

УДК 577.22; 577.322.2

ПРОВЕРКА ПОДХОДА К СОЗДАНИЮ СТАБИЛЬНЫХ ФОРМ БЕЛКОВ, ОСНОВАННОГО НА ПРЕДСКАЗАНИИ НАТИВНО-РАЗВЕРНУТЫХ УЧАСТКОВ, НА ПРИМЕРЕ РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ L1*

© 2020 Г.С. Нагибина**, В.В. Марченков, К.А. Глухова, Т.Н. Мельник, Б.С. Мельник

Институт белка РАН, 142290, Пушкино Московская обл., Россия;
электронная почта: galina-nagibina@phys.protres.ru

Поступила в редакцию 09.08.2019

После доработки 27.09.2019

Принята к публикации 27.09.2019

В наших предыдущих работах была высказана идея о том, что для поиска ослабленных участков в белке можно использовать программы, предсказывающие нативно-развернутые участки по аминокислотной последовательности. Участки, предсказанные такими программами, являются подходящими мишенями для введения мутаций, стабилизирующих белок. Однако при исследовании каждого конкретного белка остается непонятным, что является определяющим для стабилизации – аминокислотная последовательность (и, соответственно, предсказание ослабленности) или пространственная структура белка. Чтобы это выяснить, необходимо исследовать два белка, одинаковых по структуре, но отличающихся по аминокислотной последовательности и, соответственно, с разным предсказанием ослабленности. Введение одинаковых мутаций в одинаковые структурные элементы в разных белках поможет экспериментально выяснить, что является определяющим фактором для повышения стабильности белка – предсказания ослабленности или пространственная упаковка белка. Для таких исследований мы выбрали рибосомные белки L1 из галофильной археи *Haloarcula marismortui* (HmaL1) и L1 из экстремофильной бактерии *Aquifex aeolicus* (AaeL1). Эти белки одинаковы по структуре, но различны по аминокислотной последовательности. Показано, что дисульфидная связь, введенная в участок, предсказанный как структурированный в белке AaeL1, не привела к повышению температуры плавления белка. В то же время дисульфидная связь, введенная в такой же структурный элемент, но предсказанный как ослабленный участок в белке HmaL1, привела к повышению температуры плавления приблизительно на 10 градусов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рибосомный белок L1, стабилизация глобулярных белков, нативно-развернутые участки белков, дисульфидные связи.

DOI: 10.31857/S032097252001008X

В середине прошлого века были открыты белки, не имеющие фиксированной третичной структуры – так называемые «неупорядоченные» белки [1]. Активное изучение таких белков началось в конце 1990-х гг. Последние несколько лет исследованию таких белков было посвящено большое количество работ [2, 3]. Интерес к нативно-развернутым белкам инициировал активное развитие теоретических программ, позволяющих предсказывать по аминокислотной последовательности, к какому из классов относится белок: к полностью структурированному или к нативно-развернутому [2, 3]. Такие программы основаны на совершенно разных тео-

ретических подходах (например, нейронные сети – DISOPRED [4] или подсчет статистики встречаемости отдельных аминокислотных остатков в разных белках в участках, которые не детектируются методом рентгеноструктурного анализа – DisEMBL [5]). Также существуют программы, объединяющие в себе несколько разных подходов, так называемые метапредикторы: PONDR-FIT [6].

Оказалось, что, несмотря на различия в теоретических подходах, результаты предсказаний разных программ довольно хорошо согласуются. Более того, по расчетам таких программ видно, что практически в любом плотно упакованном белке есть небольшие участки полипептидной цепи, которые предсказываются как нативно-развернутые, хотя по своей структуре они плотно упакованы, структурированы и ничем особо не отличаются от других участков исследованных белков [7]. Мы предположили, что реа-

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM19-242, 02.12.2019.

** Адресат для корреспонденции.

лизированные в этих программах алгоритмы позволяют предсказать не только нативно-развернутые участки (подвижные и неструктурированные), но и участки, не способные к самостоятельному приобретению жесткой упаковки. В нашей предыдущей работе мы проверили идею, что именно такие участки могут являться «целью» для введения стабилизирующих структур мутаций, а именно искусственных дисульфидных связей, введенных на поверхности белка [8]. Нашей целью была стабилизация белка Gαo из *Drosophila melanogaster*, который долгое время не удавалось закристаллизовать. Мы предположили, что проблема заключается в подвижности и нестабильности отдельных участков полипептидной цепи этого белка. Аминокислотная последовательность белка Gαo была проанализирована с помощью программ PONDR-FIT и isUnstruct [6, 9]. Один из участков структуры этого белка был предсказан как нативно-развернутый. В этом участке нами была спроектирована дисульфидная связь, которая привела к стабилизации структуры белка Gαo на 4 градуса при тепловой денатурации [8]. Эта работа показала, что для поиска ослабленных участков в белках действительно можно использовать программы, предсказывающие нативно-развернутые участки полипептидной цепи.

Для более детальной проверки этой идеи необходимо убедиться, что основным параметром, влияющим на стабилизацию белка при введении мутации, является именно предсказанная ослабленность участка полипептидной цепи, а не особенности вторичной или третичной структуры белка.

Для этого необходимо исследовать два белка одинаковых по структуре, но достаточно сильно отличающихся по аминокислотной последовательности.

Таковыми объектами были выбраны рибосомные белки L1 из галофильной археи *Haloarcula marismortui* (HmaL1) и L1 из экстремофильной бактерии *Aquifex aeolicus* (AaeL1). Структура AaeL1 известна [10], для белка HmaL1 структура была смоделирована [11]. Оба эти белка имеют характерную для рибосомных белков L1 структуру, в которой можно выделить два домена, соединенные двухтяжевой междоменной перетяжкой. N- и C-концы белка располагаются в домене I, который отвечает за связывание 23S рРНК. Домен II участвует в процессе узнавания рРНК [11]. Особенность этих белков заключается в том, что они различаются по своей аминокислотной последовательности (идентичность 33%), но схожи по пространственной структуре. Именно поэтому мы остановили свой выбор на рибосомных белках L1, структура которых вы-

соко консервативна. К сожалению, достаточно отличающаяся аминокислотная последовательность, у которой достоверно различаются предсказания нативно-развернутых участков, оказалась только у белков, «приспособленных» к функционированию в разных условиях. Поскольку в данной работе не стояла задача сравнить между собой белки L1 из разных организмов, нам нужно сравнить белок дикого типа и мутантный, т.е. понять тенденцию, как повлияли дисульфидные связи, введенные в одинаковые участки структуры белка, но с разными предсказаниями нативно-развернутости, на стабильность белков. Безусловно, сравнение в каждой паре белков проводилось в одинаковых условиях.

Далее мы остановимся на анализе домена II этих белков, поскольку предсказания нативно-развернутости этого домена отличаются для двух исследуемых белков: в белке HmaL1 домен II предсказывается как нативно-развернутый, а в белке AaeL1 — как частично структурированный. Поэтому дизайн мутаций во втором домене белков L1 позволит сравнить влияние введения дисульфидных связей в одинаковых структурных элементах на белки с одинаковой структурой, но с разным аминокислотным составом, и потому с разной предрасположенностью быть нативно-развернутыми. Такие исследования позволят нам проверить предположение о том, что для дизайна мутаций, повышающих стабильность белков, можно использовать теоретические подходы, предсказывающие нативно-развернутые участки белков.

