et al., 2019). Таким образом, представляет интерес изучение наличия и характера взаимодействия CmPS1 с вирусными тРНК-подобными структурами. Для такого рода экспериментов был получен транскрипт, соответствующий 3'-концевым 86 нуклеотидам геномной РНК вируса желтой мозаики турнепса (*Turnip yellow mosaic virus,* TYMV), где целиком находится TLS, а так же два транскрипта, соответствующие 3'-концевой последовательности геномной РНК3 вируса мозаики костра (*Brome mosaic virus,* BMV). Последние содержат последовательность тРНК-подобной структуры BMV либо вместе с расположенным по соседству структурным элементом РНК (Dreher, 2010) (BMV-TLS1), либо без него (BMV-TLS2) и имеют длины 195 и 133 нуклеотида, соответственно. Для всех трёх протестированных TLS-содержащих РНК наблюдались как неспособные войти в гель, так и мигрирующие в геле комплексы (Рис. 8). Тем не менее, не было обнаружено дискретной полосы, характерной для комплекса CmPS1 с истинной тРНК. Результаты этого эксперимента показывают, что необходимые для образования такого комплекса структурные особенности у вирусных TLS отсутствуют.

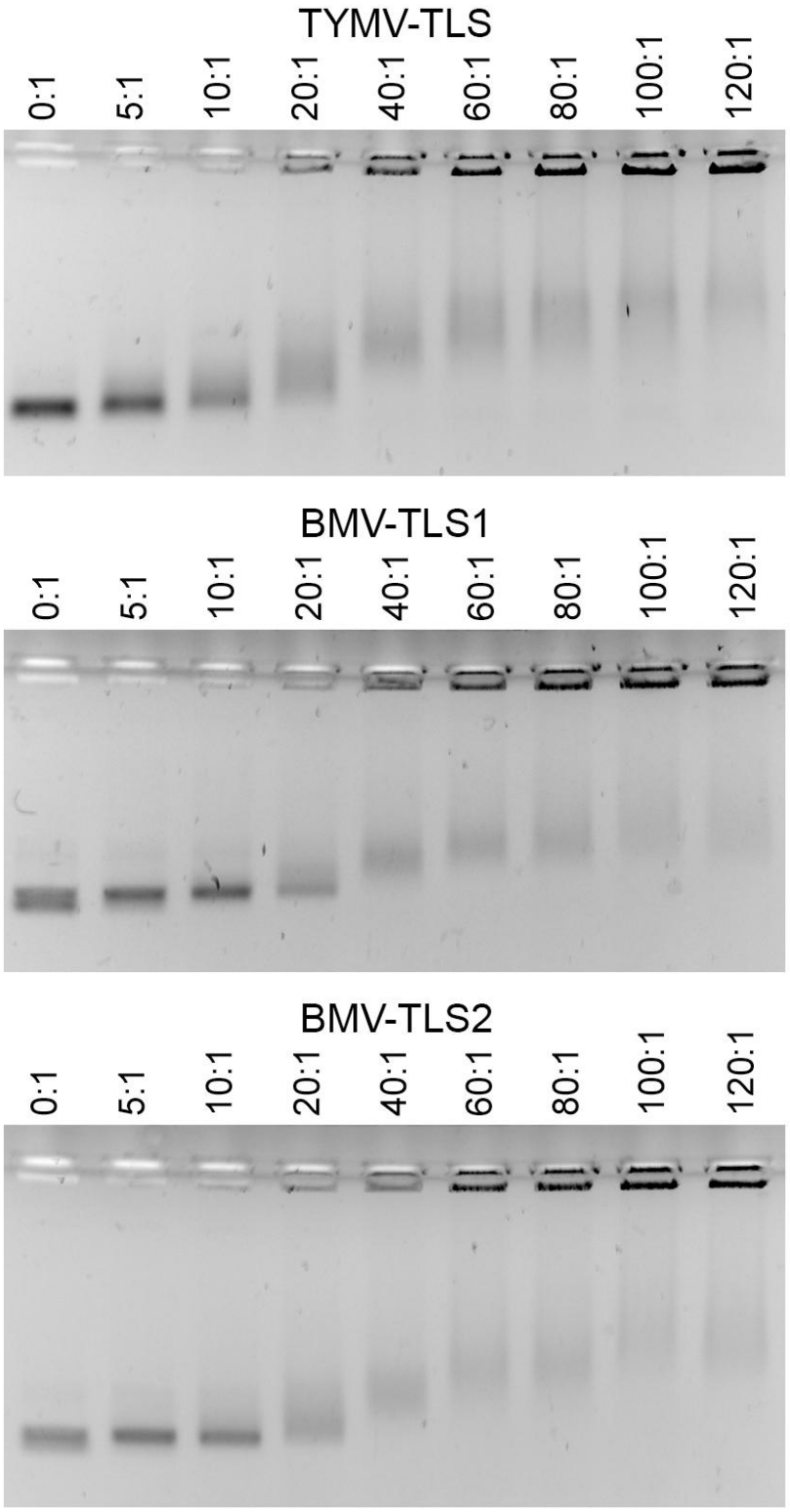

Рисунок 8. Анализ взаимодействия CmPS1 с транскриптами вирусных тРНК-подобных структур методом сдвига в геле. Транскрипты TYMV-TLS, BMV-TLS1 и BMV-TLS2 инкубировали с CmPS1. Молярные соотношения белок:РНК показаны над снимками гелей.

