

УДК 577.2

СВЯЗЫВАНИЕ РНК *in vitro* СЕРПИНАМИ РАСТЕНИЙ

© 2021 Е.А. Толстыко^{1,2}, Д.А. Чергинцев³, О.А. Толичева², Д.С. Виноградова^{2,4},
А.Л. Коневега^{2,5,6}, С.Ю. Морозов^{1,7}, А.Г. Соловьев^{1,7*}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, кафедра вирусологии, 119991 Москва, Россия

² Петербургский институт ядерной физики имени Б.П. Константинова
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», 188300 Гатчина, Россия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, кафедра физиологии растений, 119991 Москва, Россия

⁴ «НаноТемпер Технолоджис рус», 191167 Санкт-Петербург, Россия

⁵ Санкт-Петербургский политехнический университет имени Петра Великого, 195251 Санкт-Петербург, Россия

⁶ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», 123182 Москва, Россия

⁷ Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119992 Москва, Россия; электронная почта: solovyev@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 12.04.2021

После доработки 09.07.2021

Принята к публикации 09.07.2021

Серпины являются ингибиторами протеиназ, выполняющими регуляторные функции; они составляют обширное семейство белков и обнаружены у всех живых организмов. Большинство серпинов растений функционально не охарактеризовано. Исключение составляет белок AtSerpin1 *Arabidopsis thaliana*, для которого показано ингибирование проапоптотических протеиназ и предполагается участие в регулировании индукции программируемой клеточной смерти, и белок CmPS1 *Cucurbita maxima*, локализованный во флоэме и предположительно ингибирующий пищеварительные протеиназы насекомых. Помимо этого, недавно было обнаружено, что белок CmPS1 способен связывать РНК, наиболее эффективно взаимодействуя с высокоструктурированными РНК, в частности формируя специфический комплекс с тРНК. В настоящей работе продемонстрировано, что белок AtSerpin1 также способен образовывать комплекс с тРНК. Анализ тРНК, связанных белками AtSerpin1 и CmPS1 в условиях избытка тРНК, показал, что ни один из белков не проявляет строгой избирательности в связывании индивидуальных тРНК, что указывает, вероятно, на специфическое взаимодействие этих белков с элементами вторичной/третичной структуры, универсальными для всех тРНК. При анализе взаимодействия белка CmPS1 с предшественником микроРНК 390 (pre-miR390) было обнаружено, что мутантный вариант pre-miR390, стебель шпильчатой структуры которого представлял собой совершенный дуплекс, утрачивал способность формировать дискретный комплекс с CmPS1, тогда как другой вариант pre-miR390, содержащий природные неспаренные нуклеотидные остатки, такой способностью обладал. Эти данные указывают на то, что специфическое взаимодействие серпинов растений со структурированными РНК основано на узнавании структурно-уникальных пространственных мотивов, формируемых с участием неспаренных нуклеотидных остатков в дуплексах РНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: серпин, связывание РНК, РНК-связывающий белок, тРНК, микроРНК, структура РНК, флоэма.

DOI: 10.31857/S0320972521100109

ВВЕДЕНИЕ

Серпины составляют многочисленное семейство белков-ингибиторов протеиназ; они имеют характерную консервативную третичную структуру и обнаружены у всех живых организ-

мов [1, 2]. Большинство белков семейства серпинов является ингибиторами сериновых протеиназ, что и дало им название (serine protease inhibitor, serpin). Тем не менее среди серпинов обнаружены белки, ингибирующие и другие виды протеиназ [3–5], а также неингибирующие

Принятые сокращения: AtMC1 – *A. thaliana* metacaspase 1 (метакаспаза 1 резуховидки Таля); AtMC9 – *A. thaliana* metacaspase 9 (метакаспаза 9 резуховидки Таля); AtSerpin1 – *A. thaliana* serpin 1 (серпин 1 резуховидки Таля); CmPS1 – *Cucurbita maxima* phloem serpin 1 (флоэмный серпин 1 тыквы гигантской); PSTVd – potato spindle tuber viroid (вириод веретеновидности клубней картофеля); RCL – reactive center loop (ингибиторная петля); TCTP – translationally controlled tumor protein (трансляционно контролируемый опухолевый белок).

* Адресат для корреспонденции.

серпины [6–9], причисленные к данному семейству на основании характерной структуры белковой молекулы.

Структура молекулы типичного серпина формируется приблизительно 350–400 аминокислотными остатками и обычно включает три β -слоя и 8–9 α -спиралей, окружающих центральный β -слой (т.н. β -слой А), состоящий из пяти β -тяжей. Сразу же за одним из двух центральных тяжей β -слоя А расположен неструктурированный участок полипептидной цепи, находящийся на поверхности молекулы серпина и носящий название «ингибиторная петля» (reactive center loop, RCL). Часть RCL служит «наживкой», узнаваемой протеиназой, ингибируемой данным серпином, как субстрат для протеолиза [10–12]. Ингибиторный механизм серпина основан на резком изменении его конформации, происходящем на промежуточной стадии протеолиза RCL протеиназой, которая, в силу особенностей механизма катализа, в этот момент ковалентно связана с RCL. При конформационном переходе серпина ингибиторная петля втягивается в пространство между двумя центральными тяжями β -слоя А и образует дополнительный β -тяж в его составе, при этом протеиназа теряет ферментативную активность в результате нарушения ее пространственной структуры и оказывается неспособной завершить расщепление ингибиторной петли [1, 12, 13]. Таким образом, при ингибировании протеиназы серпином происходит образование ковалентной связи между одной молекулой протеиназы и одной молекулой серпина, которое приводит к инактивации данной молекулы протеиназы и является необратимым [2, 14].

Помимо собственно ингибирования протеиназ, известны и другие функции, выполняемые серпинами, среди них – перенос гормонов [6, 7], участие в фолдинге белков [8], накопление аминокислот [9]. Отдельно стоит упомянуть ингибитор ядерной протеазы MENT (myeloid and erythroid nuclear termination stage-specific protein), который способствует конденсации хроматина в терминально дифференцированных клетках птиц [15, 16], а также ингибитор лейкоцитарной эластазы (LEI), в определенных условиях приобретающий активность ДНКазы II и участвующий во фрагментации хроматина в процессе апоптоза [17, 18]. До недавнего времени лишь для этих двух серпинов была показана способность к взаимодействию с нуклеиновыми кислотами.

Анализ геномов нескольких десятков растений показал, что гены серпинов составляют небольшие мультигенные семейства, включающие 5–10 генов [19]. Сравнительный анализ первич-

ной структуры серпинов разных видов растений показал, что эти белки образуют несколько обособленных и достаточно удаленных друг от друга кластеров, соответствующих порядкам царства растений, что, как полагают, может свидетельствовать о давней дивергенции этих белков, происшедшей после эволюционного расхождения порядков, а также их функциональной специализации в отдаленных группах растений [19]. Исключение составляют серпины так называемой LR-группы, названные по наличию инвариантных остатков лейцина (L) и аргинина (R) в последовательности RCL и обнаруженные у всех растений, включая одноклеточные и колониальные зеленые водоросли. Предполагают, что серпины LR-группы в силу консервативности первичной структуры могут выполнять сходные функции у эволюционно удаленных растений [19].

Серпины растений способны ингибировать протеиназы семейства химотрипсина, которые являются наиболее распространенными мишенями серпинов животных [1, 20]. Вместе с тем, поскольку геномы растений не кодируют протеиназы такого типа, выявление функций серпинов растений не может основываться на сходстве их последовательностей с белками других организмов и требует экспериментальной работы. В настоящее время с функциональной точки зрения охарактеризовано лишь несколько серпинов растений.

Для белка *Serpin1 Arabidopsis thaliana* (*AtSerpin1*), относящегося к LR-группе, обнаружено три растительных протеиназы-мишени. Во-первых, *AtSerpin1* способен образовывать ковалентные комплексы с папаин-подобной протеиназой RD21 (responsive to desiccation 21), которая локализуется в вакуоли [21]. Поскольку известно, что высвобождение вакуолярных протеиназ в цитоплазму в результате нарушения целостности тонопласта вызывает клеточную смерть при развитии гиперчувствительного ответа у растений, была предложена модель, согласно которой локализованный в цитоплазме *AtSerpin1* контролирует активность протеиназы RD21 при ее высвобождении в цитоплазму и таким образом модулирует индукцию клеточной смерти [21]. В подтверждение этой модели показано, что сверхэкспрессия белка *AtSerpin1* в определенных условиях способна подавлять развитие клеточной смерти [22]. Во-вторых, *AtSerpin1* образует комплекс с протеиназой *AtMC1 Arabidopsis thaliana* (metacaspase 1), относящейся к метакаспазам растений, отдаленно родственным каспазам животных, и ингибирует развитие клеточной смерти, индуцированное *AtMC1* [23]. В-третьих, *AtSerpin1* способен взаимодей-

вать с еще одной метакаспазой, AtMC9, однако функциональное значение ингибирования активности AtMC9 белком AtSerpin1 *in vivo* остается неизвестным [24]. Таким образом, имеющиеся данные свидетельствуют об участии белка AtSerpin1 в процессах, связанных с регулированием индукции программируемой клеточной смерти.

