

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ДИСУЛЬФИДНОЙ СВЯЗИ НА СТАБИЛЬНОСТЬ СТРУКТУРЫ БЕЛКА L1

Нагибина Г.С., Мельник Б.С.

Институт белка РАН

ул. Институтская, 4, г. Пущино, 142290, РФ; e-mail: galina-nagibina@phys.protres.ru

Поступила в редакцию: 24.07.2018.

Аннотация. В данной работе мы исследовали белок L1 из галофильной археи *Haloarcula marismortui*. Белок является рРНК-связывающим и взаимодействует со спиралями H77-P78 23S рРНК. В структуру белка L1 нами введена стабилизирующая дисульфидная связь. Для поиска участка полипептидной цепи, в котором нужно проектировать дисульфидную связь, был использован подход, основанный на поиске нативно-развернутых участков в белках. Результаты нашего предыдущего исследования [1] подтвердили, что программы, предсказывающие нативно-развернутые участки (например, PONDR-FIT и IsUnstruct) можно использовать для поиска ослабленных участков в белках с жесткой упаковкой. Именно в таких участках нужно проектировать стабилизирующие дисульфидные связи. С помощью программ PONDR-FIT и IsUnstruct нами проведен анализ аминокислотной последовательности белка L1 и предсказан регион, обладающий высокой степенью неупорядоченности структуры. Им оказался участок во втором домене этого белка. В предсказанном участке нами выбраны аминокислотные остатки E82 и D114, замена которых на остатки цистеинов привела к формированию дисульфидной связи. Методом спектроскопии кругового дихроизма показано, что введенная дисульфидная связь увеличила температуру плавления белка L1 приблизительно на 10 градусов.

Ключевые слова: рибосомный белок L1, *Haloarcula marismortui*, дисульфидная связь, стабильность белка, нативно-развернутые участки, спектроскопия кругового дихроизма.

Существуют теоретические подходы, позволяющие по аминокислотной последовательности белка предсказать, имеет ли он в своей пространственной структуре нативно-развернутые участки, или же он жестко структурирован. Толчком в развитии таких подходов стало активное изучение нативно-развернутых белков, начавшееся в конце 1990-х годов. Нативно-развернутые белки – это белки, которые полностью или частично не имеют стабильной вторичной и третичной структуры в физиологических условиях или в отсутствии субстрата. В отличие от структурированных белков, имеющих жесткую пространственную структуру, нативно-развернутые белки являются гетерогенным ансамблем быстро переходящих одно в другое конформационных состояний, координаты которых не дают возможности описать их структуру [2]. Такие белки, ввиду преимуществ их структурной неупорядоченности, способны выполнять множество функций. Теоретическое изучение нативно-развернутых белков имеет большое значение как для развития биоинформатических подходов к анализу их структуры, так и для сохранения времени специалистов-экспериментаторов, которое могло бы быть потрачено на попытку кристаллизовать неструктурированные белки [3]. На данный момент разработано около 70 различных алгоритмов, позволяющих предсказывать нативно-развернутые участки в белках. Несмотря на большое разнообразие использованных подходов, каждую из разработанных программ можно отнести к одной из трех больших групп, выделенных в зависимости от особенностей работы: (1) программы, основанные на физико-химических свойствах аминокислотной последовательности белков – н. п. IsUnstruct [4], (2) программы, использующие искусственные нейронные сети – н. п. DISOPRED [5], и (3) программы, работающие как комбинация методов, основанных на индивидуальных алгоритмах (из групп 1 и 2) – н. п. PONDR-FIT [6]. Важно отметить, что, несмотря на различия в подходах, результаты работы программ довольно хорошо согласуются. Интересно, что такие программы практически в любом глобулярном жестко-упакованном белке предсказывают небольшие участки полипептидной цепи как нативно-развернутые, хотя по своей структуре они ни чем особо не отличаются от других участков исследованных белков.