6. Конкурентное ингибирование гепарином связывания CmPS1 с тРНК

У многих серпинов человека и животных известна способность взаимодействовать с гепарином и другими линейными отрицательно заряженными гликозаминогликанами. Связывание гепарина является одним из путей регуляции активности серпина и значительно усиливает способность серпинов к ингибированию протеиназы (Gettins, 2002). Для проверки способности CmPS1 взаимодействовать с гепарином, были проведены эксперименты по конкурентному связыванию, в ходе которых CmPS1 был инкубирован с тРНК и гепарином. Соотношение белок:РНК было фиксировано в двух вариантах, а количество гепарина варьировалось. При соотношении белок:РНК 10:1, в отсутствие гепарина, тРНК обнаруживалась в основном в несвязанной форме, а также в дискретном подвижном комплексе. Гепарин, добавленный при молярном соотношении гепарин:РНК 0,5:1, сильно ингибировал образование комплексов, и дальнейшее увеличение соотношения гепарина к РНК полностью блокировало взаимодействие CmPS1 с тРНК (Рис. 9). При соотношении CmPS1:РНК 40:1 и в отсутствие гепарина тРНК наблюдалась в составе комплексов, неспособных войти в гель, а так же подвижных комплексов в виде диффузных зон. Постепенное увеличение количества гепарина приводило к постепенному изменению картины связывания РНК: доля РНК в неподвижных комплексах уменьшалась, тогда как в подвижных комплексах, наоборот, возрастала (Рис. 9).

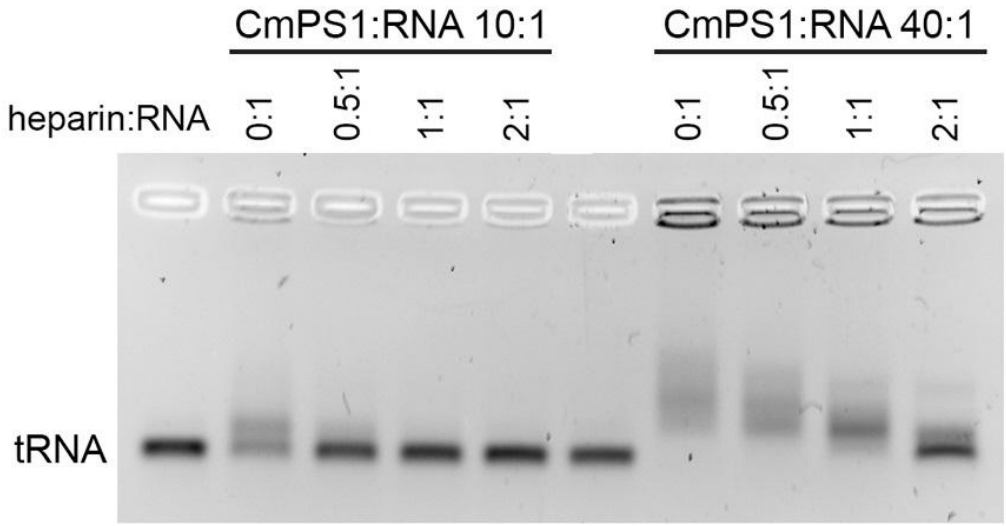

Рисунок 9. Анализ влияние гепарина на взаимодействие CmPS1 с тРНК методом сдвига в геле. CmPS1 инкубировали с дрожжевой тРНК и гепарином. Молярные соотношения белок:РНК и гепарин:РНК показаны над снимками гелей.

Эти данные указывают на наличие конкуренции гепарина с тРНК за CmPS1, свидетельствуя о наличии у CmPS1 способности связывать гепарин, подобно многим белкам из суперсемейства серпинов. Интересно, что при молярном соотношении гепарин:РНК 1:1 было

обнаружено значительное количество тРНК в дискретной полосе, соответствующей по размеру предположительно специфичному для взаимодействия CmPS1 с тРНК комплексу (Рис. 9). Можно предположить, что при соотношении белок:РНК 40:1 неспецифическая РНК-связывающая активность CmPS1 преобладает над образованием специфических комплексов из-за избытка белка в реакции, тогда как добавление гепарина в эквимолярном с РНК количестве ингибирует преимущественно неспецифическое связывание РНК, не препятствуя образованию специфических комплексов. Эти данные хорошо согласуются с моделью, предполагающей, что CmPS1 обладает двумя типами РНК-связывающей активности: сильным специфическим связыванием с тРНК, которое проявляется преимущественно при малых соотношениях белка и РНК, а так же слабое неспецифическое связывание, преобладающее в условиях избытка белка.

7. Способность к связыванию РНК у человеческого антитромбина-III

Способность к связыванию РНК не была ранее известна у белков из семейства серпинов, включающего в себя хорошо охарактеризованные белки человека. Поиск по аминокислотной последовательности CmPS1 с помощью BLAST показал, что среди белков человека наиболее схожим с CmPS1 является антитромбин-III (HsAT-III; номер NCBI NP_001351981.1; с e-value = 4e-55; 33% идентичности) (Рис. 10A). Моделирование трёхмерной структуры CmPS1 с помощью онлайн-сервиса «I-Tasser» также показало её высокую схожесть с третичной структурой HsAT-III (Данные не приведены). Для проверки способности HsAT-III связывать РНК его кодирующая последовательность аналогичным с CmPS1 образом была клонирована в экспрессионный вектор (конструкция pET33b(+)[HsAT-III]) с последующим получением препарата рекомбинантного белка. Эксперимент по инкубации тРНК с рекомбинантным HsAT-III показал отсутствие какого-либо наблюдаемого изменения подвижности в геле по сравнению с чистой тРНК. При этом небольшое количество РНК всё же было обнаружено в неспособных ко входу в гель комплексах, наблюдавшихся в виде слабых полос при молярных соотношениях белок:РНК 40:1 и 60:1. (Рис. 10B). Аналогичная картина связывания также наблюдалась и для эксперимента с использованием транскрипта PSTVd (Рис. 10C). Полученные результаты свидетельствуют о том, что HsAT-III либо не имеет способности к связыванию РНК, либо эта способность крайне слабо выражена в использованных для эксперимента условиях, и позволяют предполагать, что способность к РНК-связыванию является специфичной для серпинов растений (или уникальна для CmPS1).