Для флоэмного серпина тыквы (*Cucurbita maxima* phloem serpin 1, CmPS1), также относящегося к LR-группе, природная протеиназа-мишень неизвестна, однако показано, что он способен ингибировать эластазу – фермент млекопитающих, относящийся к сериновым протеиназам [25]. Было обнаружено, что повышение уровня CmPS1 коррелирует со снижением способности тлей питаться и размножаться на растениях, что дало основание предполагать защитную роль CmPS1, которая может быть связана с ингибированием пищеварительных протеиназ насекомых. Тем не менее в прямом эксперименте добавление рекомбинантного белка CmPS1 к корму тлей не имело какого-либо эффекта на их выживание [25]. С другой стороны, питание с добавлением рекомбинантного белка AtSerpin1 приводило к замедлению роста и повышению смертности личинок тлей и египетской хлопковой совки *Spodoptera littoralis* [26]. Наличие защитной функции, заключающейся в ингибировании пищеварительных протеаз насекомых, предполагается также у серпинов, которые в существенных количествах накапливаются в зернах злаковых [27].

Недавно мы продемонстрировали способность CmPS1 к связыванию РНК. При этом в условиях *in vitro* данный белок наиболее эффективно взаимодействует с высокоструктурированными РНК, в частности формируя специфический комплекс с тРНК [28]. С учетом того, что тРНК и тРНК-подобные структуры, как полагают, содержат сигналы, направляющие транспорт молекул РНК по флоэме [29], а также способности ортолога CmPS1 из огурца (*Cucumis sativus*) к дальнему (системному) транспорту по флоэме [30], была предложена гипотеза, согласно которой белок CmPS1 обладает не связанными с ингибированием протеиназ дополнительными регуляторными функциями, которые могут заключаться в участии в системном сигналинге, основанном на флоэмном транспорте РНК [31].

В настоящей статье продемонстрирована способность белка AtSerpin1 связывать РНК, показано его эффективное взаимодействие с тРНК, а также представлены результаты исследования специфичности связывания тРНК белками AtSerpin1 и CmPS1 и взаимодействия

белка CmPS1 с предшественником микроРНК. Полученные данные свидетельствуют о взаимодействии серпинов с элементами третичной структуры молекул РНК, такими как пространственные мотивы в несовершенных дуплексах РНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Генетические конструкции. Конструкции pET33b(+)[CmPS1] для экспрессии белка CmPS1 в бактериальных клетках и pBSCII-SK(+)-miR390 для получения *in vitro* T7-транскрипта pre-miR390 описаны ранее [28, 32]. Для получения конструкции pET33b(+)[AtSerpin1] кодирующую последовательность белка AtSerpin1 амплифицировали с использованием праймеров 5'-GGCCATGGACGTGCGTGAATCAATCTC и 5'-CGCTCGAGATGCAACGGATCAACAACCTGG на матрице кДНК *A. thaliana*. Полученный продукт амплификации расщепляли эндонуклеазами рестрикции *NcoI* и *XhoI* и лигировали с аналогичным образом разрезанным вектором pET33b(+). Для получения мутантных вариантов pre-miR390, Loop и 5M, проводили амплификацию на матрице pBSCII-SK(+)-miR390 с использованием праймера 5'-GCGGTACCGAGAAATAGCTATAAAGCTCAGGAG в комбинации либо с праймером 5'-TCGGATCCAAGAAGAAGCTATGGAACTCAGGATGGATAGCGCCAAGCCATGGCGCTATCCCTC, либо с праймером 5'-TCGGA-TCCAAGAAATAGCTATAAAACTCAGGAGGGATAGCG соответственно. Полученные продукты разрезали с использованием рестриктаз *KpnI* и *BamHI* и лигировали с аналогичным образом разрезанным вектором pBSCII-SK(+). Для получения двойного мутанта последнюю пару праймеров использовали для амплификации на матрице мутантной конструкции pBSCII-SK(+)-miR390-Loop.

Получение рекомбинантных белков. Для наработки рекомбинантных белков CmPS1 и AtSerpin1 использовали конструкции pET33b(+)[CmPS1] и pET33b(+)[AtSerpin1], которыми трансформировали клетки *E. coli* штамма BL-21(DE3). Полученные клоны-продуценты выращивали в течение ночи при 37 °С в среде 2YT, содержащей канамицин, при качании на скорости 180 об./мин. Затем 30 мл ночной культуры использовали для инокуляции 370 мл свежей среды 2YT с канамицином. После инкубации культуры в течение 1 ч при 37 °С при качании на скорости 180 об./мин индуцировали экспрессию рекомбинантных белков добавлением IPTG до конечной концентрации 1 мМ. Культуры инку-

бирова́ли в течение 3 ч в тех же условиях, затем собирали клетки центрифугированием при 4500 g в течение 10 мин и ресуспендировали в 10 мл буфера А (6 М гуанидина гидрохлорид, 100 мМ NaH₂PO₄, 10 мМ Tris-HCl, pH 8,0) с добавлением PMSF до конечной концентрации 5 мМ, после чего инкубировали в течение часа при комнатной температуре и качании. Далее лизат центрифугировали в течение 10 мин при 20 200 g с отбором супернатанта в хроматографическую колонку с Ni-NTA агарозой «Protino» («Macherey-Nagel», Германия). Для связывания белков с Ni-NTA агарозой колонку в течение часа инкубировали при комнатной температуре с умеренным перемешиванием. Далее колонку промывали, последовательно добавляя по 10 мл буфера А, буфера В (8 М мочеви́на, 100 мМ NaH₂PO₄, 10 мМ Tris-HCl, pH 8,0) и буфера С (8 М мочеви́на, 100 мМ NaH₂PO₄, 10 мМ Tris-HCl, pH 6,3). Затем связанные белки элюировали буфером Е (8 М мочеви́на, 100 мМ NaH₂PO₄, 10 мМ Tris-HCl, pH 4,5) и ренатурировали путем диализа с использованием диализных мешков SERVAPOR® (MWCO 12000–14000, диаметр 50 мм; «SERVA», Германия) против высокоочищенной воды в случае CmPS1, либо против буфера (200 мкМ Tris-HCl, pH 7,5) – в случае диализа AtSerpin1.

РНК-субстраты для связывания с белком. Для экспериментов по связыванию тРНК с белком использовали коммерческий препарат дрожжевой тРНК («Sigma», США), а также обогащенную тРНК фракцию растительных РНК [28]. Для ее получения с помощью реагента ExtractRNA («Евроген», Россия) из листовой ткани растения был выделен препарат тотальной РНК. Далее к нему был добавлен хлорид лития до конечной концентрации 2 М. Смесь инкубировали в течение ночи при 4 °С с последующим центрифугированием при 20 000 g в течение 15 мин при 4 °С для осаждения фракции длинных РНК. После этого к супернатанту был добавлен этанол для последующего осаждения центрифугированием обогащенной тРНК фракции, как было описано ранее [28]. Остальные РНК-субстраты были получены путем транскрипции *in vitro* с T7 РНК-полимеразой («Thermo Fisher Scientific», США) согласно протоколу производителя. Транскрипты РНК ТСТР (translationally controlled tumor protein) и PSTVd (potato spindle tuber viroid) были получены на матрице ранее описанных конструкций рBSCII-SK(+)-ТСТР [28] и рBSCII-SK(+)-PSTV [33], предварительно линейаризованных по сайту *Xba*I. Транскрипты pre-miR390 и двух ее мутантных вариантов (pre-miR390 Loop, pre-miR390 5M) были получены на матрицах соответствующих конструк-

ций, предварительно линейаризованных по сайту *Vam*HI. Транскрипт pre-miR390 5M-Loop был получен с использованием продукта амплификации двойного мутанта в качестве матрицы. После завершения транскрипции РНК-субстраты были очищены из реакционной смеси с помощью экстракции смесью фенол/хлороформ и осаждения этанолом.

