

УДК 577.1

## НАДМОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ФИБРИЛЛ Hfq-ПОДОБНЫХ БЕЛКОВ\*

© 2015 В.Н. Мурина<sup>1\*\*</sup>, О.М. Селиванова<sup>1</sup>, А.О. Михайлина<sup>1</sup>,  
А.С. Казаков<sup>2</sup>, Е.Ю. Никонова<sup>1</sup>, Н.В. Леконцева<sup>1</sup>,  
С.В. Тищенко<sup>1</sup>, А.Д. Никулин<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт белка РАН, 142290 Пущино Московской обл.;  
электронная почта: thyrada@rambler.ru

<sup>2</sup> Институт биологического приборостроения РАН, 142290  
Пущино Московской обл.

Поступила в редакцию 28.10.14

Бактериальные белки семейства Hfq являются структурными гомологами архейных и эукариотических Sm/Lsm белков с характерной структурой из пяти-тяжевого β-листа и одной N-концевой α-спирали. Ранее было показано, что архейные Lsm белки (SmAP) способны спонтанно образовывать протяженные фибриллы, в то время как белок Hfq из *Escherichia coli* может их формировать только при определенных условиях. Архитектура этих фибрилл значительно различается, и причина таких различий в упаковке не была найдена. В данной работе исследованы фибриллы, образуемые белком Hfq из *Pseudomonas aeruginosa* и белком SmAP из археи *Methanococcus jannaschii*, имеющими высокую гомологию с белком Hfq из *E. coli*. Обнаружено, что белок Hfq из *P. aeruginosa* образует фибриллы только при заменах в консервативном аминокислотном мотиве Sm2, а белок SmAP из *M. jannaschii* способен их формировать спонтанно. Несмотря на то, что условия образования фибрилл исследованными белками различаются, упаковка гексамеров оказалась аналогичной той, что была предложена для фибрилл Hfq из *E. coli*. Это позволяет предполагать универсальный характер архитектуры фибрилл, образуемых белками Hfq.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** Sm-подобные белки, Hfq, четвертичная структура белков, фибриллы.

Белок Hfq – это посттрансляционный регулятор экспрессии генов, который, связывая малые регуляторные некодирующие РНК, способствует их взаимодействию с матричными РНК [1, 2]. Он принадлежит обширному семейству Sm/Lsm (Sm-like) белков, представители которого найдены в бактериях, археях и эукариотах [3]. Эукариотические Sm и Lsm белки – важные компоненты рибонуклеопротеидных комплексов, которые участвуют в процессинге РНК, включая сплайсинг, деградацию мРНК, образование гистонов, репликацию теломераз [4–5]. Функция архейных Lsm белков до настоящего времени исследована очень слабо [6], однако известно, что они могут связывать малые РНК архей [7].

Белки семейства Sm/Lsm имеют характерную консервативную третичную структуру из N-концевой α-спирали, пяти β-тяжей (Sm домен) и неупорядоченного C-концевого участка переменной длины [8] (рис. 1). Контактируя внеш-

ними тяжами β4 и β5, принадлежащими домену Sm, белки формируют тороидальную четвертичную структуру, состоящую из шести (бактериальные белки Hfq) или семи (архейные SmAP, эукариотические Sm и Lsm белки) мономеров. Такая характерная организация четвертичной структуры Lsm белков нужна, по всей видимости, для специфического связывания небольшим по размеру белком повторяющихся участков однонитевой РНК [9–10]. Sm домен включает в себя два консервативных аминокислотных мотива Sm1 (тяжи β1, β2 и β3) и Sm2 (тяжи β4 и β5), соединенных петлей L4, имеющей длину всего 4 аминокислотных остатков у бактериальных белков Hfq, и ~20 остатков у Lsm белков архей и эукариот [8]. Считается, что петля L4 не оказывает влияние на четвертичную структуру белка [11]. Последовательности Sm1 и Sm2 мотивов консервативны среди всех белков [11–12], однако в бактериях Sm2 мотив имеет строго консервативный консенсус из аминокислотных остатков YKHA, в то время как эукариотические и архейные Lsm белки характеризуются паттерном RGxx [10–11]. Предполагалось, что это различие в первичной структуре Sm2 мотива может

