

УДК 577.112.083:577.112.4:577.29

## ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ СЛИТОГО БЕЛКА НА ОСНОВЕ ШАПЕРОНА GroEL ИЗ *Thermus thermophilus* ИНГИБИТОРОМ ПРОТЕАЗ AEBSF

© 2019 г. В. А. Зенин<sup>1,2</sup>, Л. А. Новикова<sup>2</sup>, М. С. Юркова<sup>1,2</sup>, О. И. Саввин<sup>1</sup>,  
К. А. Куров<sup>2</sup>, А. Н. Фёдоров<sup>1,2</sup>, \*

<sup>1</sup>Российский университет Дружбы народов,  
Москва, 117198 Россия

<sup>2</sup>Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”  
Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

\*e-mail: a.fedorov@fbras.ru

Поступила в редакцию 14.05.2019 г.

После доработки 03.06.2019 г.

Принята к публикации 20.06.2019 г.

Получение функциональных полноразмерных белков чаще всего подразумевает использование ингибиторов протеаз. Зарегистрированы и описаны модификации химерного белка на основе шаперона GroEL *Thermus thermophilus*, вызванные взаимодействием с необратимым ингибитором сериновых протеаз класса сульфонилфторидов – 4-(2-Аминоэтил)-бензолсульфонилфторид-гидрохлорида (AEBSF) в ходе пробоподготовки. Полученные формы белка после предварительной очистки были изучены методом MALDI-TOF-TOF с трипсинолизом из геля для идентификации. Показано наличие модификаций аминокислотных остатков тирозина и лизина, а также зависимость модификации от степени доступности аминокислотного остатка тирозина.

**Ключевые слова:** получение белков, AEBSF, GroEL, ингибиторы протеаз, химические модификации белка

**DOI:** 10.1134/S0555109919060163

При выделении и очистке белков, особенно растворимых, распространено использование ингибиторов протеаз для предотвращения деградации белка. Ингибиторы протеаз представляют собой высоко активные соединения, способные влиять на структуру и дальнейшую очистку белков.

4-(2-аминоэтил)-бензолсульфонилфторид-гидрохлорид (AEBSF) по своей природе является высокореакционноспособным субстратом в реакции нуклеофильного замещения [1, 2], как и другие сульфонилфториды [3]. Поскольку механизм действия сериновых протеаз включает в себя нуклеофильную атаку депротонированного атома кислорода аминокислотного остатка серина на пептидную связь, то высокая реакционная способность серина в активном центре протеазы обуславливает селективность сульфонилфторидов [4, 5]. В определенных условиях селективность подобных реагентов может снижаться [6], что является широко известным фактом [7] ([http://bioportal.bioontology.org/ontologies/PSIMOD/?p=classes&conceptid=http%3A%2F%2Fpurl.obolibrary.org%2Fobo%2FMOD\\_00596](http://bioportal.bioontology.org/ontologies/PSIMOD/?p=classes&conceptid=http%3A%2F%2Fpurl.obolibrary.org%2Fobo%2FMOD_00596))

Реагенты сульфонилфторидной природы также используются для внесения меток в активные центры ферментов. В таких случаях селективность может быть сдвинута в пользу определенного центра путем подбора пространственной структуры или других свойств реагента. Используемые концентрации близки к концентрациям AEBSF, применяемым в качестве ингибитора, а время воздействия исчисляется несколькими часами [3].

В то же время в значительной части исследований в качестве ингибирующего агента используются сложные смеси ингибиторов различной природы и механизма действия, как например, сOmplete™ фирмы “Roche” (Швейцария) с закрытым составом набора ингибиторов протеаз.

В ходе рутинных работ по получению и очистке рекомбинантного белка с применением ингибитора протеаз AEBSF был обнаружен факт модификации аминокислотных остатков данным реагентом.

Цель работы – определение степени модификации белка и поиск факторов, влияющих на вероятность модификации аминокислотного остатка тирозина и/или лизина.



Рис. 1. Выравнивание последовательности целевого белка относительно дикого типа шаперона.

