

УДК 577.322.75

УЧАСТИЕ МАЛОГО БЕЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКА IbPA В РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОГО ДЕЛЕНИЯ ACHOLEPLASMA LAIDLAWII

Федорова М. С., студент (магистр) 1 курса высшей школы
биологии института фундаментальной медицины и биологии,
masfedorova97@mail.ru

Научные руководители: Федорова М. С.¹, Чернова Л.С.¹,
Вишняков И.Е.², Каюмов А.Р.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань
²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Ключевые слова: малые белки теплового шока, белок-белковые взаимодействия, деление клетки, микоплазмы, *Acholeplasma laidlawii*, температурный стресс.

С упрощением клеточной организации количество генов, отвечающих за деление клетки, значительно снижается, однако ген белка деления *ftsZ* обнаружен в геномах даже тех бактерий, которые утратили практически всё содержимое кластера генов, ответственных за данный процесс [3]. Таким примером служит *Acholeplasma laidlawii*, у которой пока описан единственный ген белка деления – *ftsZ* [2]. Он выполняет ключевую функцию в процессе деления клеток большинства прокариот и является высоко консервативным [4]. Также геном микоплазмы несет только один ген малого белка теплового шока (мБТШ) *IbPA*, который препятствует необратимой агрегации частично денатурированных клеточных белков во время стресса. Ранее методами ко-элюции и иммунопреципитации было установлено, что белок *FtsZ* способен взаимодействовать с белком *IbPA* *in vivo* [1]. В этой работе мы показываем конститутивное взаимодействие данных белков по С-концевым мотивам, а также отсутствие влияния белка *IbPA* на ГТФазную активность *FtsZ*.

Известно, что N- и С-концевые домены *IbPA* участвуют во взаимодействии с субстратными белками [1]. Чтобы выяснить, как регулируется связывание *IbPA* с *FtsZ* – мБТШ-субстрат взаимодействием, или с участием иных механизмов – было изучено влияние усечений аминокислотных последовательностей с N- и С-концов *IbPA* на его взаи-

модействие с FtsZ. Для этого на основе вектора pET15b ранее были сконструированы плазмиды с целью продукции мутантных белков IbpA с делециями либо заменами в данных участках.

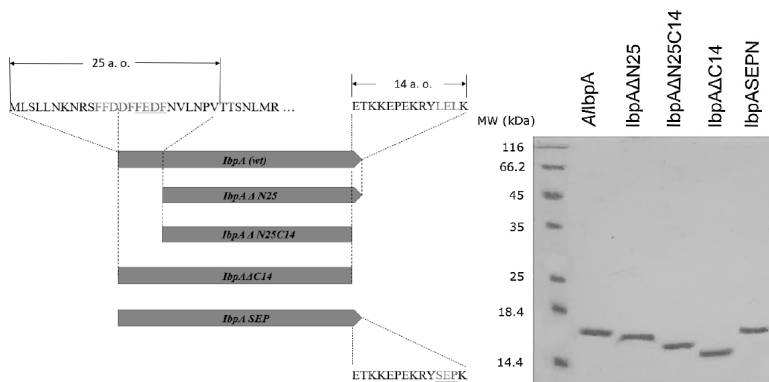


Рисунок 1 – А – схема мутаций в молекуле белка IbpA. Б – электрофореграмма очищенных мутантных белков IbpA: IbpAΔN25 – удалено 25 а.о. с N-конца; IbpAΔN25C14 – удалено 25 а.о. с N-конца и 14 а.о. с C-конца; IbpAΔC14 – удалено 14 а.о. с C-конца; IbpA SEP L134 и L136 были заменены полярными аминокислотами S134 и P136

Верификацию взаимодействия белка IbpA с белком FtsZ оценивали *in vitro* с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса (ППР). В качестве лиганда выступал His6-IbpA (FC2), в качестве анализита использовали белок FtsZ-ST. В качестве контроля неспецифических взаимодействий (FC1) использовали His6-TnrA20 из *Bacillus subtilis* [Каутов *et al.*, 2011]. На рисунке 2 (А) показаны сенсограммы взаимодействия FtsZ с иммобилизованным IbpA. В эксперименте концентрация анализита варьировала от 312 нМ до 5 мкМ. На основании полученных данных было установлено, что K_D взаимодействия FtsZ – IbpA составляет 800 ± 54 нМ (Рисунок 2-Б), что говорит о высокой эффективности взаимодействия белков.

Взаимодействие мутантных белков IbpA с делециями N- и C-концевых доменов с белком FtsZ оценивали также с помощью ППР. Характер взаимодействия FtsZ с IbpA был схож со связыванием МБТШ

с алкогольдегидрогеназой (АДГ). Таким образом, по полученным данным можно предположить, что IbrA связывает FtsZ способом БТШ20-субстрат без белок-специфического взаимодействия (Рисунок 3).