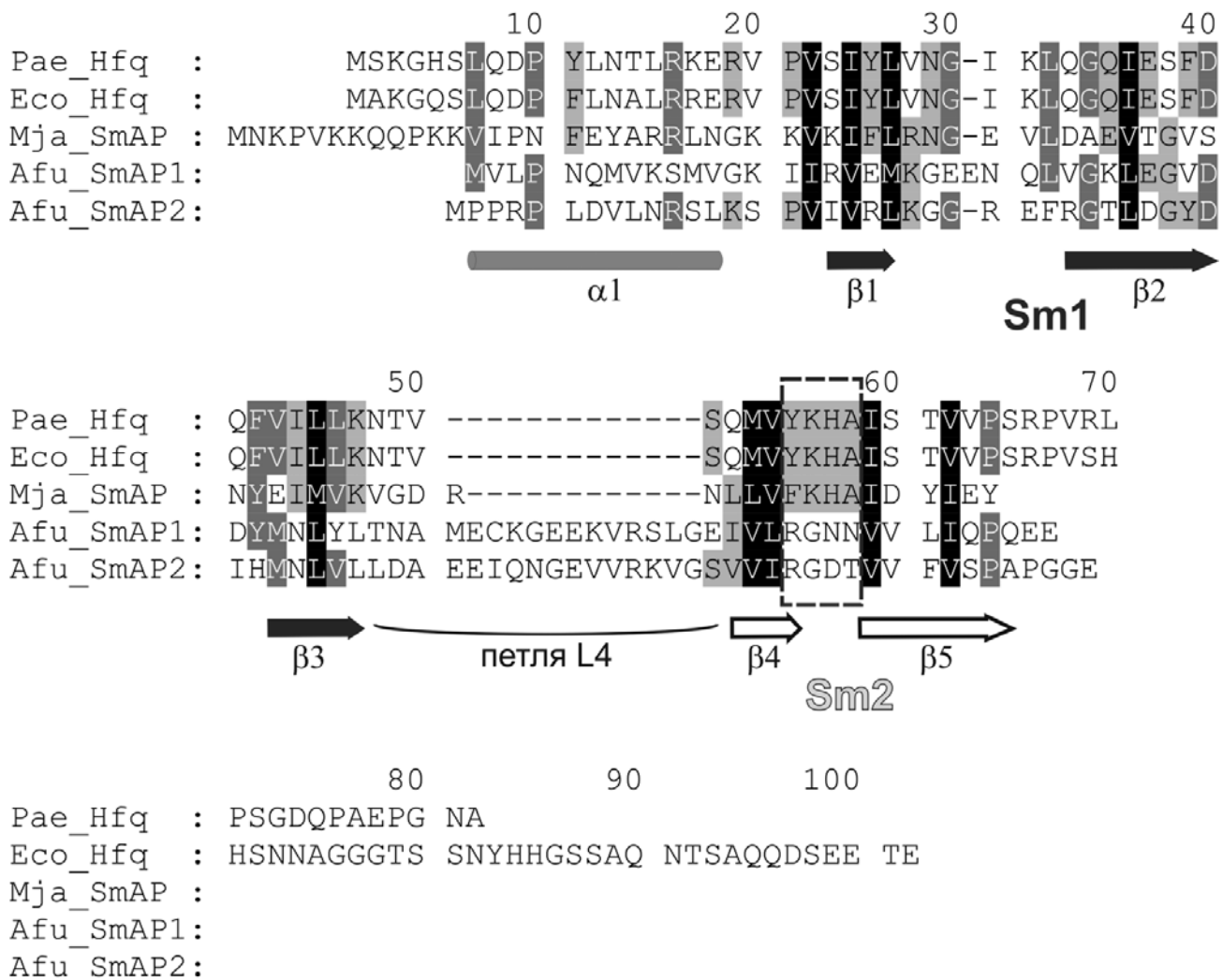
\* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, BM14-297, 15.02.2015.

\*\* Адресат для корреспонденции.

влиять на число субъединиц белка в формируемых частицах белков, а гистидин His57 консенсуса YKHA, образующий межсубъединичные водородные связи, может играть важную роль в стабилизации гексамера белка Hfq [13]. Однако оказалось, что замена His57 на аланин, треонин или аспарагин хоть и приводит к значительному понижению термостабильности белка, но не меняет его пространственную организацию [14]. Позже было показано, что замена остатка Trp55 на аланин также не оказывает влияния на структуру белка [15]. Таким образом, единичная замена в консенсусе YKHA не способна привести к изменению четвертичной структуры белка. Однако скажется ли замена всех четырех аминокислотных остатков консенсуса YKHA на структурные свойства белка? Для ответа на этот воп-

рос мы провели замену бактериального консенсуса в белке Hfq из *Pseudomonas aeruginosa* (Pae Hfq) на последовательность RGDT, которую имеет гептамерный архейный белок SmAP1 из *Archaeoglobus fulgidus*.

Известно, что архейные белки SmAP из *Pyrobaculum aerophilum* и *Methanobacterium thermautotrophicum* могут спонтанно формировать в растворе полярные фибриллы неамилоидного типа [16]. Диаметр фибрилл (~8 нМ) соизмерим с размером отдельно взятого гептамера SmAP1, что позволило предложить модель упаковки белка, при которой гептамеры располагаются «голова к хвосту» перпендикулярно оси фибриллы. Эти фибриллы в свою очередь способны полимеризоваться в толстые (~50 нМ) пучки из нескольких параллельно уложенных фибрилл.



**Рис. 1.** Сравнение первичной структуры представителей бактериальных белков Hfq и архейных SmAP белков. Обозначены элементы вторичной структуры, консервативные мотивы Sm1 (тяги  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  и  $\beta 3$ ) и Sm2 (тяги  $\beta 4$  и  $\beta 5$ ), петля L4. Пунктирным прямоугольником выделен консервативный в Hfq консенсус YKHA мотива Sm2

Позже было показано, что белок Hfq *E. coli* также может образовывать фибриллы, однако только после диализа в раствор с додецил-β-D-мальтозидом и лиофилизации с последующим ресуспендированием белка в воде [17]. С помощью электронной микроскопии и фурье-ИК-спектроскопии было показано, что белок формирует цилиндрические спирально-закрученные фибриллы, организованные из шести гексамеров белка, располагающихся тонким слоем по поверхности цилиндра. Диаметр такого цилиндра составил 17 нм, а угол между плоскостью гексамера и осью фибриллы – 37,7° (расчетные данные получены, исходя из шага спирали в 24 нм и расстояния между плоскостями гомогексамеров Hfq – 4 нм) [17]. Таким образом, как архейные SmAP белки, так и бактериальные белки Hfq, могут формировать фибриллы, однако структурная организация и условия их образования значительно различаются. Мы исследовали влияние произведенной замены YKHA/RGDT на способность белка Рае Hfq к образованию фибрилл и сравнили полученные результаты с данными, полученными для белка SmAP из архей *Methanococcus jannaschii* (Мжа SmAP), который имеет характерные признаки бактериальных белков Hfq: имеет бактериальный консенсус YKHA Sm2 мотива, а петля L4 между Sm1 и Sm2 мотивами отсутствует [18].