Мы предположили, что реализованные в этих программах алгоритмы позволяют предсказать не только нативно-развернутые участки (подвижные и неструктурированные), но и участки, неспособные к самостоятельному приобретению жесткой упаковки. Именно такие участки являются наилучшими кандидатами для введения в них стабилизирующих мутаций – таких как дисульфидные мостики, введенные на поверхности белка и закрепляющие ослабленные участки его структуры.

Объектом, который мы решили стабилизировать путем введения дисульфидной связи, стал рибосомный белок L1 из *Haloarcula marismortui* (HmaL1). L1 является рРНК-связывающим белком с молекулярной массой 23,3 кДа. Он располагается на поверхности L1-выступа – высококонсервативного участка рибосомы. *H. marismortui* – это экстремально галофильный организм из домена Архей, существующий в условиях высоких концентраций солей, близких к сатурации. Данный организм является одним из немногих хорошо изученных представителей своего домена, поэтому он становится прекрасной моделью для исследования особенностей архейных организмов [7]. Исследованием структуры рибосомы Архей занимались Кляйн с соавторами [8]. Ими были охарактеризованы и разделены на подклассы белки рибосомы *H. marismortui*, а также получена структура рибосомной 23S РНК. Однако из-за высокой подвижности L1-выступа, получить его структуру в хорошем

разрешении не удалось. Предполагались попытки получить кристаллы белка L1, изолированного от рибосомы и рРНК, но его высокая подвижность не дала возможности получить его структуру, поэтому Габдулхаковым с соавторами была построена модель структуры белка L1 из *H. marismortui* [9]. Основой модели послужила структура белка L1 из *Methanocaldococcus jannashchii* (PDB: 1CSJ).

Мы предположили, что причина, по которой белок L1 не кристаллизуется, заключается в слабой структурированности и/или высокой подвижности некоторых элементов его структуры. И если повысить стабильность таких элементов, то это приведет к уменьшению его подвижности, что, в свою очередь, может способствовать росту кристаллов данного белка. Для поиска ослабленных участков полипептидной цепи белка мы воспользовались программами PONDR-FIT и IsUnstruct. С помощью этих программ был предсказан ослабленный участок в структуре белка L1. В предсказанном участке нами была спроектирована дисульфидная связь, которая повысила температуру плавления белка приблизительно на 10 градусов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Генетическая конструкция мутантной формы белка HmaL1-E82C-D114C была сконструирована на основе плазмиды pET11ap1-HmaL1, несущей ген дикого типа белка, по стандартной ПЦР-методике с использованием вектора pET11ap1 в качестве матрицы. Для увеличения эффективности выделения и очистки белка в генетическую конструкцию была добавлена гексогистидиновая последовательность, располагающаяся на С-конце белка. Соответствие последовательностей белков проверяли секвенированием.

Выделение белка HmaL1-WT и HmaL1-E82C-D114C проводилось из клеток *E.coli* штамма Rosetta (DE3), трансформированных полученными плазмидами. Клеточную биомассу подвергали разрушению с помощью гомогенизатора высокого давления и затем центрифугировали в два этапа для осаждения клеточного дебриса и рибосом. Белок очищали путем аффинной хроматографии на Ni-NTA колонке, уравновешенной буфером 50 мМ Трис-НСl pH 7,5, 500 мМ KCl, 20 мМ Имидазол, 50 мМ MgCl₂. Элюцию проводили линейным градиентом буфера 50 мМ Трис-НСl pH 7,5, 500 мМ KCl, 200 мМ Имидазол, 50 мМ MgCl₂. Наличие белка во фракциях определяли электрофоретически [10]. Фракции с чистым белком концентрировали и диализовали против буфера 50 мМ Трис-НСl pH 7,5, 3 мМ KCl, 50 мМ NH₄Cl, 50 мМ MgCl₂.