Наши предположения полностью подтвердились. Дисульфидная связь, введенная в HmaL1 на участке аминокислотной последовательности, предсказанной как нативно-развернутый, привела к повышению стабильности белка. Дисульфидная связь, введенная в такой же по структуре, но предсказанный как структурированный участок белка AaeL1, не повлияла на стабильность белка.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Генетическую конструкцию, содержащую ген белка AaeL1 (pET11a-PL-AaeL1) экспрессировали в штамме-суперпродуценте *Escherichia coli* BL21 (DE3). Плазмида с геном мутантной формы белка AaeL1 была сконструирована на основе вектора pET11a-PL-AaeL1 («Novagen», США) и пары праймеров («Евроген», Россия), указанных в таблице, методом сайт-направленного мутагенеза с использованием полимеразы KOD Hot Start DNA Polymerase («Novagen», США) в

соответствии с инструкцией производителя. Последовательность конструкций проверяли секвенированием («Евроген», Россия). Белки AaeL1 и AaeL1-D101C-K127C были получены как описано Nikonova et al. [10]. Плазмида мутантной формы белка HmaL1-E82C-D114C была сконструирована на основе плазмиды pET11a-PL-HmaL1 («Novagen», США), несущей ген белка дикого типа, по стандартной ПЦР-методике с использованием вектора pET11a-PL в качестве матрицы. Для увеличения эффективности выделения и очистки белка в генетическую конструкцию была добавлена гексогистидиновая последовательность, располагающаяся на C-конце белка. Для этого фрагмент ДНК, кодирующий гексогистидиновую последовательность, был получен путем гидролиза эндонуклеазами рестрикции NdeI и XbaI («Thermo», США) из плазмиды pET19mod («Novagen», США) и субклонирован в вектор pET11a-PL-HmaL1-E82C-D114C [12]. Соответствие последовательностей белков проверяли секвенированием. Клетки *E. coli* штамма Rosetta (DE3) («Novagen», США) трансформировали плазмидами, содержащими ген белка HmaL1, и высевали на жидкую среду LB («Amresco», США). Биомассу выращивали («Eppendorf», Германия) при температуре 37 °С и хорошей аэрации до поглощения ($A_{600\text{нм}}$) 0,8–1,0, после чего добавляли индуктор экспрессии IPTG до конечной концентрации 1 мМ. Клеточную культуру растили при 37 °С до поглощения ($A_{600\text{нм}}$) 1,8–2,0. Экспрессию гена проверяли при помощи электрофореза в ПААГ в присутствии ДСН. Клетки, осажденные центрифугированием (8000 g, 15 мин) («Hermle», Германия), растворяли в буфере (50 мМ Tris-HCl pH 7,5; 2 М LiCl, 100 мМ имидазол, 50 мМ MgCl₂, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ PMSF) («Sigma», Германия). Биомассу подвергали разрушению с помощью гомогенизатора высокого давления EmulsiFlex-C3 («Avestin», Канада) и за-

тем центрифугировали («Beckman», США) 40 мин при 90 000 g и 4 °С. Белок, меченый гексогистидиновой последовательностью, очищали путем аффинной хроматографии на колонке HisTrap HP (5 мл) («GE Healthcare», США), уравновешенной буфером, содержащим 50 мМ Tris-HCl pH 7,5; 2 М NaCl, 20 мМ имидазол и 50 мМ MgCl₂. Элюцию проводили градиентом буфера 50 мМ Tris-HCl pH 7,5; 2 М NaCl, 200 мМ имидазол, 50 мМ MgCl₂. Фракции, содержащие HmaL1, собирали и концентрировали для дальнейшей очистки. Гель-фильтрацию проводили на колонке HiLoad 26/600 Superdex 75 prep grade («GE Healthcare», США), уравновешенной 50 мМ Tris-HCl pH 7,5; 3 М NaCl, 50 мМ MgCl₂, 500 мМ NH₄Cl. Чистоту препарата оценивали с помощью электрофореза по Лэммли [13]. Очищенный белок концентрировали и хранили при 4 °С. Аналогичным образом проводили выделение и очистку мутантной формы белка HmaL1-E82C-D114C, добавляя 5 мМ β-меркаптоэтанола для предупреждения образования межмолекулярных дисульфидных связей.

Окисление свободных SH-групп. Окисление свободных SH-групп в мутантной форме белка AaeL1-D101C-K127C происходило спонтанно в растворе. Для окисления свободных SH-групп в мутантной форме белка HmaL1-E82C-D114C использовали буфер, содержащий 200 мМ Tris-HCl pH 8,8; 2 М NaCl, 50 мМ MgCl₂, 500 мМ NH₄Cl и 1 мМ EDTA. Окисление белка проводили в присутствии окисленного и восстановленного глутатионов в конечной концентрации 10 мМ и 2 мМ соответственно. Инкубацию проводили при комнатной температуре 24 ч. После инкубации осуществляли перевод белка в буфер, содержащий 50 мМ Tris-HCl pH 7,5; 3 М NaCl, 50 мМ MgCl₂ и 500 мМ NH₄Cl. Проверку формирования цистеиновых мостиков в мутантных формах белков проводили методом электрофореза по Лэммли с некоторой модификацией:

Последовательности праймеров, использованных в работе

Название праймера	5'–3' последовательность праймеров
AaeL1_Asp101CysF	ACTACGTAGGCGGCTGCGAACTCATAAACA
AaeL1_Asp101CysR	TTGTTTATGAGTTCGCAGCCGCCTACGTAGT
AaeL1_Lys127CysF	GGAGATGATGCCATGTGTTGCAAACTTG
AaeL1_Lys127CysR	CAAGTTTTGCAACACATGGCATCATCTCC
HmaL1_Glu82CysF	GACGTACTCGACTGCGATGAACTCGAAGAA
HmaL1_Glu82CysR	TTCTCGAGTTCATCGCAGTCGAGTACGTC
HmaL1_Asp114CysF	GGACTGATGCAGTGCATCGGTGCTAC
HmaL1_Asp114CysR	CTAGCGACCGATGCACTGCATCAGTCC

наличие в белках дисульфидных связей контролировали добавлением β -меркаптоэтанола.

Концентрацию белка AaeL1 определяли по поглощению при 280 нм с коэффициентом экстинкции $A_{1\text{мг/мл}}^{1\text{см}} = 0,59$ [10]. Коэффициент экстинкции для HmaL1 ($A_{1\text{мг/мл}}^{1\text{см}} = 0,176$) был определен расчетным способом, используя программу Vector-NTI.

Измерения собственной флуоресценции белков проводили на спектрофлуориметре Varian Cary 100 («Varian», Австралия) с использованием кварцевых кювет с длиной оптического пути 1 см. Длина волны возбуждающего света составляла 280 нм, регистрацию спектров испускания флуоресценции проводили в интервале 290–500 нм. Исследования проводили в 20 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7,5 в присутствии 4 М мочевины, в диапазоне температур 21–98 °С. Рабочая концентрация белка составляла 0,2 мг/мл.