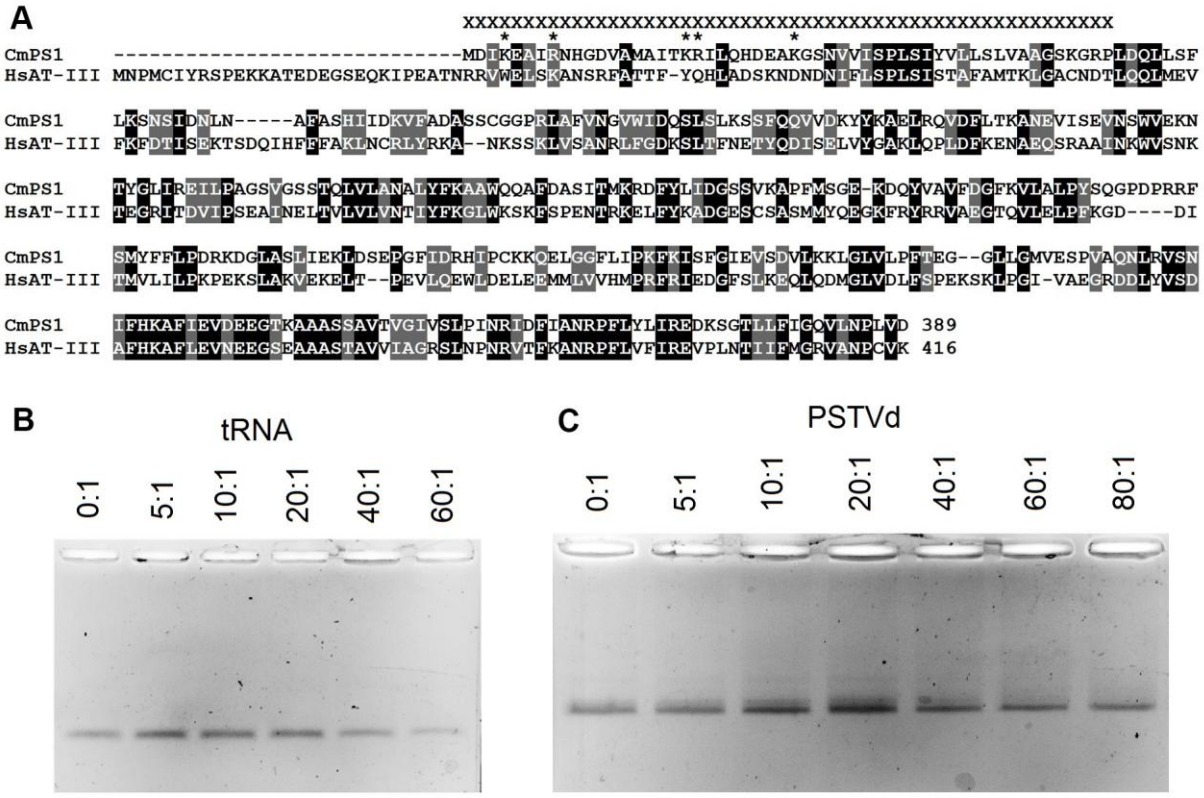

Рисунок 10. (A) Сравнение последовательностей CmPS1 и HsAT-III. (B, C) Анализ РНК-связывающей активности HsAT-III методом сдвига в геле. Рекомбинантный белок инкубировали с препаратом дрожжевой тРНК (B) и транскриптом PSTVd (C). Молярные соотношения белок:РНК показаны над снимками гелей.

8. Способность к связыванию РНК у серпина *A. thaliana*

Для того чтобы проверить, является ли способность связывать РНК уникальной для CmPS1 или серпинов тыквенных, белок-кодирующая последовательность ближайшего ортолога CmPS1 из *A. thaliana* (AtSerpin1) была клонирована в экспрессионный вектор (конструкция pET33b(+)[AtSerpin1]) с последующим получением препарата рекомбинантного белка. Эксперименты по сдвигу в геле с использованием AtSerpin1 и синтезированных *in vitro* транскриптов 1-234 TCTP и PSTVd, а также препарата дрожжевой тРНК продемонстрировали картину, имеющую значительные различия с результатами аналогичных экспериментов с использованием CmPS1 (Рис. 11). В частности, у AtSerpin1 отсутствуют наблюдаемые в виде диффузных зон и неспособные к входу в гель комплексы, характерные для предположительно неспецифического типа связывания РНК белком CmPS1. Отсутствие неспособных к входу в гель комплексов во всех случаях согласуется с данными о том, что AtSerpin1 не образует высокомолекулярных комплексов в растениях (Lampl et al., 2010). Вместе с тем, образование характерного для связывания с тРНК комплекса в виде дискретной полосы по-прежнему наблюдается. Эти результаты говорят в пользу предположения о том, что способность

связывать РНК специфически не является уникальной особенности CmPS1 и может быть присуща серпинам растений в целом.