Окисление и модификация йодацетамидом свободных SH-групп в мутантной форме белка HmaL1-E82C-D114C проводили по методике [11]. Проверка окисления или восстановления цистеиновых остатков проводилась электрофоретически по Лэмбли с модификациями. Для создания окисленных условий в буфер для образца не добавлялся β-меркаптоэтанол, а также образец не подвергался предварительному прогреву. Буфер для образца в условиях восстановления содержал β-меркаптоэтанол и прогревался. Остальные этапы проводились согласно методике.

Концентрацию белка определяли спектрофотометрически по поглощению на длине волны 280 нм. Коэффициент экстинкции для белка HmaL1 и его мутантной формы был определен расчетным способом и принят как: $A^{1\text{см}}_{1\text{мг/мл}} = 0,176$.

Спектры кругового дихроизма (КД) измеряли на спектрополяриметре Chirascan. Для измерений использовали кюветы с длиной оптического пути 0,01 см. Концентрация белка составляла 4,0 мг/мл. Спектры регистрировались в интервале длин волн 210-250 нм и при температуре 20 °С.

Значения молярной эллиптичности рассчитывали по уравнению:

$$[\theta] = [\theta]_{\text{изм}} \frac{M}{L \cdot C}$$

где C – концентрация белка (мг/мл); L – длина оптического пути кюветы (мм); $[\theta]_{\text{изм}}$ – измеренная эллиптичность (градусы) и M – средняя молекулярная масса белка (Да).

Предсказание нативно-развернутых участков в белках проводили с помощью программ IsUnstruct [4] и PONDR-FIT [6]. В расчетах использовались стандартные параметры, заданные в программах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Предсказание ослабленных участков в структуре белка HmaL1 и дизайн дисульфидной связи.

Рибосомный белок L1 из *H. marismortui* (HmaL1) состоит из двух доменов: домен I сформирован N- и C-концевыми участками полипептидной цепи белка (аминокислотные остатки 1-55 и 148-212) и его поверхность обладает сродством к домену V 23SpРНК. Домен II образован средней частью полипептидной цепи белка (56-149) и не имеет контактов с рибосомной РНК [9]. На рисунке 1 представлена модель пространственной структуры белка HmaL1, а также показано взаимное расположение доменов.

Для поиска «ослабленных» участков в белке HmaL1 мы воспользовались программами PONDR-FIT [6] и IsUnstruct [4]. На рисунке 2А показана вероятность разных аминокислотных остатков полипептидной цепи белка HmaL1 находиться в нативно-развернутом (ослабленном) состоянии. Видно, что обе программы предсказывают всплеск нативно-развернутости во втором домене белка, в районе 75-го аминокислотного остатка.

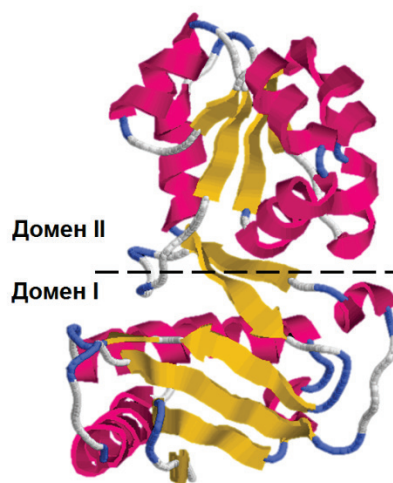


Рисунок 1. Модель пространственной структуры белка HmaL1 [9]. Черной пунктирной линией разделены два домена белка. Домен I включает аминокислотные остатки 1-55 и 148-212 и обладает рРНК-связывающей активностью. Домен II включает аминокислотные остатки 56-149

Исходя из функциональных активностей двух доменов белка, а также предсказанной вероятности разных участков полипептидной цепи белка HmaL1 быть неупорядоченными, мы предположили, что повышение стабильности домена II введением дисульфидной связи приведет к уменьшению его подвижности, что, возможно, способствует его кристаллизации, не нарушив при этом оригинальную упаковку РНК-связывающего домена.