Анализ РНК-связывающих свойств белков методом сдвига в агарозном геле. Для связывания к РНК-субстратам добавляли соответствующие различным молярным соотношениям рассчитанные количества белка, после чего инкубировали в течение 20 мин на ледяной бане в буфере для связывания (50 мМ KCl, 0,1 мМ EDTA, 5% глицерин, 10 мМ HEPES-HCl, pH 8,0). Концентрация РНК в смеси для связывания имела следующие значения: тРНК – 171 нМ; PSTVd – 43 нМ; pre-miR390-wt (дикий тип) и pre-miR390-5M – 105 нМ; pre-miR390-Loop и pre-miR390-5M-Loop – 148 нМ; ТСТР – 66 нМ. После инкубации образцы наносили на 1,5%-ный агарозный гель, содержащий бромистый этидий, для электрофореза. Результаты фиксировали с помощью системы гель-документации ChemiDoc XRS+ («Bio-Rad», США).

Микротермофорез. Анализ взаимодействия тРНК с белком проводили в экспериментах титрования методом микротермофореза [34, 35]. Комплексы формировали при постоянной концентрации 0,5 мкМ инициаторной tRNA^{fMet}, несущей флуоресцентную метку Bodipy FL («Thermo Fisher Scientific») на α-аминогруппе метионина, при концентрации белка, изменяющейся от 0,0195 до 20 мкМ. Анализ проводили в буферном растворе (50 мМ NaCl, 5% глицерин, 10 мМ HEPES-HCl, pH 8,0). После смешивания образцы инкубировали в течение 20 мин при температуре 0 °С, после чего центрифугировали при 11 000 об./мин в течение минуты. Анализ изменения флуоресценции проводили с помощью прибора Monolith NT.115 с использованием стандартных капилляров MO-K022 («NanoTemper Technologies», Германия). Интенсивность излучения ИК-лазера составляла 40%. Аппроксимация данных, полученных методом термофореза, проводилась для трех измерений.

Анализ селективности связывания тРНК белком. Для исследования селективности связывания белка с тРНК была приготовлена смесь, содержащая РНК и белок в молярном соотношении 1 : 10 в буфере для связывания (50 мМ KCl, 0,1 мМ EDTA, 5% глицерин, 10 мМ HEPES-HCl, pH 8,0). После инкубации в течение 20 мин на ледяной бане смесь была нанесена на агарозный гель для проведения электрофореза. Затем фрагмент геля, содержащий комплексы тРНК с

белком, вырезали, помещали в спин-колонку с фильтром Mini Bio-Spin («Bio-Rad») и центрифугировали при 6000 g в течение 4 мин. Пропущенная через колонку жидкость была использована для выделения РНК с помощью экстракции смесью фенол/хлороформ и осаждения этанолом. После определения концентрации с помощью бескуветного спектрофотометра Nanodrop 2000 («Thermo Scientific») образцы РНК секвенировали методом высокопроизводительного секвенирования (next generation sequencing, NGS; ООО «Геноаналитика», Россия) параллельно с эквивалентным количеством исходных препаратов тРНК. Контроль качества секвенирования проводили с помощью программы FastQC [36]. Для анализа селективности связывания тРНК белком AtSerp1 чтения были выровнены на последовательности тРНК *A. thaliana* из базы данных tRNAdb [37] с помощью алгоритма Bowtie2 [38, 39], а также на геном *A. thaliana* (идентификатор RefSeq: GCF_000001735.4) с помощью HISAT2 [40]. Для анализа селективности связывания тРНК белком CmPS1 чтения были выровнены на геном *S. maxima* (идентификатор RefSeq: GCF_002738345.1) с помощью программы STAR [41]. Подсчет количества выровненных чтений проводили с помощью алгоритма HTSeq [42].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Способность белка AtSerp1 к связыванию РНК. Способность связывать РНК была показана для белка CmPS1 [28], но не изучалась для других серпинов растений, и оставалось неясным, является ли это свойство уникальной особенностью CmPS1. В настоящей работе проводился анализ РНК-связывающих свойств белка *A. thaliana* AtSerp1, относящегося, как и белок CmPS1, к LR-группе серпинов. Кодированная последовательность белка AtSerp1 была амплифицирована на матрице кДНК *A. thaliana* и клонирована в составе вектора pET33b(+). Рекомбинантный AtSerp1, слитый с последовательностью из шести гистидиловых остатков, был экспрессирован в клетках *E. coli*, аффинно очищен на Ni-NTA агарозе и ренатурирован. Анализ РНК-связывающих свойств полученного белка проводили методом сдвига в геле. В этих экспериментах РНК инкубировали с увеличивающимися количествами белка и затем анализировали в агарозном геле. В качестве контроля использовали аналогичным образом полученный препарат рекомбинантного белка CmPS1. Как и в ранее описанных эксперимен-

тах [28], при связывании тРНК белок CmPS1 давал три типа комплексов, а именно: комплексы, неспособные входить в гель; движущиеся в геле комплексы, подвижность которых уменьшалась с увеличением соотношения белок : РНК; и специфический комплекс CmPS1–тРНК, видимый в геле как дискретная полоса (рис. 1). Комплексы двух первых типов возникают, как предполагается, ввиду наличия у белка CmPS1 способности к неспецифическому связыванию высокоструктурированных РНК, проявляющейся в образовании подобного рода комплексов с такими РНК, как РНК транскрипционно контролируемого опухолевого белка ТСТР и вирида веретеновидности клубней картофеля PSTVd, которые имеют выраженную вторичную структуру и могут рассматриваться как несовершенные дуплексы РНК [28]. При связывании белка AtSerp1 с тРНК формировался дискретный комплекс, сходный с тем, который наблюдается в случае CmPS1, однако образующийся при несколько большем соотношении белок : РНК. При этом не способные входить в гель комплексы в случае белка AtSerp1 не наблюдались (рис. 1). Еще одно существенное отличие в характере связывания тРНК белками AtSerp1 и CmPS1 проявлялось в переходе РНК из состава специфических комплексов в состав неспецифических при увеличении соотношения белок : РНК в случае CmPS1 и отсутствие такого перехода в случае белка AtSerp1 (рис. 1). Эти наблюдения указывают на то, что способность AtSerp1 к неспецифическому связыванию РНК значительно ниже таковой белка CmPS1. Для проверки этого вывода было проведено связывание белком AtSerp1 РНК ТСТР и PSTVd, которые, как было показано ранее, образуют с белком CmPS1 комплексы за счет неспецифической РНК-связывающей активности белка CmPS1 [28]. В экспериментах по сдвигу в геле комплексы этих РНК с белком AtSerp1 практически не обнаруживались (рис. 1). Таким образом, можно заключить, что белок AtSerp1, как и CmPS1, способен связывать тРНК, но обладает сравнительно низкой неспецифической РНК-связывающей активностью.

Оценка аффинности AtSerp1 к тРНК. Количественную оценку связывания тРНК с белком AtSerp1 проводили при помощи микротермофореза, где в качестве репортера выступала молекула инициаторной Вру-Met-tRNA^{Met} [34, 35]. В условиях увеличивающейся концентрации белка подвижность флуоресцентно-меченой тРНК изменялась в результате образования комплекса. Аффинность такого взаимодействия оценивалась в микромолярном диапазоне ($K_d = 3,9 \pm 2,9$ мкМ) (рис. 2) и была соизмерима сред-

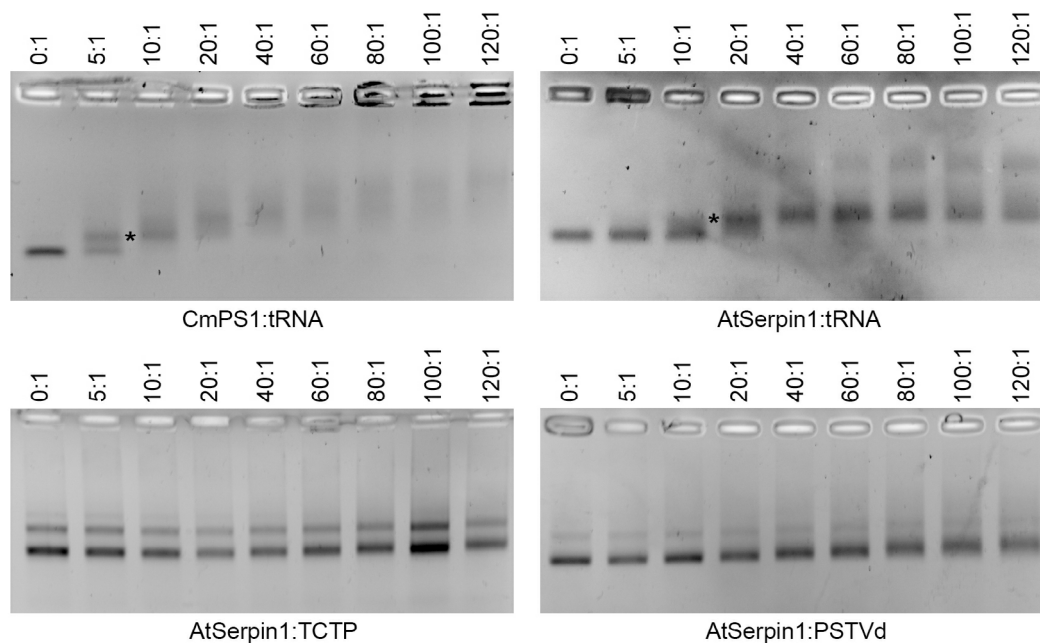


Рис. 1. Анализ РНК-связывающих свойств белка AtSerpin1 методом сдвига в геле. Рекombинантный белок инкубировали с РНК и наносили на агарозный гель. Приведены эксперименты по связыванию белком AtSerpin1 тРНК, РНК ТСТР и PSTVd. В качестве контроля использовали связывание тРНК белком CmPS1. Молярное соотношение белок : РНК указано над каждой дорожкой. Звездочкой обозначено положение дискретного комплекса с тРНК

