



УДК 577.113.5

СТРУКТУРНЫЕ СВОЙСТВА РИБОСОМНОГО БЕЛКА S8 ИЗ ЭКСТРЕМАЛЬНОГО ТЕРМОФИЛА *Thermus thermophilus*

© 1995 г. В. С. Высоцкая*, У. Ф. Насибуллин, В. Н. Уверский,
К. С. Василенко, Н. В. Нарижнева, М. Б. Гарбер

Институт белка РАН, 142292, Пушкино Московской обл.

Поступила в редакцию 03.08.94 г.

Ген рибосомного белка S8 из экстремального термофила *Thermus thermophilus* экспрессирован в *Escherichia coli* с использованием штамма BL21(DE3) и вектора рЕТ3-1. Разработана методика выделения этого белка из штамма-суперпродуцента, позволяющая получать 8 - 12 мг продукта из 1 л культуры. С помощью спектроскопии КД определена вторичная структура белка S8. Показано, что он обладает высокой устойчивостью к денатурирующим агентам.

Ключевые слова: *Thermus thermophilus*; рибосомный белок, вторичная структура.

Известно, что рибосомный белок S8 в *E. coli* играет существенную роль как в сборке 30S-субчастицы [1], так и в регуляции экспрессии генов рибосомных белков *spc*-оперона [2, 3]. Во время сборки малой субчастицы белок S8 независимо от других белков связывается с центральным доменом 16S РНК и вместе с белками S15, S6, S18 формирует боковой выступ ("платформу") 30S-субчастицы [4]. S8-Связывающий участок 16S РНК представляет собой несовершенную шпильку, образованную нуклеотидной последовательностью 583 - 653 [5 - 7]. Использование различных химических и генно-инженерных методов (химические модификации [8], УФ-индуцируемое сшивание [9], ферментативный гидролиз [10], сайт-направленный мутагенез [11]) позволило локализовать структурные детерминанты рРНК *E. coli*, необходимые для взаимодействия с белком S8. Было обнаружено, что 3 неспаренных аденина (A⁵⁹⁵, A⁶⁴⁰, A⁶⁴²), а также неканоническая пара U⁵⁹⁸ · U⁶⁴¹, окруженная двумя G · C-парами, находятся в прямом контакте с белком S8 [7].

Белок S8 известен также как репрессор трансляции *spc*-мРНК, кодирующей 11 рибосомных белков (L14, L24, L5, S14, S8, L6, L18, S5, L30, L18, L36), а также секреторный белок Sec Y [2, 3]. При избыточном синтезе (по отношению к 16S РНК) белок S8 связывается с *spc*-мРНК в начале ее третьего цистрона, кодирующего рибосомный белок L5. В результате репрессируется трансляция цистрона *rpl5* и всех следующих цистронов за счет "последовательной трансляции" полицистронной мРНК [12]. Экспрессия двух предыдущих генов (*rpl14* и *rpl24*) "ретрорегулируется" в результате дегградации *spc*-мРНК [13]. Фрагмент мРНК,

который узнается и защищается белком S8 при обработке нуклеазами, был выделен и охарактеризован [14]. Было обнаружено, что структуры участков этой мРНК и рРНК, связывающих рибосомный белок S8, очень схожи.

Участки мРНК и 16S РНК, узнаваемые белком S8, изучены достаточно основательно, но данные о структуре самого белка S8 и его РНК-связывающем центре немногочисленны и отрывочны. В ряде работ были получены результаты, указывающие на то, что за узнавание и специфическое связывание рРНК и мРНК отвечает С-конец белка S8 [15 - 17]. Все эти данные были получены для белка S8 из *E. coli*, но для структурных исследований рибосомные белки из *E. coli* являются плохими объектами вследствие их низкой стабильности. В связи с этим в группе структурных исследований аппарата трансляции Института белка была начата работа по выделению белка S8 из экстремального термофила *Thermus thermophilus*. Выбор *T. thermophilus* в качестве источника для выделения рибосомных белков объясняется тем, что, с одной стороны, по организации аппарата трансляции эта граммотрицательная бактерия похожа на хорошо изученную *E. coli*, а с другой — ее белки термостабильны, обладают повышенной устойчивостью к протеолитическим ферментам и денатурирующим веществам и поэтому более перспективны для структурных исследований.

