



УДК 577.112'311.336.088.3

© 1993 Р. Т. Тодорова

## ПОЛУЧЕНИЕ, ВЫДЕЛЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ МУТАНТНЫХ ФОРМ РИБОСОМНОГО БЕЛКА L7/L12

Институт белка РАН, Пущино Московской обл.

Для исследований N-концевой части рибосомного белка L7/L12 получены три его мутантные формы, в которых Ser1, Met14 и Met26 заменены на Tug. Сделаны три точечные мутации в гене L7/L12 с использованием системы для мутагенеза на основе фага M13mp18. Получена экспрессия генов мутантных белков L7/L12 в клетках *Escherichia coli* и разработаны методики для выделения мутантных белков. Обнаружено, что три мутантные формы рибосомного белка L7/L12 по характеристикам и структуре аналогичны природному белку L7/L12 и представляют собой подходящий объект для исследований N-концевой области белка методом <sup>1</sup>H-ЯМР.

Рибосомный белок L7/L12 (120 аминокислотных остатков, молекулярная масса 12 200 Да) локализован в большой субчастице рибосомы *E. coli* и обладает уникальными структурными и функциональными свойствами [1, 2]. Белок L7 отличается от белка L12 тем, что его N-концевой сериновый остаток ацилирован [3]. L7/L12 — единственный рибосомный белок, который присутствует на рибосомах в четырех копиях в виде двух димеров [4, 5]. При удалении белка L7/L12 или только его C-концевой части из рибосомы редуцируется связывание факторов элонгации Tu и G (EF-Tu, EF-G) и почти теряется факторзависимый гидролиз ГТР [2, 6—8].

В растворе стабильна димерная форма белка L7/L12 [9]. Димер белка представляет собой вытянутую палочкообразную молекулу и состоит из двух доменов, связанных между собой легко расщепляемым участком (аминокислотные остатки 37—50) [10]. C-Концевая часть последовательности (фрагмент 53—120) образует глобулярный C-концевой домен белка L7/L12 [11], пространственная структура которого была установлена рентгенографическим методом с разрешением 0,17 нм [11]. N-Концевой участок последовательности (аминокислотные остатки 1—36) отвечает за димеризацию белка L7/L12 [2, 9], его пространственная структура детально не изучена.

В природном белке L7/L12 отсутствует аминокислота Tug. Введение ароматической аминокислоты Tug в N-концевую часть белка L7/L12 позволило бы исследовать его структуру методом <sup>1</sup>H-ЯМР. В данной работе получены три точечных мутанта рибосомного белка L7/L12, в которых Ser1, Met14 и Met26 заменены на Tug. Показано, что мутантные белки по характеристикам и структуре аналогичны природному белку L7/L12 и являются подходящим объектом для изучения структуры N-концевой части белка L7/L12 методом <sup>1</sup>H-ЯМР.

Фрагмент оперона *rplLrpoBC* *E. coli* длиной 800 п. о., содержащий ген белка L7/L12, был переклонирован из плазмиды pRIA7 [12] в фаг M13mp18 по сайтам рестрикции *HindIII-SalI*, в результате чего был сконструирован рекомбинантный