ству инициаторного фактора трансляции IF2 к инициаторной Вру-Met-tRNA^{Met} [35]. Полученное значение константы диссоциации комплекса AtSerpin1 с инициаторной Вру-Met-tRNA^{Met} мы рассматриваем как нижнюю оценку ввиду недостаточного выхода кривой в насыщение относительно количества белка. Следует также заметить, что данные микротермофореза являются дополнительным подтверждением способности белка AtSerpin1 связывать РНК.

Селективность связывания тРНК белком AtSerpin1. При анализе РНК-связывающей активности AtSerpin1 методом сдвига в геле использовали препарат тотальной тРНК дрожжей, что не давало возможности оценить, способен ли данный белок предпочтительно связывать какие-либо тРНК *A. thaliana*. Для проверки наличия этой способности использовали фракцию, обогащенную тРНК, которая была выделена как описано ранее [28] из препарата тотальной РНК, полученной из листьев *A. thaliana*, и включала преимущественно тРНК, а также незначительные количества других клеточных РНК.

Для того, чтобы оценить возможность предпочтительного связывания каких-либо тРНК белком AtSerpin1, анализировали состав РНК в комплексе тРНК–AtSerpin1, полученном при соотношении белок : РНК = 10 : 1, при котором только часть РНК в инкубационной смеси пере-

ходила в состав комплекса. Полоса, соответствующая такому комплексу, была вырезана из агарозного геля и использована для выделения содержащейся в комплексе РНК, которую затем

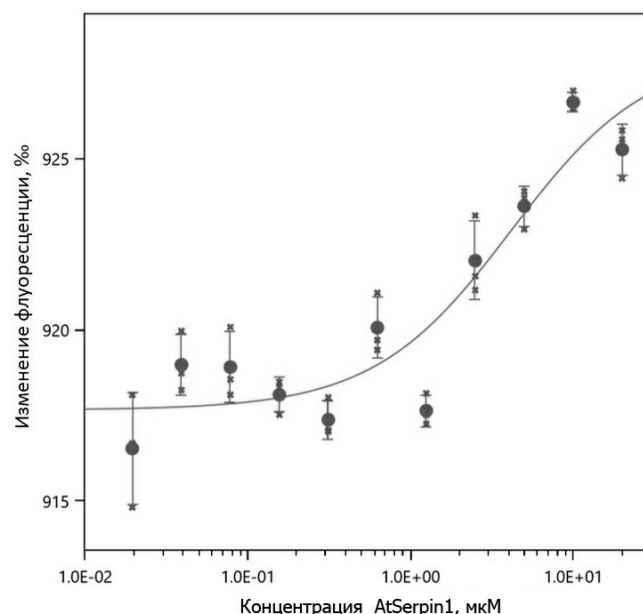


Рис. 2. Образование комплекса белка AtSerpin1 с Вру-Met-tRNA^{Met}, измеренное методом микротермофореза в условиях изменяющейся концентрации белка. Показаны значения, полученные в трех экспериментах, их среднее и стандартное отклонение

подвергали высокопроизводительному секвенированию. В качестве контроля использовали РНК, инкубированную в отсутствие белка AtSerp1 и, следовательно, имеющую исходную электрофоретическую подвижность в агарозном геле. Проводили секвенирование двух независимо полученных опытных образцов и двух контрольных образцов.

После технической фильтрации данных NGS для каждого образца определяли доли чтений, соответствующих всем индивидуальным тРНК *A. thaliana*, имеющимся в базе данных тРНК данного вида (<http://trnadb.bioinf.uni-leipzig.de>). Полученные данные (таблица в Приложении) подвергались фильтрации по двум параметрам. Во-первых, были отсеяны тРНК, для которых суммарное число чтений в двух опытных и двух контрольных образцах было меньше 200, что позволило исключить из рассмотрения последовательности с недостаточным для достоверного анализа покрытием. Во-вторых, были отсеяны тРНК, для которых разница в доле чтений между двумя повторностями эксперимента и/или контроля составляла более 30%, что делало

сравнение экспериментальных и контрольных данных заведомо недостоверным. Полученные данные (табл. 1) демонстрируют, что при образовании комплекса AtSerp1 с тРНК происходит изменение относительных долей тРНК в сравнении с тотальной тРНК *A. thaliana*. Для ряда тРНК наблюдалось увеличение доли в сравнении с контролем, тогда как для остальных — уменьшение этой доли. В частности, в 3,68–4,19 раза по сравнению с контролем увеличивалась доля tRNA-Gly(GCC), tRNA-Tyr(GUA) и tRNA-Ser(GCU), что может говорить об их предпочтительном связывании. Вместе с тем, все виды тРНК *A. thaliana* обнаруживались в составе комплекса с белком AtSerp1 в условиях, когда тРНК находилась в избытке и только часть молекул тРНК в инкубационной смеси переходила в состав комплекса. Эти данные говорят об отсутствии строгой избирательности связывания тРНК белком AtSerp1 и его способности связывать все виды тРНК, наблюдаемая разница в эффективности связывания которых является количественной, а не качественной. Поскольку AtSerp1 формирует комплексы с

Таблица 1. Анализ предпочтительности связывания тРНК *A. thaliana* белком AtSerp1 *in vitro*

тРНК	Идентификатор tRNAdb	Комплекс, %*	Контроль, %*	Отношение
tRNA-Gly(GCC)	tdbD00005327	0,05 ± 0,01	0,013 ± 0,002	4,19
tRNA-Tyr(GUA)	tdbD00011652	0,13 ± 0,01	0,033 ± 0,004	3,90
tRNA-Ser(GCU)	tdbD00009863	0,27 ± 0,02	0,07 ± 0,01	3,68
tRNA-Ala(UGC)	tdbD00003871	0,016 ± 0,001	0,0068 ± 0,0005	2,35
tRNA-Ser(GGA)	tdbD00009864	3,1 ± 0,2	1,40 ± 0,06	2,20
tRNA-Ala(AGC)	tdbD00003864	0,042 ± 0,004	0,019 ± 0,002	2,17
tRNA-Asp(GUC)	tdbD00000505	0,270 ± 0,005	0,130 ± 0,005	2,08
tRNA-Ala(AGC)	tdbD00003866	0,043 ± 0,005	0,0205 ± 0,0002	2,07
tRNA-Thr(AGU)	tdbD00010496	0,1477 ± 0,0004	0,07 ± 0,01	2,07
tRNA-Gln(UUG)	tdbD00008612	0,0335 ± 0,0005	0,016 ± 0,002	2,05
tRNA-Asp(GUC)	tdbD00004461	0,272 ± 0,002	0,135 ± 0,005	2,02
tRNA-Asp(GUC)	tdbD00004462	0,261 ± 0,005	0,132 ± 0,005	1,98
tRNA-Thr(AGU)	tdbD00010494	0,14 ± 0,01	0,070 ± 0,007	1,96
tRNA-Asp(GUC)	tdbD00000504	0,245 ± 0,006	0,127 ± 0,005	1,93
tRNA-Gly(GCC)	tdbD00005326	0,11 ± 0,01	0,065 ± 0,001	1,65
tRNA-Thr(AGU)	tdbD00010495	0,052 ± 0,002	0,032 ± 0,002	1,65
tRNA-Gly(GCC)	tdbD00005330	0,073 ± 0,002	0,045 ± 0,002	1,62
tRNA-Gly(GCC)	tdbD00005329	0,104 ± 0,009	0,068 ± 0,002	1,53
tRNA-Pro(UGG)	tdbD00008227	0,045 ± 0,006	0,031 ± 0,002	1,42
tRNA-His(GUG)	tdbD00005721	6,3 ± 0,2	4,8 ± 0,2	1,33

Примечание. В таблице показаны 20 тРНК, имеющих наибольшее отношение эксперимент : контроль и удовлетворяющих критериям фильтрации исходных данных (см. текст). Полные результаты анализа приведены в Приложении к статье.