В 1993 г. в нашей группе совместно с лабораторией проф. Эресманна (Страсбург, Франция) была определена первичная структура белка S8 из *T. thermophilus* [18]. Позднее ген белка S8 был клонирован, секвенирован и экспрессирован в штамме *E. coli* BL21(DE3) [19]. Получение штамма-суперпродуцента для белка S8 из *T. thermophilus*

* Автор для переписки.

позволило выделить этот белок в препаративных количествах, необходимых для изучения его структурных особенностей физическими методами.

Суперэкспрессия гена рибосомного белка S8 из *T. thermophilus* в *E. coli*

Для экспрессии гена рибосомного белка S8 из *T. thermophilus* был выбран штамм *E. coli* BL21(DE3), несущий на хромосомной ДНК ген T7-РНК-полимеразы под контролем lacUV5-промотора, и вектор pET3-1, содержащий промотор, сайт связывания и терминирующий сигнал фага T7 [20]. Использование штамма BL21(DE3) и плазмиды pET3-1, сконструированных Штудиером для экспрессии генов токсичных белков, позволяет вначале наработать биомассу клеток, а затем добавлением индуктора изопропилтиогалактозида (IPTG) запустить синтез T7-РНК-полимеразы и тем самым включить экспрессию встроенного под контроль T7-промотора гена. Ген рибосомного белка S8 был амплифицирован с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) и затем клонирован в плазмиду pET3-1 по сайтам *NdeI* и *XhoI*. Секвенирование амплифицированного гена не выявило каких-либо ошибок *Taq*-полимеразы. Рекомбинантные клоны BL21(DE3)/pET-tthS8 растили так, как описано в "Экспериментальной части". Белок S8 составил приблизительно 10% общего продуцируемого клеткой белка. В основном белок накапливался в клетке в растворимой форме.

Выделение гомогенного препарата рибосомного белка S8 из суперпродуцентного штамма BL21(DE3)/pET-tthS8

Предложенная нами методика выделения белка S8 из суперпродуцентного штамма включает две основные стадии: 20 мин прогревания пострибосомного лизата при 70°C и ионообменную хроматографию на колонке CM-Торореарл. В результате прогревания клеточные белки *E. coli* денатурируются, образуя нерастворимый осадок, тогда как основная часть термостабильного белка S8 остается в растворе. На этом этапе необходимо присутствие NaCl в высокой концентрации, чтобы избежать осаждения белка S8 с белками *E. coli*. Прогревание позволяет в 3-4 раза очистить белок S8. После этого было достаточно одной хроматографии на колонке CM-Торореарл, чтобы получить препарат белка S8 с чистотой 95-98% по данным электрофоретического анализа (рис. 1, 4). Предложенная схема выделения белка S8 позволяет из 4-5 г клеток (1 л клеточной культуры) выделить 8-12 мг белка.

Сравнение физико-химических свойств белков S8 из *T. thermophilus* и *E. coli*

Вопрос о сравнительном исследовании свойств гомологичных белков из термофильных и мезофильных источников не нов и неоднократно под-