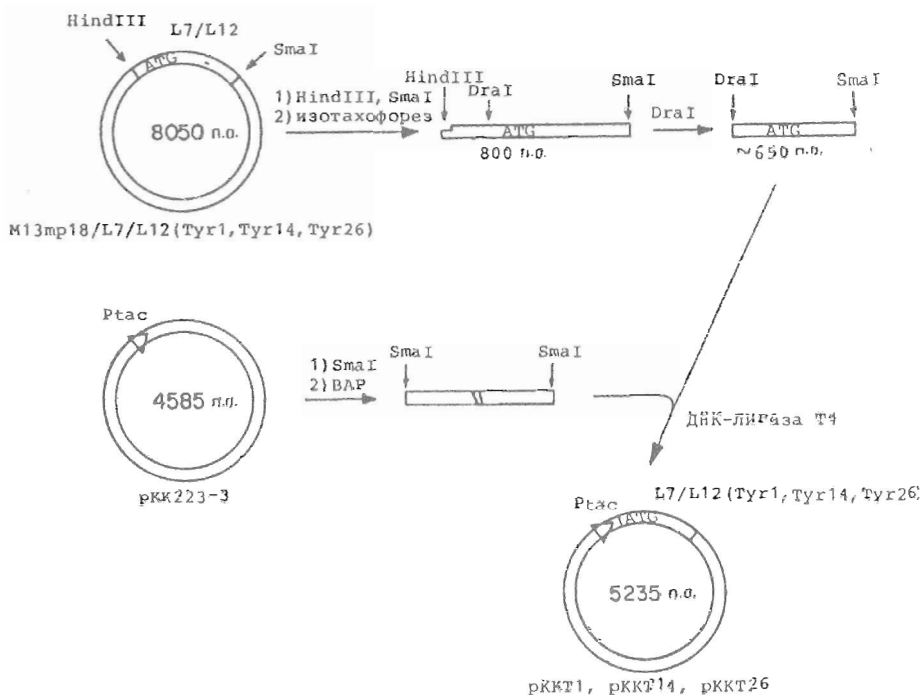


Рис. 1. Конструирование рекомбинантных плазмид рККТ1, рККТ14 и рККТ26, содержащих мутантные гены L7/L12(Tyr1, Tyr14 и Tyr26). Ptac — tac-промотор

фаг M13mp18L7/L12. Мутагенез для замены Ser1 на Tyr в рибосомном белке L7/L12 проводили в гене L7/L12 с использованием системы для мутагенеза на основе фага M13mp18L7/L12 по методам Кункеля [13] и Фрица с соавт. [14]. Триплет TCT (Ser) в гене L7/L12 заменили на триплет TAT (Tyr). Мутагенез для замены Met14 и Met26 на Tyr проводили методом Экштейна [15, 16], при этом в гене L7/L12 триплеты ATG (Met) заменили на триплет TAC (Tyr).

Фаговые клоны, содержащие нужные мутации в гене, отбирали Dot-blot-гибридизацией [17, 18].

Мутантные гены L7/L12 расщепляли перед стартовым кодоном по DraI-сайту и переклонировали по SmaI-сайту в вектор рКК223-3. В результате были сконструированы рекомбинантные плазмиды рККТ1 (содержащая мутацию Tyr1), рККТ14 (Tyr14) и рККТ26 (Tyr26), в которых экспрессия мутантных генов L7/L12 находится под контролем tac-промотора (рис. 1).

Экспрессия мутантных генов индуцируется добавлением изопрропил-β-D-тио-галактозида (IPTG) в среду. Получена экспрессия мутантных генов L7/L12 в клетках *E. coli* штаммов XL1 и JM101 (рис. 2). Оптимальными для экспрессии оказались клетки *E. coli* штамма XL1, из которых и выделяли мутантные белки.

Основные этапы выделения мутантных белков L7/L12, содержащих замены Tyr1, Tyr14 и Tyr26, показаны на рис. 3. Мутантные белки L7/L12 выделяли разными способами для подбора наиболее подходящей для выделения чистого белка методики (см. «Экспериментальную часть»).

Для исследования белков методом <sup>1</sup>H-ЯМР чистота белков, выделенных по первой методике (L7/L12(Tyr1)), была достаточна. Для получения образцов белка со спектральной чистотой с целью исследования методом флуоресцентной спектроскопии и для снятия спектров кругового дихроизма подходящими оказались методики выделения белков в присутствии мочевины (L7/L12(Tyr14) и (Tyr26)).