* Среднее значение, полученное для двух независимых образцов.

тРНК, но не с другими протестированными РНК (рис. 1), можно заключить, что данный белок специфически связывает элементы вторичной/третичной структуры, универсальные для всех тРНК.

Этот вывод согласуется с результатами экспериментов, в которых белок AtSerp1n1 эффективно связывал дрожжевые тРНК, которые не являются его природными лигандами (рис. 1). Помимо этого, выравнивание первичных чтений, полученных с помощью NGS, с полной последовательностью генома *A. thaliana* показало, что часть чтений соответствует тРНК, кодируемым геномами хлоропластов и митохондрий. Согласно полученным данным, доля таких тРНК, составляющая около 60% в исходном препарате, использованном для связывания, увеличивалась при формировании комплекса с AtSerp1n1 до 70% (рисунок в Приложении), что указывало на отсутствие преимущественного связывания этим белком тРНК, кодируемых ядерным геномом. С учетом того, что AtSerp1n1 является цитоплазматическим белком [21] и не может взаимодействовать *in vivo* с хлоропластными и митохондриальными тРНК в силу компартментализации, однако эффективно связывает их *in vitro*, как и гетерологичные дрожжевые тРНК, можно предположить, что белок AtSerp1n1 взаимодействует с универсальными элементами вторичной/третичной структуры тРНК.

Селективность связывания тРНК белком CmPS1. Для того, чтобы оценить, присущ ли характер связывания тРНК, выявленный для AtSerp1n1, белку CmPS1, был проведен эксперимент по анализу селективности связывания, сходный с описанным выше для AtSerp1n1. Рекомбинантный белок CmPS1 инкубировали с обогащенной тРНК фракцией тотального препарата РНК *S. maxima* при соотношении белок : РНК = 10 : 1, когда только часть тРНК в смеси переходила в состав комплексов, которые затем были отделены от несвязавшейся тРНК с помощью электрофореза в агарозном геле. Далее полосу, соответствующую комплексу, вырезали из агарозного геля и использовали для выделения содержащейся в комплексе РНК. Полученный образец вместе с эквивалентным количеством исходного препарата обогащенной тРНК фракции секвенировали с помощью NGS. Полученные чтения выравнивали с последовательностью генома *S. maxima*. Результаты анализа данных NGS для CmPS1 (табл. 2) в целом сходны с теми, которые были получены для AtSerp1n1. В условиях избытка тРНК белок CmPS1 в той или иной степени связывал все тРНК. При этом тРНК в составе комплексов с

Таблица 2. Анализ предпочтительности связывания тРНК *S. maxima* белком CmPS1 *in vitro*

тРНК	Комплекс, %	Контроль, %	Отношение
tRNA-Ala(CGC)	2,73	0,94	2,92
tRNA-Cys(GCA)	5,79	2,54	2,28
tRNA-Thr(GGU)	0,69	0,33	2,06
tRNA-Leu(AAG)	0,07	0,04	1,84
tRNA-Ala(UGC)	4,60	2,59	1,77
tRNA-Ala(AGC)	4,14	2,35	1,76
tRNA-Pro(CGG)	0,03	0,02	1,72
tRNA-Ile(UAU)	0,03	0,02	1,71
tRNA-Thr(CGU)	0,16	0,10	1,68
tRNA-Ser(AGA)	0,45	0,27	1,67
tRNA-Ile(AAU)	0,02	0,01	1,64
tRNA-Leu(UAA)	0,03	0,02	1,57
tRNA-Leu(UAG)	0,15	0,10	1,55
tRNA-Val(CAC)	0,04	0,03	1,50
tRNA-Pro(UGG)	1,04	0,70	1,48
tRNA-Val(UAC)	0,02	0,01	1,47
tRNA-Leu(CAG)	0,03	0,02	1,47
tRNA-Gln(UUG)	0,74	0,53	1,40
tRNA-Asn(AUU)	0,11	0,08	1,40
tRNA-Val(AAC)	0,12	0,08	1,39

Примечание. В таблице показаны 20 тРНК, имеющих наибольшее отношение эксперимент : контроль.

CmPS1, для которых наблюдалось наибольшее увеличение доли в общем количестве тРНК в сравнении с контролем (табл. 2), не соответствовали тем тРНК, для которых было выявлено наибольшее соотношение опыт : контроль в эксперименте с AtSerp1n1 (табл. 1). В целом, эти данные согласуются с выводом о способности белков AtSerp1n1 и CmPS1, относящихся к консервативной LR-группе серпинов, связывать тРНК, узнавая характерные особенности вторичной/третичной структуры, но не какую-либо специфическую нуклеотидную последовательность.

Связывание pre-miR390 белком CmPS1. Специфическое взаимодействие белков и молекул РНК основано на узнавании белками пространственных (3D) мотивов, которые создаются за счет неспаренных нуклеотидных остатков в дуплексах РНК, участвующих в неканонических взаимодействиях и формирующих структурно-уникальные поверхности [43, 44]. Ранее нами было высказано предположение, что связывание тРНК белком CmPS1 может быть основано на узнавании такого рода 3D-мотива [31]. В дан-

ной работе мы провели экспериментальную проверку этого предположения с использованием в качестве РНК-лиганда белка SmPS1 предшественника микроРНК 390 (pre-miR390), который представляет собой несовершенный дуплекс, способный за счет присутствия в его составе неспаренных остатков формировать 3D-мотивы (рис. 3). Связывание белка SmPS1 с полученным *in vitro* T7-транскриптом, соответствующим pre-miR390, анализировали методом сдвига в геле. Было обнаружено, что белок SmPS1 образует с pre-miR390 два типа комплексов, а именно: комплексы, неспособные войти в агарозный гель, и комплексы, мигрирующие в геле (рис. 3), сходные с комплексами, наблюдавшимися ранее при связывании SmPS1 с РНК TCTP и PSTVd, представляющими собой, как и pre-miR390, несовершенные дуплексы

РНК [28]. Далее был проведен анализ способности белка SmPS1 связывать мутантные варианты pre-miR390, в одном из которых было введено пять точечных замен, устраняющих некомплементарные нуклеотидные остатки в стебле шпильчатой структуры pre-miR390 и превращающие ее в совершенный дуплекс (мутант 5M), тогда как в другом был удален район, формирующий дистальную часть стебля и петлю вторичной структуры pre-miR390 (мутант Loop) (рис. 3). В эксперименте по сдвигу в геле с T7-транскриптами 5M и Loop было обнаружено, что оба мутанта сохраняют способность образовывать два типа комплексов, характерные для природной pre-miR390 (рис. 3). При этом в случае мутанта Loop было обнаружено формирование дополнительного комплекса, наблюдаемого как дискретная полоса в агарозном геле