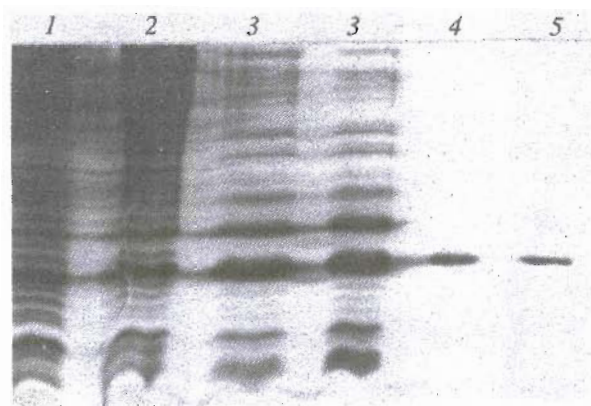


Рис. 1. Электрофорез в 15% ПААГ в присутствии SDS грубого клеточного лизата после осаждения дробиса (1); безрибосомного экстракта до (2) и после 20 мин прогревания при 70°C (3); препарата белка S8 после CM-Торореарл (4); белка S8, выделенного из рибосом *T. thermophilus* (5).

нимался в литературе (см., например, [21 - 23]). Такие исследования позволяют получить более глубокое представление об основах структурной стабильности белковой молекулы. Они также дают возможность понять, как природа приспосабливает структуру белков к экстремальным условиям среды, и, наконец, открывают перспективы к искусственной стабилизации белков посредством химических модификаций или специфического направленного мутагенеза.

Спектры КД белка S8 из *T. thermophilus* были исследованы в PMF-буфере. Выбор этого буфера вызван тем, что KF и фосфат калия меньше поглощают в дальней области УФ по сравнению с трис-ацетатом и KCl [15]. Из анализа полученного спектра КД в дальней УФ-области (рис. 2) можно сделать вывод, что белок S8 из *T. thermophilus*, как и аналог из *E. coli*, имеет выраженную вторичную структуру. Расчеты, произведенные

Таблица 1. Вторичная структура белка S8 из *T. thermophilus* (Tth) в сравнении с данными работы [15] по белку S8 из *E. coli* (Eco)

Белок	Содержание элементов вторичной структуры, %		
	α-спирали	β-структуры	неупорядоченный клубок
Из КД-спектров			
S8 Tth	15	60	25
S8 Eco	11	58	31
По аминокислотной последовательности			
S8 Tth	29	20	51
S8 Eco	27	17	56

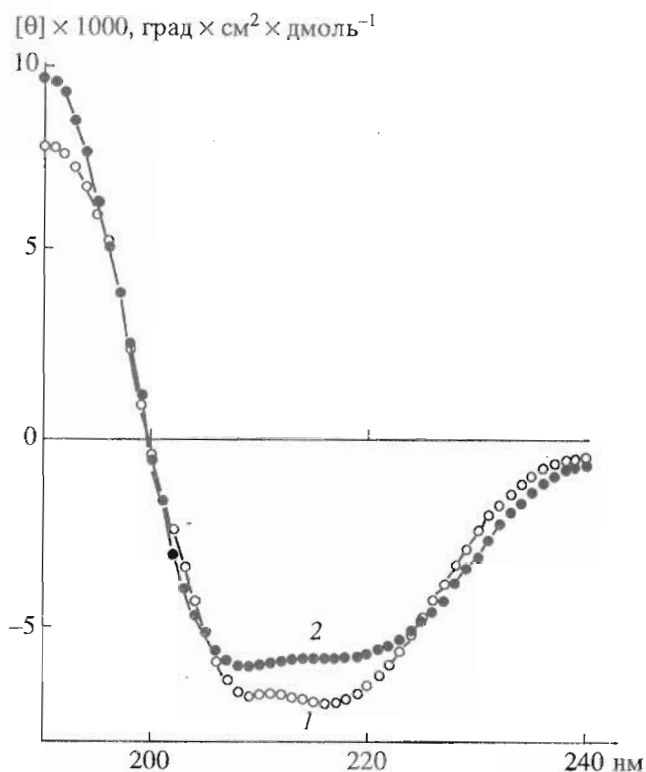


Рис. 2. Спектры КД рибосомных белков S8 из *T. thermophilus* (1) и *E. coli* (2).

по методу Провенчер–Глукнера [24], показали, что содержание α -спиральных участков составляет 12%, а β -структурированных – 60%.

