

УДК 577.322

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АГРЕГАЦИИ РИБОСОМНОГО БЕЛКА bS1 И ЕГО СТАБИЛЬНОГО ФРАГМЕНТА ИЗ *Thermus thermophilus*

© 2020 С.Ю. Гришин<sup>1</sup>, У.Ф. Джус<sup>1</sup>, О.М. Селиванова<sup>1</sup>,  
В.А. Балобанов<sup>1</sup>, А.К. Сурин<sup>1,2,3</sup>, О.В. Галзитская<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup> Институт белка РАН, 142290 Пущино, Московская обл., Россия; электронная почта: ogalzit@vega.protres.ru

<sup>2</sup> Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, 142279 Оболensk, Московская обл., Россия; электронная почта: alan@vega.protres.ru

<sup>3</sup> Филиал Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290 Пущино, Московская обл., Россия

<sup>4</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290 Пущино Московская обл., Россия

Поступила в редакцию 21.10.2019

После доработки 24.12.2019

Принята к публикации 11.01.2020

Многодоменный бактериальный белок bS1 является самым большим и функционально важным белком 30S субъединицы рибосомы, взаимодействующим как с мРНК, так и с белками. Известно, что белок bS1 обладает высокой склонностью к формированию ассоциатов, однако детально этот процесс не изучали. Для рибосомного белка bS1, а также его стабильного фрагмента из *Thermus thermophilus* нами были получены суперпродукцентные штаммы, выделены и очищены препараты рекомбинантного рибосомного белка bS1 из *T. thermophilus*, а также его стабильного фрагмента bS1(49). Методами флуоресцентной спектроскопии, динамического рассеяния света и высокоэффективной жидкостной хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрическим анализом продуктов ограниченного протеолиза, показано, что неструктурированные участки на N- и C-концах белка bS1 могут играть ключевую роль в его агрегации. При этом полученный фрагмент белка bS1(49) менее склонен к формированию агрегатов по сравнению с целым белком из *T. thermophilus*. Выявленные особенности могут быть использованы для получения белковых кристаллов и выяснения структуры стабильного фрагмента белка bS1.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** агрегация белков, рибосомный белок, bS1, домен, *Thermus thermophilus*, ионная сила раствора, масс-спектрометрия.

DOI: 10.31857/S0320972520030100

В настоящее время известно, что склонность к агрегации и формированию амилоидоподобных фибрилл является общим свойством пептидов и белков [1–4]. Отдельный интерес представляет изучение агрегации рибосомных белков в связи с их повсеместной представленностью в клетке и вовлеченностью в надмолекулярные ансамбли с другими белками и нуклеиновыми кислотами [5–8].

Белок bS1, также обозначаемый как S1, по номенклатуре, предложенной до 2014 года

Принятые сокращения:  $I_{320}/I_{380}$  – отношение интенсивностей флуоресценции на длинах волн 320 и 380 нанометров; bS1(49) – фрагмент белка bS1 из *Thermus thermophilus* с молекулярной массой ~49 кДа; m/z – отношение массы иона к его заряду; ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрией; ДРС – динамическое рассеяние света; ДХШ – домен холодного шока; КД – круговой дихроизм; ЭМ – электронная микроскопия.

\* Адресат для корреспонденции.

[9, 10], является самым большим (~60 кДа) белком 30S рибосомной субчастицы. В составе рибосомы данный РНК-связывающий белок выполняет структурные и регуляторные функции [11–14]. Многие РНК-связывающие белки содержат в своей структуре либо домены холодного шока (ДХШ), либо структурно аналогичные им S1-домены, которые от одной до нескольких копий повторяются в рибосомальном белке bS1 [15–20]. Однако трехмерная структура bS1 до сих пор не определена в связи с невозможностью получить ее в кристаллической форме, что, в свою очередь, обусловлено относительной подвижностью S1-доменов в растворе. Каждый S1-домен состоит из ~70 аминокислотных остатков (а.о.), разделенных гибкими участками (15–20 а.о.) [21]. Большинство экспериментальных исследований проведено на выделенном из *Escherichia coli* белке bS1, в состав которого входит шесть доменов [22–25]. Белок bS1

из термофильного микроорганизма *Thermus thermophilus* имеет пять S1-доменов (D1–D5) и меньше изучен. Однако белки из термофилов стабильны, с ними удобнее работать при обычных температурах, и они лучше поддаются кристаллизации [26, 27].

Рибосомный белок bS1 из *T. thermophilus* был идентифицирован относительно недавно [28]. В серии экспериментов для белка bS1 была выявлена склонность образовывать ассоциаты при низкой (25 мМ HEPES-NaOH, pH 7,5) и умеренной (25 мМ HEPES-NaOH, pH 7,5 в присутствии 100–150 мМ NaCl) ионной силе раствора [29–31]. Как отмечалось выше, S1-домены белка bS1 хотя и отличаются по последовательности от ДХШ, тем не менее сходны с последними по структуре и принадлежат к семейству ОБ-мотивов [32]. В предыдущих работах было показано, что только в условиях с высокой ионной силой раствора (2 М LiCl) белок YB-1, имеющий в составе ДХШ, способен формировать фибриллы [33], причем именно ДХШ вносит основной вклад в фибрилlogenез [34]. Влияние высокой ионной силы раствора на процесс формирования агрегатов S1-доменами не было изучено.

Формирование белком bS1 из *T. thermophilus* ассоциатов обусловлено взаимодействием друг с другом его аминокислотных последовательностей, склонных к агрегации. Однако до сих пор не был выявлен вклад в этот процесс конкретных а.о. из S1-доменов N- и C-концевых фрагментов данного белка. В то же время с целью выяснения особенностей агрегации белка bS1 из *T. thermophilus* можно использовать для сравнения его усеченный фрагмент с молекулярной массой 49 кДа – bS1(49). Данный фрагмент укорочен с N- и C-концов на 25 а.о. и 71 а.о. соответственно, но сохраняет пять S1-доменов и также как целый белок способен связываться с рибосомной 30S субъединицей [30]. В связи с этим имеет значение выяснить, есть ли отличия в процессе агрегации и в морфологии формируемых агрегатов для целого белка и его фрагмента bS1(49), связанные с различием в их аминокислотной последовательности? В то же время следует уточнить, будут ли высокие концентрации LiCl вызывать фибрилlogenез белка bS1 и его стабильного фрагмента, имеющих в своей структуре 5 повторяющихся доменов структурных аналогов ДХШ? Чтобы ответить на эти вопросы, мы охарактеризовали агрегационные свойства bS1 и bS1(49) с помощью методов флуоресцентной спектроскопии, динамического рассеяния света (ДРС), электронной микроскопии (ЭМ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-

МС). Склонность этих белков к формированию ассоциатов была изучена в буферных растворах с низкой ионной силой (25 мМ HEPES-NaOH, pH 7,5), умеренной (25 мМ HEPES-NaOH, pH 7,5; 150 мМ NaCl) и высокой (25 мМ HEPES-NaOH, pH 7,5; 2 М LiCl).

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Выделение белков.** Ген белка bS1 *T. thermophilus* и фрагмент гена, соответствующий белку bS1(49) *T. thermophilus*, были клонированы в экспрессионный вектор pET28b («Novagen», Германия) и суперэкспрессированы в культуре клеток *E. coli* BL21 (DE3) («Novagen», Германия) [35]. Рекомбинантный белок bS1 был выделен из штамма-суперпродуцента *E. coli* BL21(DE3) и очищен по ранее описанной методике с некоторыми изменениями [28]. Для увеличения доли связанного на колонке белка при хроматографической очистке вместо DEAE-Sepharose была использована колонка Q-Sepharose («GE Healthcare», Швеция).

bS1(49), фрагмент белка bS1 из *T. thermophilus*, был выделен из штамма-суперпродуцента *E. coli* аналогично целому белку [28]. В связи с тем, что белок термостабилен, для очистки использовали стадию прогрева супернатанта при 75 °С 15 мин, в результате которой удаляется большая часть термолабильных белков *E. coli*. Далее белковую фракцию осаждали путем высаливания сульфатом аммония. Поскольку bS1(49) обладает сильными РНК-связывающими свойствами, препарат последовательно очищали вначале с помощью аффинной хроматографии на Heparin-Sepharose («GE Healthcare», Швеция), затем на гидрофобном хроматографическом носителе Butyl-Sepharose («GE Healthcare», Швеция). Конечной стадией очистки стала гель-фильтрация на носителе Superdex 75 («GE Healthcare», Швеция). Гель-фильтрацию белков осуществляли в буферном растворе, содержащем 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 200 мМ NaCl и 5 мМ β-меркаптоэтанол. Для хранения препаратов при –20 °С белковые фракции высаливали добавлением (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> до конечной концентрации 3 М.

