

ДИФРАКЦИЯ И РАССЕЯНИЕ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ

УДК 548.55

ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И АНАЛИЗ МЕТОДОМ МАЛОУГОЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ ГТФАЗЫ YsxC ИЗ ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА

© 2023 г. А. Д. Биктимиров¹, Д. Р. Исламов¹, Ш. З. Валидов¹, Г. С. Петерс², А. В. Халиуллина¹,
М. М. Юсупов³, К. С. Усачев^{1,*}

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

²Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

³Институт генетики, молекулярной и клеточной биологии, Илькирш-Граффенштаден, Франция

* E-mail: k.usachev@kpfu.ru

Поступила в редакцию 20.10.2022 г.

После доработки 31.10.2022 г.

Принята к публикации 31.10.2022 г.

Изучение структур различных биологических макромолекул является одним из основных направлений, которое активно развивается при помощи различных физических методов. Поскольку белки являются элементарной единицей структурной и функциональной организации клетки, одной из стратегий борьбы с патогенными микроорганизмами является изучение белоксинтезирующего аппарата бактерии и сопряженных с ним систем. Представлены выделение, очистка и анализ структуры методом малоуглового рентгеновского рассеяния белка YsxC из патогенной бактерии золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*). Данный белок вовлечен в процессы роста и деления клеток, является энергозависимым фактором и участвует в сборке большой субъединицы рибосомы. Структурные исследования данного белка открывают возможность для поиска малых молекул, способных ингибировать его функцию. Поскольку варибельность в строении белковых факторов выше, чем у консервативных сайтов рибосомы, их ингибирование дает возможность селективно воздействовать на патогенный микроорганизм.

DOI: 10.31857/S0023476123020042, EDN: ВРҮРСД

ВВЕДЕНИЕ

Золотистый стафилококк является грамположительной шаровидной бактерией, вызывающей широкий спектр инфекционных заболеваний [1–3]. Бесконтрольное применение антибиотиков, вследствие влияния естественного отбора, привело к появлению новых штаммов со множественной устойчивостью к стрессовым условиям (перепады температуры, снижение оксигенации, давление антибиотиков и др.). В результате антибиотикорезистентность становится одним из серьезнейших вызовов, стоящих перед системой здравоохранения [4].

Механизм действия большинства существующих антибактериальных препаратов заключается в остановке синтеза белка в клетке, в частности работы бактериальной рибосомы [5, 6] – специальной каталитической биологической молекулярной машины, состоящей из порядка 50 рибосомных белков и 3 молекул РНК. При воздействии стрессовых условий перевод рибосом в инактивированное состояние позволяет клетке снижать общий уровень трансляции, а также со-

хранять рибосомы от воздействия антибиотиков. Поскольку синтез рибосом является высокоэнергетическим процессом, сохранение рибосом при стрессе позволяет существенно сэкономить энергию клетке и быстро восстановить синтез белка после снятия стрессовых условий [7]. Сборка рибосомных субъединиц в клетке – это высокоточный процесс, который регулируется специализированными факторами созревания. Одним из таких представителей является гуанозинтрифосфат (ГТФ) связывающий белок YsxC, выполняющий структурную и организационную функции на поздних этапах сборки большой субъединицы рибосомы [8]. Исследуемый в настоящей работе белок YsxC из *S. aureus* состоит из 196 аминокислотных остатков с суммарной массой 22.6 кДа. Анализ аминокислотной последовательности данного белка показал наличие мотива Уокера A Gx(4)-GK-[TS], который является центром связывания энергетических молекул (ГТФ, аденозинтрифосфата) [9], а также наличие сайта связывания ионов магния (Mg²⁺).

Согласно [10] для микроорганизма *Bacillus subtilis* потеря гена белка YsxC приводит к отсутствию шести рибосомных белков в составе большой субъединицы рибосомы. Такая функциональная особенность указывает на значимость данного белка в процессе биосинтеза и обуславливает актуальность структурных исследований фактора YsxC с целью определения механизмов связывания с рибосомой и поиска мишеней в его структуре для разработки новых ингибиторов. Анализ существующих в базе данных PDB пространственных структур белка YsxC патогенной бактерии *S. aureus* показал, что его структура неизвестна, а гомология по последовательности с ближайшим аналогом из *B. subtilis* (код pdb 1SUL) составляет менее 55%.