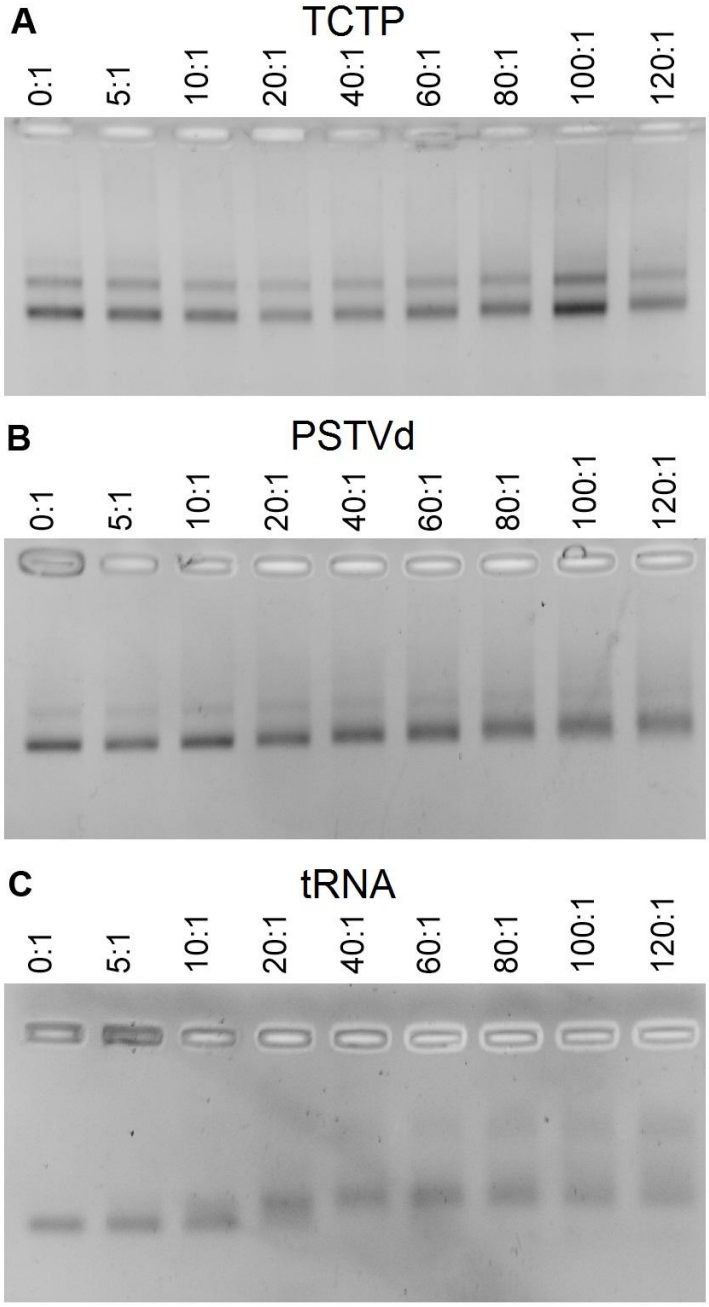

Рисунок 11. Анализ РНК-связывающей активности AtSerpin1 методом сдвига в геле. Рекомбинантный белок инкубировали с транскриптами 1-234 TCTP (A), PSTVd (B) и препаратом дрожжевой тРНК (C). Молярные соотношения белок:РНК показаны над снимками гелей.

9. Оценка константы диссоциации серпина *A. thaliana*

Для дополнительного подтверждения способности AtSerpin1к связыванию тРНК, а также оценки величины константы диссоциации, комплексы AtSerpin1 с репортерным тРНК-субстратом (Bpy-Met-tRNA^{fMet}) анализировали методом микротермофореза. В соответствии с увеличением концентрации белка наблюдалось уменьшение величины падения уровня

флуоресценции при включении ИК-лазера (см. рис. 12), что, в свою очередь, означает уменьшение подвижности репортерной тРНК по причине образования комплексов с белком. При этом полученные в экспериментах с термофорезом кривые зависимости изменения флуоресценции от концентрации лиганда имеют точку перегиба, по которой можно оценить константу диссоциации комплекса этого лиганда с репортерной молекулой (DS et al., 2020; M et al., 2018). Таким образом, аффинность взаимодействия AtSerpin1 с (Bpy-Met-tRNA^{fMet}) оценивается в микромолярном диапазоне (Кд = 3,9 ± 2,9 мкМ), что соизмеримо со сродством инициаторного фактора трансляции IF2 к инициаторной Bpy-Met-tRNA^{fMet} (DS et al., 2020). Однако, полученное значение необходимо рассматривать лишь как нижнюю оценку ввиду недостаточного выхода кривой в насыщение относительно количества белка.