**Подготовка препаратов белков bS1 и bS1(49) для исследований.** Для изучения агрегации белков использовали буферные растворы с низкой ионной силой – буфер 1 (25 мМ HEPES-NaOH, pH 7,5), умеренной ионной силой – буфер 2 (25 мМ HEPES-NaOH, pH 7,5; 150 мМ NaCl) и высокой ионной силой – буфер 3 (25 мМ HEPES-NaOH, pH 7,5; 2 М LiCl). Перед экспериментами сульфатный осадок белков раство-

ряли в 25 мМ HEPES-NaOH, pH 7,5 и переводили диализом в соответствующие буферные растворы при 4 °С в течение 16 ч. После диализа алиquotы раствора (по 4 мг белка) хранили при -20 °С. Перед экспериментами белковые препараты центрифугировали в течение 20 мин (4 °С) при 50 тыс. об./мин на ультрацентрифуге Beckman 100 («Beckman Coulter», Канада). Концентрацию белков определяли по методу Бредфорда [36], а также спектрофотометрическим методом с учетом коэффициента экстинкции  $\varepsilon_{278} = 0,65$  (мл  $\times$  мг<sup>-1</sup>  $\times$  см<sup>-1</sup>) [37]. Полученные образцы bS1 и bS1(49) в концентрации 20 мкМ использовались в дальнейших экспериментах.

**Спектры кругового дихроизма (КД).** Спектры белковых растворов bS1 и bS1(49) регистрировали на спектрополяриметре Chirascan («Photophysics», Англия) в кварцевой ячейке с длиной пути 0,01 см (концентрация белков 20 мкМ). Изменения во вторичной структуре bS1 и bS1(49) контролировали в дальней области УФ-спектра (190–250 нм) для каждого буфера (1, 2 и 3) при температуре 25 °С. Каждый спектр записывали трижды с разрешением 0,5 нм, усредняли, затем вычитали базовый спектр буферного раствора и применяли сглаживание методом Savitzky и Golay [38], используя программное обеспечение Chirascan («Photophysics», Англия). Полученные данные КД были проанализированы с помощью онлайн-сервера Bestsel [39].

**Кривые температурной денатурации.** Спектры флуоресценции получали с помощью четырехкуветного спектрофлуориметра Varian Cary Eclipse («Varian», США) в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 0,3  $\times$  0,3 см и объемом 100 мкл, скорость прогрева 1 °С/мин. Длина волны возбуждения составляла 280 нм, спектры испускания регистрировали в диапазоне 300–450 нм. Для белков bS1 и bS1(49) из *T. thermophilus* кривые температурной денатурации получали на основе расчета отношения интенсивностей флуоресценции триптофанов при длинах волн 320 и 380 нм ( $I_{320}/I_{380}$ ) [40].

**Динамическое рассеяние света (ДРС).** Измерения ДРС осуществляли с помощью прибора Zetasizer Nano ZS («Malvern Instruments Ltd.», Великобритания), оснащенного гелий-неоновым лазером мощностью 4 мВт и с температурным контролем кюветы ( $\pm 0,1$  °С для объема 100 мкл). Измерения светорассеяния проводили в кварцевых кюветах при длине волны 532 нм, под углом 173°. Температурную зависимость увеличения интенсивности светорассеяния определяли в диапазоне 25–90 °С с шагом 5 °С. Время уравнивания и термостатирования

составляло 2 мин для каждого шага. Средние значения температуры агрегации определяли для образцов bS1 и bS1(49) (при концентрации белков 20 мкМ) в трех буферах (1, 2 и 3) на основе трех независимых измерений.

**Электронная микроскопия.** Препараты свежевыделенного белка bS1 *T. thermophilus* и его фрагмента bS1(49) в условиях 25 мМ HEPES-NaOH, pH 7,5 и препараты после прогревания при 70 °С в течение 24 ч в условиях 25 мМ HEPES-NaOH, pH 7,5; 25 мМ HEPES-NaOH, pH 7,5; 150 мМ NaCl; 25 мМ HEPES-NaOH, pH 7,5; 2 М LiCl анализировали с помощью электронного микроскопа JEM-1200EX («JEOL», Япония). Перед анализом концентрацию препаратов доводили соответствующим буфером до 0,2 мг/мл. Образцы готовили для анализа методом негативного контрастирования. На каплю препарата (~10 мкл) помещали медную сеточку (400 Mesh, «Electron Microscopy Sciences», США), покрытую формваровой пленкой (0,2%-ный раствор формвара в хлороформе). После адсорбции (5 мин) сеточки с препаратом переносили на 1%-ный (w/v) водный раствор уранилацетата (1 мин). Излишки препарата и уранилацетата убирали с помощью фильтровальной бумаги. Анализ препаратов проводили при ускоряющем напряжении 80 кВ. Съемку осуществляли на пленку Kodak (SO-163) для электронной микроскопии при увеличении 40 тыс.

**ВЭЖХ-МС анализ продуктов протеолиза агрегатов bS1 и bS1(49).** Для анализа ВЭЖХ-МС разделения продуктов ограниченного протеолиза агрегатов bS1 и bS1(49) препараты белков делили на контрольные (25 мМ HEPES-NaOH, pH 7,5) и опытные образцы. Первые хранились при -20 °С, а ко вторым добавляли LiCl (конечная концентрация 2 М LiCl) и инкубировали при 70 °С в течение суток с целью получения агрегатов. После этого контрольные и опытные образцы отдельно инкубировали со смесью протеаз (трипсина, химотрипсина («Sigma-Aldrich», Германия) и протеиназы К («AppliChem», США)) в течение 8 ч при 37 °С со скоростью перемешивания 450 об./мин в термостатируемом миксере Thermomixer comfort («Eppendorf», Германия). Конечная концентрация белка в препаратах составила 20 мкМ, концентрация каждой протеазы 0,27 мкМ. После инкубации реакцию протеолиза останавливали добавлением концентрированной муравьиной кислоты (0,2% (v/v)). Контрольные и опытные образцы центрифугировали 20 мин при 10 000 об./мин на центрифуге Eppendorf 5418R («Eppendorf», Германия). Осадок дважды промывали 100 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (pH 7,5), затем все препараты высушивали и

растворяли в 20 мкл 0,5%-ной трифторуксусной кислоты для последующей жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии, как описано в работе Surin et al. [41].

После смыва с колонки пептиды ионизуют, затем они попадают в масс-спектрометр. В ходе масс-спектрометрического анализа определяют заряд каждого иона, отношение его массы к заряду ( $m/z$ ) и, в случае тандемной масс-спектрометрии, определяют отношение массы к заряду для его фрагментов. Данные характеристики являются уникальными для каждой последовательности пептидов. Полученные значения  $m/z$ , в свою очередь, анализировали программой PEAKS Studio 7.5 для идентификации пептидов.