Выбор аминокислотных остатков в последовательности белка HmaL1 осуществлялся с использованием модели его пространственной структуры и по следующим критериям: (1) расстояние между C β -атомами аминокислотных остатков должно составлять около 5Å; (2) взаимонаправленность аминокислотных остатков – молекулы аминокислот в цепи должны быть «повернуты друг на друга» и образовывать угол $\approx 90^\circ$. На рисунке 2Б показана модель пространственной структуры домена II белка HmaL1. Зеленым цветом выделен участок полипептидной цепи, предсказанный программами как нативно-развернутый, объемом показаны выбранные нами для замены на цистеины аминокислотные остатки. Ими оказались E82 и D114.

2. Формирование дисульфидной связи в мутантной форме белка HmaL1.

Наработка препарата белков HmaL1 дикого типа и мутантной формы с введенной SS-связью – HmaL1-E82C-D114C, а также окисление свободных SH-групп в мутантной форме белка проводились согласно методике.

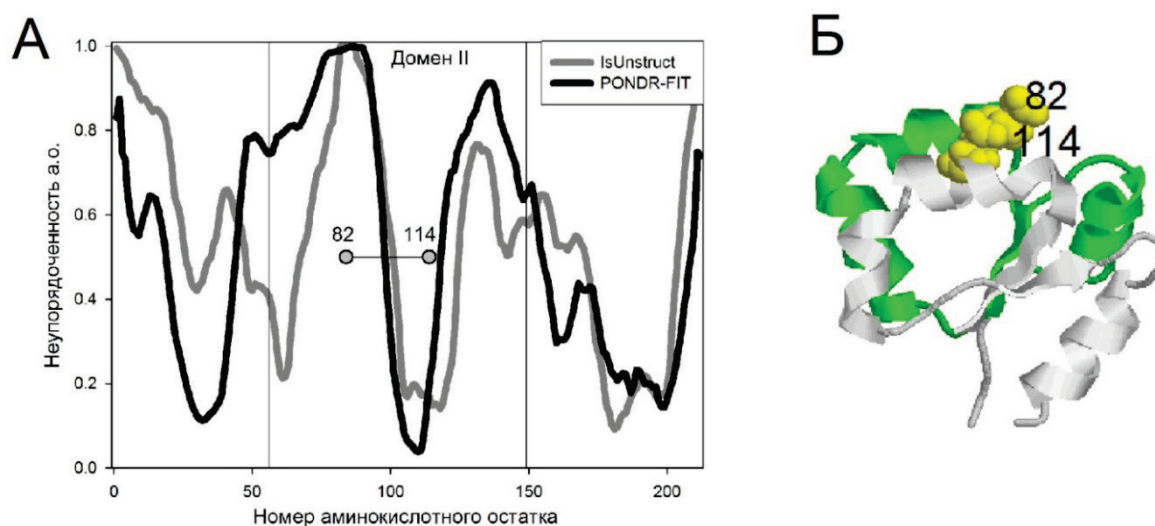


Рисунок 2. (А) Вероятность разных аминокислотных остатков белка HmaL1 быть неупорядоченными (в нативно-развернутом состоянии): вертикальными линиями выделен участок аминокислотной последовательности белка HmaL1, образующий домен II. Серыми шариками показаны аминокислотные остатки, выбранные для замены на остатки цистеинов – E82 и D114. (Б) Модель пространственной структуры Домена II белка HmaL1: зеленым цветом выделен участок полипептидной цепи белка, предсказанный программами как ослабленные, желтым цветом и объемом показаны выбранные нами аминокислотные остатки (E82 и D114), замена которых на цистеины приведет к формированию SS-связи