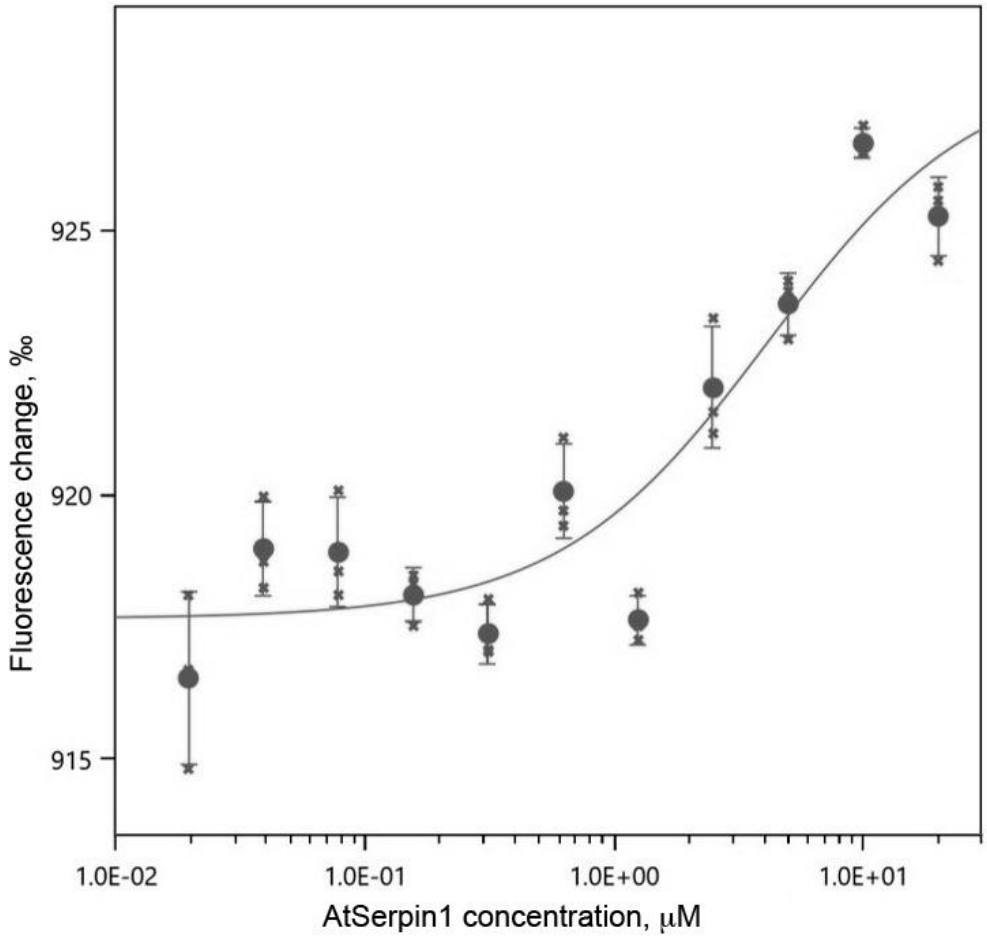

Рисунок 12. Микротермофорез комплексов AtSerpin1 с тРНК. На графике приведена зависимость уровня остаточной флуоресценции после включения ИК-лазера от концентрации AtSerpin1. Для каждой концентрационной точки приведены результаты по трём повторностям (крестики), а также их усреднённое значение (точки).

10. Роль N-концевого домена CmPS1 в связывании РНК

Обладающий способностью к связыванию РНК CmPS1 и не имеющий такой способностью HsAT-III довольно схожи и демонстрируют значительную степень идентичности аминокислотной последовательности в центральной и С-концевой областях, тогда как N-концевая область консервативна в меньшей степени, будучи разной как по длине, так и по составу последовательности (Рис. 10А). Таким образом, можно предположить, что способность CmPS1 связывать РНК может быть связана с особенностями его N-концевой области. Для проверки данного предположения были сконструированы два мутантных варианта серпина: pET33b(+)[CmPS1-mutN], где пять положительно заряженных остатков в N-концевой области были заменены остатками Ser и Gly (Lys изменены на Ser, Arg на Gly, позиции замен обозначены на Рис. 10А), и pET33b(+)[CmPS1-delN] с делецией 54 N-концевых остатков. Мутантные белки были наработаны в бактериальных клетках, очищены и использованы для экспериментов по связыванию РНК. Для обоих мутантных вариантов эксперименты по сдвигу в геле продемонстрировали паттерны связывания тРНК, схожие с таковым для белка CmPS1 дикого типа: комплексы, неспособные к входу в гель, подвижные в геле комплексы, а также дискретная полоса предположительно специфического комплекса CmPS1 с тРНК (Рис. 13). Таким образом, можно сделать вывод, что в связывании РНК N-концевая область CmPS1 не участвует.

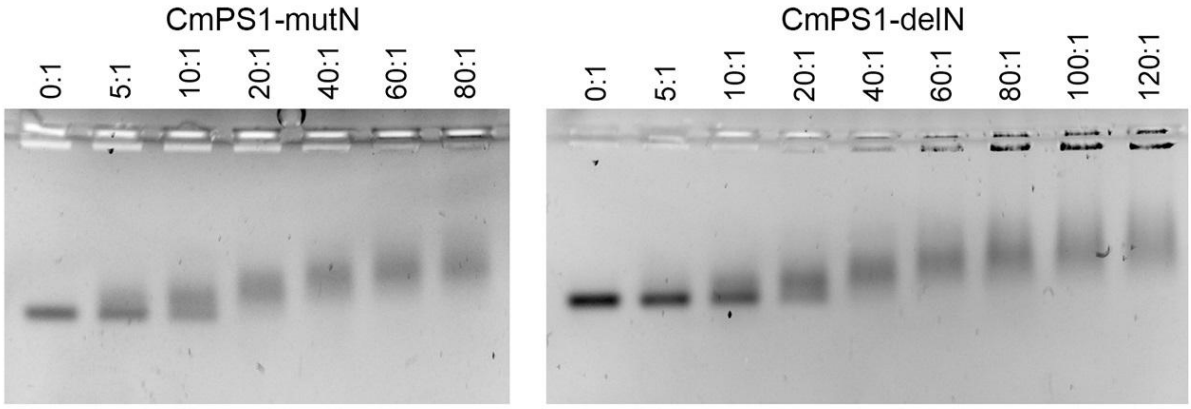

Рисунок 13. Анализ РНК-связывающей активности мутантных вариантов CmPS1 методом сдвига в геле. Мутантные белки с заменой положительно заряженных остатков в N-концевой области (mutN) и с делецией N-концевой области (delN) инкубировали с препаратом дрожжевой тРНК. Молярные соотношения белок:РНК показаны над снимками гелей.

11. Селективность связывания тРНК CmPS1

Для анализа возможной селективности связывания определённых тРНК тыквенным серпином, белок был инкубирован с обогащённой тРНК фракцией тотального препарата РНК *C. maxima*, после чего образовавшиеся комплексы были выделены из смеси с помощью

электрофореза. Полоса, соответствующая предположительно специфическому комплексу тРНК с белком, была вырезана из агарозного геля. Далее содержащаяся в составе комплекса РНК была очищена. Полученный образец вместе с эквивалентным количеством исходного препарата обогащённой тРНК фракции были просеквенированы с помощью NGS, после чего были посчитаны соотношения количества чтений, приходящиеся на каждую из обнаруженных последовательностей тРНК. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1: Анализ селективности связывания тРНК рекомбинантным CmPS1.