Предварительный отбор идентифицированных пептидов с молекулярной массой  $>600$  Да проводили согласно критерию оценки программы PEAKS Studio 7.5 («Bioinformatics Solution Inc.», Канада), т.е. значимыми считались пептиды, имеющие значение пороговой функции  $T = -10 \lg P > 15$ , где  $P$  — это вероятность того, что ложная идентификация в текущем поиске достигнет такой же или лучшей оценки соответствия. Значение  $T$ , равное  $>15$ , соответствует  $p$ -критерию  $< 0,03$  [42].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

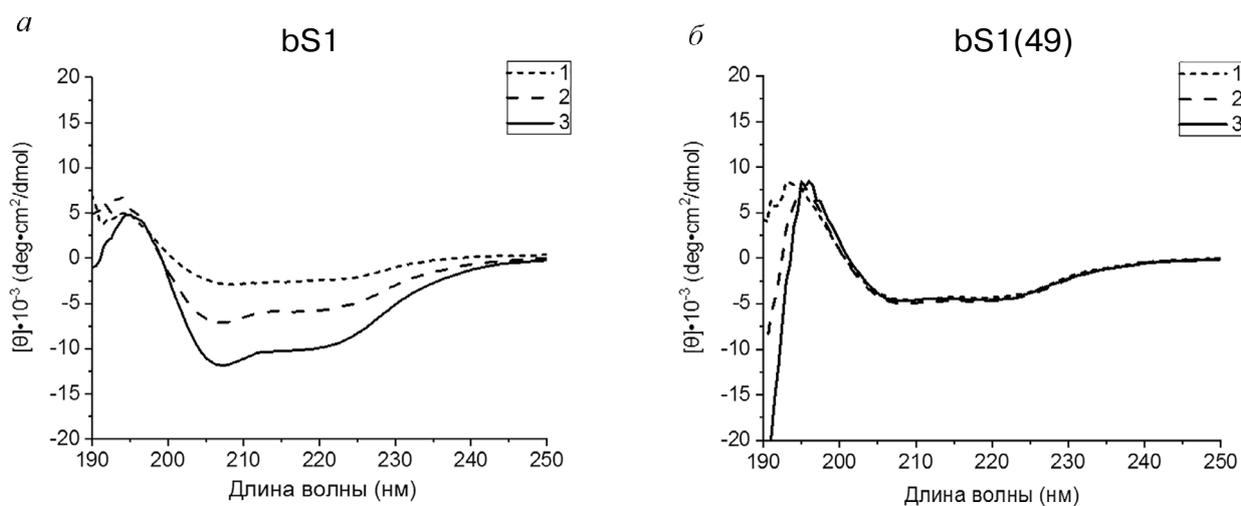
**Спектры кругового дихроизма.** Мы рассмотрели эффекты различной ионной силы буферных растворов на вторичную структуру белков bS1 и bS1(49). Конформационные изменения выявляли с помощью КД спектроскопии в даль-

ней области УФ-спектра (190–250 нм) для белков в буферных растворах 1 (25 мМ HEPES-NaOH), 2 (25 мМ HEPES-NaOH, 150 мМ NaCl) и 3 (25 мМ HEPES-NaOH, 2М LiCl). Спектры КД для препаратов целого белка bS1 и bS1(49) были получены с учетом базовых спектров буферных растворов (рис. 1).

Как видно из рис. 1, ионная сила раствора оказывала наибольший эффект на вторичную структуру bS1 белка, в то время как для bS1(49) спектры практически не изменялись. По данным программы Bestsel, с увеличением ионной силы раствора увеличивалось содержание  $\alpha$ -спиралей в структуре белка (табл. 1). Так, для препаратов bS1 этот показатель увеличивался в три раза, одновременно с уменьшением содержания  $\beta$ -поворотов и других вторичных структур. Очевидно, что существенные изменения происходили в участках, отсутствующих во фрагменте bS1(49). Таким образом, увеличение ионной силы раствора привело к более существенному изменению вторичной структуры для целого bS1 белка по сравнению с bS1(49).

**Анализ денатурационных кривых для белков bS1 и bS1(49).** Изменения в структуре белков bS1 и bS1(49) наблюдали по изменению интенсивности флуоресценции триптофанов в ультрафиолетовой области [40]. Снижение соотношения  $I_{320}/I_{380}$  указывало на то, что происходят изменения в экспонированности и локальном окружении триптофанов, связанные с формированием интермедиатов при переходе от нативного состояния белка к денатурированному (рис. 2).

Поэтому сравнение кривых денатурации для bS1 и bS1(49) позволяет сделать вывод, что су-



**Рис. 1.** Спектры КД в дальней УФ-области для препаратов bS1 и bS1(49) при различной ионной силе раствора. Обозначены данные, полученные для образцов белка в соответствующих буферных растворах с различной ионной силой: 1 – 25 мМ HEPES-NaOH; 2 – 25 мМ HEPES-NaOH, 150 мМ NaCl; 3 – 25 мМ HEPES-NaOH, 2 М LiCl

**Таблица 1.** Параметры вторичной структуры, полученные программой Bestsel из анализа данных КД (диапазон 200–250 нм), для препаратов белков bS1 и bS1(49)

Элементы вторичной структуры	bS1, 25 мМ HEPES-NaOH	bS1, 25 мМ HEPES-NaOH, 150 мМ NaCl	bS1, 25 мМ HEPES-NaOH, 2 М LiCl	bS1(49), 25 мМ HEPES-NaOH	bS1(49), 25 мМ HEPES-NaOH, 150 мМ NaCl	bS1(49), 25 мМ HEPES NaOH, 2 М LiCl
α-Спирали	16%	42%	52%	31%	36%	41%
β-Структура	18%	11%	21%	18%	8%	0%
β-Поворот	20%	8%	0%	11%	11%	11%
Другие	46%	39%	27%	40%	45%	48%

шественные конформационные изменения белков, вызванные повышением температуры, происходили с ростом температуры выше 80 °С. Значимых различий между bS1 и bS1(49) не было выявлено в температурных зависимостях изменения  $I_{320}/I_{380}$ . В то же время следует отметить, что кривая изменения  $I_{320}/I_{380}$  в буфере 3 расположена ниже соответствующих кривых для буферных условий с низкой и средней ионной силой (буферы 1 и 2), что указывает на сдвиг спектров флуоресценции триптофанов в длинноволновую область и большую доступность этих а.о. для растворителя.

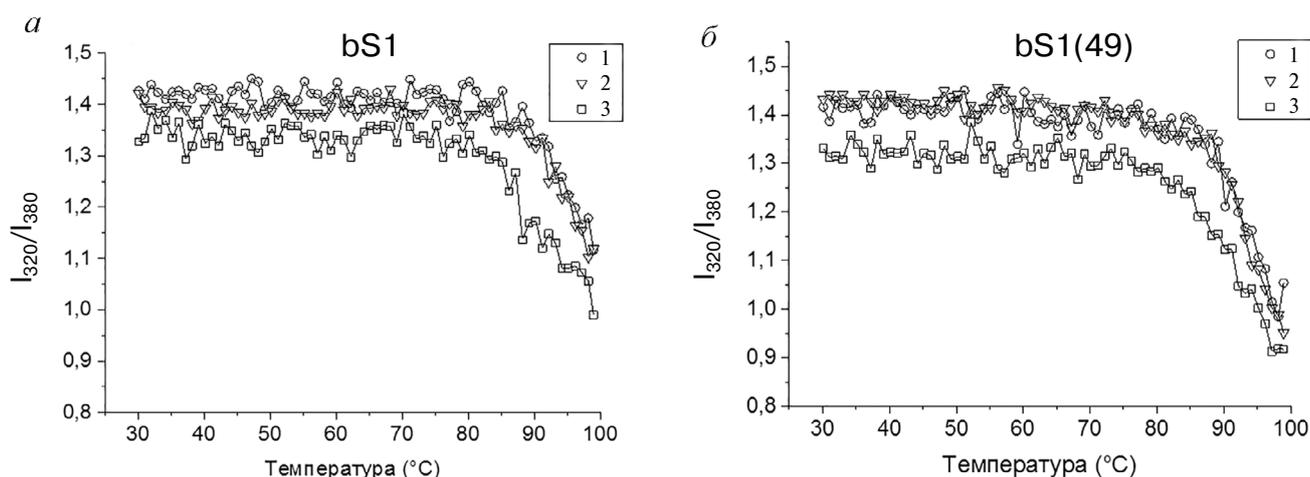
**Температурная зависимость накопления агрегатов.** Мы исследовали температурную зависимость интенсивности светорассеяния агрегатов белков bS1 и bS1(49) соответственно для трех различных буферных условий (рис. 3).

