

РНК-связывающие свойства многофункционального белка NUCB1 и его возможная роль в регуляции трансляции

Костарева О.*, Михайлина А., Тищенко С.

Институт белка РАН, Пушкино, Россия

* kostareva@vega.protres.ru

Ключевые слова: нуклеобиндин 1; NUCB1; микро-РНК; регуляция трансляции

Мотивация и цель: Нуклеобиндин 1 (NUCB1) – консервативный Ca^{2+} -связывающий эукариотический белок. NUCB1 опосредованно вовлечен в регуляцию множества процессов в организме в результате его взаимодействия различными партнёрами: белками: Gai [1], Hsc70-interacting protein [2], APP [3]; липидами [4]; ДНК [5, 6]. Предполагается, что ДНК-связывающая активность NUCB1 может играть роль индуктора аутоиммунных реакций [7]. Было показано, что NUCB1 в качестве транскрипционного фактора [6] принимает участие в активации эпителиально-мезенхимального перехода, связываясь с последовательностью ДНК E-box *cripto* промотора. Недавно мы впервые показали, что NUCB1 способен образовывать прочные комплексы с некоторыми микроРНК человека, ассоциированными с развитием системной красной волчанки и эпителиально-мезенхимальным переходом [8]. Мы предполагаем, что взаимодействие белка NUCB1 с РНК имеет функциональное значение и может влиять на регуляцию экспрессии генов на уровне трансляции. Целью настоящей работы было исследование роли доменов NUCB1 во взаимодействии с РНК.

Методы и алгоритмы: Было получено 5 фрагментов белка NUCB1, содержащих разные домены белка, РНК-связывающая способность трёх фрагментов была исследована с помощью метода поверхностного резонанса плазмонов.

Результаты: NUCB1 образует функциональный димер и состоит из нескольких доменов: сигнальный пептид, ДНК-связывающий домен, Ca^{2+} -связывающий домен (содержит 2 EF-Hand мотива) и лейциновая «застёжка-молния». NUCB1 был впервые обнаружен как фактор роста и дифференцировки В-клеток при системной красной волчанке (СКВ) в культуре клеток селезенки мыши KLM1-7. Было показано, что NUCB1 способен взаимодействовать с тотальной ДНК, выделенной из этой культуры клеток. Систематические инъекции NUCB1 приводили к развитию у модельных линий мышей (MRL/lpr и MRL/n) СКВ-подобного заболевания (появление аутоантител к одно- и двуцепочечной ДНК). Мутантная форма NUCB1, лишенная предположительных участков взаимодействия с ДНК (ДНК-связывающий домен или лейциновая «застёжка-молния»), не стимулировала появления антител к ДНК. Эти данные позволили предположить, что ДНК-связывающая активность NUCB1 играет роль индуктора аутоиммунных реакций. Таким образом, для взаимодействия с ДНК необходимы как ДНК-связывающий домен белка, так и домен лейциновая «застёжка-молния». Однако, какова роль доменов во взаимодействии с РНК, до сих пор не было показано. Мы получили три мутантные формы NUCB1, которые содержали кальций-связывающий домен: NUCB1 Δ N (239–461 а. о., NUCB1, лишенный ДНК-связывающего домена), NUCB1 Δ Z (31–320 а. о., NUCB1, лишенный лейциновой

«застёжки-молнии») и CaBD (228–326 а. о., содержащий только кальций-связывающий домен). Полноразмерный белок NUCB1 и мутантные формы белка были продуцированы в клетках *E.coli* и очищены с помощью хроматографических методов. Мутантная форма белка NUCB1ΔN так же, как полноразмерный белок, формировала гомодимер, а мутантные формы NUCB1ΔZ и CaBD присутствовали в растворе в виде мономеров из-за отсутствия домена лейциновая «застёжка-молния». Мы определили аффинность взаимодействия всех полученных форм белка с РНК методом поверхностного резонанса плазмонов (табл. 1). Показано, что белок NUCB1 и его мутантные формы обладают высоким (наномолярным) и специфическим сродством к РНК, в том числе к микроРНК, ассоциированной с развитием СКВ у человека. Таким образом, было показано, что для взаимодействия с РНК достаточен кальций-связывающий домен белка NUCB1. Однако, несмотря на вовлеченность кальций-связывающего домена, взаимодействие белка с РНК не зависело от присутствия ионов кальция в растворе.