тРНК	Число чтений (опыт)	Число чтений (контроль)	Отношение количеств чтений опыта и контроля	Процентная доля от общего числа чтений (опыт)	Процентная доля от общего числа чтений (контроль)	Отношение процентных долей опыта и контроля
TRNAA-CGC	14052	9050	1.55	2.73%	0.94%	2.92
TRNAC-GCA	29792	24615	1.21	5.79%	2.54%	2.28
TRNAT-GGU	3529	3218	1.10	0.69%	0.33%	2.06
TRNAL-AAG	385	394	0.98	0.07%	0.04%	1.84
TRNAA-UGC	23703	25106	0.94	4.60%	2.59%	1.77
TRNAA-AGC	21310	22757	0.94	4.14%	2.35%	1.76
TRNAP-CGG	167	182	0.92	0.03%	0.02%	1.72
TRNAI-UAU	170	187	0.91	0.03%	0.02%	1.71
TRNAT-CGU	829	930	0.89	0.16%	0.10%	1.68
TRNAS-AGA	2335	2622	0.89	0.45%	0.27%	1.67
TRNAI-AAU	121	139	0.87	0.02%	0.01%	1.64
TRNAL-UAA	173	207	0.84	0.03%	0.02%	1.57
TRNAL-UAG	790	959	0.82	0.15%	0.10%	1.55
TRNAV-CAC	193	242	0.80	0.04%	0.03%	1.50
TRNAP-UGG	5348	6810	0.79	1.04%	0.70%	1.48
TRNAV-UAC	102	130	0.78	0.02%	0.01%	1.47
TRNAL-CAG	130	166	0.78	0.03%	0.02%	1.47
TRNAQ-UUG	3805	5093	0.75	0.74%	0.53%	1.40
TRNAN-AUU	565	759	0.74	0.11%	0.08%	1.40
TRNAV-AAC	595	805	0.74	0.12%	0.08%	1.39
TRNAS-UGA	1100	1490	0.74	0.21%	0.15%	1.39
TRNAR-UCU	757	1053	0.72	0.15%	0.11%	1.35
TRNAT-AGU	1231	1716	0.72	0.24%	0.18%	1.35
TRNAP-AGG	960	1365	0.70	0.19%	0.14%	1.32
TRNAR-UCG	233	334	0.70	0.05%	0.03%	1.31
TRNAF-GAA	124557	180465	0.69	24.19%	18.65%	1.30
TRNAS-GCU	3096	4683	0.66	0.60%	0.48%	1.24
TRNAD-GUC	2071	3148	0.66	0.40%	0.33%	1.24
TRNAR-CCG	217	333	0.65	0.04%	0.03%	1.22
TRNAS-CGA	2862	4443	0.64	0.56%	0.46%	1.21
TRNAY-GUA	7083	11168	0.63	1.38%	1.15%	1.19
TRNAG-GCC	3291	5253	0.63	0.64%	0.54%	1.18
TRNAN-GUU	7218	11525	0.63	1.40%	1.19%	1.18
TRNAM-CAU	1399	2370	0.59	0.27%	0.24%	1.11
TRNAK-CUU	852	1525	0.56	0.17%	0.16%	1.05
TRNAQ-CUG	6591	11980	0.55	1.28%	1.24%	1.03
TRNAL-CAA	1035	1883	0.55	0.20%	0.19%	1.03
TRNAT-UGU	550	1001	0.55	0.11%	0.10%	1.03
TRNAE-CUC	32537	59670	0.55	6.32%	6.17%	1.03
TRNAR-CCU	788	1517	0.52	0.15%	0.16%	0.98
TRNAW-CCA	1484	2886	0.51	0.29%	0.30%	0.97
TRNAR-ACG	5657	11809	0.48	1.10%	1.22%	0.90
TRNAE-UUC	72527	172034	0.42	14.09%	17.78%	0.79

TRNASTOP-UCA	599	1424	0.42	0.12%	0.15%	0.79
TRNAC-ACA	432	1031	0.42	0.08%	0.11%	0.79
TRNAG-CCC	1211	3218	0.38	0.24%	0.33%	0.71
TRNAK-UUU	3727	10043	0.37	0.72%	1.04%	0.70
TRNAH-GUG	98103	268201	0.37	19.06%	27.71%	0.69
TRNAG-UCC	24551	85815	0.29	4.77%	8.87%	0.54

Полученные данные показывают, что при образовании комплекса CmPS1 с тРНК происходит изменение относительно доли присутствующих в препарате тРНК. Так, более чем вдвое увеличивается доля tRNA-A(CGC), tRNA-C(GCA) и tRNA-T(GGU), а доля ряда других тРНК уменьшается (Табл. 1). Вместе с тем, результаты этого эксперимента показывают, что разница в связывании различных видов тРНК белком CmPS1 является количественной, а не качественной, и таким образом может быть отвергнуто предположение о том, что данный белок селективно связывает только какие-то определенные виды тРНК.

12. Связывание pre-miR390 белком CmPS1.