Эксперименты с белками AaeL1 и AaeL1-D101C-K127C проводили с помощью дифференциального сканирующего микрокалориметра («СКАЛ-1», Россия) со стеклянной ячейкой объемом 0,33 мл при скорости нагрева 1 °С/мин (1,0 К/мин) и под давлением 2,5 атм [14]. Образцы переводили в соответствующий буферный раствор (20 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7,5; 4 М мочевины) путем продолжительного диализа. Концентрации белков в экспериментах (1,0 мг/мл) измеряли спектрофотометрически («Экром», Россия). Для записи данных использовали программу SCAL («СКАЛ», Россия). Зависимость молярной теплоемкости от температуры рассчитывали стандартным способом [15] и в дальнейшем анализировали с использованием программы SigmaPlot («SigmaPlot», США).

Спектры кругового дихроизма (КД) измеряли на спектрополяриметре Chirascan («Applied Photophysics», Англия). Для измерений КД в дальней ультрафиолетовой области использовали кюветы с длиной оптического пути 0,1 см. Концентрация белка для измерений спектров дальнего КД составляла 0,2 мг/мл для AaeL1 и AaeL1-D101C-K127C и 0,4 мг/мл для HmaL1 и HmaL1-E82C-D114C. Спектры регистрировали в интервале длин волн 200–250 нм.

Значения молярной эллиптичности рассчитывали по уравнению:

$$[\theta] = [\theta]_{\text{изм}} \times M / (L \times C),$$

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). Зависимость эл-

липтичности от температуры при 215 нм измеряли со скоростью нагрева 1 °С/мин. Исследования AaeL1 и AaeL1-D101C-K127C проводили в 20 мМ натрий-фосфатном буфере при pH 7,5 в присутствии 4 М мочевины. Исследования HmaL1 и HmaL1-E82C-D114C проводили в 50 мМ Tris-HCl pH 7,5; 3 М NaCl, 50 мМ MgCl_2 и 50 мМ NH_4Cl .

Фрагмент 23S рРНК *H. marismortui* (спирали 76–78) был любезно предоставлен С.В. Тищенко (ИБ РАН, лаборатория структурных исследований аппарата трансляции). Последовательность фрагмента: ggGUCGCCGAUGUGCAGCAUAGGUAGGAGACACUACACAGGUACC-CGCGCUAGCGGGCCACCGAGUCAACAGUGAAAUACUACCCGUCGGUGACcc.

Для формирования РНК–белкового комплекса раствор с фрагментом рРНК инкубировали при 70 °С в течение 10 мин, затем охлаждали на льду. Далее к раствору рРНК добавляли белок, диализованный против буфера для связывания (50 мМ Tris-HCl pH 7,5; 3 М NaCl, 500 мМ NH_4Cl , 10 мМ MgCl_2) в молярном соотношении рРНК/белок – 1/1. Полученный раствор инкубировали при комнатной температуре 30 мин.

Для оценки образования комплекса рРНК/белок *in vitro* мы использовали эксклюзионную хроматографию. Для анализа мы использовали хроматографическую систему Varian ProStar HPLC («Varian», Австралия) с колонкой для гелефильтрации Superdex 200 (24 мл) («GE Healthcare», США), предварительно уравновешенной буфером 50 мМ Tris-HCl pH 7,5; 3 М NaCl, 500 мМ NH_4Cl , 20 мМ MgCl_2 . Препарат рРНК/белок (0,2 мг/мл, рРНК/белок в молярном соотношении 1/1, $v = 200$ мкл) наносили на колонку и элюировали со скоростью 0,4 мл/мин. Калибровочную кривую строили с использованием белков БСА, овальбумин, рибонуклеаза и апротинин («Bio-Rad», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнение пространственной структуры и аминокислотных последовательностей белков AaeL1 и HmaL1. Пространственная структура рибосомных белков L1 отличается высокой консервативностью: в ней можно выделить два домена (I и II), которые соединены гибкой перетяжкой, позволяющей им менять взаимное расположение. Известно два варианта взаимного расположения доменов в растворе: «открытое» и «закрытое» [10]. «Открытая» конформация характерна для архейных белков L1 (к ним относится HmaL1) и подразумевает такое расположение доменов друг относительно друга, при

котором РНК-связывающие участки открыты и доступны для РНК. «Закрытая» конформация – это такое расположение доменов, когда они сближены, а РНК-связывающие участки скрыты. Такая конформация присуща бактериальным белкам L1 и была обнаружена у белка AaeL1 [10].

На рис. 1, *a* представлено наложение пространственной структуры белка AaeL1 (синим) и модели пространственной структуры белка HmaL1 (зеленым). Оба белка имеют характерную для белков L1 двухдоменную структуру: N- и C-концы расположены в домене I, который связан двухцепочечной перетяжкой с доменом II. Видно, что основные элементы вторичной структуры домена I двух белков (четырёхтяжевой антипараллельный β -слой, закрытый с одной стороны двумя α -спиралями) хорошо накладываются друг на друга, за исключением C-концевой α -спирали в домене I белка AaeL1. При сравнении структур двух белков видно характерное различие архейных и бактериальных белков L1, заключающееся в разном повороте домена II относительно домена I. Однако если отдельно сравнить структуры доменов II, мы также уви-

дим их хорошее наложение (рис. 1, *б*). Видно, что оба этих домена имеют топологию укладки по Россману [16], когда параллельный четырёхтяжевой β -слой закрыт двумя α -спиралями с одной стороны и четырьмя α -спиралями с другой.

Сравнение аминокислотных последовательностей белков, выполненное в программе BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), показало, что идентичность аминокислотных последовательностей белков AaeL1 и HmaL1 составляет 33%. На рис. 2 показано выравнивание аминокислотных последовательностей двух белков, серым цветом показаны идентичные аминокислотные остатки. Белки AaeL1 и HmaL1 отличаются по своей длине: AaeL1 состоит из 242 а.о., белок HmaL1 – из 212 а.о. Интересно, что белок HmaL1 имеет в своей последовательности $\sim 1/4$ отрицательно заряженных а.о. (аспаратат и глутамат), располагающихся в основном на поверхности домена II, что является нехарактерным для белков L1 из других организмов [11].

Поиск неупорядоченных участков и дизайн дисульфидных связей в белках AaeL1 и HmaL1. Поиск неупорядоченных участков в последовательностях белков проводился с помощью про-