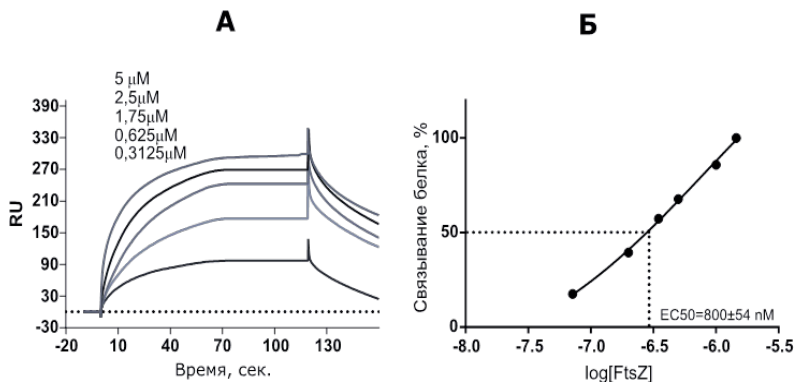
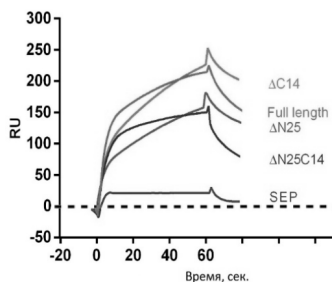


Рисунок 2 – ППР-анализ взаимодействия белков IbrA-FtsZ *in vitro*

А/IbrA - FtsZ взаимодействие



А/IbrA – АДГ взаимодействие

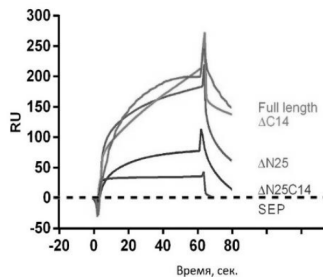


Рисунок 3 – ППР-анализ взаимодействия (А) FtsZ и (Б) алкогольдегидрогеназы с полноразмерными, мутантными и укороченными белками IbrA. FtsZ и АДГ загружали на поверхность чипа с различными вариантами иммобилизованного IbrA

Взаимодействие белков IbrA и FtsZ исследовали также *in vivo* с помощью бактериальной двугибридной системы на основе бактери-

альной аденилатциклазы [Battesti, Bouveret, 2012]. Чтобы оценить уровень взаимодействия рекомбинантных белков *in vivo*, ранее нами были получены следующие генетические конструкции pUT18-FtsZ, pUT18C-FtsZ, pUT18-Ef-Tu, pUT18C-Ef-Tu, pKT25-lbpA, обеспечивающие экспрессию N- или C-концевых фьюжен конструкций соответствующих белков с T18 или T25 субъединицами аденилатциклазы. В качестве положительного контроля были использованы плазмиды pUT18C-Zip, pKT25-Zip. Для анализа взаимодействия исследуемых белков отобранные клоны высевали в жидкую среду LB с соответствующим антибиотиком. Клетки *E. coli* индуцировали IPTG в течение 2 часов при температурах 30 °C и 42 °C, затем измеряли активность β -галактозидазы в клетках.

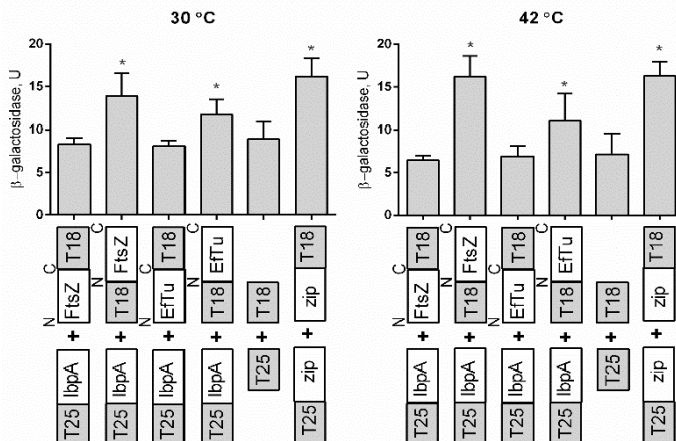


Рисунок 4 – Схема исследования взаимодействия белков lbpA и FtsZ в бактериальной двугибридной системе

Полученные данные свидетельствуют, что в клетках *E. coli* с конструкциями pKT25-lbpA + pUT18-FtsZ и pKT25-lbpA + pUT18-Ef-Tu уровень активности β -галактозидазы сопоставим с положительным контролем. В клетках с pKT25-lbpA + pUT18C-FtsZ и pKT25-lbpA + pUT18C-Ef-Tu уровень активности β -галактозидазы сопоставим с отрицательным контролем. Это говорит о взаимодействии белков по C-концевым мотивам. Тем не менее, значимых различий в активности β -галактозидазы между клетками pKT25-lbpA + pUT18-FtsZ, выращенными при 30 °C и 42 °C, не

наблюдалось, что свидетельствует о конститутивном взаимодействии между IbpA и FtsZ *in vivo* в бактериальной системе в данных условиях. Далее было показано отсутствие влияния IbpA на ГТФазную активность FtsZ *in vitro* в реакции с малахитовым зеленым. Эти данные противоречат выдвинутому ранее предположению о взаимодействии белков по типу МБТШ-субстрат и свидетельствуют в пользу того, что должны быть другие механизмы распознавания.