## МЕТОДИКА.

**Экспрессия целевого слитого белка в *E. coli***  
 Аминокислотная последовательность белка на основе GroEL из *Thermus thermophilus* с введенной последовательностью пептида полифемузина-1 (SwissProt P14215.1), представлена на рис. 1 в виде выравнивания с диким типом GroEL.

Ген целевого белка был химически синтезирован, секвенирован (“GenScript”, США) и клонирован в бицистронную плазмиду pETDuet™-1 (“Merck”, Германия) совместно с синтетическим геном GroES *T. thermophilus*. Gene ID:3168828 (“GenScript”, США) экспрессировали в штамме BL21(DE3) pLysE *Escherichia coli* (“ThermoFisher”, США).

Культивирование штамма *Escherichia coli* BL21(DE3) проводили согласно рекомендациям производителя в среде LB (250 мл) в конических стеклянных колбах объемом 1 л при 37°C и интен-

сивном перемешивании на шейкере-инкубаторе ES-20/60 (“Bio-San”, Латвия). В среду добавляли ампициллин, в концентрации рекомендованной производителем плазмиды. Для индукции белкового синтеза в питательную среду вносили ИПТГ в конечной концентрации 0.4 мМ после достижения оптической плотности 0.5 при длине волны 600 нм. Через 3 ч после начала индукции клетки отделяли центрифугированием при 4000 g в течение 17 мин при 4°C.

**Лизис клеток *E. coli* экспрессионного штамма.**  
 Буфер для лизиса клеток имел следующий состав: PBS, (“Amresco”, США); 1 мМ АЕBSF. Лизис проводили в ледяной бане, разрушенные клетки ресуспендировали в буфере для лизиса (“Appli-Chem”, Германия) в соотношении 1 : 8 – масса кл. : масса буфера, обрабатывали ультразвуком 10 с при амплитуде 5 мкм с интервалом 60 с 6 раз в Soniprep 150 (“MSE”, Великобритания). Полу-

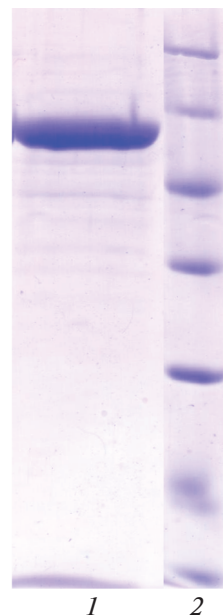
ченный гомогенат центрифугировали при 16000 g 40 мин при 4°C.

**Предварительная очистка лизата.** Полученный супернатант разбавляли в 20 раз буфером для лизиса, прогревали на водяной бане в стеклянном стакане при температуре 62°C в течение 7 мин при интенсивном перемешивании. Затем стакан переносили в ледяную баню и продолжали перемешивание для охлаждения до 5°C. Полученный раствор центрифугировали при 16000 g 40 мин при 4°C.

**Очистка целевого белка GroEL из *Thermus thermophilus* с введенной последовательностью пептида полифемузина-1.** К полученному в ходе предварительной очистки лизата супернатанту добавляли сухую мочевины (“Amresco”, США) до 6 М концентрации и 0.1%-ную трифторуксусную кислоту (ТФУ) для ВЭЖХ (“Merck”, Германия). полученный раствор фильтровали через мембранный фильтр Millex PVDF с размером пор 0.45 мкм (“Merck Millipore”, США). Колонку размером 150 × 4.6 мм с носителем Nucleosil C4 5 мкм, 300 Å (“Macherey-Nagel”, Германия) уравнивали 6 М раствором мочевины с 0.1%-ным ТФУ и наносили образец. Колонку промывали от мочевины 0.1%-ным раствором ТФУ в 5%-ном растворе ацетонитрила для ВЭЖХ (“Panreac”, Испания) и проводили элюцию градиентом концентрации ацетонитрила с 0.1%-ной ТФУ до 95%-ного содержания ацетонитрила. Полученные фракции лиофилизовали, растворяли в 4-кратном буфере для нанесения образцов для электрофореза и проводили электрофорез белков по Лэммли. Гель окрашивали кумасси R250 (“Amresco”, США) по стандартному протоколу (рис. 2). Использовали маркеры молекулярной массы Unstained Protein MW Marker (“Thermo Fisher Scientific”, США).