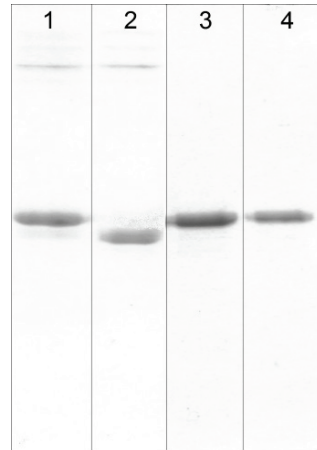


Рисунок 3. Анализ результатов электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии ДСН белков HmaL1 дикого типа (полосы 3 и 4) и мутантной формы HmaL1-E82C-D114C (полосы 1 и 2) в окисленных (полосы 2 и 4) и восстановленных (полосы 1 и 3) условиях

Проверка формирования дисульфидной в мутантной форме белка HmaL1-E82C-D114C проводилась с использованием модифицированного метода электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии ДСН. Использование данного метода возможно благодаря различию Стоксова радиуса для денатурированных молекул с дисульфидной связью и без нее. На рисунке 3 показан результат электрофореза белков HmaL1 дикого типа и мутантной формы с введенной дисульфидной связью в окисленных и в восстановленных условиях. В условиях, когда SH-группы восстановлены, оба белка (дикого типа и мутантной формы) показывают схожую подвижность в геле (рис. 3, линии 1 и 3). В условиях, когда SH-группы окислены и SS-связь завязана, белок HmaL1 дикого типа и мутантная форма HmaL1-E82C-D114C показывают разную подвижность в геле (рис. 3, линии 2 и 4). Это говорит о том, что в результате реакции окисления мы получаем белок HmaL1-E82C-D114C с завязанной дисульфидной связью.

3. Исследование стабильности белков HmaL1 дикого типа и мутантной формы HmaL1-E82C-D114C.

Исследование стабильности белков HmaL1 дикого типа и его мутантной формы – HmaL1-E82C-D114C с введенной дисульфидной связью проводилось с использованием метода спектроскопии кругового дихроизма.

На рисунке 4А представлены спектры кругового дихроизма для белков HmaL1 дикого типа, мутантной формы HmaL1-E82C-D114C с завязанной SS-связью и HmaL1-E82C-D114C с разорванной SS-связью (путем модификации SH-групп йодацетамидом) в нативных условиях (20 °C) и денатурированных условиях (94 °C). Видно, что спектры, снятые в одинаковых условиях, совпадают для всех форм белков. Из этого можно заключить, что введенные аминокислотные замены не нарушили нативную упаковку белков.