В белке S8 из *E. coli* содержание α -спирали составляет 10 - 13%, β -структуры – 56 - 60% и неупорядоченного клубка – 30 - 31% [15]. Таким образом, эти белки имеют примерно одинаковое содержание α - и β -структурированных участков (табл. 1), несмотря на то что степень их гомологии по первичной структуре лишь 47% [18].

Полученное нами предсказание вторичной структуры для белков S8 из *T. thermophilus* и *E. coli* с использованием алгоритмов, основанных на матричном аппарате Крамерса-Ванье для расче-

Таблица 2. Термодинамические характеристики* белков S8 из *T. thermophilus* (Tth) и *E. coli* (Eco) [15]

Белок	ΔG_{H_2O} , ккал/моль	[Мочевина] _{1/2} , М	m , ккал/(моль М)
S8 Tth	6.5	3.7	1.8
S8 Eco	2.3	2.6	0.9

* ΔG_{H_2O} – изменение свободной энергии стабилизации в отсутствие денатуранта; [мочевина]_{1/2} – молярная концентрация мочевины в точке перехода; m – мера “кооперативности”. Определены из анализа кривых 1 и 2 рис. 4 согласно методике [15].

та одномерной кооперативной системы [25 - 27], привело к следующему распределению структурированных участков в белках S8 из *T. thermophilus* и *E. coli*: α -спирали – 29 - 27%, β -структуры – 20 и 17% (рис. 3). Представленные результаты предсказания отличаются от данных, полученных с помощью спектроскопии КД, особенно по оценке содержания β -структуры. Подобные результаты, когда теоретически предсказанное содержание β -структуры было значительно ниже значений, определенных из анализа КД-спектров, были получены также и для других рибосомных белков [28].

Особый интерес представляет локализация в белке S8 РНК-связывающего мотива. Для ряда эукариотических РНК-связывающих белков, пространственная структура которых была определена на основе рентгеноструктурного анализа, было обнаружено, что РНК-связывающий мотив представляет собой β -лист из четырех антипараллельных β -тяжей, с одной стороны которого расположены две α -спирали [29]. Подобные структурные мотивы были обнаружены также для ряда рибосомных белков: для L30 [30] и L6 [31] из *Bacillus stearothermophilus*, для S6 из *T. thermophilus* [32] и для L7/L12 из *E. coli* [33]. В ряде работ было показано, что С-концевая часть белка S8 из *E. coli* играет важную роль в связывании 16S РНК [16, 17, 34]. Возможно, что предполагаемые β -структурные участки в С-концевой части белка участвуют в формировании РНК-связывающего домена. Планируемые в нашей группе кристаллографические исследования белка S8 из *T. thermophilus* позволят точнее локализовать детерминанту, ответственную за узнавание и связывание рРНК.

Спектры триптофановой флуоресценции белка S8 из *T. thermophilus* в нативном и полностью развернутом состоянии приведены на вставке к рис. 4. Видно, что в нативных условиях максимум флуоресценции находится на 333 нм, а при добавлении 7.5 М мочевины – на 350 нм. Этот эффект объясняется тем, что в нативном состоянии триптофановый остаток белка S8 экранирован от взаимодействия с растворителем. Добавление же денатуранта приводит к полному разворачиванию полипептидной цепи и, как следствие, к возрастанию сольватации триптофанового остатка.

Как следует из денатурационных кривых, полученных при исследовании индуцированного мочевиной конформационного перехода в белках S8 из *T. thermophilus* и *E. coli* (рис. 4), а также из соответствующих термодинамических параметров (табл. 2), белок S8 из *T. thermophilus* более устойчив к денатурации мочевиной, чем гомологичный белок из *E. coli* – денатурационная кривая существенно сдвинута в сторону больших концентраций денатуранта. Денатурация белка из термофильного источника протекает более кооперативно (табл. 2, параметр m , являющийся мерой