Таблица 1. Константы диссоциации комплексов белка NUCB1 и его мутантных форм с РНК

РНК	K _D , nM			
	NUCB1	NUCB1ΔN	NUCB1ΔZ	CaBD
miR-200a-3p	3.8 ± 0.1	0.6 ± 0.09	0.3 ± 0.01	5.2 ± 0.2
Олиго (C)	Взаимодействие не детектировалось			
Олиго (A)	1.2 ± 0.1	1.4 ± 0.1	0.3 ± 0.02	5.7 ± 0.5
Олиго (U)	1.1 ± 0.1	1.7 ± 0.3	0.4 ± 0.03	0.2 ± 0.04
Олиго (G)	1.5 ± 0.2	5.3 ± 0.6	3.1 ± 0.2	18.2 ± 3

Для того чтобы оценить необходимость участия CaBD во взаимодействии белка с РНК, мы создали две мутантные формы белка, не содержащие CaBD – NUCB1 DBD (31–220 а. о.) и NUCB1 LZ (328–416 а. о.). В настоящее время ведётся исследование РНК-связывающей способности этих мутантных форм.

Выводы: Показано, что кальций-связывающий домен белка NUCB1 достаточен для связывания белка с РНК, причём, это взаимодействие является кальций-независимым. В литературе описан только один случай вовлеченности EF-hand мотива белка VILIP в связывание с РНК [9], но это взаимодействие зависит от ионов кальция. По-видимому, белок NUCB1 узнает РНК по уникальному, пока не исследованному, механизму и может опосредованно участвовать в регуляции трансляции РНК посредством взаимодействия с микроРНК.

RNA-Binding capacity of multifunctional NUCB1 protein and its proposal role in translation regulation

Kostareva O.*, Mikhaylina A., Tishchenko S.
Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Rossiya
* kostareva@vega.protres.ru

Key words: nucleobindin 1; NUCB1; micro-RNA; translation regulation

Motivation and Aim: Nucleobindin 1 (Calnuc, NUCB1) is a highly conserved multi-domain DNA- and calcium-binding eukaryotic protein. NUCB1 is involved in the

regulation of many processes via interactions with proteins: Gai [1], carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein [2], APP [3]; lipids [4], and DNA [5,6]. DNA-binding ability is suggested to can play the role autoimmune reactions inductor [7]. It has been shown that NUCB1 is involved in epithelial-mesenchymal transition (EMT) activation as a transcription factor through binding to the canonical enhancer box (E-box) sequence of the Cripto-1 gene promoter. Recently we have shown that NUCB1 is capable to form high-affinity complexes with some of human micro-RNAs which are associated with system lupus erythematosus (SLE) and EMT [8]. We assume that RNA-binding ability of NUCB1 has the functional significance and could be develop on gene expression regulation at the translational level. The purpose of current study was investigation of contribution of different NUCB1 domains to the RNA interaction.

Methods and Algorithms: Five truncated forms of NUCB1 protein have been produced and RNA-binding ability for three of them has been estimated by surface plasmon resonance technique.

Results: NUCB1 forms functional dimer and consists of several independent functional domains: a signal peptide, a basic amino acid-rich DNA-binding domain (DBD), calcium-binding domain (contains two Ca²⁺-binding EF-hand motifs) (CaBD), a C-terminal leucine zipper (LZ). NUCB1 was first found as B-cells growth and differentiation factor in spleen cell culture KLM1-7 of SLE-prone mice. NUCB1 has been shown to bind total DNA extracted from these cells. Systematic injections of NUCB1 into SLE-prone mice (MRL/lpr и MRL/n) resulted in increased production of anti-ssDNA and anti-dsDNA autoantibodies. Injections of mutant forms of NUCB1 lacked proposal fragments for DNA interaction (DBD and LZ) didn't result in increased production anti-DNA autoantibodies. Thus, one may assume a potential role of NUCB1 DNA-binding capacity as inductor of autoimmune processes. It was established that the DBD and the LZ domain are important for DNA binding, but their involvement in NUCB1 binding to RNA has never been shown. We obtained three mutant forms of NUCB1 all of which contains CaBD: NUCB1ΔN (239–461 aa, NUCB1, lacked DBD), NUCB1ΔZ (31–320 aa, NUCB1, lacked LZ) and CaBD (228–326 aa, containing EF-hand motifs). NUCB1 and its mutant forms were produced in *E. coli* cells and purified using chromatographic techniques. The truncated forms NUCB1ΔZ and CaBD were monomers due to the absence of LZ, whereas NUCB1ΔN formed dimers similarly to NUCB1. We have defined affinity of all produced mutant forms to RNA by surface plasmon resonance technique (Table 1). Apparently, all truncated NUCB1 variants retained high (nanomolar) affinity for RNA. They are also bind RNA in specific manner, including to micro-RNA associated with SLE in human. CaBD alone has been shown to be sufficient for RNA binding. Calcium ions did not affect the binding of the truncated NUCB1 forms to RNAs.