С увеличением температуры инкубации росло количество регистрируемых фотонов, рассеянных от частиц, что указывало на увеличение количества и размеров агрегатов. В на-

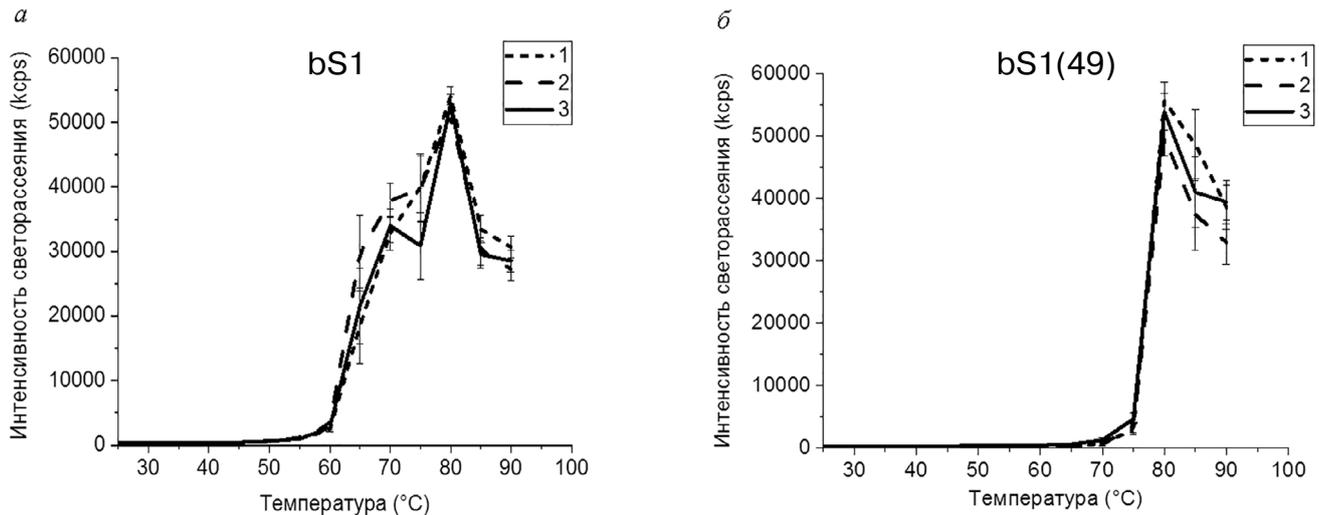
ших экспериментах не было выявлено существенных эффектов ионной силы раствора, с учетом погрешности измерений, для образцов одного и того же белка. С ростом температуры выше 80 °С интенсивность светорассеяния падала, часть агрегатов оседала на дно кюветы, а новые уже не формировались. В то же время температурная зависимость агрегации для препаратов bS1 и bS1(49) несколько различалась. Последний был более устойчив к формированию агрегатов с повышением температуры. Так, если значительный рост интенсивности светорассеяния для препаратов bS1 отмечали при 60 °С, то для bS1(49) аналогичное увеличение агрегации происходило при температуре 75 °С.

**Электронно-микроскопические изображения агрегатов.** ЭМ является прямым методом визуализации морфологии агрегатов (табл. 2).

По данным ЭМ видно, что изменение ионных условий от низкой (буфер 1), средней (буфер 2) до высокой ионной силы (буфер 3) при



**Рис. 2.** Температурная зависимость изменения  $I_{320}/I_{380}$ , соответствующая конформационным изменениям в структуре белков bS1 (a) и bS1(49) (б), в буферных растворах с различной ионной силой: 1 – 25 мМ HEPES-NaOH; 2 – 25 мМ HEPES-NaOH, 150 мМ NaCl; 3 – 25 мМ HEPES-NaOH, 2 М LiCl



**Рис. 3.** Графики температурной зависимости интенсивности светорассеяния агрегатов для препаратов bS1 (а) и bS1(49) (б) в буферных растворах с различной ионной силой: 1 – 25 мМ HEPES-NaOH; 2 – 25 мМ HEPES-NaOH, 150 мМ NaCl; 3 – 25 мМ HEPES-NaOH, 2 М LiCl

прогревании при 70 °С в течение 24 ч как для белка bS1 *T. thermophilus*, так и для bS1(49) не приводило к видимым изменениям морфологии препаратов. Во всех случаях на изображениях были видны большие агрегаты разного размера. Однако следует отметить, что компоненты агрегатов белка bS1 имели большие размеры по сравнению с его 49 кДа фрагментом. В исследуемых условиях оба препарата не формировали фибриллы.

**Результаты ВЭЖХ-МС-анализа участков, склонных к агрегации в белке bS1 и его стабильном фрагменте bS1(49).** С помощью ВЭЖХ проводится предварительное разделение пептидов, полученных после гидролиза различных образцов белков. Всего было идентифицировано 883 пептида в продуктах гидролиза агрегатов bS1 и 513 пептидов для контрольного образца bS1. В то же время в продуктах гидролиза агрегатов bS1(49) было выявлено 572 пептида и 482 пептида для контрольного образца bS1(49).

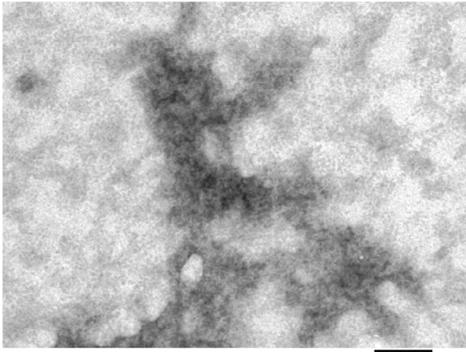
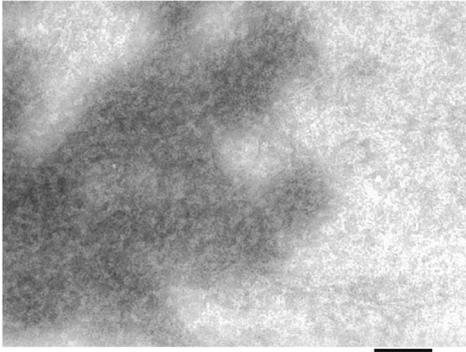
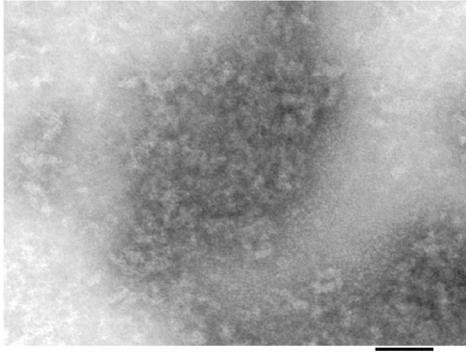
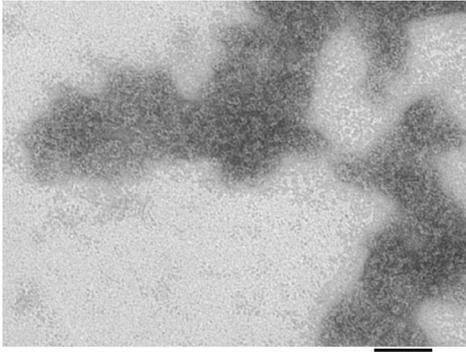
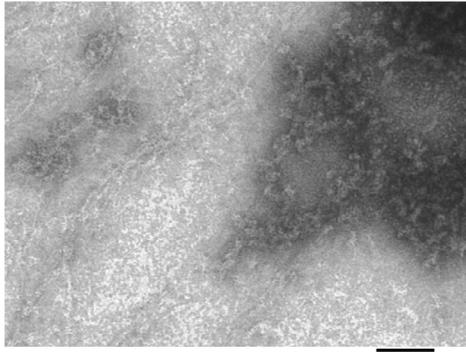
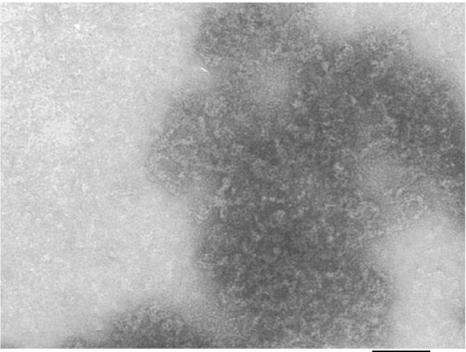
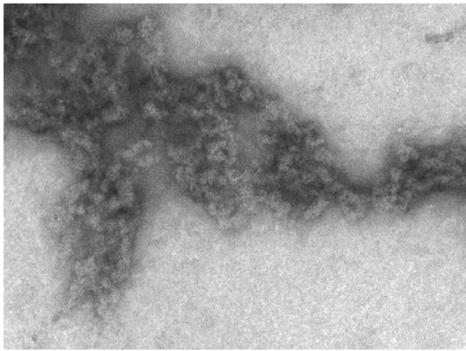
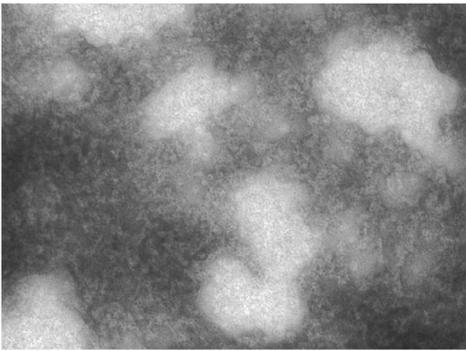
На рис. 4 представлены результаты распределения пептидов по их массам и относительным интенсивностям, соответствующие белкам bS1 и bS1(49) в различных условиях. Прежде всего, следует подчеркнуть, что укороченный белок bS1(49) был менее склонен формировать агрегаты в опыте по 24-часовой инкубации при 70 °С с 2М LiCl по сравнению с целым белком bS1, о чем свидетельствует относительно низкая интенсивность пиков, соответствующая пептидам в гидролизатах агрегатов bS1(49) (рис. 4, з). Кроме того, на рис. 4, б и г показано, что в продуктах протеолиза агрегатов по срав-