Так как в природном белке L7/L12 отсутствует аминокислота Tyr, УФ-спектры трех тирозиновых мутантов отличаются от спектра природного белка и имеют

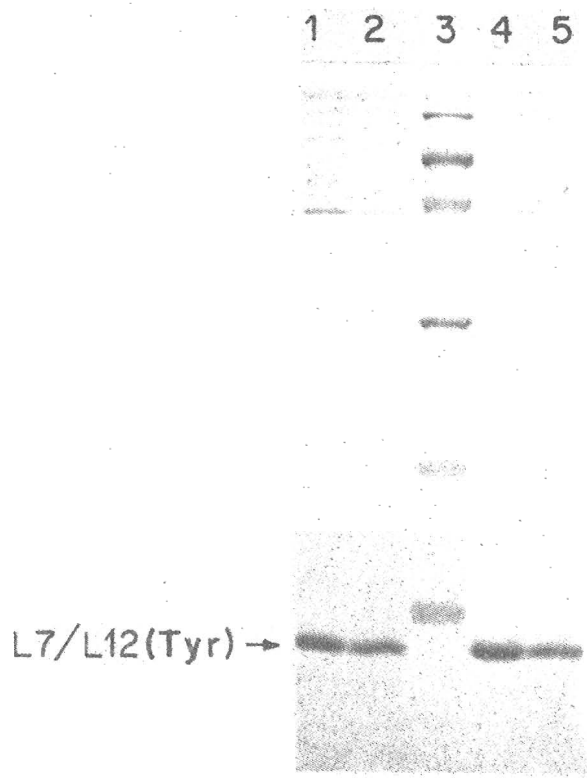


Рис. 2. Электрофорез в 15% ПААГ в присутствии SDS мутантных белков: 1, 2 — L7/L12(Tyr26), 4 — L7/L12(Tyr14), 5 — L7/L12(Tyr1). 3 — маркеры молекулярной массы (Pharmacia) сверху вниз, кДа: 94, 67, 43, 30, 20, 14

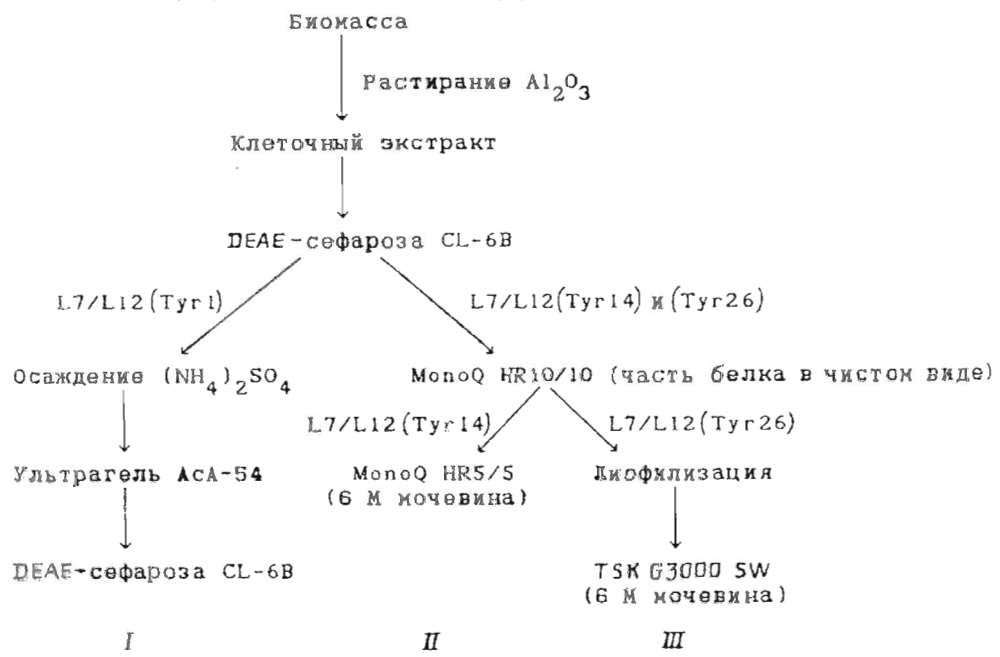


Рис. 3. Схема выделения мутантных белков L7/L12(Tyr1, Tyr14 и Tyr26)