Для проверки гипотезы о специфическом распознавании белком определённых трёхмерных мотивов РНК-субстрата была проведена серия экспериментов по связыванию рекомбинантного CmPS1 с использованием в качестве РНК-лиганда предшественника микро-РНК390 (pre-miR390), который представляет собой несовершенный дуплекс, способный формировать 3Dмотивы за счет присутствия в его составе неспаренных остатков. Помимо этого, в качестве РНК-субстратов были взяты и изменённые (мутантные) варианты pre-miR390: pre-miR390-5M, в котором было введено пять точечных замен, устраняющих некомплементарные нуклеотидные остатки в стебле шпилечной структуры предшественника и превращающие ее в совершенный дуплекс, а также мутант pre-miR390-Loop, в котором был делетирован район, формирующий дистальную часть стебля и петлю вторичной структуры pre-miR390 (см. рис. 14). Картины связывания у неизменённого pre-miR390, а также мутанта pre-miR390-5M оказались схожими между собой и с наблюдаемыми в случае ранее проведённых экспериментов с другими субстратами: 1-234 TCTP и PSTVd. В обоих случаях наблюдались лишь комплексы, неспособные входить в агарозный гель, а также мигрирующие в геле комплексы. В то же время, связывание белка с мутантом pre-miR390-Loop продемонстрировало наличие не только комплексов данных двух типов, но и появление характерной дискретной полосы предположительно специфического комплекса, что ранее наблюдалось только для случаев тРНК или её *in vitro* транскрипта. Такой результат позволяет предполагать, что формирование специфического комплекса требует взаимодействия CmPS1 с 3Dмотивами, формируемыми некомплементарными остатками в стебле шпилечной структуры pre-miR390. При этом данные трёхмерные мотивы, вероятно, недоступны для взаимодействия с белком, т.к.

маскированы в составе природной структуры за счет наличия ее дистального района, включающего петлю, и становятся доступными для взаимодействия с CmPS1 лишь в результате делеции этого района. Для проверки этого предположения был сконструирован дополнительный мутант pre-miR390-5M-Loop, несущий одновременно обе мутации, присутствующие в конструкциях 5M и Loop (рис. 14). Связывание белка CmPS1 с транскриптом такого мутанта показало, что в этом случае дискретный комплекс не образуется (рис. 14), что ясно свидетельствует о роли неспаренных остатков стебля шпилечной структуры pre-miR390 в формировании этого комплекса. Таким образом, специфическое взаимодействие белка CmPS1 с РНК может определяться 3Dмотивами, существующими в РНК за счет некомплементарных нуклеотидных остатков.

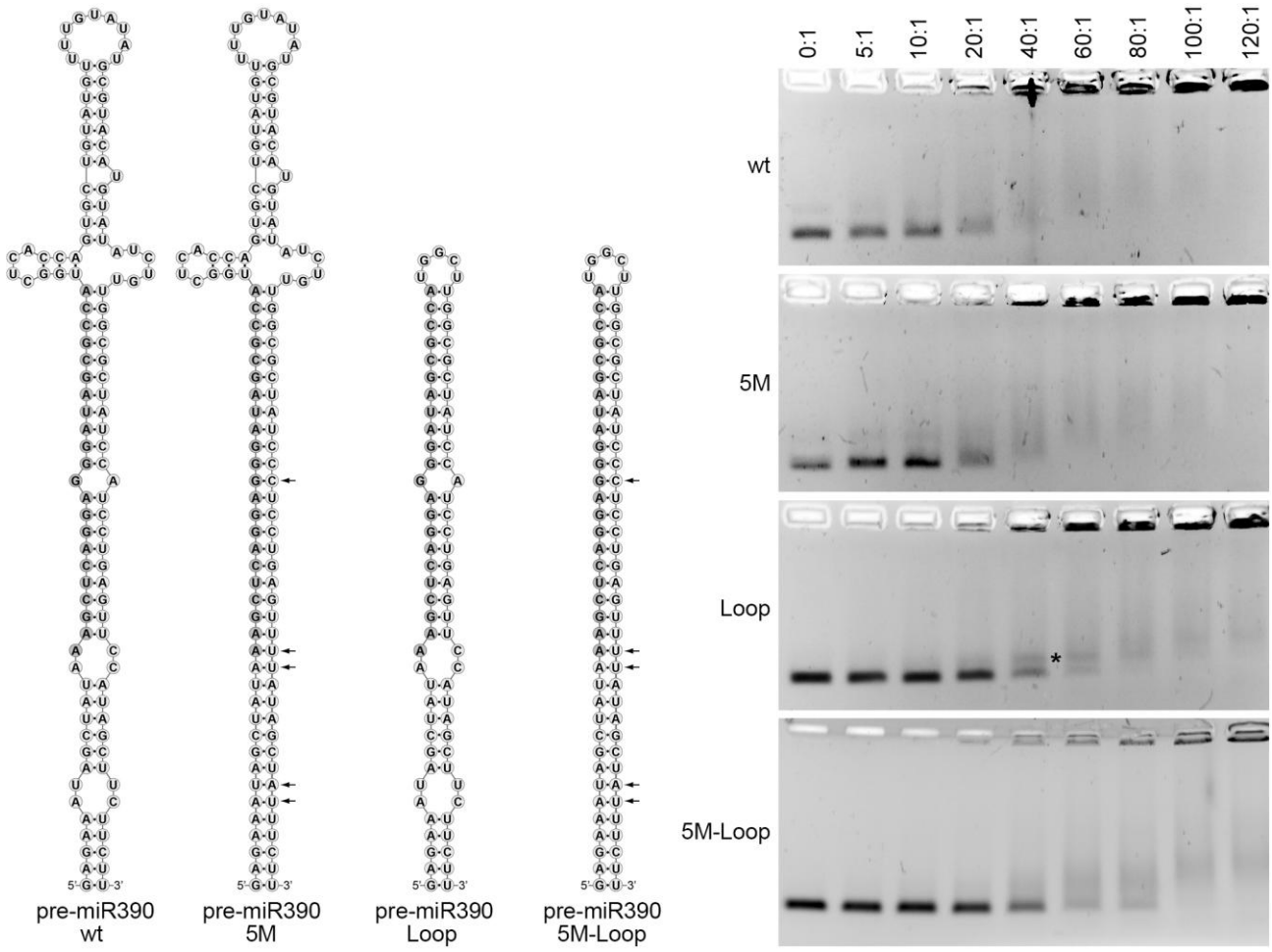

Рисунок 14: Связывание CmPS1 с транскриптом предшественника микро-РНК 390 (pre-miR390 wt) и его мутантными вариантами (5M, Loop, 5M-Loop). Позиции точечных замен неспаренных нуклеотидных остатков в мутантах 5M и 5M-Loop отмечены стрелками.