Table 1. The K_D (nM) of complexes formed by the NUCB1 mutant forms with RNAs

PHK	K _D , nM			
	NUCB1	NUCB1ΔN	NUCB1ΔZ	CaBD
miR-200a-3p	3.8 ± 0.1	0.6 ± 0.09	0.3 ± 0.01	5.2 ± 0.2
Oligo (C)	Not detected			
Oligo (A)	1.2 ± 0.1	1.4 ± 0.1	0.3 ± 0.02	5.7 ± 0.5
Oligo (U)	1.1 ± 0.1	1.7 ± 0.3	0.4 ± 0.03	0.2 ± 0.04
Олиго (G)	1.5 ± 0.2	5.3 ± 0.6	3.1 ± 0.2	18.2 ± 3

To estimate necessary of CaBD into RNA-interaction of NUCB1 we produced two additional NUCB1 truncated forms lacked CaBD – NUCB1 DBD (31–220 aa) and NUCB1 LZ (328–416 aa). We are studying their RNA-binding ability now.

Conclusion: Calcium-binding domain of NUCB1 protein is shown to sufficient to the interaction with RNA, moreover the interaction is calcium-independently. Only one article is devoted to involvement of EF-hand motif of VILIP protein in RNA-binding [9], but that interaction is calcium-dependent. Apparently, NUCB1 protein recognize RNA using a unique, not yet studied mechanism, and could be involved in the regulation of translation of mRNAs via interaction with microRNAs.

Список литературы/References

1. Kapoor N., Gupta R., Menon S.T. et al. Nucleobindin 1 is a calcium-regulated guanine nucleotide dissociation inhibitor of G_i1. *J Biol Chem.* 2010;285:31647-31660. doi 10.1074/jbc.M110.148429
2. Xue F., Wu Y., Zhao X. et al. CHIP mediates down-regulation of nucleobindin-1 in preosteoblast cell line models. *Cell Signal.* 2016;28:1058-1065. doi 10.1016/j.cellsig.2016.04.016
3. Lin P., Li F., Zhang Y.-W. et al. Calnuc binds to Alzheimer's beta-amyloid precursors protein and affects its biogenesis. *J Neurochem.* 2007;100:1505-1514. doi 10.1111/j.1471-4159.2006.04336.x
4. Niphakis M.J., Lum K.M., Cognetta A.B. et al. A global map of lipid-binding proteins and their ligandability in cells. *Cell.* 2015;16:1668-1680. doi 10.1016/j.cell.2015.05.045
5. Miura K., Titani K., Kurosawa Y., Kanai Y. Molecular cloning of nucleobindin, a novel DNA-binding protein that contains both a signal peptide and a leucine zipper structure. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;187:375-380. doi 10.1016/s0006-291x(05)81503-7
6. Sinha S., Pattnaik S., Aradhyam G.K. Molecular evolution guided functional analyses reveals Nucleobindin-1 as a canonical E-box binding protein promoting Epithelial-to-Mesenchymal transition (EMT). *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.* 2019;1867:765-775. doi 10.1016/j.bbapap.2019.05.009
7. Kanai Y., Takeda O., Kanai Y., Miura K., Kurosawa Y. Novel autoimmune phenomena induced *in vivo* by a new DNA binding protein Nuc: A study on MRL/n mice. *Immunol Lett.* 1993;39:83-89. doi 10.1016/0165-2478(93)90168-2
8. Mikhaylina A., Svoeglazova A., Stolboushkina E., Tishchenko S., Kostareva O. The RNA-binding and RNA-melting activities of the multifunctional protein nucleobindin 1. *Int J Mol Sci.* 2023;24:6193. doi 10.3390/ijms24076193
9. Mathisen P.M., Johnson J.M., Kawczak J.A., Tuohy V.K. Visinin-like protein (VILIP) is a neuron-specific calcium-dependent double-stranded RNA-binding protein. *J Biol Chem.* 1999;274:31571-31576. doi 10.1074/jbc.274.44.31571