С целью получения данных о размерах, форме и ориентации доменов белковой молекулы, поиска оптимальных условий для растворимости и кристаллизации белков применяли метод малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР). Данная работа посвящена поиску условий выделения и очистки, а также анализу формы молекул в растворе методом МУРР белка YsxC из *S. aureus*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Создание конструкции и экспрессия. В рамках работы провели клонирование гена целевого белка ysxC из *S. aureus* в векторную систему pet28a с добавлением шести аминокислот гистидина (гистаг) на N-конце под контролем лактозного оператора LacI^q. Правильность нуклеотидной последовательности полученного конструкта была подтверждена методом секвенирования.

Созданную плазмиду трансформировали в клетки *E. coli* BL21(DE3)PlysS. Клеточную культуру выращивали в жидкой питательной среде LB с добавлением антибиотиков, соответствующих маркеру селекции (Km, Cm), в термошейкере при 180 об./мин с температурой 310 К до оптической плотности OD₆₀₀ = 0.8. Индукцию экспрессии проводили с помощью добавления 0.1 мМ индуктора изопропил-β-D-тиогаляктопиранозид (IPTG) и дальнейшей инкубации культуры при тех же настройках шейкера. Клеточную биомассу отделяли от жидкой среды методом центрифугирования на центрифуге BECKMAN Avanti J-25 (Beckman Coulter, США) 5000 об./мин при 277 К. Полученный осадок хранили в морозильном шкафу при температуре 253 К.

Очистка целевого белка. Осажденные клетки далее размораживали на льду и ресуспендировали в буфере А (50 мМ натрий-фосфатный буфер, рН 6.0, 250 мМ NaCl) с добавлением ингибитора протеаз (PIC) (Roche, Швейцария). После получения гомогенного раствора разрушали клеточную стенку с помощью ультразвуковой установки

HD2070 (Bandelin, Германия) (мощность 50%, цикл 5 раз по 50 с) при температуре 277 К. Полученный субстрат отделяли от разрушенной массы с помощью центрифугирования на центрифуге Avanti JXN-26 (Beckman Coulter, США) при 25000 об./мин в течение 30 мин и температуре 277 К. Далее супернатант повторно осаждали центрифугированием в ультрацентрифуге XPN-80 (Beckman Coulter, США) при 45000 об./мин в течение 45 мин при температуре 277 К. При таком сочетании ультрацентрифугирования все тяжелые клеточные субстраты оседают на дне в виде дегриза, а белок остается в жидкой фазе.

Полученную на предыдущем этапе неосажденную жидкость наносили на хроматографическую колонку, заполненную 2 мл никелевого (Ni-NTA) сорбента Superflow (QUIAGEN, Германия). За счет наличия гистидинового тага белок связывался с ионами никеля вследствие образования аффинной связи. После прохождения всего объема жидкости через колонку сорбент промывали от неспецифически связанных белков 20 мл буфера Б (50 мМ натрий-фосфатный буфер, рН 6.0, 500 мМ NaCl). После этого с помощью элюирующего буфера (50 мМ натрий-фосфатный буфер, рН 6.0, 250 мМ NaCl, 300 мМ имидазол) отмывали целевой белок с никелевой смолы во фракции объемом 500 мкл. Второй этап очистки проводили методом гель-фильтрации на хроматографе NGC Discover (BioRad, США) и колонке Superdex SEC-70 (BioRad, США) при 277 К в буфере А. На колонку наносили образец объемом 250 мкл с концентрацией 10 мг/мл. Анализ качества очистки образца проводили по профилю гель-фильтрации, регистрируя поглощение на длине волны 280 нм, и последующему анализу отобранных пиков методом денатурирующего гель-электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) в трис-глициновом буферном растворе, рН 8.3 (25 мМ Трис-буфер; 250 мМ глицин; 0.1-додецилсульфат натрия), при температуре 293 К и напряжении 110–140 В. Удовлетворяющие условиям чистоты образцы были отобраны и сконцентрированы для дальнейших исследований.