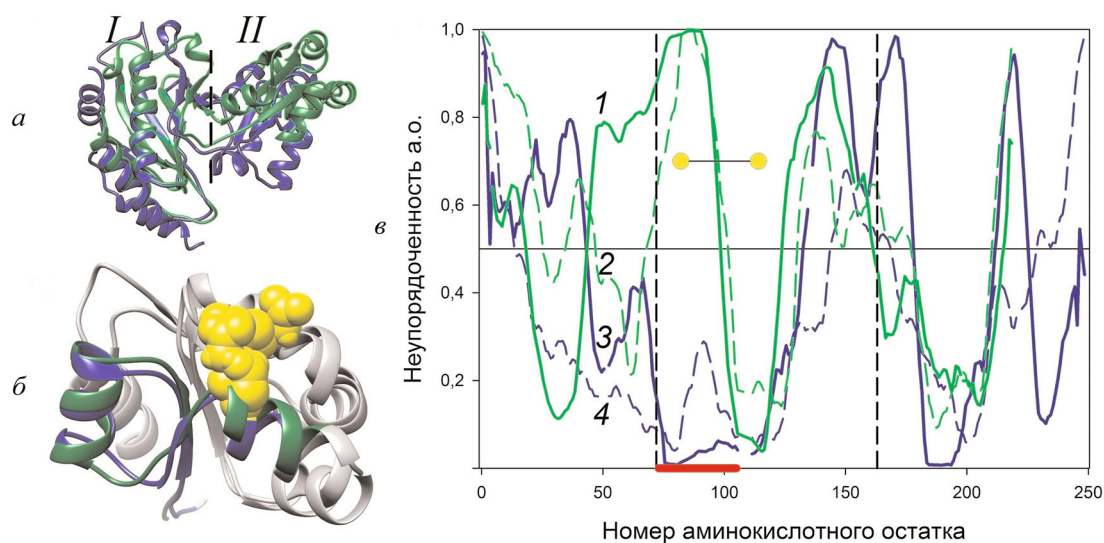


Рис. 1. Сравнение пространственной структуры и аминокислотных последовательностей белков AaeL1 и HmaL1. *a* – Наложение пространственной структуры белка AaeL1 (PDB:3QOY) (синим) и модели пространственной структуры HmaL1 (зеленым). Пунктирной линией разделены домены I и II. *б* – Наложение пространственных структур доменов II белка AaeL1 и HmaL1. Синим цветом окрашен участок полипептидной цепи белка AaeL1, предсказанный программами PONDR-FIT и IsUnstruct как структурированный. Зеленым цветом окрашен участок полипептидной цепи белка HmaL1, предсказанный как неупорядоченный. Желтым цветом и объемом выделены аминокислотные остатки, выбранные нами для замены на остатки цистеинов. *в* – Вероятность аминокислотных остатков в белках HmaL1 (зеленые линии 1 и 2) и AaeL1 (синие линии 3 и 4) быть неупорядоченными (в нативно-развернутом состоянии), выполненные с помощью программ PONDR-FIT (сплошными линиями) и IsUnstruct (пунктирными линиями). Вертикальными линиями выделены участки аминокислотных последовательностей белков, образующие домен II. Красной линией внизу графика показан участок аминокислотной последовательности, в котором предсказания неупорядоченности участков для белков AaeL1 и HmaL1 различаются. Желтыми кружками показаны позиции для введения дисульфидных связей. С цветным вариантом рис. 1 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>

HmaL1	12	RALEDAPERNFRETVDLAVNLRDLDLNDPSNRVDESVVLPAGTGQETTIVVFAEGETALR	71
AaeL1	31	KKMEEVLQRRFDETVELAMRL-NVDPRYADQMVRGSVVLP HGLGKPIKVVVFAEGEYAKK	89
HmaL1	72	AEEVADDVLDDELEELGGDDDAKDLADDTDFFI AEKGLMQDIGRYLGTVLGPRGKMPE	131
AaeL1	90	AEEAGADYVGGDEL-----INKILKEEWTDFDVAIATPEMMPKVAK-LGRILGPRGLMPS	143
HmaL1	132	PLDP--DDDVEVEIERMK-NTVQLRSGERRTFHTRVGAEDMSAENIADN----IDVILRR	184
AaeL1	144	PKTGTVT'TNVEQAIKDAKRGRVEFKVDKAGNVHMPVVGKISFEKEKLIIDNLYAAIDAVV-R	202
HmaL1	185	LHADLEKGPLNIDTVYVKT'TMGPFAMEV	211
AaeL1	203	AKPPGAKGQY-IKNMAVSLTMSFSVKL	228

Рис. 2. Сравнение аминокислотных последовательностей рибосомных белков HmaL1 и AaeL1. Идентичные остатки выделены серым цветом

грамм PONDR-FIT и IsUnstruct [6, 9]. На рис. 1, *в* показана вероятность разных аминокислотных остатков белков AaeL1 (синим цветом) и HmaL1 (зеленым цветом) быть в нативно-развернутом состоянии. Данные получены программами PONDR-FIT (сплошной линией) и IsUnstruct (пунктирной линией). Вертикальными линиями выделен участок аминокислотной последовательности, относящийся к домену II этих белков. В этом домене мы видим большую разницу в предсказаниях программ (участок выделен красным отрезком внизу графика). Для белка AaeL1 этот участок предсказывается как стабильный, в то время как для белка HmaL1 этот участок предсказывается как неупорядоченный. Именно такой участок подходит для проверки нашей идеи. Если результат работы программ типа PONDR-FIT и IsUnstruct действительно можно интерпретировать как предсказание стабильных и ослабленных частей полипептидной цепи белка, тогда введение дисульфидной связи в участок, предсказанный как неупорядоченный, найденный в HmaL1, приведет к повышению стабильности и уменьшению подвижности этого белка, а введение дисульфидной связи в такой же участок, но предсказанный как структурированный в AaeL1, не изменит стабильность белка или даже уменьшит ее. Если более важным для стабилизации белка является его пространственная структура, то введенные мутации одинаковым образом должны повлиять на оба белка.

Дополнительно мы проверили, насколько сам факт замен а.о. в позициях D101 и K127 в белке AaeL1 и E82 и D114 в белке HmaL1 повлияет на предсказания программ PONDR-FIT и IsUnstruct. Незначительные изменения в аминокислотной последовательности белков (замена двух а.о.) слабо влияют на кривые, показанные на рис. 1, *в*. По крайней мере это влияние мень-

ше, чем отличия между предсказаниями программ PONDR-FIT и IsUnstruct.

На рис. 1, *б* показано наложение пространственных структур доменов II белков AaeL1 и HmaL1. В них синим и зеленым цветами соответственно показаны участки аминокислотных последовательностей белков, выбранных нами для введения дисульфидных связей, исходя из предсказаний, выполненных программами PONDR-FIT и IsUnstruct. Желтым цветом и объемом показаны аминокислотные остатки, выбранные нами для замены на остатки цистеинов. Ими оказались D101 и K127 в белке AaeL1 и E82 и D114 в белке HmaL1. Выбор аминокислотного остатка для замены на остатки цистеинов проводили по двум критериям: расстояние между C β -атомами аминокислотных остатков должно быть ~ 5 Å, и остатки в пространстве должны быть направлены друг на друга.

Формирование дисульфидных связей в мутантных формах белков AaeL1-D101C-K127C и HmaL1-E82C-D114C. Мутантные формы белков AaeL1 и HmaL1 были выделены и очищены, как описано в «Методах исследования». Проверку формирования дисульфидных связей в мутантных формах белка проводили методом ПААГ электрофореза в присутствии ДСН. Это возможно благодаря различию гидродинамического радиуса денатурированных белков с завязанной дисульфидной связью и без нее. На рис. 3 показаны результаты электрофореза в ПААГ в присутствии ДСН для белка AaeL1 дикого типа и AaeL1-D101C-K127C (рис. 3, *а*) и HmaL1 дикого типа и HmaL1-E82C-D114C (рис. 3, *б*). В условиях, когда SH-группы восстановлены – в присутствии β -меркаптоэтанола (дорожки 1 и 2 на обоих рисунках) белки дикого типа и мутантных форм имеют одинаковую подвижность в геле. В условиях, когда дисульфидные связи завязаны, т.е. в условиях отсутствия β -меркаптоэта-