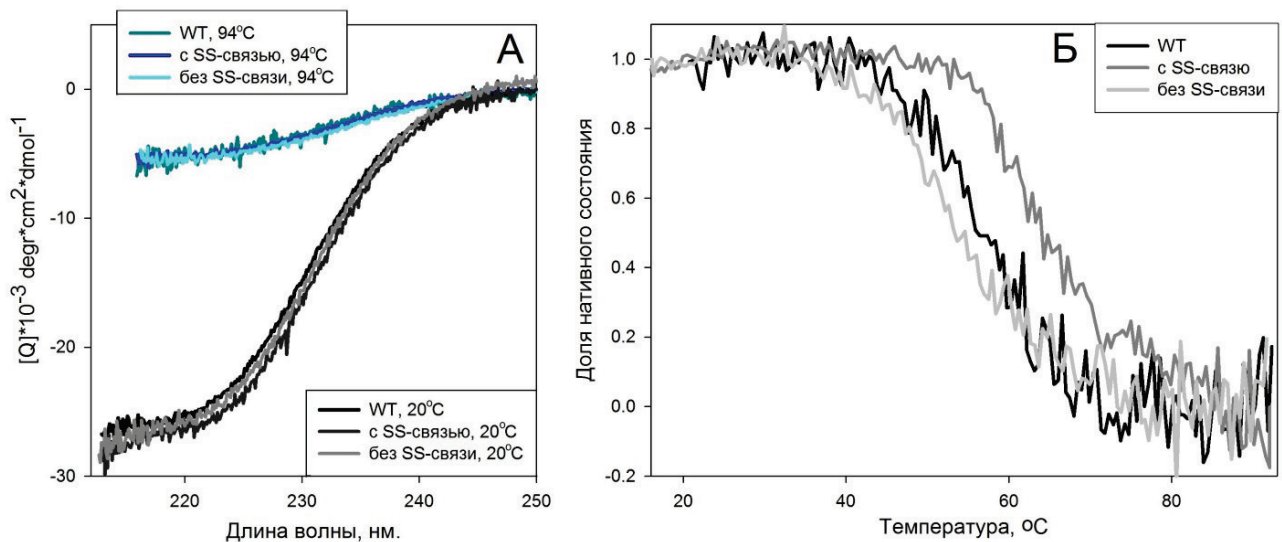


Рисунок 4. (А) Спектры кругового дихроизма белков HmaL1 дикого типа, мутантной формы HmaL1-E82C-D114C с завязанной дисульфидной связью и HmaL1-E82C-D114C с разорванной дисульфидной связью (путем модификации SH-групп йодацетамидом) в нативных условиях (20 °C) и денатурированных условиях (94 °C). (Б) Доля нативного состояния белка HmaL1 дикого типа, мутантной формы HmaL1-E82C-D114C с завязанной дисульфидной связью и HmaL1-E82C-D114C с разорванной дисульфидной связью от температуры. Количество структуры белка оценивалось по изменению молярной эллиптичности на 222 нм

Процесс тепловой денатурации белков HmaL1 дикого типа, мутантной формы HmaL1-E82C-D114C с завязанной SS-связью и HmaL1-E82C-D114C с разорванной SS-связью проводился так же с использованием метода спектроскопии кругового дихроизма. Нагрев раствора белка проводился непосредственно в кювете и с постоянной скоростью 1 °С/мин. Количество вторичной структуры белка оценивалось по изменению молярной эллиптичности на 222 нм. На рисунке 4Б показан график зависимости доли нативного состояния белка, рассчитанной из величины молярной эллиптичности на 215 нм, от температуры. Видно, что белок HmaL1 дикого типа плавится в районе 55 °С, в то время как HmaL1 с завязанной дисульфидной связью – в районе 65 °С. Таким образом, введенная нами дисульфидная связь привела к стабилизации структуры белка HmaL1 в процессе тепловой денатурации.

Мутантная форма белка с разорванной дисульфидной связью показала небольшое уменьшение термостабильности относительно белка дикого типа. Такой результат может быть связан с модификацией SH-групп молекулами йодацетамида: введение довольно массивных группировок могло привести к локальным изменениям структуры, которые отразились на процессе плавления белка, что видно из рисунка 4Б.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ кривых плавления белков HmaL1 дикого типа и мутантной формы HmaL1-E82C-D114C с введенной дисульфидной связью показал, что спроектированная нами мутация действительно привела к повышению стабильности белка при тепловой денатурации, увеличив его температуру плавления приблизительно на 10°. Таким образом, можно заключить, что дисульфидные связи, введенные в участки, предсказанные программами типа PONDR-FIT и IsUnstruct как нативно-развернутые, приводят к повышению термостабильности белков. А значит, предложенный нами подход может быть использован для стабилизации структуры глобулярных белков.

Авторы выражают благодарность Глуховой К.А. за помощь в создании генетических конструкций. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 18-34-00243 мол_а.