Малоугловое рентгеновское рассеяние. Для включения влияния межчастичного взаимодействия между молекулами белков эксперимент МУРР проводили при двух концентрациях образца: 6 и 12 мг/мл. Предварительный анализ данных выполняли с использованием дифрактометра Nanostar SAXS (Bruker AXS GmbH, Германия) в ЦКП ФИЦ КазНЦ РАН. Дальнейшие эксперименты выполняли на Курчатовском специализированном источнике синхротронного излучения “КИСИ-Курчатов” [11] с параметрами энергии пучка 8 кэВ на детекторе DECTRIS Pilatus3 1M (1043 × 981 точек, 20 бит, 500 Гц) при температуре 293 К. Первичный анализ и обработку данных проводили в программном пакете PRIMUS [12],

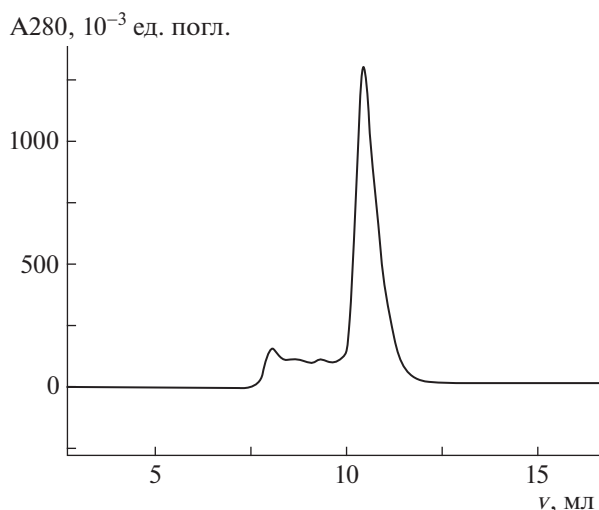


Рис. 1. Профиль гель-фильтрации исследуемого белка: V — объем, прошедший через колонку, A_{280} — поглощение на заданной длине волны.

получение формы электронной плотности — в программе DAMMIN [13] сервиса ATSAS online (<https://www.embl-hamburg.de/biosaxs/atsas-online>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения образца белка YsxC были проведены подбор и оптимизация условий выделения и очистки. Поиск буферных условий является одним из важнейших этапов в подготовке образца, поскольку для проведения эксперимента по МУРР необходим препарат, который будет стабилен во время длительных экспериментов, включающих в себя физические воздействия [14]. С этой целью подобрали условия, а также провели оценку стабильности образца. Таким образом, в качестве наиболее предпочтительного был выбран буфер А с составом 50 мМ натрий-фосфатный буфер, рН 6,0, 250 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂. Степень очистки образца оценивали с помощью гель-фильтрации (рис. 1), качество очистки образца и наличие примесей в полученном растворе — с помощью денатурирующего полиакриламидного гель-электрофореза (рис. 2).

Для исследования способности к олигомеризации белковой молекулы в зависимости от ее концентрации в растворе получили два препарата исходного объекта в буфере А с концентрациями 6 и 12 мг/мл соответственно. Для гомологов белка Ysc ранее была показана возможность кристаллизации как в форме димера, так и мономера [15]. Анализ разностной картины МУРР (рис. 3) от двух исходных концентраций образца показал, что концентрационная зависимость в исследуемом объекте отсутствует, и белок остается мономером при высоких концентрациях. Последую-

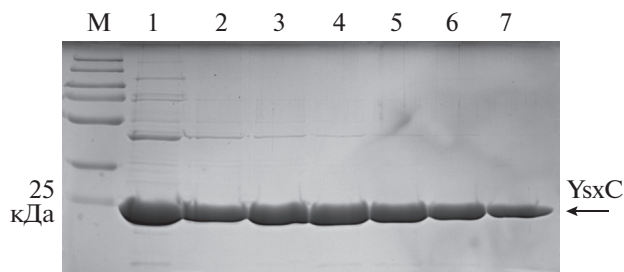


Рис. 2. Электрофоретическая картинка белка YsxC после завершающего этапа очистки: М — маркерная лестница, 1 — контроль до очистки, 2–7 — фракции белка.

щую обработку данных проводили в программном пакете PRIMUS: статистическое усреднение кривых по времени, а также их калибровку и вычитание сигнала от буфера, чтобы получить информацию только о монодисперсной системе белка. Для определения структурных инвариантов выполнили построения Гинье и Кратки. Полученные графики представлены на рис. 4. Поскольку в координатах Гинье есть линейная зависимость, это свидетельствует о том, что раствор является монодисперсным и условия для применения математического аппарата для обработки данных являются уместными. Для использования математического аппарата в приближении сферической молекулы необходимо понять, является ли молекула в растворе глобулярной, поскольку помимо сферического приближения можно использовать цилиндрическое (в случае, если молекула имеет форму вытянутого цилиндра). Данную информацию подтверждает кривая рассеяния в координатах Кратки (рис. 4б). Как видно из эксперимента, кривая рассеяния в координатах Кратки имеет куполообразную форму, что явля-