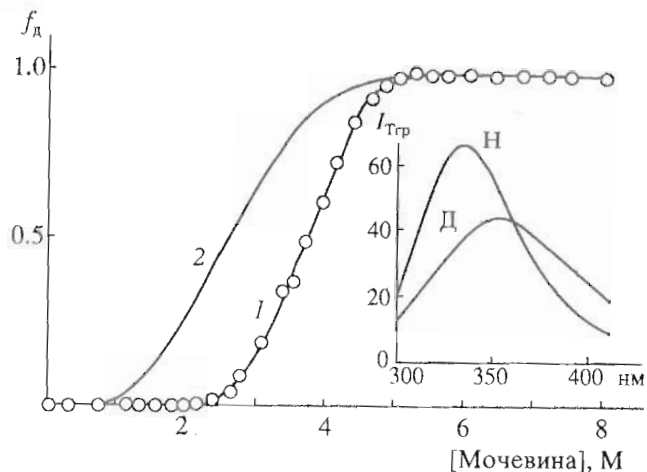


Рис. 4. Индуцированная мочевиной денатурация белков S8 из *T. thermophilus* (1) и *E. coli* (2) [15]. f_d – доля денатурированного состояния (см. “Экспер. часть”). На вставке приведены спектры триптофановой флуоресценции белка S8 из *T. thermophilus* в нативных условиях (H) и в полностью развернутом состоянии (7.5 М мочевины) (Д). I_{Trp} – интенсивность триптофановой флуоресценции.

быть денатурирован температурой с точкой полуперехода 57°C. В нашем же случае нагревание раствора белка до 94°C не приводило к заметным изменениям его структурных свойств.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали рестриктазы *Nde*I, *Xho*I (Boehringer–Mannheim, Германия), бактериальную щелочную фосфатазу (Promega, США), ДНК-лигазу фага T4 (New England Biolabs, США), *Taq*-ДНК-полимеразу (Pharmacia LKB, Швеция), изопропилтиогалактозид (Promega, США), питательные среды (Difko, США), CM-Toyorearl (Toyo Soda, Япония).

Рекомбинантные клоны BL21(DE3)/pET-S8, несущие плазмиду pET3-1 со встроенным геном белка S8, растили в среде M9ZB (10 г триптона, 5 г NaCl, 1 г NH₄Cl, 3 г KH₂PO₄, 6 г Na₂HPO₄, 4 г глюкозы и 1 мл 1 М MgSO₄ на 1 л воды) при 30°C до оптического поглощения $A_{600} = 0.8 - 1.0$. Затем добавляли изопропилтиогалактозид (IPTG) до конечной концентрации 0.5 - 1.0 мМ и клетки растили еще 3 ч. Затем клетки осаждали центрифугированием и уровень синтеза белка S8 проверяли электрофорезом в 15% ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия [35]. Синтез белка S8 составлял до 10% продуцируемого клеткой белка.

Выделение белка S8 из суперпродуцентного штамма. Отмытые клетки (4 - 5 г) разрушали механическим растиранием с Al₂O₃, затем добавляли к клеточному лизату 9 мл буфера А (0.1 М трис-НСl, pH 8.0, 0.1 мМ EDTA, 0.8 М NaCl). Последовательным центрифугированием клеточно-

го лизата в течение 10 мин при 13000 g и 3 ч при 100000 g освобождались от обломков клеточных стенок и рибосом. Пострибосомный лизат прогревали 20 мин при 70°C и центрифугировали 20 мин при 13000 g, после чего 6 мл супернатанта, содержащего белок S8, разводили 8 мл буфера Б (50 мМ Na-ацетат, pH 5.5) до конечной концентрации NaCl 0.3 М и затем наносили на колонку (0.9 × 16 см) с CM-Toyorearl, уравновешенным буфером Б, содержащим 0.3 М NaCl. Элюирование проводили линейным градиентом концентрации NaCl (0.3 → 0.9 М, общий объем 150 мл). Белок S8 элюируется с колонки при концентрации NaCl 0.75 М. К полученному препарату белка S8 добавляли сульфат аммония до конечной концентрации 3 М и хранили при 4°C. Выход составил до 8 - 12 мг белка из 4 - 5 г клеток BL21(DE3)/pET-tthS8.