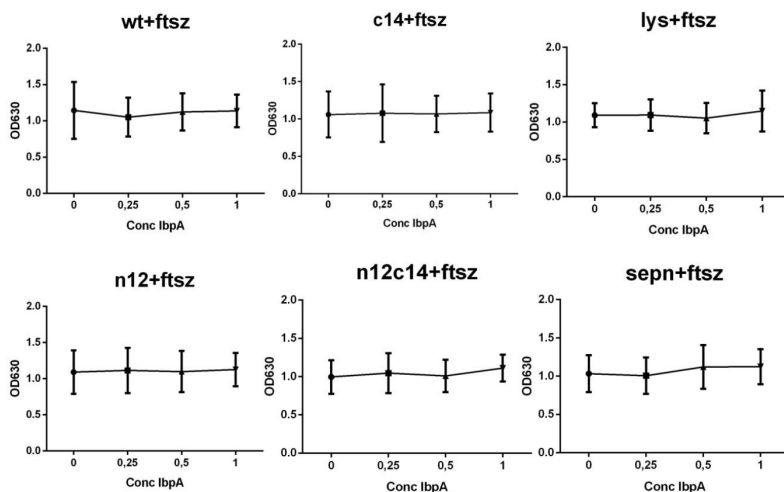


Рисунок 5 – Влияние IbpA на ГТФазную активность FtsZ *in vitro*

Таким образом, экспериментально доказано взаимодействие белков IbpA и FtsZ *in vivo* и *in vitro*, сайт взаимодействия IbpA с FtsZ располагается на С-конце белка FtsZ. При этом, несмотря на сходство закономерности влияния N- и С-концевых мутаций IbpA на связывание с FtsZ и алкогольдегидрогеназой, в условиях повышенных температур эффективность взаимодействия IbpA с белком FtsZ не меняется и *in vitro* IbpA не влияет на ГТФазную активность белка деления FtsZ. Это позволяет судить о взаимодействии белков не по механизму взаимодействия Hsp20-субстрат и физиологическая роль взаимодействия данных белков остается неизвестной.

**Работа выполнена при финансовой поддержке
РФФИ-20-34-90066.**

Библиографический список:

1. Chernova, L. S. N-and C-terminal regions of the small heat shock protein IbpA from *Acholeplasma laidlawii* competitively govern its oligomerization pattern and chaperone-like activity [Text] / L. S. Chernova, M. I. Bogachev, V. V. Chasov, I. E. Vishnyakov, A. R. Kayumov // RSC Advances. – 2020. – Т. 10. – №. 14. – С. 8364-8376.
2. Koonin, E. V. Evolution of cell division: from shear mechanics to complex molecular machineries [Text] / E. V. Koonin, A. Y. Mulkidjanian // Cell. – 2013. – Т. 152. – №. 5. – С. 942-944.
3. Margolin, W. FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles [Text] / W. Margolin // Nature reviews Molecular cell biology. – 2005. – Т. 6. – №. 11. – С. 862-871.
4. Vedyaykin, A. D. Influence of FtsZ proteins from some mycoplasma species on the division process in Escherichia coli cells [Text] / A. D. Vedyaykin, V. S. Polinovskaya, A. V. Sabantsev, M. A. Khodorkovskii, S. N. Borchsenius, I. E. Vishnyakov // Cell and Tissue Biology. – 2017. – Т. 11. – №. 5. – С. 389-398.

PARTICIPATION OF SMALL HEAT SHOCK PROTEIN IBPA IN REGULATION OF ACHOLEPLASMA LAIDLAWII CELL DIVISION

Fedorova M.S.

Key words: *small heat shock proteins, protein-protein interactions, cell division, mycoplasma, Acholeplasma laidlawii, heat shock.*

With the simplification of the cellular organization, the number of genes responsible for cell division is strongly decreased. However, ftsZ (the cell division protein gene) was found in the genomes of bacteria that have lost almost all genes responsible for this process. Thus, Acholeplasma laidlawii carries only one cell division gene ftsZ. FtsZ plays a key role in the cell division of the most prokaryotes and is highly conserved. As well, the mycoplasma genome carries only one gene encoding of the small heat shock protein (sHSP) IbpA, which prevents the irreversible aggregation of partially denatured proteins during stress. The co-elution and immunoprecipitation previously demonstrated that the FtsZ interacts with the IbpA protein in vivo. In this study, we show the constitutive interaction of these proteins via C-terminal motifs, as well as the absence of an effect of the IbpA protein on GTPase activity of FtsZ. This suggests non sHSP-substrate like interaction of the proteins and opens the question regarding physiological role of this interaction.