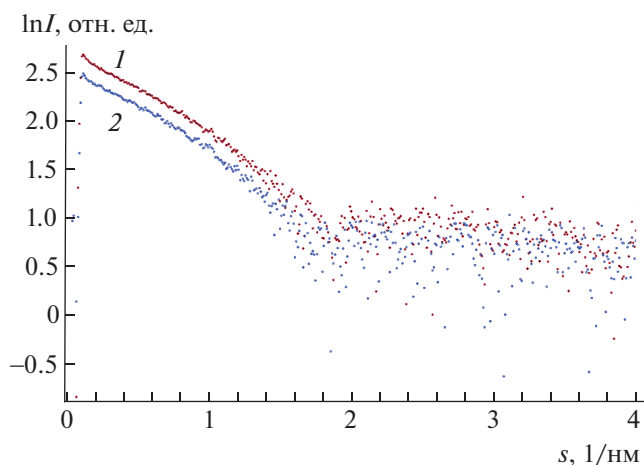


Рис. 3. Разностные кривые, полученные из эксперимента по МУРР для концентраций 12 (1) и 6 мг/мл (2).

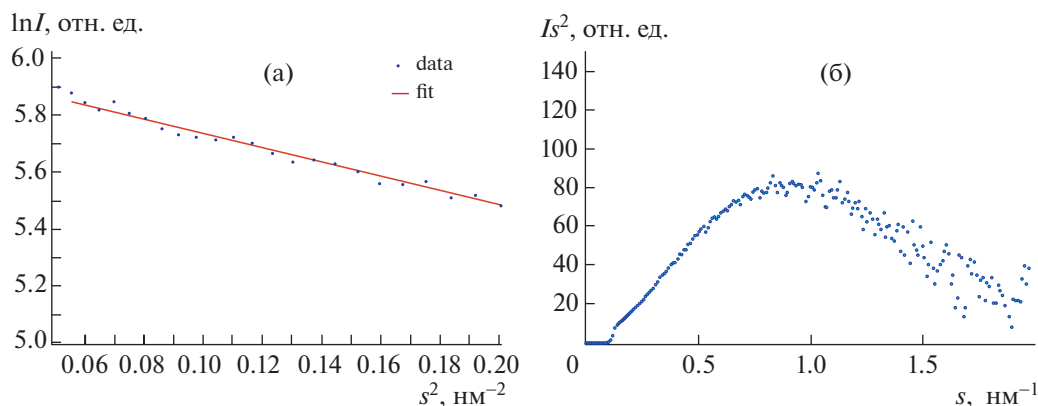


Рис. 4. Построения для определения инвариантов белка YsxC: а – в координатах Гинье, б – в координатах Кратки.

ется доказательством глобулярности белковой структуры [16], поэтому дальнейшие вычисления проводили в приближении сферической молекулы.

Один из методов *ab initio* восстановления формы электронной плотности с помощью применения виртуальных сферических атомов был предложен в [17]. Этот метод исполнен в программном пакете DAMMIN, в котором определяется форма молекулы из экспериментальных данных путем имитации отжига. Как видно из рис. 5, конечная модель электронной плотности имеет особенности поверхности, которые отличаются от заданной вначале сферической системы. Благодаря наличию таких особенностей можно однозначно сопоставить уже имеющуюся (или предсказанную) структуру с расчетными экспериментальными данными. Таким образом, была получена электронная плотность с параметрами радиуса гирации $R_g = 27.4 \text{ \AA}$ и наибольшим размерным па-

раметром рассчитанной частицы $D_{\text{max}} = 37.7 \text{ \AA}$. Эксперимент *in silico* по МУРР в программном пакете CRY SOL [18] на расчетной модели из AlphaFold2 [19] белка YsxC показал, что теоретический параметр радиуса гирации в таком случае равен $R_g = 26.9 \text{ \AA}$. Расчетная масса электронной плотности исследуемого белка равна 23.67 кДа, тогда как молекулярная масса конструкции вместе с N-концевым гистидиновым тагом – 23.71 кДа. Сопоставление предсказанной структуры белка из AlphaFold2 и полученной электронной плотности, а также полученный ряд расчетных параметров свидетельствуют о том, что белок в растворе находится в виде мономера. Наблюдаемый вид поверхности электронной плотности указывает на то, что белковая молекула в растворе находится в компактном виде, не имеет неструктурированных частей, которые могли бы мешать дальнейшей ее кристаллизации и решению структуры методом рентгеноструктурного анализа.