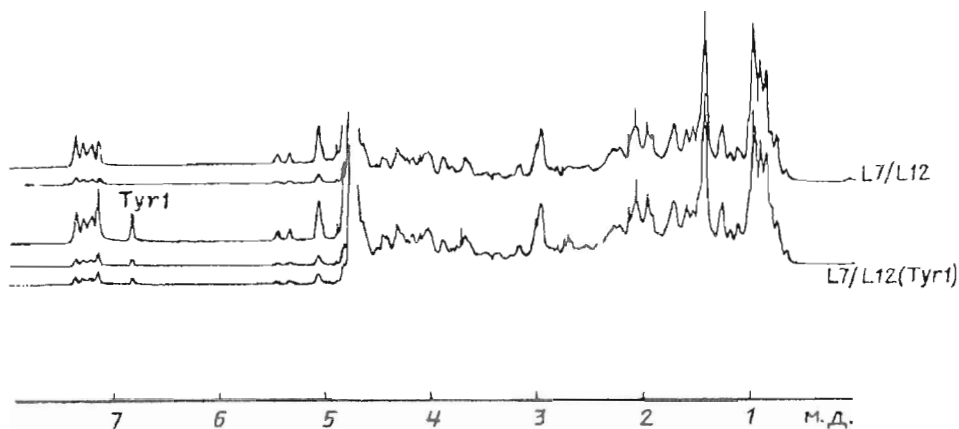


Рис. 4. Спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР мутантного белка L7/L12(Tyr1) и природного белка L7/L12

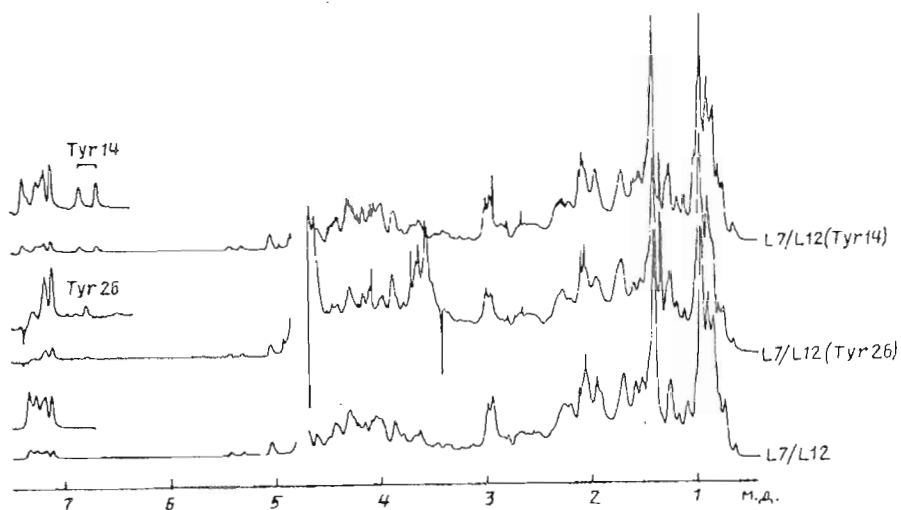


Рис. 5. Спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР белков L7/L12(Tyr14 и Tyr26) и природного белка L7/L12

максимумы поглощения в области 276 нм для L7/L12(Tyr1) и L7/L12(Tyr26) и 280 нм для L7/L12(Tyr14).

Согласно данным равновесной седиментации, белок L7/L12(Tyr1) в растворе существует в виде димера, как и белок дикого типа. По сиквенсу N-концевой последовательности белка установлено, что аминокислота Met на N-конце не отщепляется в клетке и является первой аминокислотой в мутантном белке, а за ней идет Tyr1 и все последующие аминокислоты, как в природном белке. Два других мутантных белка L7/L12(Tyr14 и Tyr26) по строению N-конца не отличаются от природного белка.