13. Субклеточная локализация CmPS1

Для изучения внутриклеточной локализации тыквенного серпина была получена конструкция pLH(*)[CmPS1-GFP], где кодирующая последовательность PS1 была слита с последовательностью GFP. На третий день после инфильтрации листа *N. benthamiana* культурой агробактерий, несущей данную конструкцию, проводили конфокальную микроскопию эпидермальных клеток абаксиальной стороны листа (Рис. 15). Полученные результаты свидетельствуют о том, что белок локализован диффузно в пределах цитоплазмы и нуклеоплазмы, при этом не попадая в ядрышко. Такое распределение белка характерно для GFP в клетках растений и говорит о том, что CmPS1 не оказывает какого-либо специфического влияния на локализацию слитого с ним GFP.

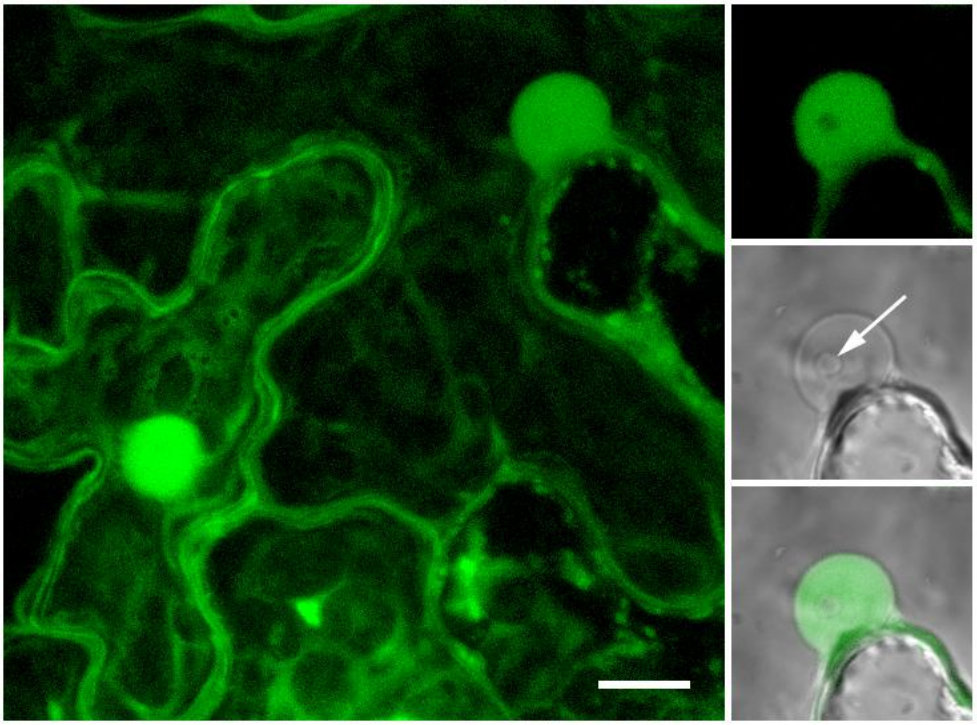

Рисунок 15. Внутриклеточная локализация CmPS1. Проекция максимальной интенсивности, полученная на основе серии оптических срезов, показана слева. Справа приведен один оптический срез в канале флуоресценции GFP (вверху), в проходящем свете (в центре) и их суперпозиции (внизу). Положение ядрышка отмечено стрелкой, масштабная линия соответствует 10 µм.

ВЫВОДЫ

1. Клонированы транслируемые области мРНК и получены препараты белков, кодируемых генами флоэмных серпинов тыквенных и капустных растений (*C. maxima* - CmPS1 и *A. thaliana* - AtSerpin1).
2. Флоэмные серпины CmPS1 и AtSerpin1 обладают способностью связывать *in vitro* РНК, имеющие выраженную вторичную структуру.
3. Оба белка обладают высоким сродством к молекулам тРНК и формируют с ними специфический комплекс.
4. Связывание CmPS1 с тРНК конкурентно ингибируется гепарином и не требует наличия N-концевой области белка.
5. Обнаружено высокоаффинное связывание предшественника растительной микро-РНК (pre-miR390) белком CmPS1
6. Образование специфических комплексов с pre-miR390 белком CmPS1 зависит от наличия неспаренных нуклеотидных остатков в составе РНК-дуплекса лиганда, что объясняет природу высокого сродства изученных серпинов к несовершенным дуплексам РНК, к которым относится и тРНК.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

Соискатель имеет 3 статьи по теме диссертации, опубликованных в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международных системах цитирования и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Список статей, опубликованных по теме диссертации:

1. **Tolstyko, E. A.**, Lezzhov, A. A., Pankratenko, A. V., Serebryakova, M. V., Solovyev, A. G., Morozov, S. Y. (2020) Detection and in vitro studies of Cucurbita maxima phloem serpin-1 RNA-binding properties. Biochimie, 170:118–127. IF_{2021} = 4.079

2. **Tolstyko, E. A.**, Lezzhov, A. A., Morozov, S. Y., Solovyev, A. G. (2020) Phloem transport of structured RNAs: A widening repertoire of trafficking signals and protein factors. Plant Science, 299:110602. IF_{2020} = 3.591

3. **Tolstyko, E. A.**, Chergintsev, D. A., Tolicheva, O. A., Vinogradova, D. S., Konevega, A. L., Morozov, S. Y., Solovyev, A. G. (2021) RNA Binding by Plant Serpins in vitro. Biochemistry (Moscow), 86(10):1214-1224. IF_{2020} = 2.487