нению с результатами для протеолиза контрольных образцов белков (рис. 4, а и в) было идентифицировано больше фрагментов с молекулярной массой 3000–7500 Да. Такие более протяженные фрагменты в белковых агрегатах соответствуют участкам молекул, защищенным от действия протеаз, а значит содержащим аминокислотные последовательности, склонные к агрегации.

В дальнейшем мы ранжировали значимые пептиды, выявленные в гидролизатах контролей и опытных образцов белков bS1 и bS1(49), по длине и нанесли самые длинные из них на последовательность белка bS1, чтобы определить места, наиболее защищенные от воздействия протеаз в контрольных препаратах и агрегатах (рис. 5).

На рис. 5, б можно видеть, что фрагменты, выявленные в агрегатах опытных образцов, в целом длиннее, чем в контрольных образцах. В то же время есть общие последовательности в контрольных и опытных образцах (агрегатах), а именно последовательности а.о.: 30–60, 66–92, 133–153, 158–188, 198–246, 264–287, 328–356, 365–412, 417–465, 503–533, которые не прерываются местами протеолитического расщепления, что может указывать на их относительную защищенность от протеолиза как в агрегатах, так и в контроле. С другой стороны, в контрольном образце bS1 не удалось идентифицировать в продуктах протеолиза протяженную целую последовательность а.о. 466–502 на С-конце белка, так как она подвергается полному расщеплению, но большая ее часть (476–502 а.о.) сохраняется во фрагменте 476–533 а.о., выявленной в

**Таблица 2.** Электронно-микроскопический анализ препаратов белка bS1 *T. thermophilus* и его 49 кДа фрагмента в различных ионных условиях

Препарат	bS1	bS1(49)
25 мМ HEPES- NaOH, pH 7,5 (без прогрева)		
Результаты ЭМ-анализа образцов после прогрева (70 °С, 24 ч)		
25 мМ HEPES- NaOH, pH 7,5		
25 мМ HEPES- NaOH, pH 7,5; 150 мМ NaCl		
25 мМ HEPES- NaOH, pH 7,5; 2 М LiCl		