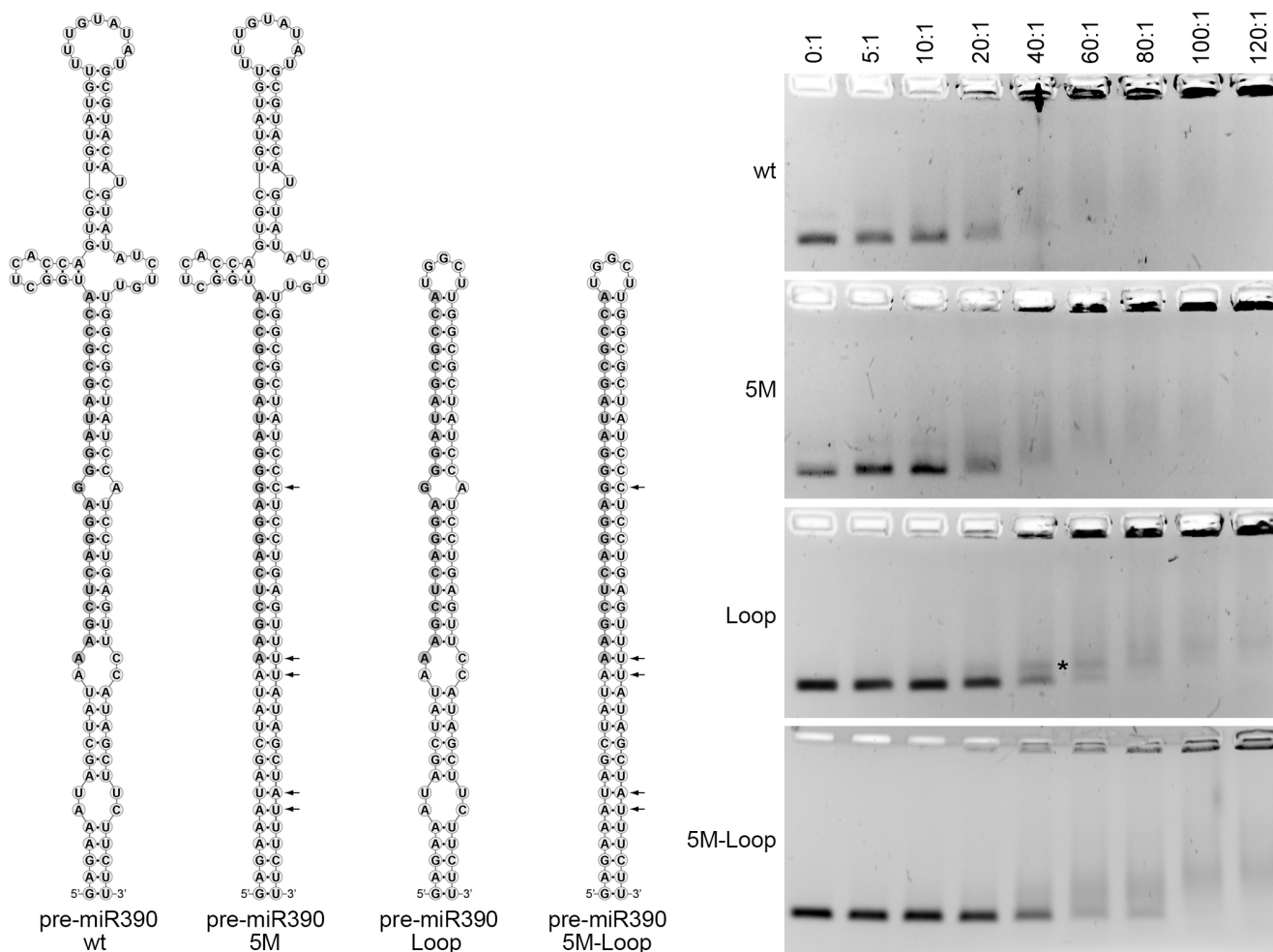


Рис. 3. Связывание pre-miR390 и ее мутантных вариантов белком SmPS1. Показаны модели вторичной структуры pre-miR390 дикого типа (wt) и мутантов 5M, Loop и 5M-Loop. Нуклеотидные остатки, входящие в зрелую miR390, выделены темно-серым цветом. Стрелками отмечены остатки, мутированные в конструкциях 5M и 5M-Loop. Анализ связывания РНК белком SmPS1 проводили методом сдвига в геле. Указаны молярные соотношения белок : РНК для всех РНК-субстратов. Звездочкой обозначено положение дискретного комплекса

(рис. 3) и сходного со специфическим комплексом, формируемым белком CmPS1 и тРНК. Можно предположить, что формирование такого комплекса могло быть результатом взаимодействия CmPS1 с 3D-мотивами, формируемыми некомплемментарными остатками в стебле шпилечной структуры pre-miR390. Вполне вероятно, что эти остатки маскированы в составе природной структуры за счет наличия ее дистального района, включающего петлю, и становятся доступными для взаимодействия с CmPS1 в результате делеции этого района. Для того, чтобы проверить это предположение, был сконструирован дополнительный мутант 5M-Loop, несущий обе мутации, присутствующие в конструкциях 5M и Loop (рис. 3). Связывание белка CmPS1 и транскрипта 5M-Loop показало, что в этом случае дискретный комплекс не образуется (рис. 3), 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 3D-мотивами, существующими в РНК за счет некомплемментарных нуклеотидных остатков.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Взаимодействие белка AtSerp1 с тРНК, продемонстрированное в данной работе, позволяет предполагать, что связывание РНК является общим свойством серпинов LR-группы, включающей и AtSerp1, и CmPS1 (флоэмный серпин тыквы), РНК-связывающие свойства которого были выявлены ранее [28]. С учетом того, что серпины LR-группы являются эволюционно консервативными, предполагают, что функции этих белков могут быть сходными у широкого спектра организмов от одноклеточных зеленых водорослей до цветковых растений [19]. На основании данных о том, что белок AtSerp1 может ингибировать по крайней мере три протеиназы, задействованные в индукции клеточной смерти [21, 23, 24], можно полагать, что одна из функций серпинов LR-группы заключается в регулировании проапоптотических механизмов. Вместе с тем роль связывания РНК, свойственного серпинам этой консервативной группы, в настоящий момент остается неясной.

Способность взаимодействовать с РНК может являться функцией, независимой от ингибирующей активности серпинов. Принимая во внимание данные для CmPS1, который является флоэмным белком [25], и его ортолога из

C. sativus, способного к транспорту по флоэме в удаленные части растения [30], было высказано предположение о том, что связывание тРНК может быть задействовано в двух различных механизмах сигналинга. Во-первых, поскольку многие мРНК, способные к транспорту по флоэме, несут в составе некодирующих областей последовательности тРНК, которые служат сигналами для транслокации таких мРНК по флоэме [29], белок CmPS1, взаимодействуя с этими РНК, может служить белком-транспортером, обеспечивающим их перенос к удаленным частям растения и/или повышающим их стабильность в ситовидных трубках флоэмы. Во-вторых, с учетом того, что цитоплазма ситовидных элементов содержит как полноразмерные тРНК, так и фрагменты тРНК, которые, как известно, выполняют регуляторные функции при ответах на стрессы и в первую очередь на вирусную инфекцию, взаимодействие CmPS1 с тРНК или их фрагментами может играть роль во флоэмном сигналинге [31]. Эта гипотеза согласуется с фактом локализации белка CmPS1 в экстрафасцикулярной флоэме, содержащей белки, выполняющие преимущественно защитные и сигнальные функции [45]. С учетом возможной роли серпинов в системном сигналинге у высших растений было бы интересно выяснить, обладают ли РНК-связывающими свойствами серпины LR-типа, кодируемые эволюционно древними организмами, не имеющими тканей и систем межклеточной коммуникации, такими как, например, одноклеточная зеленая водоросль *Chlamydomonas reinhardtii* и колониальная зеленая водоросль *Volvox carterii*.

С другой стороны, можно предположить наличие взаимосвязи между РНК-связыванием и ингибирующей активностью серпинов, что представляется весьма вероятным с учетом их структурных особенностей, молекулярного механизма ингибирования протеиназ и ряда данных, имеющихся для серпинов животных. В частности, существенной особенностью серпинов является возможность регуляции ингибиторной активности этих белков [1, 46]. Примером такого регулируемого ингибитора может быть хорошо изученный антитромбин III человека, ингибиторная петля которого в достаточной степени экспонируется на поверхности белковой молекулы и становится полностью доступной для протеиназы только после связывания антитромбина с гепарином, который является активатором белка [47–49]. Можно предполагать, что в отсутствие гепарина в растениях тРНК может играть роль регулятора ингибиторной активности CmPS1 по аналогии с гепарином, участвующим в регуляции активности ан-

титромбина III, наиболее структурно близкого белку CmPS1 серпина человека. Действительно, показано конкурентное ингибирование гепарином формирования комплекса CmPS1–тРНК [28]. Кроме того, вполне вероятно, что ингибирование протеиназы серпином, сопряженное с кардинальным изменением его конформации, может существенным образом влиять на способность серпина связывать РНК [31].

В настоящее время для белка AtSerp1n1 не показана способность к транспорту по флоэме. Нельзя исключать, что AtSerp1n1 обладает такой способностью, однако имеющиеся данные об ингибировании белком AtSerp1n1 проапоптотических протеиназ, не имеющих флоэмной локализации, говорят в пользу того, что образование комплекса AtSerp1n1 с тРНК имеет регуляторную функцию, не связанную с флоэмным транспортом. Можно предполагать, что связывание РНК белком AtSerp1n1 представляет собой дополнительный уровень контроля проапоптотической активности протеиназ, являющихся мишенями AtSerp1n1, за счет модулирования ингибирующей активности самого белка AtSerp1n1. Для проверки этой гипотезы требуются дополнительные эксперименты, которые ведутся в нашей лаборатории и ставят целью выявление функциональной связи между двумя известными активностями серпинов LR-группы, а именно ингибированием протеиназ и РНК-связыванием.