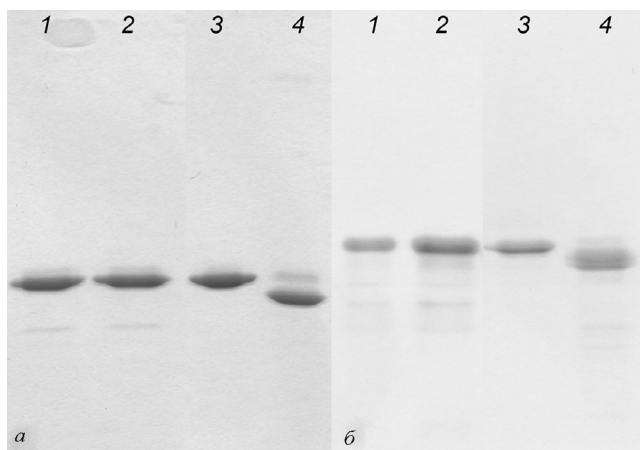


Рис. 3. Результаты анализа методом электрофореза в ПААГ в присутствии ДСН белков AaeL1 и AaeL1-D101C-K127C (*a*), HmaL1 и HmaL1-E82C-D114C (*б*): в условиях восстановленных дисульфидных связей (дорожки 1 и 2) и окисленных дисульфидных связей (дорожки 3 и 4)

нола (дорожки 3 и 4 на обоих рисунках) подвижность белков дикого типа и белков с завязанными дисульфидными связями различается. Результаты, показанные на рис. 3, говорят о том, что введенные нами дисульфидные связи спроектированы корректно и завязываются спонтанно в растворе в белке AaeL1-D101C-K127C, а также формируются в процессе окисления в белке HmaL1-E82C-D114C, как описано в «Методах исследования».

Исследование стабильности белка AaeL1 с введенной дисульфидной связью. AaeL1 — белок из термофильной бактерии, его отличает высокая термостабильность. Для того чтобы исследовать процесс его плавления, нам было необходимо немного уменьшить его стабильность, например, присутствием дополнительного денатуранта. На рис. 4 показано плавление белка AaeL1 в присутствии разных концентраций мочевины, исследованное методом флуоресценции. Видно, что в отсутствие денатуранта температура плавления белка находится за пределами 100 °С. В присутствии 1 М мочевины — в районе 90 °С, в присутствии 4 М мочевины — в районе 75 °С. На рис. 5, *a* серым и черным цветами показаны спектры КД для белка AaeL1 дикого типа в отсутствие денатуранта (кривая 1) и в присутствии 4 М мочевины (кривая 3). Видно, что форма спектров белка в 0 М мочевины и в 4 М мочевины совпадает. Т.е. 4 М мочевины практически не влияют на структуру нативного состояния, но дестабилизируют его при дальнейшем повышении температуры. Поэтому дальнейшие эксперименты с белком AaeL1 мы решили проводить в присутствии 4 М мочевины.

Теперь, когда мы подобрали условия для исследования белка AaeL1, необходимо проверить не нарушила ли дисульфидная связь нативную упаковку белка. На рис. 5, *a* показаны спектры КД, полученные для белка AaeL1 дикого типа и мутантной формы в отсутствие денатуранта и в присутствии 4 М мочевины. Видно, что в нативных условиях (в отсутствие мочевины) форма спектров белков дикого типа и мутантной формы хорошо совпадает и характерна для α -спиральных белков. В присутствии 4 М мочевины, несмотря на зашумленность, видно, что форма спектров белка дикого типа и мутантной формы совпадают, а также эти спектры совпадают со спектрами белков в нативных условиях. Таким образом, можно сделать вывод, что ни присутствие 4 М мочевины, ни введенная дисульфидная связь не нарушили вторичную структуру в белке.

Процесс плавления белка AaeL1 и AaeL1-D101C-K127C был исследован методом спектроскопии кругового дихроизма. На рис. 5, *б* показаны кривые зависимости интенсивности мольярной эллиптичности при 215 нм от температуры. Видно, что кривые для белка AaeL1 дикого типа и мутантной формы с введенной дисульфидной связью AaeL1-D101C-K127C совпадают. Для уточнения температуры плавления белков AaeL1 дикого типа и AaeL1-D101C-K127C мы исследовали процессы плавления этих белков методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии. На рис. 5, *в* показаны кривые плавления белка AaeL1 и его мутантной формы с введенной дисульфидной связью в присутствии 4 М мочевины. Видно, что для белка дикого типа и для белка с введенной дисульфидной связью температура плавления совпадает и составляет 347К (74 °С).

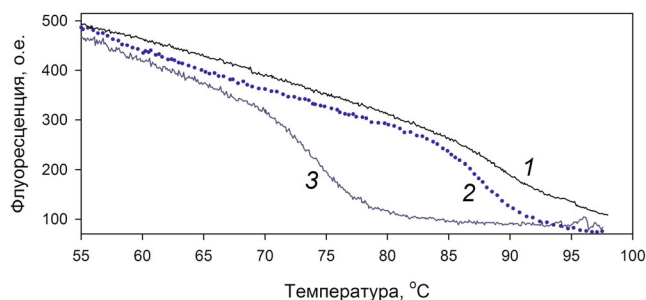


Рис. 4. Изменение интенсивности флуоресценции в процессе тепловой денатурации для белка AaeL1 дикого типа в нативных условиях (1), в присутствии 1 М мочевины (2) и 4 М мочевины (3). Измерения проводились в 20 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7,5. С цветным вариантом рис. 4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