**Триптический гидролиз белка в полиакриламидном геле.** Триптический гидролиз белка в ПАГ с ДДС-На, окрашенного кумасси R250, проводили следующим образом: кусочек геля размером 3–4 мм<sup>3</sup> дважды промывали для удаления красителя 100 мкл 40%-ного раствора ацетонитрила в 0.1 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> в течение 20 мин при 37°C. После удаления раствора, для дегидратации геля добавляли 100 мкл ацетонитрила. После удаления ацетонитрила и высушивания геля добавляли 3.5 мкл раствора модифицированного трипсина (“Promega”, США) в 0.05 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> с концентрацией 15 мкг/мл. Гидролиз проводили в течение 3 ч при 37°C, затем к раствору добавляли 5.25 мкл 0.5%-ной ТФУ в 50%-ном растворе водного ацетонитрила и тщательно перемешивали. Раствор (супернатант) использовали для получения MALDI-масс-спектров.

**Подготовка образцов для масс-спектрометрии.** Для подготовки образцов на мишени смешивали по 1.5 мкл раствора супернатанта, полученного при триптическом гидролизе, и 0.5 мкл раствора



**Рис. 2.** Электрофорез очищенного GroEL из *Thermus thermophilus* с введенной последовательностью пептида полифемузина-1. 1 – очищенный белок, 2 – стандарты молекулярной массы: 14, 18, 25, 35, 45, 67 и 116 кДа.

2,5-дигидроксibenзойной кислоты (“Aldrich”, США) 10 мг/мл в 20%-ном водном ацетонитриле, 0.5% ТФУ. Смесь высушивали на воздухе.

**MALDI-TOF/TOF-масс-спектрометрия.** Масс-спектры образцов получали на MALDI-времяпролетно-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex-treme (“Bruker”, Германия), оснащенном УФ лазером (Nd) в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона. Точность измеренных моноизотопных масс после докалибровки по пикам автолиза трипсина составила 0.005% (50 ppm). Спектры получали в диапазоне масс 500–6500 *m/z*, выбирая мощность лазера оптимальную для достижения наилучшего разрешения. Для получения спектров фрагментации использовали тандемный режим прибора, погрешность измерения фрагментных ионов была не более 2.0 Да.

**Идентификация белков.** Белки идентифицировали при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com). Масс-спектры были обработаны с помощью программного пакета FlexAnalysis 3.3 (“Bruker Daltonics”, Германия). При помощи программы Mascot (опция “пептидный фингерпринт”) проводили поиск в локальной базе данных и базе данных NCBI среди белков всех организмов с указанной выше точностью, с учетом возможного окисления метионинов кислородом воздуха, возможной модификации цистеинов акриламидом геля, аминоэтилбензолсульфонилования тирозина и лизина. Кандидатные белки, имеющие па-