Список литературы / References:

1. Nagibina G.S., Tin U.F., Glukhov A.S., Melnik T.N., Melnik B.S. Intrinsic Disorder-Based Design of Stabilizing Disulphide Bridge in Galphao Protein. *Protein Pept. Lett.*, 2016, vol. 23, no. 2, pp. 176-184.
2. Tompa P., Han K.-H. Intrinsically disordered proteins. *Phys. Today*, 2012, vol. 65, no. 8, pp. 64-65.
3. Deng X., Eickholt J., Cheng J. A comprehensive overview of computational protein disorder prediction methods. *Mol. BioSyst.*, 2012, vol. 8, no. 1, pp. 114-121.
4. Lobanov M.Y., Sokolovskiy I.V., Galzitskaya O.V. IsUnstruct: Prediction of the residue status to be ordered or disordered in the protein chain by a method based on the Ising model. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2013, vol. 31, no. 10, pp. 1034-1043.
5. Dosztányi Z., Csizmók V., Tompa P., Simon I. The pairwise energy content estimated from amino acid composition discriminates between folded and intrinsically unstructured proteins. *J. Mol. Biol.*, 2005, vol. 347, no. 4, pp. 827-839.
6. Xue B., Dunbrack R.L., Williams R.W., Dunker A.K., Uversky V.N. PONDR-FIT: A meta-predictor of intrinsically disordered amino acids. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, 2010, vol. 1804, no. 4, pp. 996-1010.
7. Camacho Córdova D.I., Camacho Ruíz R.M., Mateos Díaz J.C., Córdova López J.A., Rodríguez González J.A. Haloarcula marismortui, eighty-four years after its discovery in the Dead Sea, Review. *Int. J. Eng. Res. Technol.*, 2014, vol. 3, no. 6, pp. 1257-1267.
8. Klein D. J., Moore P. B. and Steitz T. A. The roles of ribosomal proteins in the structure assembly, and evolution of the large ribosomal subunit. *J. Mol. Biol.*, 2004, vol. 340, no. 1, pp. 141-177.
9. Gabdulkhakov A., Tishchenko S., Mikhaylina A., Garber M., Nevskaya N., Nikonov S. Crystal Structure of the 23S rRNA Fragment Specific to r-Protein L1 and Designed Model of the Ribosomal L1 Stalk from Haloarcula marismortui. *Crystals*, 2017, vol. 7, no. 2, p. 37.
10. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, no. 5259, pp. 680-685.
11. Ellman G.L. Tissue Sulfhydryl Groups. *Biochem. Biophys.*, 1958, vol. 82, no. 1, pp. 70-77.

INVESTIGATION OF EFFECT OF DISULPHIDE BOND ON STABILITY OF L1 PROTEIN STRUCTURE

Nagibina G.S., Melnik B.S.

Institute of protein research RAS

Institutskaya Str., 4, Pushchino, 142290, Russia; e-mail: galina-nagibina@phys.protres.ru

Abstract. We have studied protein L1 from halophilic archaea *Haloarcula marismortui*. The protein is rRNA-binding and interacts with helices H77-P78 of the 23S rRNA. We introduced a stabilizing disulphide bridge in the structure of protein L1. To identify the region in the polypeptide chain where the SS-bridge should be inserted, we used the approach based on the search for intrinsically disordered regions in proteins. The results of our previous study [1] confirmed that the software for prediction of intrinsically disordered regions, for example, PONDR-FIT and IsUnstruct, can be employed for identification of weakened regions in proteins with rigid packing. Such regions are most suitable to insert stabilizing disulphide bridges. Using software PONDR-FIT and IsUnstruct we analyzed the amino acid sequence of protein L1 and predicted the region with a high structural irregularity. It is the region in the second domain of the protein. We chose amino acid residues E82 and D114 in the predicted region, the substitution of which for cysteine residues resulted in the formation of the desired disulphide bridge. Using the method of circular dichroism spectroscopy it was demonstrated that the introduced disulphide bridge increased the melting temperature of protein L1 by approximately 10 degrees.

Key words: *ribosomal protein L1, Haloarcula marismortui, disulphide bond, protein stability, intrinsic disorder regions, circular dichroism spectroscopy.*