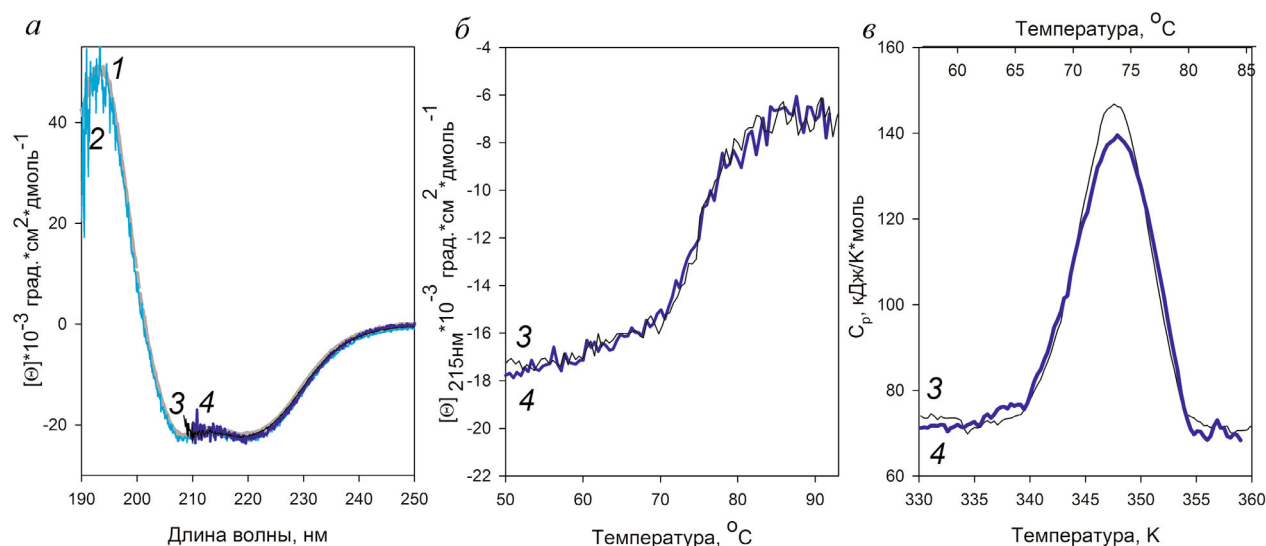


Рис. 5. Исследование стабильности белка AaeL1 с введенной дисульфидной связью. *а* – Спектры кругового дихроизма (КД) белка AaeL1 дикого типа (кривые 1 и 3) и мутантной формы с введенной дисульфидной связью AaeL1-D101C-K127C (кривые 2 и 4) в присутствии различных концентраций мочевины: 1 и 2 (серым и голубым цветом соответственно) в отсутствие денатуранта, 3 и 4 (черным и синим цветом соответственно) в присутствии 4М мочевины. Измерения проводились в 20мМ натрий-фосфатном буфере, рН 7,5. *б* – Температурная зависимость молярной эллиптичности на 215 нм – 3 (черным цветом) для белка AaeL1 дикого типа в присутствии 4М мочевины, 4 (синим цветом) для белка AaeL1-D101C-K127C в присутствии 4М мочевины. *в* – Зависимость избыточной теплоемкости белка AaeL1 дикого типа (3, черным цветом) и AaeL1-D101C-K127C с завязанной дисульфидной связью (4, синим цветом) от температуры в присутствии 4 М мочевины. С цветным вариантом рис. 5 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>

Исследование стабильности белка HmaL1 с введенной дисульфидной связью. Белок HmaL1 является белком из экстремально галофильного организма, обитающего в условиях высоких концентраций соли, близких к сатурации [17]. Поэтому на начальном этапе работы с данным белком мы подобрали такие условия (концентрация NaCl), в которых белок будет структурированным. На рис. 6 показаны спектры КД, полученные для белка HmaL1 в присутствии различных концентраций NaCl. Видно, что в концентрациях 0–2 М NaCl (кривые 1–8) белок HmaL1 неструктурирован или слабоструктурирован. Наибольшее количество вторичной структуры белок HmaL1 имеет в условиях 3 М NaCl (кривая 13, голубым цветом). Таким образом, была определена минимальная концентрация NaCl (3 М), необходимая для структурированности белка HmaL1.

Проектирование дисульфидной связи в белке HmaL1 было основано на модели структуры белка, предложенной в работе Gabdulkhakov et al. [11]. Для корректного завязывания дисульфидных связей в этом белке проводили окисление, как указано в «Методах исследования». Исследование влияния введенной дисульфидной связи на структуру белка HmaL1 проводили с использованием метода спектроскопии КД. На рис. 7, *а* показаны спектры КД белков

HmaL1 дикого типа и его мутантной формы с завязанной дисульфидной связью HmaL1-E82C-D114C. Видно, что дисульфидная связь, введенная в неупорядоченный участок белка, увеличила количество вторичной структуры в белке. Методом спектроскопии КД был исследован процесс плавления белков HmaL1. На рис. 7, *б* показан график зависимости доли нативного состояния белка HmaL1 дикого типа и мутантной формы с введенной дисульфидной связью HmaL1-E82C-D114C, рассчитанной интенсивности молярной эллиптичности при 215 нм от температуры. Видно, что белок HmaL1 дикого типа плавится при 55 °С, в то время как белок HmaL1-E82C-D114C с завязанной дисульфидной связью плавится при 65 °С. Это подтверждает нашу гипотезу о том, что дисульфидная связь, введенная в участок, предсказанный как неупорядоченный (несмотря на то что в структуре этого белка он структурирован), приводит к повышению стабильности белка.

Так как белок HmaL1 является слабоструктурированным и не содержит остатков триптофана в последовательности, а также требует высокой концентрации соли и склонен к агрегации, изучить процесс его плавления методами собственной флуоресценции и дифференциальной сканирующей микрокалориметрии оказалось не-

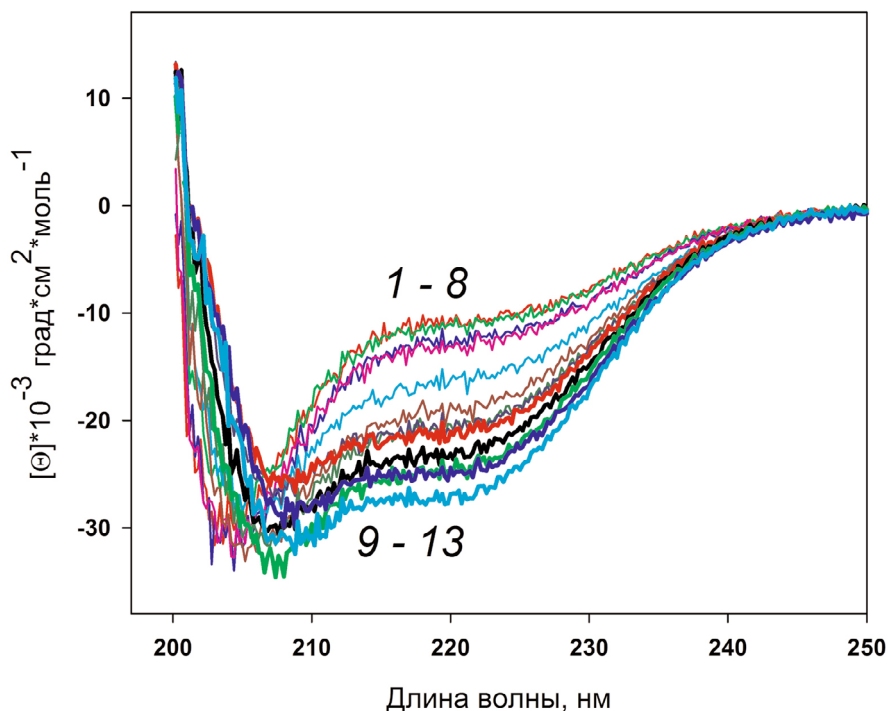


Рис. 6. Спектры КД белка HmaL1 в присутствии различных концентраций NaCl: от 0 М (кривая 1) до 3,5 М (кривая 13) с шагом 0,25 М NaCl. Измерения проводились в буфере 50 мМ Tris-HCl, pH 7,5. С цветным вариантом рис. 6 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>