Полученные мутантные формы белка L7/L12(Tyr1, Tyr14 и Tyr26) были исследованы методом  $^1\text{H}$ -ЯМР. Спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР мутантных белков сравнивали со спектрами белка дикого типа, полученными ранее [19—21]. Синглетные сигналы при 2,12; 1,94 и 1,88 м. д. в спектре  $^1\text{H}$ -ЯМР белка дикого типа относятся к протонам  $\text{CH}_3$ -групп трех остатков Met в молекуле L7, а синглет при 2,05 м. д. — к ацетильной группе N-концевого остатка Ser1 в белке L7; этот сигнал отсутствует в белке L12 [19]. Метиониновые остатки (Met14, Met17, Met26) в

димере имеют различное химическое окружение, два из них более заторможены в структуре димера, чем третий (Met26) и N-концевой остаток серина [19]. Два из трех метиониновых остатков димера, а также Phe30 находятся в структурированной области димера [20]. В составе молекулы белка L7/L12 содержатся ароматические остатки Phe30 и Phe54, которым соответствуют два резонансных сигнала при 7,32 и 7,21 м. д. в <sup>1</sup>H-ЯМР-спектре белка [21].

Сравнивая спектры <sup>1</sup>H-ЯМР димера природного белка L7/L12 со спектрами мутантных белков L7/L12(Tyr1, Tyr14 и Tyr26) (рис. 4, 5), можно сделать вывод, что мутантные белки сохраняют форму димера в растворе и их структура аналогична структуре димера природного белка L7/L12.

В спектре <sup>1</sup>H-ЯМР белка L7/L12(Tyr1) появляются резонансные сигналы при 6,8 м. д. для протонов ароматической аминокислоты Tyr1 (рис. 4). Анализ спектральных характеристик белка L7/L12(Tyr1) свидетельствует о том, что Tyr1 (Ser1) не включается в структуру N-концевой области белка, а остается свободным и не имеет соседей.

В спектре <sup>1</sup>H-ЯМР белка L7/L12(Tyr14) появляются резонансные сигналы при 6,7 и 6,85 м. д. для протонов ароматической аминокислоты Tyr14 (рис. 5). Согласно анализу спектральных характеристик белка L7/L12(Tyr14), Tyr14(Met14) структурирован в N-концевой части белка L7/L12. По изменению резонансного сигнала для Phe30 при 7,32 м. д. можно предположить, что Phe30 находится вблизи Tyr14(Met14).

В спектре <sup>1</sup>H-ЯМР белка L7/L12(Tyr26) появляются резонансные сигналы при 6,8 м. д., характерные для протонов ароматической аминокислоты Tyr26. Анализ спектра белка L7/L12(Tyr26) говорит о том, что Tyr26(Met26) структурирован в N-концевой области белка L7/L12.

Сравнение резонансных сигналов для протонов ароматических аминокислот Tyr14 и Tyr26 и анализ спектральных характеристик белков L7/L12(Tyr14 и Tyr26) позволяют сделать вывод, что Tyr14(Met14) в большей степени структурирован в N-концевой области белка L7/L12, чем Tyr26(Met26).

Таким образом, исследование мутантных форм рибосомного белка L7/L12, содержащих аминокислотные замены Ser1 → Tyr1, Met14 → Tyr14, Met26 → Tyr26, показало, что мутантные белки близки по структуре природному белку L7/L12 и являются удобными объектами для изучения его структуры. Необходимые для детализации структуры N-концевой части белка данные могут быть получены в ходе дальнейших исследований Tyr-содержащих мутантных белков методами двумерного <sup>1</sup>H-ЯМР, а также флуоресцентной спектроскопии, микрокалориметрии и кругового дихроизма.

### Экспериментальная часть

В работе использованы рестриктазы *Hind*III, *Bam*HI, *Eco*RI, *Sa*II (НПО «Фермент», Вильнюс); *Dra*I, *Sma*I (Amersham); фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I, ДНК-лигаза фага T4, бактериальная щелочная фосфатаза (BAP) и полинуклеотидная фага T4 (Amersham).

Дезоксирибоолигонуклеотиды синтезированы на синтезаторе Beckman System I DNA Synthesizer.