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Клонирование гена белка Рае Hfq YKHA/RGDT и выделение белка.** Для получения замены YKHA/RGDT в белке Рае Hfq был использован QuikChange Site\_Directed Mutagenesis Kit («Stratagene», США). ПЦР проводили с использованием плазмиды pET22b(+)/Hfq и олигонуклеотидных праймеров:

5'-GTCAGCCAGATGGTTCGCGGCGACAC-GATCTCCACCG-3' (прямой)

и  
5'-CGGTGGAGATCGTGTGCGCCGCGAAC-CATCTGGCTGAC-3' (обратный),

содержащих необходимые замены. Полученную конструкцию проверяли секвенированием. Экспрессию гена и очистку белка Рае Hfq дикого типа проводили, как описано ранее [14]. Для экспрессии гена белка Рае Hfq YKHA/RGDT использовали клетки *E. coli* штамма BL21(DE3). Клетки наращивали в среде LB при 42° до оптической плотности OD<sub>600</sub> ≈ 0,8 ОЕ. Индукцию проводили добавлением ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ в течение 2 ч. Клетки осаждали центрифугированием и разрушали ультразвуком в буфере 1 М NaCl, 0,25 М MgCl<sub>2</sub> и 5 мМ EDTA, 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0. Клеточные стенки и рибосомы осаждали последовательным центрифугированием в течение 20 мин при 14 000 g и 50 мин при 90 000 g соответственно. Надосадочную жидкость диализовали в буфер 0,1 М NaCl, 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, наносили на колонку с Heparin-Sepharose («Amersham», Швеция) и смывали в градиенте 0,1–0,8 М NaCl с 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0. Фракции анализировали с помощью электрофореза в 15%-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях в присутствии ДСН. Белок Рае Hfq YKHA/RGDT был сконцентрирован до 12 мг/мл в растворе с 0,3 М NaCl и 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0.

**Клонирование гена белка SmAP из *M. jannaschii* и выделение белка.** Ген белка SmAP из *M. jannaschii* был клонирован в экспрессионный вектор pET11a-PL. Матрицей для ПЦР была геномная ДНК *M. jannaschii*. Для ПЦР использовали праймеры:

5'-GGAATTCATATGAATAAGCCAGTAAAA-AAACAGCAACCAAGAAAGTC-3' (прямой)

и  
5'-CAATATGAATTCTTAGTATTCTATGTTAGT-CAATAGCATGTTTAAATACTAATAAGTTCC-3' (обратный),

имеющие сайты для эндонуклеаз рестрикции *FauNDI* и *EcoRI* соответственно. Нуклеотидная последовательность клонированного гена была проверена секвенированием.

Ген белка Мжа SmAP был экспрессирован в штамме-суперпродуценте *E. coli* BL21(DE3). Во избежание ошибочного включения аминокислот в архейный белок (лизина вместо аргинина) клетки были котрансформированы плазмидой pUBS520 [19]. Эта плазида несет ген аргининовой тРНК (тРНК<sup>Arg</sup><sub>AGA/AGG</sub>), узнающей редкие для *E. coli* кодоны аргинина AGA и AGG [20], а также ген *kan*, обуславливающий устойчивость к канамицину.

Клеточную культуру растили при 37° на среде LB, содержащей 100 мкг ампицилина и 50 мкг канамицина на 1 мл среды, до оптической плотности OD<sub>600</sub> ≈ 0,8 ОЕ. Для активации T7 РНК-полимеразы в среду добавляли ИПТГ до конечной концентрации 0,6 мМ. После добавления индуктора клетки инкубировали при 20° в течение ночи. Клетки собирали центрифугированием (8000 g, 20 мин, 4°). Биомассу ресуспендировали в лизирующем буфере (50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 1 М NaCl, 0,25 М MgCl<sub>2</sub> и 5 мМ EDTA) и разрушали на проточном прессе EmulsiFlex-C3 («Avestin», Канада). Клеточный дебрис осажда-

ли центрифугированием 30 мин при 14 000 g. Супернатант прогревали при 82° 20 мин. Денатурировавшие термолабильные белки *E. coli* осаждали низкоскоростным центрифугированием (14 000 g, 40 мин, 4°). К супернатанту добавляли сульфат аммония до конечной концентрации 1,5 М и наносили на колонку со смолой Butyl-Toyorearl 650S, уравновешенную буфером 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 M NaCl, 1,5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Для элюции белка использовали линейный градиент хлорида натрия и сульфата аммония от стартового буфера до 50 mM Tris-HCl, pH 8,0. Фракции, содержащие белок Mja SmAP, анализировали с помощью электрофореза в 15%-ном ПААГ в присутствии ДСН. Белок Mja SmAP был сконцентрирован до 30 мг/мл и переведен диализом в буфер, содержащий 0,2 M NaCl и 50 mM Tris-HCl, pH 8,0.

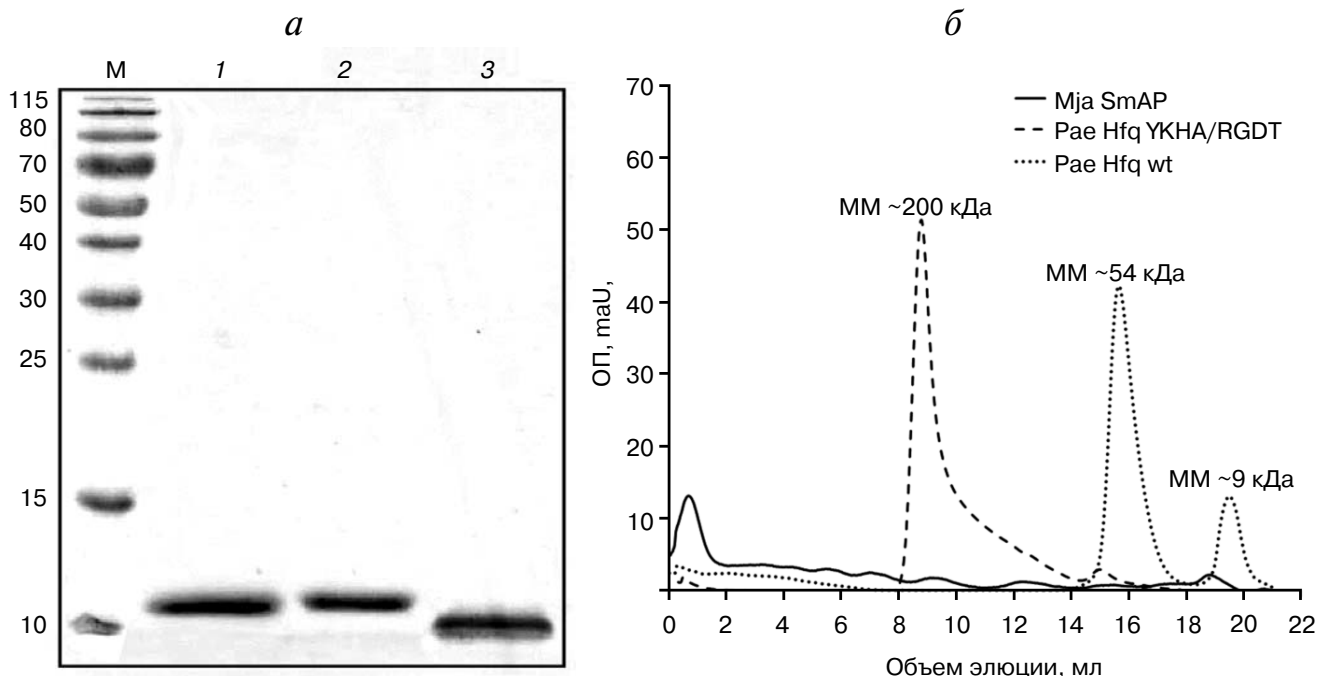
**Анализ размера частиц белка с помощью гель-фильтрации.** Хроматографию проводили на системе Acta basic («Amersham», Швеция) на колонке объемом 24 мл со смолой Superdex 200. Для проведения хроматографии использовали буфер 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0. Образец наносили на колонку со скоростью 0,4 мл/мин в объеме 100 мкл с концентрацией белка 2 мг/мл. Калибровочная кривая была построена по образцам белков БСА, овальбумина, рибонуклеазы А и апротинина.