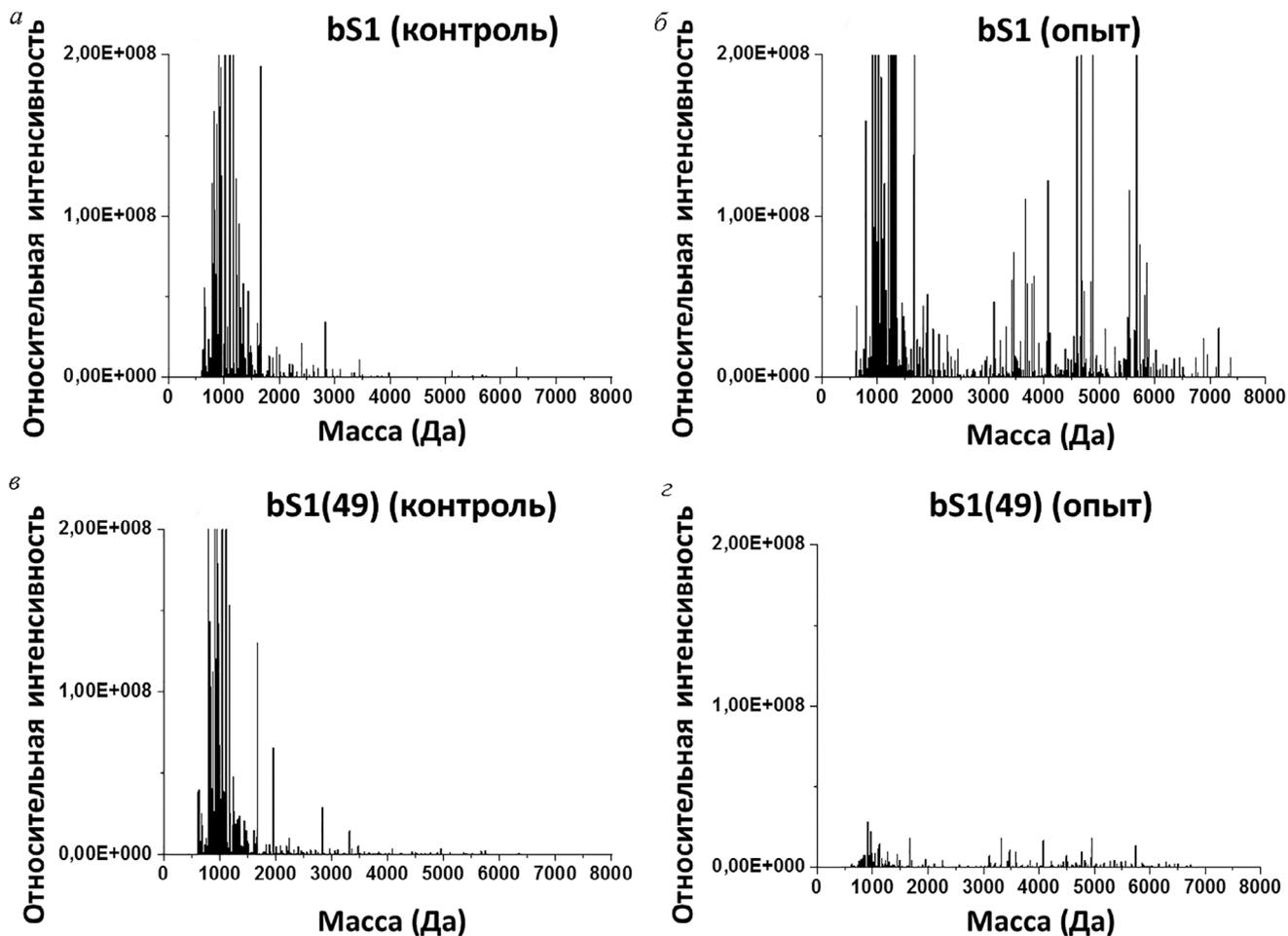


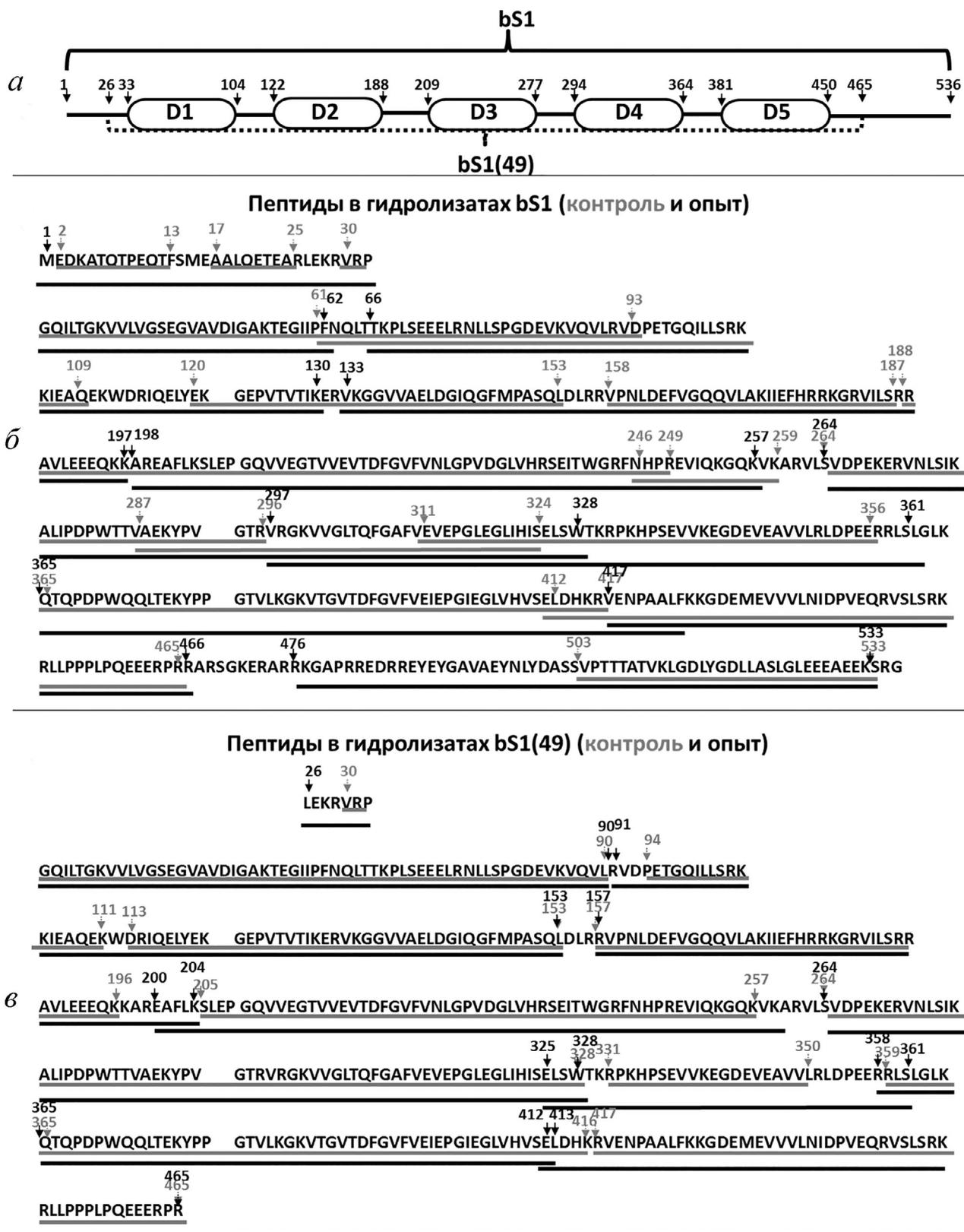
Рис. 4. Сравнение результатов распределения пептидов по массам и относительным интенсивностям для белков bS1 (а) и bS1(49) (в), а также белковых агрегатов, полученных после инкубации в буферном растворе с 2 М LiCl bS1 (б) и bS1(49) (г)

гидролизатах агрегатов. Такие последовательности а.о. (1–29, 94–119, 298–327, 476–502), которые расщепляются в контрольных образцах, но остаются целыми в продуктах гидролиза агрегатов, могут играть ключевую роль в агрегации белка bS1 в опыте при высокой концентрации соли.

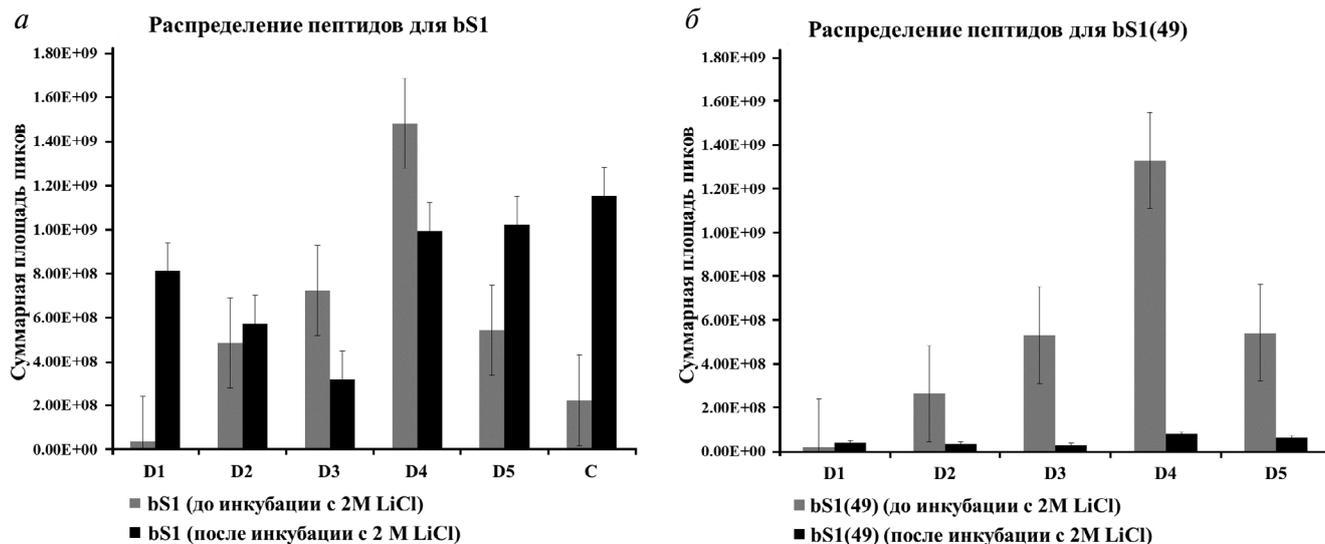
На рис. 5, в показано, что как в контроле, так и в агрегатах белка bS1(49) в продуктах протеолиза сохраняются длинные фрагменты, которые имеют сходные сайты расщепления (небольшие вариации в длине гидролизатов обусловлены особенностями работы протеаз) [43]. Отсутствие существенных различий с контрольным образцом указывает на то, что в отличие от целого белка bS1 увеличение ионной силы раствора вплоть до 2М LiCl существенно не влияет на способность к агрегации усеченного фрагмента белка bS1(49). Эти результаты согласуются с данными КД, полученными при изучении влияния различной ионной силы буферных раство-

ров на вторичную структуру белков bS1 и bS1(49). В ходе этого исследования было показано, что в отличие от bS1 изменение ионной силы буферного раствора не приводит к видимым изменениям во вторичной структуре bS1(49). Этим объясняется и низкая склонность к агрегации bS1(49) при изменениях ионной силы раствора.

Сравнение выявленных сайтов протеолиза (рис. 5, б, в) с распределением доменов в белках (рис. 5, а) указывает на то, что большинство сайтов протеолиза приходится на гибкие участки на концах или вне доменов. Чтобы выявить возможную роль S1-доменов в процессах агрегации, мы сравнили распределение всех идентифицированных пептидов, которые выявлены во внутренних последовательностях доменов (Д1: 33–104, Д2: 122–188, Д3: 209–277, Д4: 294–364, Д5: 381–450), для самих доменов и для аналогичного по длине неупорядоченного участка белка bS1 (С: 449–518) (рис. 6, а).



**Рис. 5.** Схематическое представление доменной организации белков bS1 и bS1(49) из *T. thermophilus* (a) и результаты пептидного картирования после ВЭЖХ-МС анализа контрольных белков и агрегатов bS1 (б) и bS1(49) (в). Серым и черным цветом подчеркнуты пептиды, выявленные в контрольных и опытных образцах соответственно. Последовательность а.о. белка bS1 получена из базы данных Uniprot (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q83YV9>)



**Рис. 6.** Гистограммы распределения пептидов по белковым фрагментам, соответствующим доменам (D1: 33–104 а.о., D2: 122–188 а.о., D3: 209–277 а.о., D4: 294–364 а.о., D5: 381–450 а.о.), и внутри неструктурированного участка (C: 449–518 а.о.) для белков bS1 (1–536 а.о.) (а) и bS1(49) (26–465 а.о.) (б) до и после инкубации в буферном растворе с 2 М LiCl. Показаны планки погрешностей со стандартными ошибками