В настоящей работе показано, что белок AtSerp1n1 обладает меньшей неспецифической РНК-связывающей активностью в сравнении с CmPS1. Вместе с тем, белки AtSerp1n1 и CmPS1, эффективно связывая тРНК, не проявляют выраженной специфичности в отношении каких-либо видов тРНК растений, в той или иной степени связывая все тРНК в условиях проводившихся экспериментов. Сочетание двух особенностей исследованных серпинов, высокой аффинности к тРНК по сравнению с другими высокоструктурированными РНК и способности связывать все виды тРНК, может быть объяснено взаимодействием этих белков с какими-либо элементами третичной структуры, общими для всех молекул тРНК. Такая модель представляется вполне вероятной, поскольку специфическое связывание белками молекул РНК основано на узнавании пространственных (3D) мотивов, а не элементов первичной структуры [41, 42]. Такие 3D-мотивы возникают в несовершенных дуплексах РНК за счет наличия в их составе некомплементарных оснований, способных участвовать в неканонических взаимодействиях с окружающими нуклеотидными остатками, создавая

уникальные пространственные структуры, с которыми специфически связываются соответствующие белки. С этой точки зрения можно предположить, что исследованные серпины взаимодействуют с консервативными элементами пространственной укладки полинуклеотидной цепи молекул тРНК. Способность серпинов узнавать 3D-мотивы в молекулах РНК нашла подтверждение в экспериментах по связыванию pre-miR390 белком CmPS1. Действительно, мутантный вариант pre-miR390, стебель шпильчатой структуры которого не включал неспаренные нуклеотидные остатки, утрачивал способность формировать комплекс с CmPS1, видимый в геле как дискретная полоса, тогда как другой вариант pre-miR390, сохраняющий некомплементарные остатки, способные к образованию 3D-мотивов, такой способностью обладал. Мы предполагаем, что взаимодействие с такого рода 3D-мотивами является основой специфического связывания серпинами растений некоторых структурированных РНК, таких как тРНК, тогда как неспецифическое связывание РНК, наблюдаемое для CmPS1 и, в существенно меньшей степени, для AtSerp1n1, имеет под собой иную основу.

Результаты, представленные в данной работе, выявляют новые особенности взаимодействия белков AtSerp1n1 и CmPS1 с РНК, но не могут однозначно ответить на вопрос о функциональной значимости таких взаимодействий *in vivo*. Исследование функциональной роли связывания РНК серпинами растений является задачей будущих исследований.

Финансирование. Работа Е.А. Толстыко, Д.А. Чергинцева, С.Ю. Морозова, А.Г. Соловьева выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 17-14-01032).

Конфликт интересов. А.Л. Коневега является учредителем компании «Нанотемпер Технологии Рус», предоставляющей услуги по проведению исследований и представляющей технологии «NanoTemper Technologies GmbH» в России.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>) и на сайте издательства Springer (www.springer.com/journal/10541), том 86, вып. 10, 2021.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gettins, P. G. W. (2002) Serpin structure, mechanism, and function, *Chem. Rev.*, **102**, 4751-4804, doi: 10.1021/cr010170+.
2. Law, R. H. P., Zhang, Q., McGowan, S., Buckle, A. M., Silverman, G. A., et al. (2006) An overview of the serpin superfamily, *Genome Biol.*, **7**, 1-11, doi: 10.1186/gb-2006-7-5-216.
3. Schick, C., Pemberton, P. A., Shi, G. P., Kamachi, Y., Çataltepe, S., et al. (1998) Cross-class inhibition of the cysteine proteinases cathepsins K, L, and S by the serpin squamous cell carcinoma antigen 1: a kinetic analysis, *Biochemistry*, **37**, 5258-5266, doi: 10.1021/bi972521d.
4. Irving, J. A., Pike, R. N., Dai, W., Brömme, D., Worrall, D. M., et al. (2002) Evidence that serpin architecture intrinsically supports papain-like cysteine protease inhibition: engineering α 1-antitrypsin to inhibit cathepsin proteases, *Biochemistry*, **41**, 4998-5004, doi: 10.1021/bi0159985.
5. Ray, C. A., Black, R. A., Kronheim, S. R., Greenstreet, T. A., Sleath, P. R., et al. (1992) Viral inhibition of inflammation: Cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 β converting enzyme, *Cell*, **69**, 597-604, doi: 10.1016/0092-8674(92)90223-Y.
6. Klieber, M. A., Underhill, C., Hammond, G. L., and Muller, Y. A. (2007) Corticosteroid-binding globulin, a structural basis for steroid transport and proteinase-triggered release, *J. Biol. Chem.*, **282**, 29594-29603, doi: 10.1074/jbc.M705014200.
7. Zhou, A., Wei, Z., Read, R. J., and Carrell, R. W. (2006) Structural mechanism for the carriage and release of thyroxine in the blood, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 13321-13326, doi: 10.1073/pnas.0604080103.
8. Mala, J. G. S., and Rose, C. (2010) Interactions of heat shock protein 47 with collagen and the stress response: an unconventional chaperone model? *Life Sci.*, **87**, 579-586, doi: 10.1016/j.lfs.2010.09.024.
9. Huntington, J. A., and Stein, P. E. (2001) Structure and properties of ovalbumin, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **756**, 189-198, doi: 10.1016/S0378-4347(01)00108-6.
10. Kumar, A. (2015) Bayesian phylogeny analysis of vertebrate serpins illustrates evolutionary conservation of the intron and indels based six groups classification system from lampreys for ~500 MY, *PeerJ*, **2015**, e1026, doi: 10.7717/peerj.1026.
11. Marijanovic, E. M., Fodor, J., Riley, B. T., Porebski, B. T., Costa, M. G. S., et al. (2019) Reactive centre loop dynamics and serpin specificity, *Sci. Rep.*, **9**, 1-15, doi: 10.1038/s41598-019-40432-w.
12. Whisstock, J. C., and Bottomley, S. P. (2006) Molecular gymnastics: serpin structure, folding and misfolding, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **16**, 761-768, doi: 10.1016/j.sbi.2006.10.005.
13. Whisstock, J. C., Skinner, R., Carrell, R. W., and Lesk, A. M. (2000) Conformational changes in serpins: I. The native and cleaved conformations of α 1-antitrypsin, *J. Mol. Biol.*, **296**, 685-699, doi: 10.1006/jmbi.1999.3520.
14. Rühlmann, A., Kukla, D., Schwager, P., Bartels, K., and Huber, R. (1973) Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor. Crystal structure determination and stereochemistry of the contact region, *J. Mol. Biol.*, **77**, 417-436, doi: 10.1016/0022-2836(73)90448-8.
15. Grigoryev, S. A., and Woodcock, C. L. (1998) Chromatin structure in granulocytes. A link between tight compaction and accumulation of a heterochromatin-associated protein (MENT), *J. Biol. Chem.*, **273**, 3082-3089, doi: 10.1074/jbc.273.5.3082.
16. Irving, J. A., Shushanov, S. S., Pike, R. N., Popova, E. Y., Brömme, D., et al. (2002) Inhibitory activity of a heterochromatin-associated serpin (MENT) against papain-like cysteine proteinases affects chromatin structure and blocks cell proliferation, *J. Biol. Chem.*, **277**, 13192-13201, doi: 10.1074/jbc.M108460200.
17. Torriglia, A., Perani, P., Brossas, J. Y., Chaudun, E., Treton, J., et al. (1998) L-DNase II, a molecule that links proteases and endonucleases in apoptosis, derives from the ubiquitous serpin leukocyte elastase inhibitor, *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 3612-3619, doi: 10.1128/mcb.18.6.3612.
18. Padron-Barthe, L., Lepretre, C., Martin, E., Counis, M.-F., and Torriglia, A. (2007) Conformational modification of serpins transforms leukocyte elastase inhibitor into an endonuclease involved in apoptosis, *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 4028-4036, doi: 10.1128/mcb.01959-06.
19. Cohen, M., Roberts, T. H., and Fluhr, R. (2015) Serpins in plants, in *Serpin Fam. Proteins with Mult. Funct. Heal. Dis. Cham*, Springer International Publishing, pp. 15-28.
20. Roberts, T. H., and Hejgaard, J. (2008) Serpins in plants and green algae, *Funct. Integr. Genomics*, **8**, 1-27, doi: 10.1007/s10142-007-0059-2.
21. Lampl, N., Alkan, N., Davydov, O., and Fluhr, R. (2013) Set-point control of RD21 protease activity by AtSerpin1 controls cell death in Arabidopsis, *Plant J.*, **74**, 498-510, doi: 10.1111/tpj.12141.
22. Koh, E., Carmieli, R., Mor, A., and Fluhr, R. (2016) Singlet oxygen-induced membrane disruption and serpin-protease balance in vacuolar-driven cell death, *Plant Physiol.*, **171**, 1616-1625, doi: 10.1104/pp.15.02026.
23. Lema Asqui, S., Vercammen, D., Serrano, I., Valls, M., Rivas, S., et al. (2018) ATSERPIN1 is an inhibitor of the metacaspase AtMC1-mediated cell death and autocatalytic processing in planta, *New Phytol.*, **218**, 1156-1166, doi: 10.1111/nph.14446.
24. Vercammen, D., Belenghi, B., van de Cotte, B., Beunens, T., Gavigan, J. A., et al. (2006) Serpin1 of *Arabidopsis thaliana* is a suicide inhibitor for metacaspase 9, *J. Mol. Biol.*, **364**, 625-636, doi: 10.1016/j.jmb.2006.09.010.
25. Yoo, B. C., Aoki, K., Xiang, Y., Campbell, L. R., Hull, R. J., et al. (2000) Characterization of Cucurbita maxima phloem serpin-1 (CmPS-1). A developmentally regulated elastase inhibitor, *J. Biol. Chem.*, **275**, 35122-35128, doi: 10.1074/jbc.M006060200.
26. Alvarez-Alfageme, F., Maharramov, J., Carrillo, L., Vandenabeele, S., Vercammen, D., et al. (2011) Potential use of a serpin from Arabidopsis for pest control, *PLoS One*, **6**, e20278, doi: 10.1371/journal.pone.0020278.
27. Cohen, M., Davydov, O., and Fluhr, R. (2019) Plant serpin protease inhibitors: Specificity and duality of function, *J. Exp. Bot.*, **70**, 2077-2085, doi: 10.1093/jxb/ery460.
28. Tolstyko, E. A., Lezzhov, A. A., Pankratenko, A. V., Serebryakova, M. V., Solovyev, A. G., and Morozov, S. Y. (2020) Detection and *in vitro* studies of Cucurbita maxima phloem serpin-1 RNA-binding properties, *Biochimie*, **170**, 118-127, doi: 10.1016/j.biochi.2020.01.006.
29. Kehr, J., and Kragler, F. (2018) Long distance RNA movement, *New Phytol.*, **218**, 29-40, doi: 10.1111/nph.15025.
30. Petersen, M. L. C., Hejgaard, J., Thompson, G. A., and Schulz, A. (2005) Cucurbit phloem serpins are graft-transmissible and appear to be resistant to turnover in the sieve element-companion cell complex, *J. Exp. Bot.*, **56**, 3111-3120, doi: 10.1093/jxb/eri308.
31. Tolstyko, E. A., Lezzhov, A. A., Morozov, S. Y., and Solovyev, A. G. (2020) Phloem transport of structured RNAs: a widening repertoire of trafficking signals and protein factors, *Plant Sci.*, **299**, 110602, doi: 10.1016/j.plantsci.2020.110602.
32. Atabekova, A. K., Pankratenko, A. V., Makarova, S. S., Lazareva, E. A., Owens, R. A., et al. (2017) Phylogenetic and functional analyses of a plant protein related to human B-cell receptor-associated proteins, *Biochimie*, **132**, 28-37, doi: 10.1016/j.biochi.2016.10.009.