#### Определение размера и молекулярной массы частиц белков методом динамического рассеяния света (ДРС).

Эксперименты по динамическому светорассеянию проводили на приборе Zetasizer Nano ZS («Malvern Instruments Ltd.», Великобритания). Рассеянный назад свет от 4 мВт He/Ne лазера (длина волны 632,8 нм) собирался под углом 173°. Использовали образцы белков с концентрацией 1 мг/мл в буфере 0,1 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5. Температура измерения была равна 25°. Время накопления автокорреляционной функции составляло 100 с. Конечная автокорреляционная функция являлась средним из 10 измерений. Распределение радиусов от интенсивности светорассеяния рассчитывали при следующих параметрах: коэффициент преломления 1,330 и вязкость раствора 0,8882 Па·с. Распределение молекулярной массы от интенсивности светорассеяния рассчитывали, исходя из уравнения Марк-Хаувинка в стандартном программном обеспечении для данного прибора (Malvern Zetasizer Software, «Malvern Instruments Ltd.», Великобритания):

$$D = K \cdot M^{-a},$$

где  $D$  – коэффициент диффузии, а  $K$  и  $a$  – константы (использовали значения константы  $a$ , равное 0,428 см<sup>2</sup>/с и  $K$ , равное 7,67E–5),  $M$  – молекулярная масса в кДа.



**Рис. 2.** а – Гель-электрофорез в присутствии ДСН: М – маркеры, 1 – Pae Hfq wt, 2 – Pae Hfq YKHA/RGDT, 3 – Mja SmAP; б – профиль элюции белков Pae Hfq wt, Pae Hfq YKHA/RGDT на колонке Superdex 200 10/30

**Трансмиссионная электронная микроскопия.**

Перед проведением эксперимента образцы белка Рае Hfq дикого типа и с заменой YKHA/RGDT диализовали в 50 мМ NaCl, 25 мМ Tris-HCl, рН 8,0, до конечной концентрации 2 мг/мл, а затем разбавляли этим же буфером до концентрации 0,1 мг/мл. Мжа SmAP в буфере 0,1 М NaCl и 50 мМ Tris-HCl, рН 8,0, с концентрацией 20–40 мг/мл разводили тем же буфером до концентрации 0,2 мг/мл.

Аликвоты белков адсорбировали на медные сеточки (400 Mesh), покрытые формваровой пленкой (0,2%), помещали на каплю образца (10 мкл). После 5 мин адсорбции сеточку с препаратом негативно контрастировали в течение 1,5–2 мин 1%-ным (w/v) водным раствором уранилацетата. Препараты анализировали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEM-100C при ускоряющем напряжении 80 кВ. Изображения фиксировали на фотопленку Кодак при номинальном увеличении 40 000–60 000.

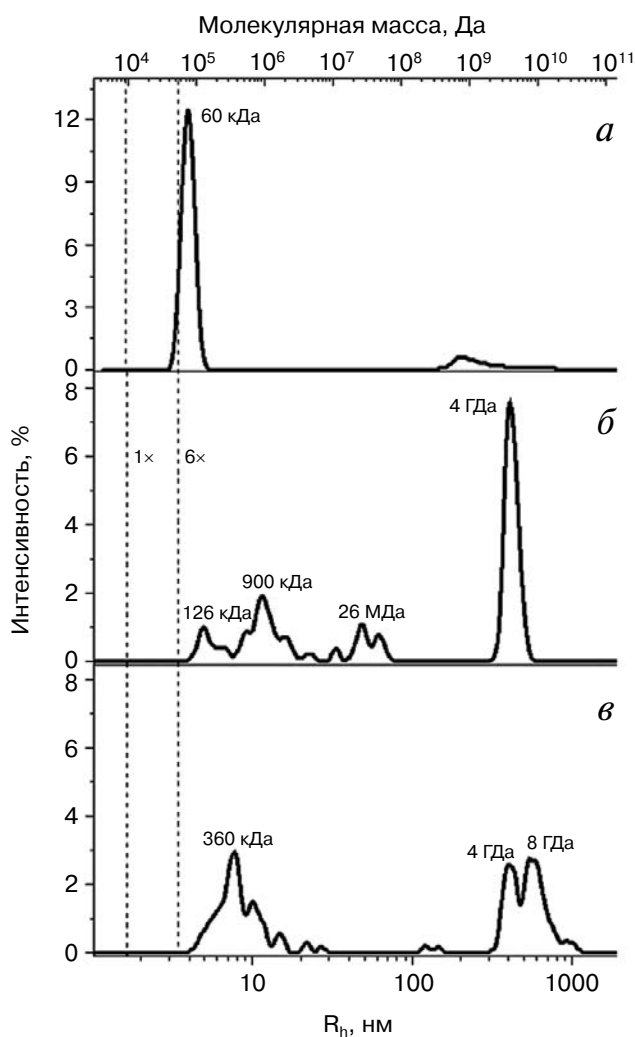
**РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