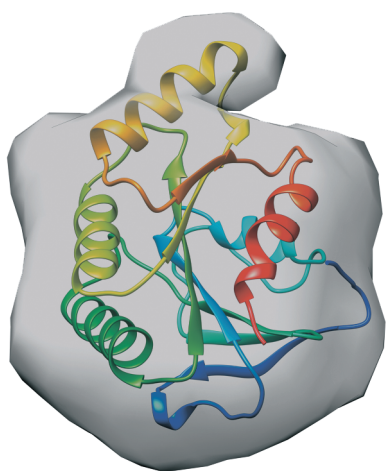


Рис. 5. Сопоставление структуры белка YsxC из AlphaFold2 и полученной электронной плотности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен синтез рекомбинантного белка YsxC из патогенного микроорганизма *Staphylococcus aureus* в модельной системе *Escherichia coli*. Найдены стабилизирующие белок буферные условия, а также проведена оценка концентрационной зависимости белка в растворе для структурных исследований на основе разностных кривых МУРР. Получены ряд структурных параметров и электронная плотность белка, которые указывают на то, что белок в растворе является мономером, компактно свернут и не имеет неструктурированных участков на профиле поверхности молекулы. Полученные стабилизирующие белок условия могут быть использованы в дальнейших этапах по поиску условий кристаллизации исследуемой белковой молекулы.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-20034).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Chambers H.F., Deleo F.R.* // Nat Rev Microbiol. 2009. V. 7 № 9. P. 629.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2200>
2. *Stapleton P.D., Taylor P.W.* // Sci Prog. 2002. V. 85 № 1. P. 57.
<https://doi.org/10.3184/003685002783238870>
3. *Gan T., Shu G., Fu H. et al.* // BMC Vet Res. 2021. V. 17 P. 177.
<https://doi.org/10.1186/s12917-021-02884-z>
4. *Murray Ch.J.L., Shunji I.K., Sharara F. et al.* // Lancet. 2022. V. 10325. № 399. P. 629.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
5. *Poehlsgaard J., Douthwaite S.* // Nat. Rev. Microbiol. 2005. V. 3. P. 870.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1265>
6. *Усачев К.С., Юсупов М.М., Валидов Ш.З.* // Биохимия. 2020. Т. 85. № 11. С. 1690.
<https://doi.org/10.1134/S0006297920110115>
7. *Khusainov I., Fatkhullin B., Pellegrino S.* // Nature Commun. 2020. V. 11 № 1656.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-15517-0>
8. *Cooper E.L., García-Lara J., Foster S.J.* // BMC Microbiol. 2009. V. 9. № 266.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-266>
9. *Ramakrishnan C., Dani V.S., Ramasarma T.* // Protein Eng. Des. Sel. 2002. V. 15. № 10. P. 783.
<https://doi.org/10.1093/protein/15.10.783>
10. *Ni X., Davis J.H., Jain N. et al.* // Nucl. Acids Res. 2016. V. 44. № 17. P. 8442.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw678>
11. *Корчуганов В.Н., Валентинов А.Г., Полозов С.М. и др.* // Кристаллография. 2022. Т. 67. № 5. С. 735.
<https://doi.org/10.31857/S0023476122050058>
12. *Konarev P.V., Volkov V.V., Sokolova A.V. et al.* // J. Appl. Cryst. 2003. V. 36. P. 1277.
<https://doi.org/10.1107/S0021889803012779>
13. *Svergun D.I.* // Biophys J. 1999. V. 76. № 6. P. 2879.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77443-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77443-6)
14. *Gosavi R.A., Mueser T.C., Schall C.A.* // Acta Cryst. 2008. V. 64. P. 506.
<https://doi.org/10.1107/S0907444908004265>
15. *Ruzhenikov S.N., Das Sanjan K., Sedelnikova S.E. et al.* // J. Mol. Biol. 2004. V. 339 № 2. P. 265.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.03.043>
16. *Goldenberg D.P., Argyle B.* // Biophys. J. 2014. V. 106. № 4. P. 895.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.12.004>
17. *Chacon P., Moran F., Diaz J.F. et al.* // Biophys. J. 1998. V. 74. P. 2760.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77984-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77984-6)
18. *Svergun D.I., Barberato C., Koch M.H.J.* // J. Appl. Cryst. 1999. V. 28. P. 768.
<https://doi.org/10.1107/S1600576717007786>
19. *Jumper J., Evans R., Pritzel A. et al.* // Nature. 2021. V. 596. P. 583.
<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>