Спектры кругового дихроизма (КД) получали на приборе Jasco-J600, используя образцы белка S8 (1 мг/мл) в PMF-буфере (1.0 мМ фосфат калия, pH 7.4; 300 мМ KF; 5 мМ β-меркаптоэтанол). Концентрацию белка S8 определяли по методу [36], при этом коэффициент поглощения белка S8 (λ 277.5 нм) $A_{1\text{см}}^{0.1\%}$ равен 0.55.

Для исследования индуцированной мочевиной денатурации белок S8 из *T. thermophilus* инкубировали 20 мин при комнатной температуре в PMF-буфере, содержащем определенное количество денатуранта. За денатурацией белковой молекулы следили по красному сдвигу максимума собственной флуоресценции триптофанового остатка [37].

f_d (доля денатурированного состояния) рассчитывалась согласно соотношению [38]

$$f_d = \frac{y_n - y}{y_n - y_d},$$

где y – исследуемый параметр (положение максимума флуоресценции) при данных условиях, а y_n и y_d – значение этого параметра для нативного и денатурированного состояний, которые определяются методом наименьших квадратов из исследования поведения кривой до и после конформационного перехода.

Выражаем благодарность О.В. Галзитской за помощь при расчете вторичной структуры белков S8 из *T. thermophilus* и *E. coli*, а также Н.Н. Кальнину за обсуждение результатов.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 94-04-12046а) и Международного научного фонда, учрежденного Дж. Соросом (грант № MTR000).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Held W.A., Ballou B., Mizushima S., Nomura M. // J. Biol. Chem. 1974. № 8. V. 249. P. 3103 - 3111.
2. Dean D., Yates J.L., Nomura M. // Nature. 1981. V. 289. P. 89 - 91.