**Выделение препаратов белков и проверка их гомогенности.** Белок Рае Hfq выделяли согласно ранее описанной методике [13]. Оценку гомогенности полученных белков проводили методами гель-электрофореза в присутствии ДСН, гель-фильтрации и методом динамического рассеяния света. В денатурирующих условиях (рис. 2, а) все исследуемые белки гомогенны и практически соответствуют молекулярному весу своего мономера: для белка Рае Hfq дикого и с заменой — 9,5 кДа, Мжа SmAP — 8,3 кДа. При выделении белка Рае Hfq YKHA/RGDT было установлено, что белок имеет низкую растворимость; это не позволило определить структуру белка с помощью рентгеноструктурного анализа и исследовать его термостабильность как было сделано нами ранее для ряда мутантных форм белка Рае Hfq [15].

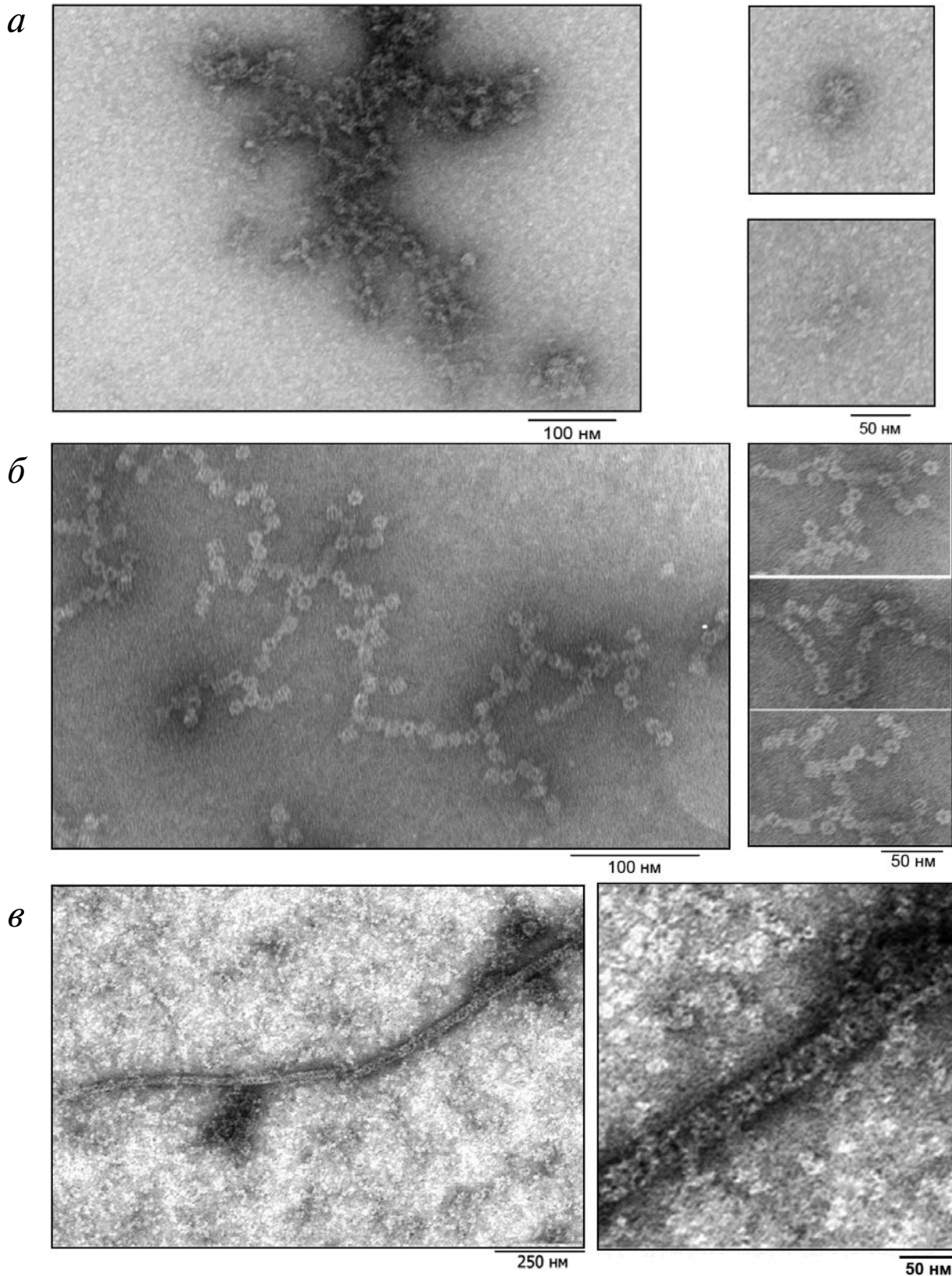
Анализ полученных препаратов белков в неденатурирующих условиях методом гель-фильтрации показал, что, в отличие от белка Рае Hfq дикого типа, формирующего в растворе гексамеры и мономеры, Рае Hfq YKHA/RGDT, в основном, образует мультимеры, содержащие несколько гексамеров (рис. 2, б). Для Мжа SmAP характерно наличие пика в самом начале хроматограммы, что свидетельствует о высокой степени олигомеризации белка в растворе.