**Бактериальные штаммы и плазмиды** — бактериофаг M13mp18 и плаزمида pKK223-3 (Pharmacia); штаммы *E. coli*: XL1 [*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17*, (*rk<sup>-</sup>mk<sup>+</sup>*), *supE44*, *relA1*,  $\lambda^-$ , *lac<sup>-</sup>/F'proAB*, *lacI<sup>q</sup>ZAM15Tn10tet*]; JM101 [*Δlacpro*, *thi*, *supE*, *F' traD36*, *proAB*, *lacI<sup>q</sup>ZAM15*]; CJ236 [pCJ105(Cm<sup>r</sup>)/*dut1*, *ung1*, *thi1*, *relA1*].

Одноцепочечную фаговую ДНК и плазмидную ДНК выделяли по стандартным методикам [14, 22]. Векторную ДНК подвергали дефосфорилированию [17]. Рестриктсионные фрагменты для клонирования выделяли из агарозных гелей изотахофорезом [22].

Электрофорезы для тестирования ДНК проводили в 1 и 1,5% гелях агарозы

и окрашивали бромистым этидием. Электрофорезы белков осуществляли в 15% ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия и окрашивали кумасси G-250.

Спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР сняты на спектрофотометре WM-500 (Bruker) при 27° С. Химические сдвиги измерены относительно внутреннего стандарта — натриевой соли 2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфокислоты. Концентрация белков составляла 1—2 мг/мл. Мутантные белки лиофилизировали из буферного раствора 20 мМ Na-фосфатного буфера, pH 7,2,—0,1 М KCl и перед измерением спектров  $^1\text{H}$ -ЯМР растворяли в  $^2\text{H}_2\text{O}$ .

Для выделения белков использовали буферы: 40 мМ трис-HCl (pH 7,8), 2 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол, 0,02 М PMSF (А); 10 мМ  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ , pH 7,8 (Б); 100 мМ  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  (pH 7,5), 6 М мочевины (В).

Для выделения мутантных белков L7/L12 клетки *E. coli* штамма XL1, содержащие плазмиды pKKT1, pKKT14 и pKKT26, наращивали в среде LB при 37° С до  $A_{550}$  1,3 и проводили индукцию при помощи IPTG в течение 3,5 ч. После центрифугирования биомассу разрушали растиранием с  $\text{Al}_2\text{O}_3$ .

Для выделения L7/L12(Tyr1) проводили ионообменную хроматографию клеточного экстракта на колонке (1,6×16 см) с DEAE-сефарозой CL-6B в линейном градиенте концентрации NaCl (0—0,4 М) в буфере А. Фракции, содержащие L7/L12(Tyr1), осаждали  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  в 75%-ном насыщении и подвергали гель-фильтрации в буфере А на колонке (2,6×196 см) с ультрагелем AcA-54. Последнюю очистку белка проводили на колонке с DEAE-сефарозой CL-6B в тех же условиях, что и первую.

Для очистки L7/L12(Tyr14 и Tyr26) фракции, содержащие мутантные белки после первого этапа хроматографии на колонке с DEAE-сефарозой CL-6B, разбавляли тройным объемом буфера А и подвергали ионообменной хроматографии на MonoQ HR10/10 в линейном градиенте концентрации NaCl (0,1—0,3 М) в буфере А. В этих условиях часть фракций содержала мутантный белок в чистом виде. Фракции белка L7/L12(Tyr14), требующие дополнительной очистки, разбавляли тройным объемом буфера А с 10 М мочевиной и подвергали ионообменной хроматографии на MonoQ HR5/5 в линейном градиенте концентрации NaCl (0—0,3 М) в буфере А с 6 М мочевиной. Фракции белка L7/L12(Tyr26), требующие дополнительной очистки, диализовали против буфера Б и лиофилизовали, после чего следовала гель-фильтрация на TSKG 3000 SW (7,5×600 мм) в буфере В.

Полученные в чистом виде мутантные белки L7/L12 диализовали против буфера Б или меняли буфер на буфер Б на колонке с сефадексом G-25 и лиофилизовали.