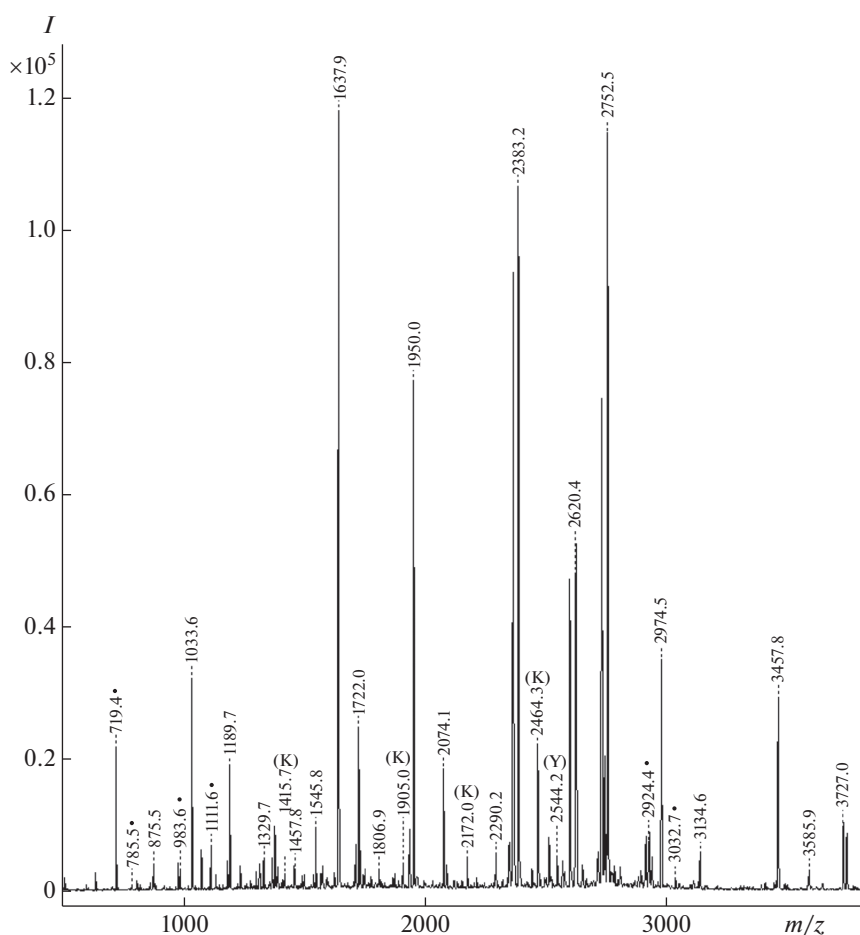


Рис. 3. Масс-спектр продуктов трипсинолиза белка. Нецелевые пептиды отмечены черной точкой, модифицированные пептиды отмечены символом модифицированной аминокислоты.

раметр достоверности score >41 в локальной базе данных считали определенными надежно ( $p < 0.05$ ). Также были получены спектры фрагментации отдельных пептидов. С использованием программного обеспечения Biotoools 3.2 ("Bruker Daltonics", Германия) проведен поиск по объединенным MS + MS/MS результатам. По полученным спектрам фрагментации были построены предполагаемые аминокислотные последовательности.

**Отбор пептидов для включения в расчет корреляции.** Было проведено 6 экспериментов протеолиза из геля, результатом каждого являлся MS + MS/MS спектр и отчет о поиске в базе данных. Для дальнейшей работы были отобраны пептиды, соответствующие последовательности целевого белка и отмеченные в отчете Mascot, как максимально правдоподобные. Набор пептидов с данными о наличии модификации был выровнен относительно последовательности целевого белка, в которую были внесены отметки о количестве модифицированных (1) и интактных (0) пептидов, соответствующих каждой модифицируемой аминокислоте.

**Расчет площади поверхности, доступной для растворителя.** Файл, содержащий структуру Gro-

EL *T. thermophilus* был загружен из Protein Data Bank по идентификатору 4V4O [8]. Для расчета использовали цепь A и стандартный скрипт ([https://pymolwiki.org/index.php/Get\\_Area](https://pymolwiki.org/index.php/Get_Area)).

**Расчет корреляции площади поверхности аминокислотного остатка, доступной для растворителя и вероятности его модификации.** Для расчета использовали два подхода. При первом подходе рассчитывали процент модификации каждого аминокислотного остатка тирозина и лизина, затем процент модификации и соответствующая ему площадь поверхности были переданы на вход функции `statsmodels.stats.weightstats.DescrStatsW.corrcoef` статистического программного модуля `Statmodels 0.10.0` для Python (<https://www.statsmodels.org/dev/generated/statsmodels.stats.weightstats.DescrStatsW.corrcoef.html>). Дополнительно были переданы количества обнаруженных пептидов для каждой аминокислоты в качестве фактора значимости. Расчет проводился для лизина и тирозина вместе и по отдельности.