Наличие олигомерных состояний исследуемых белков было подтверждено методом динамического рассеяния света (рис. 3). Полученные данные показали, что Рае Hfq дикого типа в

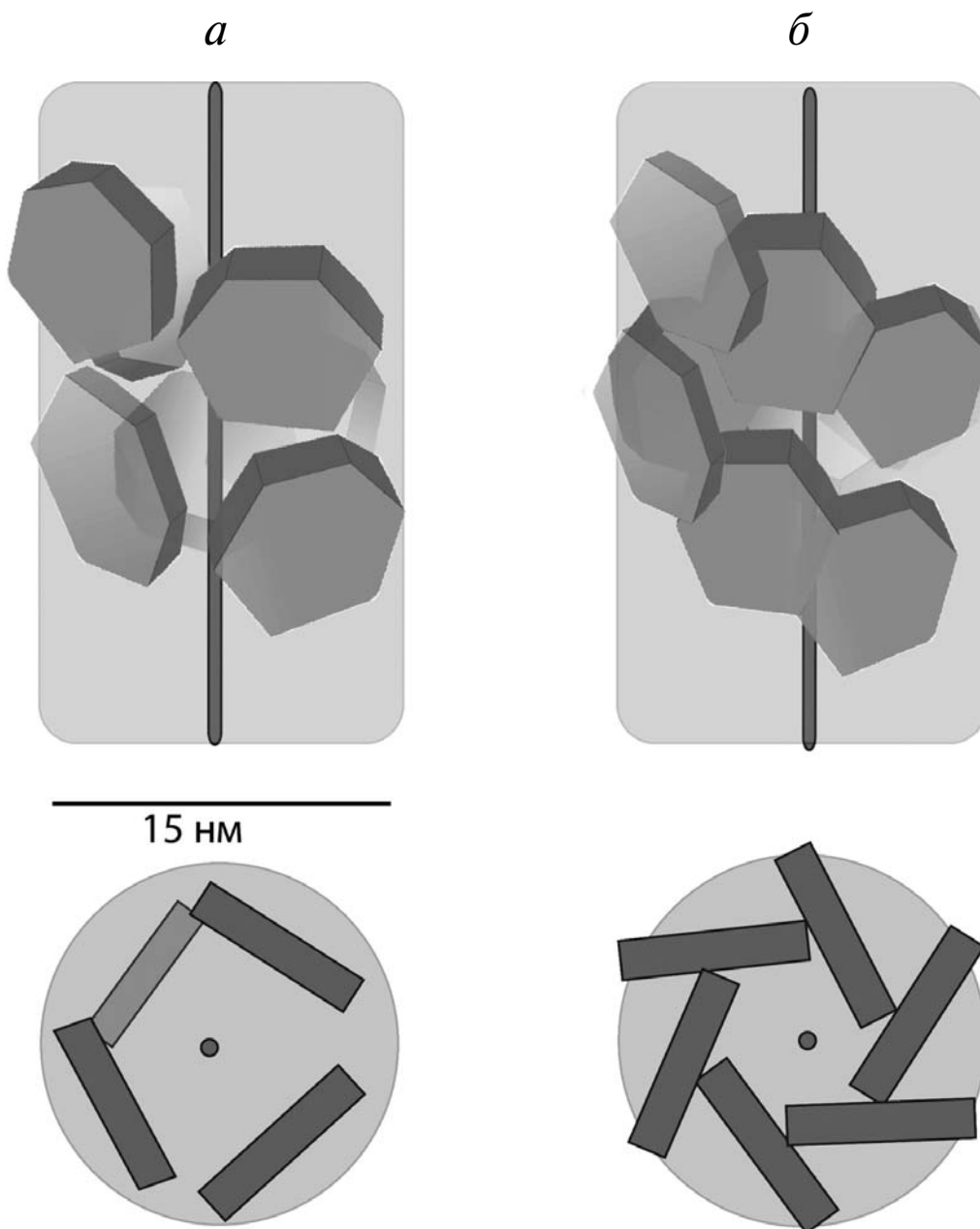
растворе образует гексамеры с мол. весом ~56 кДа (рис. 3, а). Белки Рае Hfq YKHA/RGDT и Мжа SmAP представлены гетерогенными популяциями: Рае Hfq YKHA/RGDT образует частицы с мол. весом от 126 кДа до 26 МДа и имеет пик, соответствующий частицам 4 ГДа (рис. 3, б), а Мжа SmAP имеет пик в области 360 кДа и области 4–8 ГДа (рис. 3, в). Таким образом, замена YKHA/RGDT в Рае Hfq повышает способность белка образовывать олигомеры большой молекулярной массы, белок дикого типа не обладает такой способностью. В то же время белок Мжа



**Рис. 3.** Зависимость гидродинамического радиуса (внизу) и молекулярной массы (вверху) от интенсивности светорассеяния для белков Рае Hfq дикого типа (а), с заменой YKHA/RGDT (б) и для белка Мжа SmAP (в). Вертикальными пунктирными линиями показаны расчетные положения пиков для глобулярных белков с мол. массой, соответствующей мономеру и гексамеру белка Рае Hfq (9,5 и 57 кДа). Указана оценка молекулярной массы частиц по их гидродинамическому радиусу для наиболее характерных пиков



**Рис. 4.** ЭМ фотографии препаратов белков Paе Hfq дикого типа (*a* – неупорядоченные олигомеры), Paе Hfq YKHA/RGDT (*б* – «бочонки» протофибрилл) и Mja SmAP (*в* – протяженные фибриллы). Приведены фрагменты поля и увеличенные фрагменты характерных формирований. Во всех трех образцах на поле рядом с олигомерами видны отдельные частицы диаметром менее 10 нм, соответствующие гексамерам белков



**Рис. 5.** Модель положения гексамеров Рае Hfq YKHA/RGDT в составе наночастиц, соответствующая наличию симметрии третьего порядка. Один виток спирали состоит из 3 (а) или 6 (б) гексамеров. В случае трех гексамеров на виток упаковка наночастиц более рыхлая, так что первый гексамер следующего витка виден при рассмотрении с торца «бочонка». На верхних изображениях показан вид сбоку, на нижних – вид сверху

SmAP, хоть и имеет консенсус YKHA в области Sm2 мотива, способен образовывать высокомолекулярные олигомеры.