3. Yates J.L., Arfsten A.E., Nomura M. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. № 4. P. 1837 - 1841.
4. Svensson P., Changchien L.-M., Craven G.R., Noller H.F. // J. Mol. Biol. 1988. V. 200. № 2. P. 301 - 308.
5. Muller R., Garrett R.A., Noller H.F. // J. Biol. Chem. 1979. V. 254. № 10. P. 3873 - 3878.
6. Zimmermann R.A., Singh-Bergmann K. // Biochim. et biophys. acta. 1979. V. 563. P. 422 - 431.
7. Mougel M., Allmang C., Eyermann F., Cachia C., Ehresmann B., Ehresmann C. // Eur. J. Biochem. 1993. V. 215. № 3. P. 787 - 792.
8. Thurlow D.L., Ehresmann C., Ehresmann B. // Nucl. Acids Res. 1983. V. 11. № 19. P. 6787 - 6802.
9. Wower I., Brimacombe R. // Nucl. Acids Res. 1983. V. 11. № 5. P. 1419 - 1437.
10. Zimmermann R.A., Singh-Bergmann K. // Biochim. et biophys. acta. 1979. V. 563. P. 422 - 431.
11. Gregory R.J., Zimmermann R.A. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 14. P. 5761 - 5776.
12. Mattheakis L., Nomura M. // J. Bacteriol. 1988. V. 170. № 10. P. 4484 - 4492.
13. Mattheakis L., Vu L., Sor F., Nomura M. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 448 - 452.
14. Gregory R.J., Cahill P.B.F., Thurlow D.L., Zimmermann R.A. // J. Mol. Biol. 1988. V. 204. № 2. P. 295 - 307.
15. Wu H., Wower I., Zimmermann R.A. // Biochemistry. 1993. V. 32. P. 4761 - 4768.
16. Wower I., Kowaleski M.P., Sears L.E., Zimmermann R.A. // J. Bacteriol. 1992. V. 174. P. 1213 - 1221.
17. Mougel M., Ehresmann B., Ehresmann C. // Biochemistry. 1986. V. 25. № 10. P. 2756 - 2765.
18. Reinbolt J., Eliseikina I., Sedelnikova S., Garber M., Ehresmann C., Ehresmann B. // J. Protein Chem. 1993. V. 12. № 1. P. 79 - 83.
19. Vysotskaya V., Tischenko S., Garber M., Kern D., Mougel M., Ehresmann C., Ehresmann B. // Eur. J. Biochem. 1994. V. 223. № 2. P. 437 - 445.
20. Studier F.W., Rosenberg A.H., Dunn J.J., Dubendorff J.W. // Meth. Enzymol. 1990. V. 185. P. 60 - 89.
21. Chen C.-H., Berns D.S. // Biophys. Chem. 1978. V. 8. P. 203.
22. Varly P.G., Pain R.H. // J. Mol. Biol. 1991. V. 220. P. 531.
23. Chen C.-H., Roth L.G., MacColl R., Berns D.S. // Biophys. Chem. 1994. V. 50. P. 313 - 321.
24. Provencher S.W., Glockner J. // Biochemistry. 1981. V. 20. № 1. P. 33 - 37.
25. Финкельштейн А.В. Пакет прикладных программ "ALB" для расчета вторичной структуры белков и полипептидов. Пушкино, 1982.
26. Pitsyn O.B., Finkelstein A.V. // Biopolymers. 1983. V. 22. P. 15 - 25.
27. Финкельштейн А.В., Ройтберг М.А. // Докл. на IV Всесоюзн. совещании "Математические методы для исследования полимеров и биополимеров". Препринт. Пушкино, 1985. 31 с.
28. Wittmann H.G. // Ann. Rev. Biochem. 1982. V. 51. P. 155 - 183.
29. Kenan D.J., Query C.C., Keene J.D. // Trends Biochem. Sci. 1991. V. 16. P. 214 - 220.
30. Wilson K.S., Appelt K., Badger J., Tanaka I., White S.W. // J. Mol. Biol. 1986. V. 83. P. 7251 - 7255.
31. Golden B.L., Ramakrishnan V., White S.W. // EMBO J. 1993. V. 12. № 13. P. 4901 - 4908.
32. Lindahl M., Svensson L.A., Liljas A., Sedelnikova S.E., Eliseikina I.A., Fomenkova N.P., Nevskaya N., Nikonov S.V., Garber M.B., Muranova T.A., Rykunova A.I., Amons R. // EMBO J. 1994. V. 13. № 6. P. 1249 - 1254.
33. Leijonmarck M., Eriksson S., Liljas A. // Nature. 1980. V. 286. P. 824 - 826.
34. Daya-Grosjean L., Reinbolt J., Pongs O., Garrett R.A. // FEBS Lett. 1974. V. 44. № 3. P. 253 - 256.
35. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680 - 685.
36. Jaenicke L. // Anal. Biochem. 1974. V. 61. P. 623 - 627.
37. Stryer L. // Science. 1966. V. 162. P. 526 - 540.
38. Aune K.C., Tanford C. // Biochemistry. 1969. V. 8. P. 4586 - 4590.

Structural Properties of Ribosomal Protein S8 from the Extreme Thermophile *Thermus thermophilus*

V. S. Vysotskaya*, U. F. Nasibullin, V. N. Uverskii, K. S. Vasilenko,
N. V. Narizhneva, and M. B. Garber

Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moskovskaya oblast', 142292 Russia

Abstract – The gene of ribosomal protein S8 from the extreme thermophile *Thermus thermophilus* was expressed in *E. coli* using the strain BL21(DE3) and vector pET3-1. A method of isolating this protein from the superproducing strain was developed, which makes it possible to obtain 8 - 12 mg of product from 1 l of culture. The secondary structure of protein S8 was determined by using CD spectroscopy. The protein was shown to be highly resistant to denaturants.

Key words: *Thermus thermophilus*; ribosomal protein; secondary structure.

* To whom correspondence should be addressed.