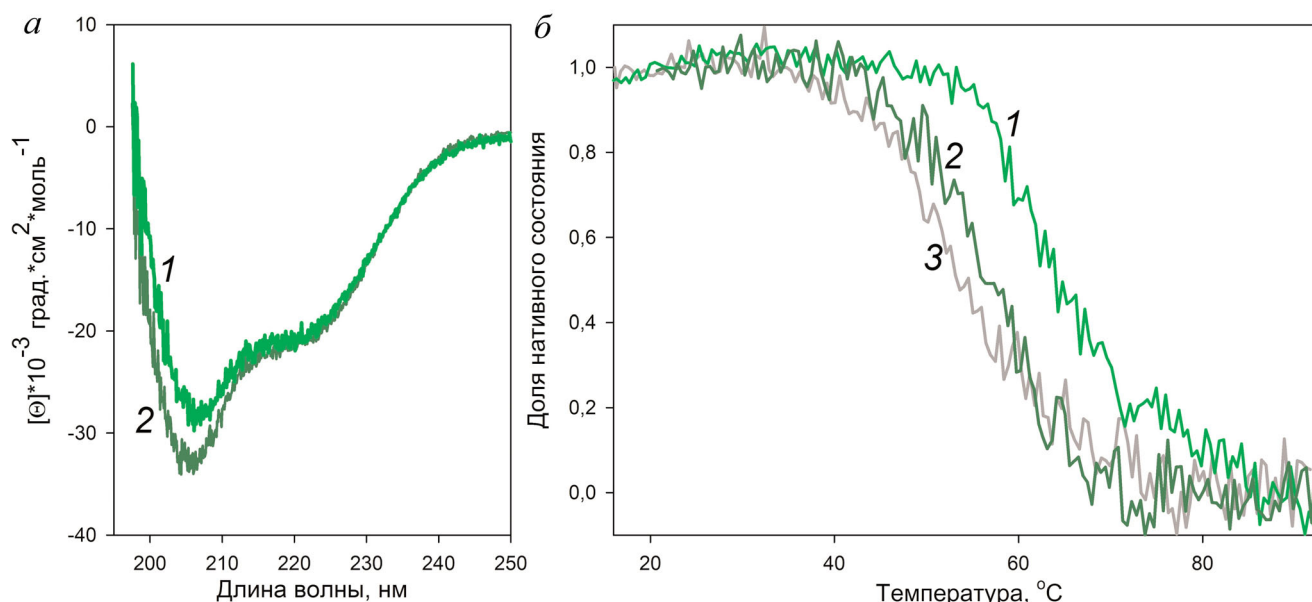


Рис. 7. Исследование стабильности белка HmaL1 с введенной дисульфидной связью. *а* – Спектры КД белка HmaL1 дикого типа (2, темно-зеленым цветом) и HmaL1-E82C-D114C (1, зеленым цветом). Измерения проводились в буфере 50 мМ Tris-HCl, pH 7,5; 3М NaCl, 50 мМ MgCl₂. *б* – Зависимость доли нативного состояния белка HmaL1 дикого типа (2, темно-зеленым цветом), HmaL1-E82C-D114C с завязанной (1, зеленым цветом) и с разорванной (3, серым цветом) дисульфидной связью от температуры. Доля нативного состояния белка рассчитывалась из величины молярной эллиптичности на 215 нм.

С цветным вариантом рис. 7 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>

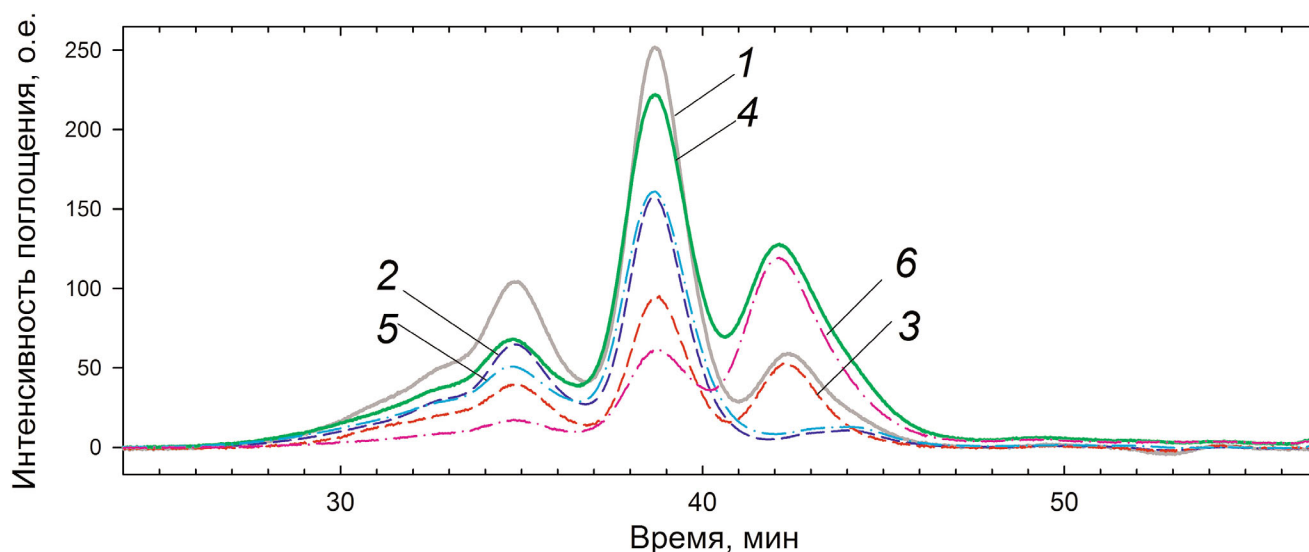


Рис. 8. Профиль элюции HmaL1/23S рРНК (1); HmaL1-E82C-D114C/23S рРНК (4), а также вклад белков HmaL1 (3) и HmaL1-E82C-D114C (6) в комплекс. Кривые 2 и 5 показывают вклад 23S рРНК в комплексы с белком HmaL1 дикого типа и HmaL1 с введенной дисульфидной связью соответственно.

С цветным вариантом рис. 8 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

возможным. Мы решили проверить, как повлияла введенная дисульфидная связь на биологическую функцию белка. Белок L1 – высоко консервативный рибосомный белок, который связывается с 23S рРНК. За связывание РНК отвечает домен I белка, домен II, в который мы ввели дисульфидную связь, участвует в процессе узнавания РНК. Исследование комплекса HmaL1/рРНК мы проводили с использованием гель-фильтрационной хроматографии. Связывание белка и рРНК проводили, как описано в «Методах исследования». На рис. 8 показаны профили элюции свободной H77-H78 23S рРНК, комплексов белков HmaL1/H77-H78 23S рРНК и HmaL1-E82C-D114C/H77-H78 23S рРНК, а также показан вклад белка и рРНК в эти комплексы. По высоте пиков на профиле элюции (рис. 8) видно, что 2/3 белка HmaL1 дикого типа связывает РНК, а 1/3 остается свободной. В случае комплекса рРНК с белком HmaL1-E82C-D114C с введенной дисульфидной связью, непосредственно в комплексе с рРНК находится 1/3 белка, 2/3 белка остаются в свободном состоянии. Из этого можно сделать вывод о том, что введенная во II-ой домен дисульфидная связь не нарушает биологическую функцию белка, но снижает ее. Это можно объяснить тем, что уменьшение подвижности структуры домена II (из-за дисульфидной связи) повлияло на процесс узнавания целевой рРНК, для которого, возможно, необходима его подвижность.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Цель данной работы заключалась в подтверждении нашего предположения, что введение дисульфидных связей в участок, предсказываемый программами типа PONDR-FIT и IsUnstruct как нативно-развернутый, приведет к повышению стабильности и уменьшению подвижности структуры белка, в то время как введение дисульфидной связи в такой же участок, предсказанный как структурированный, не повлияет на стабильность белка. В структурах белков AaeL1 и HmaL1 мы нашли участок, одинаковый по пространственной структуре, но предсказанный программами как структурированный в белке AaeL1 и как неупорядоченный в белке HmaL1. Мы спроектировали дисульфидные связи в одинаковом положении в двух белках и исследовали их влияние на стабильность их структур. В результате можно сделать следующие выводы: (1) дисульфидная связь, введенная в участок, предсказанный как структурированный, не повлияла на стабильность белка AaeL1; (2) дисульфидная связь, введенная в участок, предсказанный как нативно-развернутый, привела к повышению температуры плавления белка HmaL1; (3) мутантный белок HmaL1 с повышенной стабильностью сохранил свою функциональную активность. Таким образом, мы получили подтверждение нашей гипотезы о том, что предсказания программ

типа PONDR-FIT и IsUnstruct действительно коррелируют с ослабленностью или стабильностью участков полипептидной цепи белка L1, а не с особенностями его пространственной структуры.