Из рис. 6, а следует, что в продуктах гидролиза агрегатов, полученных в опыте с 24-часовой инкубацией при 70 °С в условиях с 2М LiCl, существенно возросла относительная доля пептидов, входящих в 1-й домен и участок 449–518 а.о. Такое поведение свидетельствует о высокой степени защищенности данных пептидов от воздействия протеаз. Увеличение защищенности данных участков белка bS1 от воздействия протеаз в случае длительной инкубации при высокой концентрации соли можно объяснить тем, что эти участки белка (1-й домен и участок 449–518 а.о.) вовлечены в межмолекулярные взаимодействия в процессе агрегации. Кроме того, наблюдается сходство распределения пептидов между образцами bS1 и bS1(49) как внутри контрольной группы (рис. 6, а), так и между образцами экспериментальной группы (рис. 6, б).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее было показано, что белок bS1 (60 кДа) из *T. thermophilus* обладает высокой склонностью формировать ассоциаты в растворах с низкой и умеренной ионной силой [31]. Способность белка bS1 к ассоциации обусловлена особенностями структуры белка и выполняемыми функциями, в частности формированием гомодимеров и связыванием с рибосомными белками в 30S рибосомной субчастице. В опытах *in vitro* целый bS1 белок из *T. thermophilus*

показывает низкую стабильность, при длительном хранении происходит частичная деградация белка, в связи с этим был выделен стабильный фрагмент белка bS1(49) [30]. В настоящей работе было проведено сравнение агрегационных свойств белков bS1 и bS1(49) из *T. thermophilus* в растворах с различной ионной силой – низкой (25 мМ HEPES-NaOH, pH 7,5), умеренной (в присутствии 150 мМ NaCl) и высокой (в присутствии 2 М LiCl). Следует отметить, что особый интерес представляло изучение свойств белков в условиях раствора с высокой ионной силой, так как такие исследования для целого белка bS1 не проводили. Кроме того, было необходимо проверить (возможные) стимулирующие фибрилогенез эффекты присутствия 2 М LiCl, как это было сделано для белка YB-1 [33]. Как подчеркивалось выше, белки bS1 и bS1(49) мультидоменные, каждый состоит из пяти S1-доменов, которые являются структурными аналогами домена холодового шока YB-1. Поэтому мы предположили, что сходство во вторичной структуре ДХШ и S1-домена может иметь отражение в аналогичных механизмах формирования фибрилл белками YB-1 и bS1, в частности вызываться присутствием в растворе 2 М LiCl.

В настоящем исследовании было показано, что целый белок bS1 (1–536 а.о.) из *T. thermophilus* более склонен к агрегации по сравнению с его фрагментом bS1(49) (26–465 а.о.). Методом ДРС показано, что температура начала процесса агрегации для белков bS1 и bS1(49) –

60 °С и 75 °С соответственно. При этом денатурация белков, оцененная по флуоресценции триптофанов W111, W242, W284, W328 и W371 (находящихся в центральной части белка), начинается при температуре выше 80 °С, т.е. процесс агрегации начинается раньше, чем процесс денатурации доменов основной части белков.

Сравнительный анализ данных ВЭЖХ-МС продуктов ограниченного протеолиза агрегатов целого белка bS1 показал, что участки 1–25 и 466–502, отсутствующие в белке bS1(49), играют важную роль в агрегации целого белка bS1.

По данным ЭМ агрегаты обоих белков сходны по морфологии. Увеличение ионной силы раствора вплоть до 2М LiCl не приводит к заметному формированию фибрилл, которые могут формировать, например, инсулин [44] или белок YB-1 [33] для обоих белков (bS1 и bS1(49)), как это предполагалось в начале исследования.

*T. thermophilus*, как и *E. coli*, является модельным объектом для изучения структуры бактериальной рибосомы в целом и отдельных образующих ее белков [45, 46]. В связи с тем, что трехмерная структура bS1 *T. thermophilus* до сих пор не определена, актуальной задачей является кристаллизация белка (или его стабильного

фрагмента). Выяснение условий и механизмов агрегации рибосомного белка bS1 из *T. thermophilus*, в свою очередь, значимо для решения этой задачи. Кроме того, результаты ВЭЖХ-МС анализа продуктов протеолиза могут быть использованы для выявления последовательностей белка bS1 из *T. thermophilus*, важных для белковой мультимеризации, а также для выяснения роли отдельных доменов N- и C-конца молекулы во взаимодействии с другими белками рибосомы и мРНК [30].

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (проект № 18-14-00321) и при участии Центра коллективного пользования «Структурно-функциональные исследования белков и РНК» ИБ РАН (584307). ЭМ исследования были проведены на базе оборудования ЦКП (№ 670266).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chiti, F., and Dobson, C.M. (2006) Protein misfolding, functional amyloid, and human disease, *Annu. Rev. Biochem.*, **75**, 333–366.
- Dovidchenko, N.V., and Galzitskaya, O.V. (2015) Computational approaches to identification of aggregation sites and the mechanism of amyloid growth, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **855**, 213–239.
- Galzitskaya, O. (2019) New mechanism of amyloid fibril formation, *Curr. Protein Pept. Sci.*, **20**, 630–640.
- Solovyov, K.V., Gasteva, A.A., Egorov, V.V., Aleinikova, T.D., Sirotkin, A.K., Shvartsman, A.L., and Shavlovsky, M.M. (2006) Role of the C-terminal fragment of human transthyretin in abnormal fibrillogenesis, *Biochemistry (Moscow)*, **71**, 543–549.
- Pilla, S.P., Thomas, A., and Bahadur, R.P. (2019) Dissecting macromolecular recognition sites in ribosome: implication to its self-assembly, *RNA Biol.*, **16**, 1300–1312.
- Pechmann, S., Willmund, F., and Frydman, J. (2013) The ribosome as a hub for protein quality control, *Mol. Cell*, **49**, 411–421.
- Chaillou, T. (1985) Ribosome specialization and its potential role in the control of protein translation and skeletal muscle size, *J. Appl. Physiol.*, **127**, 599–607.
- Schieber, G.L., and O'Brien, T.W. (1982) Extraction of proteins from the large subunit of bovine mitochondrial ribosomes under nondenaturing conditions, *J. Biol. Chem.*, **257**, 8781–8787.
- Wittmann, H.G., Stöfflet, G., Hindennach, I., Kurland, C.G., Birge, E.A., Randall-Hazelbauer, L., Nomura, M., Kaltschmidt, E., Mizushima, S., Traut, R.R., and Bickle, T.A. (1971) Correlation of 30S ribosomal proteins of *Escherichia coli* isolated in different laboratories, *Mol. Gen. Genet.*, **111**, 327–330.
- Ban, N., Beckmann, R., Cate, J.H., Dinman, J.D., Dragon, F., Ellis, S.R., Lafontaine, D.L., Lindahl, L., Liljas, A., Lipton, J.M., McAlear, M.A., Moore, P.B., Noller, H.F., Ortega, J., Panse, V.G., Ramakrishnan, V., Spahn, C.M., Steitz, T.A., Tchorzewski, M., Tollervey, D., Warren, A.J., Williamson, J.R., Wilson, D., Yonath, A., and Yusupov, M. (2014) A new system for naming ribosomal proteins, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **24**, 165–169.
- Giri, L., and Subramanian, A.R. (1977) Hydrodynamic properties of protein S1 from *Escherichia coli* ribosome, *FEBS Lett.*, **81**, 199–203.
- Laughrea, M., and Moore, P.B. (1977) Physical properties of ribosomal protein S1 and its interaction with the 30 S ribosomal subunit of *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.*, **112**, 399–421.
- Tedin, K., Resch, A., and Bläsi, U. (1997) Requirements for ribosomal protein S1 for translation initiation of mRNAs with and without a 5' leader sequence, *Mol. Microbiol.*, **25**, 189–199.
- Wower, I.K. (2000) Binding and cross-linking of tmRNA to ribosomal protein S1, on and off the *Escherichia coli* ribosome, *EMBO J.*, **19**, 6612–6621.
- Deryusheva, E.I., Machulin, A.V., Selivanova, O.M., and Galzitskaya, O.V. (2017) Taxonomic distribution, repeats, and functions of the S1 domain-containing proteins as members of the OB-fold family, *Proteins*, **85**, 602–613.
- Bycroft, M., Hubbard, T.J.P., Proctor, M., Freund, S.M.V., and Murzin, A.G. (1997) The solution structure of the S1