33. Makarova, S. S., Solovyev, A. G., and Morozov, S. Y. (2014) RNA-binding properties of the plant protein Nt-4/1, *Biochemistry*, **79**, 717-726, doi: 10.1134/S000629791407013X.
34. Asmari, M., Ratih, R., Alhazmi, H. A., El Deeb, S. (2018) Thermophoresis for characterizing biomolecular interaction, *Methods*, **146**, 107-119, doi: 10.1016/j.ymeth.2018.02.003.
35. Vinogradova, D. S., Zegarra, V., Maksimova, E., Nakamoto, J. A., Kasatsky, P., et al. (2020) How the initiating ribosome copes with ppGpp to translate mRNAs, *PLoS Biol.*, **18**, e3000593, doi: 10.1371/journal.pbio.3000593.
36. Andrews, S. (2010) FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
37. Jühling, F., Mörl, M., Hartmann, R. K., Sprinzl, M., Stadler, P. F., and Pütz, J. (2009) tRNADB 2009: compilation of tRNA sequences and tRNA genes, *Nucleic Acids Res.*, **37**, D159-D162, doi: 10.1093/nar/gkn772.
38. Langmead, B., and Salzberg, S. L. (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2, *Nat. Methods*, **9**, 357-359, doi: 10.1038/nmeth.1923.
39. Langmead, B., Wilks, C., Antonescu, V., and Charles, R. (2019) Scaling read aligners to hundreds of threads on general-purpose processors, *Bioinformatics*, **35**, 421-432, doi: 10.1093/bioinformatics/bty648.
40. Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., Bennett, C., and Salzberg, S. L. (2019) Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype, *Nat. Biotechnol.*, **37**, 907-915, doi: 10.1038/s41587-019-0201-4.
41. Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., et al. (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner, *Bioinformatics*, **29**, 15-21, doi: 10.1093/bioinformatics/bts635.
42. Anders, S., Pyl, P. T., and Huber, W. (2014) HTSeq – a Python framework to work with high-throughput sequencing data, *bioRxiv*, 002824, doi: 10.1101/002824.
43. Chojnowski, G., Waleń, T., and Bujnicki, J. M. (2014) RNA Bricks – a database of RNA 3D motifs and their interactions, *Nucleic Acids Res.*, **42**, D123-31, doi: 10.1093/nar/gkt1084.
44. Leontis, N. B., Lescoute, A., and Westhof, E. (2006) The building blocks and motifs of RNA architecture, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **16**, 279-287, doi: 10.1016/j.sbi.2006.05.009.
45. Gaupels, F., and Ghirardo, A. (2013) The extrafascicular phloem is made for fighting, *Front. Plant Sci.*, **4**, 187, doi: 10.3389/fpls.2013.00187.
46. Gettins, P. G. W., and Olson, S. T. (2016) Inhibitory serpins. New insights into their folding, polymerization, regulation and clearance, *Biochem. J.*, **473**, 2273-2293, doi: 10.1042/BCJ20160014.
47. Whisstock, J. C., Pike, R. N., Jin, L., Skinner, R., Pei, X. Y., et al. (2000) Conformational changes in serpins: II. The mechanism of activation of antithrombin by heparin, *J. Mol. Biol.*, **301**, 1287-1305, doi: 10.1006/jmbi.2000.3982.
48. Rezaie, A. R. (1998) Calcium enhances heparin catalysis of the antithrombin-factor Xa reaction by a template mechanism: evidence that calcium alleviates Gla domain antagonism of heparin binding to factor Xa, *J. Biol. Chem.*, **273**, 16824-16827, doi: 10.1074/jbc.273.27.16824.
49. Li, W., Johnson, D. J. D., Esmon, C. T., and Huntington, J. A. (2004) Structure of the antithrombin-thrombin-heparin ternary complex reveals the antithrombotic mechanism of heparin, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 857-862, doi: 10.1038/nsmb811.

RNA BINDING BY PLANT SERPINS *in vitro*

E. A. Tolstyko^{1,2}, D. A. Chergintsev³, O. A. Tolicheva², D. S. Vinogradova^{2,4},
A. L. Konevega^{2,5,6}, S. Y. Morozov^{1,7}, and A. G. Solovyev^{1,7*}

¹ Department of Virology, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

² Konstantinov St. Petersburg Nuclear Physics Institute of National Research Center “Kurchatov Institute”, 188300 Gatchina, Russia

³ Department of Plant Physiology, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

⁴ NanoTemper Technologies Rus, 191167 Saint Petersburg, Russia

⁵ Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University, 195251 Saint Petersburg, Russia

⁶ National Research Center “Kurchatov Institute” 123182 Moscow, Russia

⁷ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia; e-mail: solovyev@belozersky.msu.ru

Serpins constitute a large family of protease inhibitors with regulatory functions found in all living organisms. Most plant serpins have not been functionally characterized, with the exception of *Arabidopsis thaliana* AtSerp1, an inhibitor of pro-apoptotic proteases, which is involved in the regulation of the programmed cell death induction, and *Cucurbita maxima* CmPS1, a phloem protein, which presumably inhibits insect digestive proteases and binds RNA. CmPS1 interacts most efficiently with highly structured RNA; in particular, it forms a specific complex with tRNA. Here, we demonstrated that AtSerp1 also forms a complex with tRNA. Analysis of tRNA species bound by AtSerp1 and CmPS1 in the presence of tRNA excess revealed that both proteins have no strict selectivity for individual tRNAs, suggesting specific interaction of AtSerp1 and CmPS1 proteins with elements of the secondary/tertiary structure universal for all tRNAs. Analysis of CmPS1 binding of the microRNA precursor pre-miR390 and its mutants demonstrated that the pre-miR390 mutant with a perfect duplex in the hairpin stem lost the ability to form a discrete complex with CmPS1, whereas another variant of pre-miR390 with the native unpaired nucleotide residues in the stem retained this ability. These data indicate that specific interactions of plant serpins with structured RNA are based on the recognition of structurally unique spatial motifs formed with the participation of unpaired nucleotide residues in the RNA duplexes.

Keywords: serpin, RNA binding, RNA-binding protein, tRNA, microRNA, RNA structure, phloem