Результаты наших исследований, выполненных в этой и предыдущей работе [8], позволяют высказать предположение, что стабильность белка зависит не столько от структуры нативного состояния (жестко упакованного), а скорее от особенностей развернутых и промежуточных состояний (подвижных с несформировавшимися контактами). Эта мысль может показаться простой с точки зрения теоретика, но она весьма сложна с точки зрения экспериментального подтверждения и тем более с позиции экспериментатора, перед которым стоит задача увеличить стабильность конкретного белка. Выполненные нами исследования позволяют использовать программы по предсказанию нативно-развернутых участков как инструмент для поиска ослабленных частей белка, которые, в свою

очередь, потенциально могут быть причиной существования более подвижных нестабильных промежуточных состояний и, соответственно, влиять на переход между нативным и другими состояниями при плавлении или разворачивании белка денатурантами.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта 18-34-00243 мол_а.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

Благодарности. Авторы выражают благодарность С.В. Тищенко за предоставленный препарат рРНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jirgensons, S.C., Hnilica, B., and Capetillo, L.S. (1966) Viscosity and conformation of calf thymus histones, *Die Makromol. Chemie*, **97**, 216–224, doi: 10.1002/macp.1966.020970120.
- DeForte, S., and Uversky, V. (2016) Order, disorder, and everything in between, *Molecules*, **21**, 1090, doi: 10.3390/molecules21081090.
- He, B., Wang, K., Liu, Y., Xue, B., Uversky, V.N., and Dunker, A.K. (2009) Predicting intrinsic disorder in proteins: an overview, *Cell Res.*, **19**, 929–949, doi: 10.1038/cr.2009.87.
- Jones, D.T., and Cozzetto, D. (2015) DISOPRED3: Precise disordered region predictions with annotated protein-binding activity, *Bioinformatics*, **31**, 857–863, doi: 10.1093/bioinformatics/btu744.
- Linding, R., Jensen, L.J., Diella, F., Bork, P., Gibson, T.J., and Russell, R.B. (2003) Protein disorder prediction: implications for structural proteomics, *Structure*, **11**, 1453–1459, doi: 10.1016/j.str.2003.10.002.
- Xue, B., Dunbrack, R.L., Williams, R.W., Dunker, A.K., and Uversky, V.N. (2010) PONDR-FIT: a meta-predictor of intrinsically disordered amino acids, *Biochim. Biophys. Acta*, **1804**, 996–1010, doi: 10.1016/j.bbapap.2010.01.011.
- Li, J., Feng, Y., Wang, X., Li, J., Liu, W., Rong, L., and Bao, J. (2015) An overview of predictors for intrinsically disordered proteins over 2010–2014, *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 23446–23462, doi: 10.3390/ijms161023446.
- Nagibina, G.S., Tin, U.F., Glukhov, A.S., Melnik, T.N., and Melnik, B.S. (2016) Intrinsic disorder-based design of stabilizing disulphide bridge in Galphao protein, *Protein Pept. Lett.*, **23**, 176–184, doi: 10.2174/092986652302160105130540.
- Lobanov, M.Y., and Galzitskaya, O.V. (2011) The Ising model for prediction of disordered residues from protein sequence alone, *Phys. Biol.*, **8**, 35004, doi: 10.1088/1478-3975/8/3/035004.
- Nikonova, E.Yu., Tishchenko, S.V., Gabdulkhakov, A.G., Shklyayeva, A.A., Garber, M.B., Nikonov, S.V., and Nevskaya, N.A. (2011) Crystal structure of ribosomal protein L1 from the bacterium *Aquifex aeolicus*, *Crystallogr. Rep.*, **56**, 648–652, doi: 10.1134/S1063774511040158.
- Gabdulkhakov, A., Tishchenko, S., Mikhaylina, A., Garber, M., Nevskaya, N., and Nikonov, S. (2017) Crystal structure of the 23S rRNA fragment specific to r-protein L1 and designed model of the ribosomal L1 stalk from *Haloarcula marismortui*, *Crystals*, **7**, 37, doi: 10.3390/cryst7020037.
- Muller, M.P., Peters, H., Blumer, J., Blankenfeld, W., Goody, R., and Itzen, A. (2010) The *Legionella* effector protein DrrA AMPylates the membrane traffic regulator Rab1b, *Science*, **329**, 946–949.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680–685, doi: 10.1038/227680a0.
- Senin, A.A., Potekhin, S.A., Tiktopulo, E.I., and Filimonov, V.V. (2000) Differential scanning microcalorimeter SCAL-1, *J. Therm. Anal. Calorim.*, **62**, 153–160, doi: 10.1023/A:1010171013669.
- Privalov, P.L., and Potekhin, S.A. (1986) Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins, *Methods Enzymol.*, **131**, 4–51, doi: 10.1016/0076-6879(86)31033-4.
- Rao, S.T., and Rossmann, M.G. (1972) Comparison of super-secondary structures in proteins, *J. Mol. Biol.*, **4**, 241–250, doi: 10.1016/0022-2836(73)90388-4.
- Camacho Córdova, D.I., Camacho Ruíz, R.M., Mateos Díaz, J.C., Córdova López, J.A., and Rodríguez González, J.A. (2014) *Haloarcula marismortui*, eighty-four years after its discovery in the Dead Sea, *Int. J. Eng. Res. Technol.*, **3**, 1257–1267.

**VERIFICATION OF THE STABILIZED PROTEIN DESIGN
BASED ON THE PREDICTION OF INTRINSICALLY
DISORDERED REGIONS: RIBOSOMAL PROTEINS L1****G. S. Nagibina*, V. V. Marchenkov, K. A. Glukhova, T. N. Melnik, and B. S. Melnik***Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino,
Moscow Region, Russia; E-mail: galina-nagibina@phys.protres.ru*

Received August 9, 2019

Revised September 27, 2019

Accepted September 27, 2019

In our previous papers, we proposed the idea that programs predicting intrinsically disordered regions in amino acid sequences can be used for finding weakened sites in proteins. The regions predicted by such programs are suitable targets for the introduction of protein-stabilizing mutations. However, for each specific protein, it remains unclear what determines protein stabilization – the amino acid sequence (and accordingly, prediction of weakened sites) or the 3D structure. To answer this question, it is necessary to study two proteins with similar structures but different amino acid sequences and, consequently, different predictions of weakened regions. By introducing identical mutations into identical elements of the two proteins, we will be able to reveal whether predictions of the weakened sites or the 3D protein structure are the key factors in the protein stability increase. Here, we have chosen ribosomal proteins L1 from the halophilic archaeon *Haloarcula marismortui* (HmaL1) and extremophilic bacterium *Aquifex aeolicus* (AaeL1). These proteins are identical in their structures but different in amino acid sequences. A disulfide bond introduced into the region predicted as the structured one in AaeL1 did not lead to the increase in the protein melting temperature. At the same time, a disulfide bond introduced into the same region in HmaL1 that was predicted as a weakened one, resulted in the increase in the protein melting temperature by approximately 10°C.

Keywords: ribosomal protein L1, globular protein stabilization, protein intrinsically disordered regions, disulfide bonds