- RNA binding domain: a member of an ancient nucleic acid-binding fold, *Cell*, **88**, 235–242.
17. Mihailovich, M., Militti, C., Gabaldón, T., and Gebauer, F. (2010) Eukaryotic cold shock domain proteins: highly versatile regulators of gene expression, *BioEssays*, **32**, 109–118.
  18. Machulin, A.V., Deryusheva, E.I., Selivanova, O.M., and Galzitskaya, O.V. (2019) The number of domains in the ribosomal protein S1 as a hallmark of the phylogenetic grouping of bacteria, *PLoS One*, **14**, e0221370.
  19. Дерюшева Е.И., Мачулин А.В., Селиванова О.М., Сердюк И.Н. (2010) Семейство рибосомных белков S1 содержит уникальный консервативный домен, *Молекулярная биология*, **44**, 728–734.
  20. Machulin, A., Deryusheva, E., Lobanov, M., and Galzitskaya, O. (2019) Repeats in S1 proteins: flexibility and tendency for intrinsic disorder, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 2377.
  21. Subramanian, A.R. (1983) Structure and functions of ribosomal protein S1, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **28**, 101–142.
  22. Sengupta, J., Agrawal, R.K., and Frank, J. (2001) Visualization of protein S1 within the 30S ribosomal subunit and its interaction with messenger RNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 11991–11996.
  23. Boni, I.V., Artamonova, V.S., and Dreyfus, M. (2000) The last RNA-binding repeat of the *Escherichia coli* ribosomal protein S1 is specifically involved in autogenous control, *J. Bacteriol.*, **182**, 5872–5879.
  24. Salah, P., Bisaglia, M., Aliprandi, P., Uzan, M., Sizun, C., and Bontems, F. (2009) Probing the relationship between gram-negative and gram-positive S1 proteins by sequence analysis, *Nucleic Acids Res.*, **37**, 5578–5588.
  25. Loveland, A.B., and Korostelev, A.A. (2018) Structural dynamics of protein S1 on the 70S ribosome visualized by ensemble cryo-EM, *Methods*, **137**, 55–66.
  26. Cava, F., Hidalgo, A., and Berenguer, J. (2009) *Thermus thermophilus* as biological model, *Extremophiles*, **13**, 213–231.
  27. Sedelnikova, S.E., Agalarov, S.C., Garber, M.B., and Yusupov, M.M. (1987) Proteins of the *Thermus thermophilus* ribosome purification of several individual proteins and crystallization of protein TL7, *FEBS Lett.*, **220**, 227–230.
  28. Shiryayev, V.M., Selivanova, O.M., Hartsch, T., Nazimov, I.V., and Spirin, A.S. (2002) Ribosomal protein S1 from *Thermus thermophilus*: its detection, identification and overproduction I, *FEBS Lett.*, **525**, 88–92.
  29. Selivanova, O.M., Shiryayev, V.M., Tiktopulo, E.I., Potekhin, S.A., and Spirin, A.S. (2003) Compact globular structure of *Thermus thermophilus* ribosomal protein S1 in solution, *J. Biol. Chem.*, **278**, 36311–36314.
  30. Selivanova, O.M., Fedorova, Y.Y., and Serdyuk, I.N. (2007) Proteolysis of ribosomal protein S1 from *Escherichia coli* and *Thermus thermophilus* leads to formation of two different fragment, *Biochemistry (Moscow)*, **72**, 1225–1232.
  31. Тимченко А.А., Ширияев В.М., Федорова Ю.Ю., Кихара Х., Кимура К., Виллумаит Р., Гарамус В.М., Селиванова О.М. (2007) Конформация рибосомного белка S1 из *Thermus thermophilus* в растворе при разных ионных условиях, *Биофизика*, **52**, 216–222.
  32. Theobald, D.L., Mitton-Fry, R.M., and Wuttke, D.S. (2003) Nucleic acid recognition by OB-fold proteins, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **32**, 115–133.
  33. Selivanova, O.M., Guryanov, S.G., Enin, G.A., Skabkin, M.A., Ovchinnikov, L.P., and Serdyuk, I.N. (2010) YB-1 is capable of forming extended nanofibrils, *Biochemistry (Moscow)*, **75**, 115–120.
  34. Guryanov, S.G., Selivanova, O.M., Nikulin, A.D., Enin, G.A., Melnik, B.S., Kretov, D.A., Serdyuk, I.N., and Ovchinnikov, L.P. (2012) Formation of amyloid-like fibrils by Y-box binding protein 1 (YB-1) is mediated by its cold shock domain and modulated by disordered terminal domains, *PLoS One*, **7**, e36969.
  35. William Studier, F., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., and Dubendorff, J.W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes, *Methods Enzymol.*, **185**, 60–89.
  36. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254.
  37. Gill, S.C., and von Hippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data, *Anal. Biochem.*, **182**, 319–326.
  38. Savitzky, A., and Golay, M.J.E. (1964) Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures, *Anal. Biochem.*, **36**, 1627–1639.
  39. Micsonai, A., Wien, F., Bulyáki, É., Kun, J., Moussong, É., Lee, Y.-H., Goto, Y., Réfrégiers, M., and Kardos, J. (2018) BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 315–322.
  40. Balobanov, V.A., Katina, N.S., Finkelstein, A.V., and Vyckova, V.E. (2017) Intermediate states of apomyoglobin: are they parts of the same area of conformations diagram? *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 625–631.
  41. Surin, A.K., Grishin, S.Y., and Galzitskaya, O.V. (2019) Identification of amyloidogenic regions in the spine of insulin fibrils, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 47–55.
  42. Zhang, J., Xin, L., Shan, B., Chen, W., Xie, M., Yuen, D., Zhang, W., Zhang, Z., Lajoie, G.A., and Ma, B. (2012) PEAKS DB: *de novo* sequencing assisted database search for sensitive and accurate peptide identification, *Mol. Cell. Proteomics*, **11**, M111.010587.
  43. Катина Н.С., Суворина М.Ю., Григорашвили Е.И., Марченков В.В., Рябова Н.А., Никулин А.Д., Сурин А.К. (2016) Определение участков апомиоглобина, образующих межмолекулярные взаимодействия в амилоидных агрегатах методом масс-спектрометрии высокого разрешения, *Масс-спектрометрия*, **13**, 225–234.
  44. Селиванова О.М., Гришин С.Ю., Глякина А.В., Садгян А.С., Ушакова Н.И., Галзитская О.В. (2018) Анализ аналогов инсулина и стратегия их дальнейшей разработки, *Успехи биологической химии*, **58**, 313–346.
  45. Yusupov, M.M., Garber, M.B., Vasiliev, V.D., and Spirin, A.S. (1991) *Thermus thermophilus* ribosomes for crystallographic studies, *Biochimie*, **73**, 887–897.
  46. Tung, C.S., and Sanbonmatsu, K.Y. (2004). Atomic model of the *Thermus thermophilus* 70S ribosome developed *in silico*, *Biophys. J.*, **87**, 2714–2722.

## COMPARATIVE ANALYSIS OF THE AGGREGATION OF THE bS1 RIBOSOMAL PROTEIN AND ITS STABLE FRAGMENT FROM *Thermus thermophilus*

S. Yu. Grishin<sup>1</sup>, U. F. Dzhus<sup>1</sup>, O. M. Selivanova<sup>1</sup>,  
V. A. Balobanov<sup>1</sup>, A. K. Surin<sup>1,2,3</sup>, and O. V. Galzitskaya<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences,  
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; E-mail: ogalzit@vega.protres.ru

<sup>2</sup> State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology,  
142279 Obolensk, Moscow Region, Russia; E-mail: alan@vega.protres.ru

<sup>3</sup> The Branch of the Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia

<sup>4</sup> Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,  
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia

Received October 21, 2019

Revised December 24, 2019

Accepted January 11, 2020

The multidomain bacterial protein bS1 is the largest and functionally important ribosome protein of subunit 30S that interacts with both mRNA and proteins. It is known that bS1 protein has a high tendency to form associates, but this process has not been studied in detail. We isolated and purified *Thermus thermophilus* recombinant bS1 ribosomal protein and its stable truncated bS1(49) fragment using superproducing *Escherichia coli* strains. Using fluorescence spectroscopy, dynamic light scattering, and high-performance liquid chromatography combined with mass-spectrometry analysis of the limited proteolysis products, it has been shown that unstructured regions at the N- and C-ends of the bS1 protein can play a key role in its aggregation. At that, the truncated bS1(49) fragment is less prone to form aggregates compared to the whole *T. thermophilus* protein. The revealed features can be used to obtain protein crystals and elucidate the structure of a stable fragment of the bS1 protein.

**Keywords:** protein aggregation, ribosomal protein, bS1, domain, *Thermus thermophilus*, ionic strength of a solution, mass-spectrometry