**Электронная микроскопия белков.** Для детального анализа получаемых олигомеров препараты белков были исследованы с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. Попытка по-

лучить фибриллы Рае Hfq по методике, описанной для белка Hfq из *E. coli* [17], не увенчалась успехом. В этих условиях, также как при разведении белка до 0,2 мг/мл в буфере 50 мМ NaCl, 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, в поле зрения видны были лишь гексамеры диаметром ~8 нм и неупорядоченные агрегаты Рае Hfq различного размера (рис. 4, а).

В отличие от белка дикого типа, белок Рае Hfq YKHA/RGDT при концентрации 0,2 мг/мл в растворе 50 mM NaCl и 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, формировал однородные олигомерные частицы в виде бочонков размером  $\sim 15 \times 15$  нм с выраженной симметрией третьего порядка с их торца (рис. 4, б). Диаметр этих частиц отличается от диаметра фибрилл SmAP белков ( $\sim 8$  нм, что соответствует диаметру гептамера белка) и немного меньше диаметра фибрилл Hfq *E. coli* ( $\sim 17$  нм) [17]. Поскольку в центральной части частиц видно затемнение, мы предполагаем, что упаковка гексамеров белка не является сплошной, а аналогична той, которая наблюдалась для фибрилл белка Hfq из *E. coli*. Разницу в диаметре фибрилл можно объяснить уменьшением размера белка Рае Hfq по сравнению с Eco Hfq из-за укорачивания С-концевой части белка (рис. 1) или большим наклоном плоскости гексамеров белка к оси фибриллы. Таким образом, полученные «протофибриллы» можно моделировать несколькими короткими витками спирально расположенных гексамеров белка, на каждый виток при этом приходится, в соответствии с симметрией 3-го порядка, три или шесть гексамеров (рис. 5).

Белок Mja SmAP при концентрации 0,2 мг/мл в буфере 0,1 M NaCl и 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, образовывал фибриллы длиной более 1 мкм и диаметром 25–30 нм (рис. 4, в). Поскольку на их поверхности видны располагающиеся по спирали кольцеобразные гексамеры Mja SmAP, то можно предположить, что они располагаются строго по поверхности цилиндра. Этим можно объяснить большой диаметр полученных фибрилл Mja SmAP по сравнению с фибриллами Рае Hfq YKHA/RGDT и Eco Hfq.

Поскольку белки семейства Hfq являются преимущественно  $\beta$ -белками, для проверки амилоидной природы полученных фибрилл был проведен тест по рассеянию рентгеновских лучей на образцах белков Рае Hfq YKHA/RGDT и Mja SmAP по методике, описанной ранее [21]. Тест показал наличие только диффузного рассеяния при полном отсутствии каких-либо отражений от образцов (данные не приведены), что соответствует отсутствию амилоидов в полученных нами фибриллах.

Таким образом, нами было показано, что, несмотря на различия первичных структур белков семейства Hfq, они способны образовывать фибриллы схожей архитектуры: гексамеры белка располагаются спирально по поверхности полового цилиндра, причем плоскость гексамеров сонаправлена с поверхностью этого цилиндра; образующиеся фибриллы имеют внутреннюю сквозную полость по оси цилиндра. Основным отличием фибрилл, формируемых разными белками, по всей видимости, является количество гексамеров, приходящихся на один виток и угол наклона гексамеров относительно оси фибриллы. Эти параметры должны определять диаметр фибрилл и плотность упаковки частиц в них. По всей видимости, замена консенсуса YKHA консервативного мотива Sm2 бактериального белка Hfq на консенсус архей RGDT в центральной части белка Рае Hfq вызвала локальное изменение распределения зарядов на поверхности белка, что в свою очередь привело к возможности образования наночастиц с более плотной упаковкой гексамеров белка в виде «бочонков». В результате была получена новая форма наночастиц белка, не похожая на полученные ранее фибриллы Hfq из *E. coli* и архейных SmAP белков.

Полученные фибриллы и наночастицы могут быть интересным объектом для применения в области нанобиотехнологий, поскольку легко воспроизводятся в физиологических условиях, а соответствующие белки нарабатываются в больших количествах. Примером такого применения может служить использование жгутиков архей в качестве матрицы для получения высокоэффективных материалов для электродов аккумуляторов [22, 23].

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 14-14-00496). Работа А.С. Казакова по измерению гидродинамического радиуса частиц в растворе методом ДРС выполнена при финансовой поддержке программы МКБ Президиума РАН. Эксперименты по ЭМ выполнены О.М. Селивановой при финансовой поддержке РФФИ (грант 14-14-00536).



СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vogel, J., and Luisi, B.F. (2011) Hfq and its constellation of RNA, *Nature Rev. Microbiol.*, **9**, 578–589.
2. Valentin-Hansen, P., and Eriksen, M. (2004) MicroReview The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions, *Mol. Microbiol.*, **51**, 1525–1533.
3. Brennan, R.G., and Link, T.M. (2007) Hfq structure, function and ligand binding, *Curr. Opin. Microbiol.*, **10**, 125–133.
4. Beggs, J.D. (2005) Lsm proteins and RNA processing, *Biochem. Soc. Trans.*, **33**, 433–438.
5. Spiller, M.P., Boon, K.-L., Reijns, M.A., and Beggs, J.D. (2007) The Lsm2–8 complex determines nuclear localization of the spliceosomal U6 snRNA, *Nucleic Acids Res.*, **35**, 923–929.
6. Mura, C., Randolph, P.S., Patterson, J., and Cozen, A.E. (2013) A structural and evolutionary perspective on Sm function archaeal and eukaryotic homologs of Hfq, *RNA Biol.*, **10**, 636–651.
7. Fischer, S., Benz, J., Spath, B., Maier, L.-K., Straub, J., Granzow, M., Raabe, M., Urlaub, H., Hoffmann, J., Brutschy, B., Allers, T., Soppa, J., and Marchfelder, A. (2010) The archaeal Lsm protein binds to small RNAs, *J. Biol. Chem.*, **285**, 34429–34438.
8. Murina, V.N., and Nikulin, A.D. (2011) RNA-binding Sm-like proteins of bacteria and archaea: similarity and difference in structure and function, *Biochemistry (Moscow)*, **76**, 1434–1449.
9. Khusial, P., Plaag, R., and Zieve, G.W. (2005) LSm proteins form heptameric rings that bind to RNA via repeating motifs, *Trends Biochem. Sci.*, **30**, 522–528.
10. Robinson, K.E., Orans, J., Kovach, A.R., Link, T.M., and Brennan, R.G. (2014) Mapping Hfq-RNA interaction surfaces using tryptophan fluorescence quenching, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 2736–2749.
11. Sauter, C. (2003) Sm-like proteins in Eubacteria: the crystal structure of the Hfq protein from *Escherichia coli*, *Nucleic Acids Res.*, **31**, 4091–4098.
12. Salgado-Garrido, J., Bragado-Nilsson, E., Kandels-Lewis, S., and Seraphin, B. (1999) Sm and Sm-like proteins assemble in two related complexes of deep evolutionary origin, *EMBO J.*, **18**, 3451–3462.
13. Nikulin, A., Stolboushkina, E., Perederina, A., Vassilieva, I., Blaesi, U., Moll, I., Kachalova, G., Yokoyama, S., Vassilyev, D., Garber, M., and Nikonov, S. (2005) Structure of *Pseudomonas aeruginosa* Hfq protein, *Acta Crystallogr. D*, **61**, 141–146.
14. Moskaleva, O., Melnik, B., Gabdulkhakov, A., Garber, M., Nikonov, S., Stolboushkina, E., and Nikulin, A.D. (2010) The structures of mutant forms of Hfq from *Pseudomonas aeruginosa* reveal the importance of the conserved His57 for the protein hexamer organization, *Acta Crystallogr. F*, **66**, 760–764.
15. Murina, V.N., Melnik, B.S., Filimonov, V.V., Uhlein, M., Weiss, M.S., Muller, U., and Nikulin, A.D. (2014) Effect of conserved intersubunit amino acid substitutions on Hfq protein structure and stability, *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 469–477.
16. Mura, C., Kozhukhovskiy, A., Gingery, M., and Phillips, M. (2003) The oligomerization and ligand-binding properties of Sm-like archaeal proteins (SmAPs), *Prot. Sci.*, **12**, 832–847.
17. Arluison, V., Mura, C., Guzman, M.R., Liquier, J., Pellegrini, O., Gingery, M., Regnier, P., and Marco, S. (2006) Three-dimensional structures of fibrillar Sm proteins: Hfq and other Sm-like proteins, *J. Mol. Biol.*, **356**, 86–96.
18. Nielsen, J.S., Boggild, A., Andersen, C.B.F., Nielsen, G., Boysen, A., Brodersen, D.E., and Valentin-Hansen, P. (2007) An Hfq-like protein in archaea: crystal structure and functional characterization of the Sm protein from *Methanococcus jannaschii*, *RNA*, **13**, 2213–2223.
19. Calderone, T.L., Stevens, R.D., and Oas, T.G. (1996) High-level misincorporation of lysine for arginine at AGAcodons in a fusion protein expressed in *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.*, **262**, 407–412.
20. Brinkmann, U., Mattes, R.E., and Buckel, P. (1989) High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the dnaY gene product, *Gene*, **85**, 109–114.
21. Guryanov, S.G., Selivanova, O.M., Nikulin, A.D., Enin, G.A., Melnik, B.S., Kretov, D.A., Serdyuk, I.N., and Ovchinnikov, L.P. (2012) Formation of amyloid-like fibrils by Y-box binding protein 1 (YB-1) is mediated by its cold shock domain and modulated by disordered terminal domains, *PLoS One*, **7**, e36969.
22. Безносков С.Н., Пятибратов М.Г., Федоров О.В. (2009) Жгутики архей как матрицы для создания новых наноматериалов, *Российские нанотехнологии*, **4**, 94–98.
23. Безносков С.Н., Пятибратов М.Г., Федоров О.В., Кулова Т.Л., Скундин А.М. (2011) Электрохимические характеристики наноструктурированного материала на основе модифицированных жгутиков галофильных архей *Halobacterium salinarum* для отрицательного электрода литий-ионного аккумулятора, *Российские нанотехнологии*, **6**, 43–47.

## SUPRAMOLECULAR ORGANIZATION OF Hfq-LIKE PROTEINS

V. N. Murina<sup>1\*</sup>, O. M. Selivanova<sup>1</sup>, A. O. Mikhaylina<sup>1</sup>,  
A. S. Kazakov<sup>2</sup>, E. Yu. Nikonova<sup>1</sup>, N. V. Lekontseva<sup>1</sup>,  
S. V. Tishchenko<sup>1</sup>, A. D. Nikulin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of protein research, Russian Academy of Sciences,  
Pushchino 142290, Moscow Region, Russia;  
E-mail: thyrada@rambler.ru

<sup>2</sup> Institute for biological instrumentation, Russian Academy  
of Sciences, Pushchino 142290, Moscow Region, Russia

Received October 28, 2014

Bacterial Hfq are structural homologs of archaeal and eukaryotic Sm/Lsm proteins which are characterized by a 5-stranded  $\beta$ -sheet and an *N*-terminal  $\alpha$ -helix. It was shown previously that archaeal Lsm proteins (SmAP) could produce long fibrils spontaneously, in contrast to the Hfq from *Escherichia coli*, which could form similar fibrils only after special treatment. The organization of these fibrils is significantly different, but the reason for the dissimilarity was not found. In the present work, we studied the process of fibril formations by bacterial protein Hfq from *Pseudomonas aeruginosa* and archaeal protein SmAP from *Methanococcus jannaschii*. Both proteins possess high homology with *E. coli* Hfq. We found that Hfq from *P. aeruginosa* could form fibrils after substitutions in only the conserved Sm2 motif. SmAP from *M. jannaschii* as other archaeal Lsm proteins form fibrils spontaneously. Despite differences in the fibril formation conditions, the architecture of both were similar to that described for *E. coli* Hfq. Therefore, the universal nature of fibril architecture formed by Hfq proteins is suggested.

**Key words:** Sm-like proteins, Hfq, quaternary structure of proteins, fibrils