Автор признателен В. Н. Бушуеву за снятие спектров  $^1\text{H}$ -ЯМР белков, Л. М. Винокурову за сиквенс белка, М. Г. Бубуненко за помощь при выделении первого мутанта.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kaltschmidt E., Wittman H. G. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1970. V. 67. № 3. P. 1276—1282.
2. Koteliansky V. E., Domogatsky S. P., Gudkov A. T. // Eur. J. Biochem. 1978. V. 90. № 2. P. 319—323.
3. Terhorst C., Möller W., Laursen R., Wittmann-Liebold B. // Eur. J. Biochem. 1973. V. 34. № 1. P. 138—152.
4. Subramanian A. R. // J. Mol. Biol. 1975. V. 95. № 1. P. 1—8.
5. Hardy S. J. S. // Mol. Gen. Genet. 1975. V. 140. № 3. P. 254—274.
6. Van Aghthoven A. J., Maasen J. A., Schrier P. I., Möller W. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1975. V. 64. № 4. P. 1184—1191.
7. Petterson J., Kurland C. G. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. № 7. P. 4007—4010.
8. Möller W., Schrier P. I., Maasen J. A., Zantema A., Schop E., Reinald H. // J. Mol. Biol. 1983. V. 163. № 4. P. 553—573.

9. Gudkov A. T., Behlke J. // *Eur. J. Biochem.* 1978. V. 90. № 2. P. 309—312.
10. Liljas A. // *Progr. Biophys. Mol. Biol.* 1982. V. 40. № 3. P. 161—228.
11. Leijonmark M., Enksson S., Liljas A. // *Nature.* 1980. V. 286. № 5775. P. 824—826.
12. Gudkov A. T., Bubunenko M. G., Gryaznova O. I. // *Biochimie.* 1991. V. 73. № 11. P. 1387—1389.
13. Kunkel T. A. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1985. V. 82. № 2. P. 488—492.
14. Клонирование ДНК. Методы / Ред. Д. Гловер. М.: Мир, 1988. С. 191—205.
15. Taylor J. W., Ott J., Eckstein F. // *Nucl. Acids Res.* 1985. V. 13. № 24. P. 8764—8785.
16. Nakamaye K., Eckstein F. // *Nucl. Acids Res.* 1986. V. 14. № 14. P. 9679—9698.
17. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. С. 100—106, 141, 142.
18. Carter P. J., Williams J. G. *Nucleic Acid Hybridisation, a Practical Approach* / Eds Hames B. D., Higgins S. J., IRL Press.
19. Buchuev V. N., Sepetov N. F., Gudkov A. T. // *FEBS Lett.* 1984. V. 178. № 1. P. 101—104.
20. Сенемов Н. Ф., Бушув В. Н., Гудков А. Т. // *Молекулярн. биология.* 1988. Т. 22. № 5. С. 254—274.
21. Gudkov A. T., Khechinashvili N. N., Bushuev V. N. // *Eur. J. Biochem.* 1978. № 2. V. 90. P. 313—318.
22. Ofverstedt L., Hammarstrom K., Bazgobin N., Hjerten S., Petterson U., Chattopadhyaya J. // *Biochim. et biophys. acta.* 1984. V. 782. № 2. P. 120—126.

Поступила в редакцию  
6.VIII. 1992

После доработки  
5.X.1992

*R. T. Todorova*

#### CONSTRUCTION, PURIFICATION AND STUDY OF THE PROTEIN L7/L12 MUTANT FORMS

*Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences,  
Pushchino, Moscow Region*

Three mutant forms of the ribosomal protein L7/L12 with Ser1, Met14 and Met26 substituted by the Tyr residue were constructed for studying the protein's N-terminal domain. Three point mutations were introduced into the L7/L12 gene by means of the phage M13mp18 system, the mutant genes were expressed in *Escherichia coli* cells, and methods of the proteins' purification were developed. The mutant proteins L7/L12 are very close, in structure and properties to the wild type protein and represent suitable objects for the <sup>1</sup>H-NMR study of the N-terminal domain.