Второй подход состоял в использовании функции `scipy.stats.pointbiserialr` программного модуля `Scipy 1.3.0` для Python [9]. В этом случае на вход

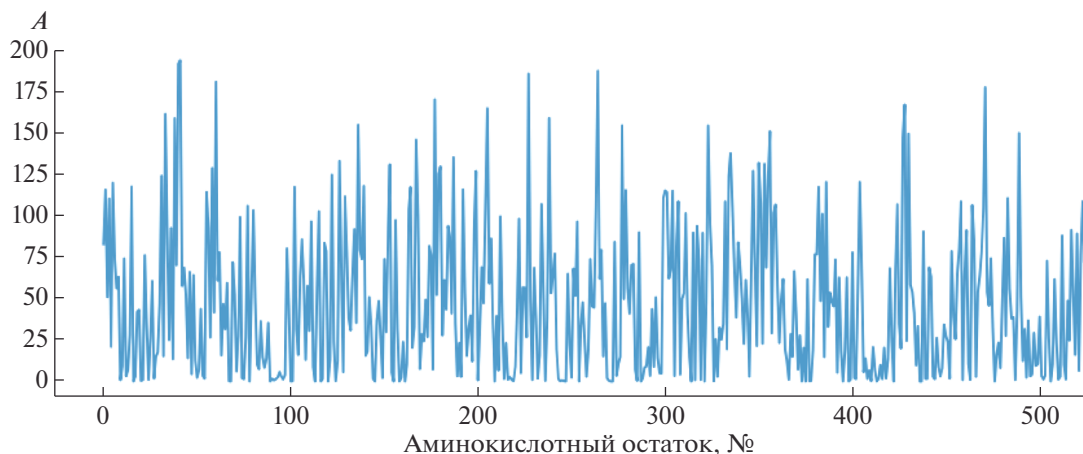


Рис. 4. Диаграмма площади поверхности аминокислотных остатков белка GroEL, доступной для растворителя.

функции передавался случай успеха (1) или неудачи (0) модификации и соответствующая ему доступная для растворителя поверхность аминокислоты.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В работе использовали ингибитор сериновых протеиназ AEBSF, как растворимую и стабильную альтернативу другому ингибитору PMSF, добавляя 1 мМ в буфер для лизиса на основе PBS. Нагревание является стандартным этапом предварительной очистки многих белков, тем не менее, при подтверждении подлинности полученных белков методом MALDI-TOF-TOF ранее не были обнаружены модификации AEBSF (данные не представлены).

Уровень экспрессии целевого белка на основе GroEL из *Thermus thermophilus* с введенной последовательностью пептида полифемузина-1 согласно данным денситометрии геля ПАГ с Na ДДС составлял 150–200 мг/л среды.

В работе было использовано пятиминутное прогревание, что могло значительно ускорить модификацию, однако стандартной рекомендацией производителей является использование ингибиторов протеаз (“The Complete Guide for Protease Inhibition”, “Roche”) на протяжении всего процесса выделения и очистки, что, в случае длительных процедур очистки, может быть сопоставимым по воздействию на белок процедуры прогрева. Полученные в ходе работ по подтверждению подлинности масс-спектры (рис. 3) показали высокий уровень модификации целевого белка по лизину – 13.5% и тирозину – 38.3%. На точность определения степени модификации могла повлиять разница в ионизируемости модифицированных и немодифицированных пептидов.

При подсчете доступной для растворителя поверхности [10] был получен профиль для всей мо-

лекулы (рис. 4). После выравнивания, подсчета модификаций и расчета корреляции первым методом было обнаружено, что корреляция модификаций лизина составляла 0.03 (отсутствие связи с доступной для растворителя поверхностью аминокислоты), модификаций тирозина 0.7 (значительный уровень корреляции). При использовании первой методологии расчетов было трудно определить статистическую значимость полученных результатов. Именно по этой причине была найдена и использована вторая методология.

Результаты второй методологии расчетов – отсутствие связи для лизина и низкий уровень корреляции – 0.25 – для тирозина. Тем не менее, статистическая значимость  $p = 0.049$  позволяла предположить высокую вероятность наличия такой зависимости.

На рис. 5 показаны остатки тирозина, имеющие различную доступность для растворителя. Полученные данные позволяют утверждать, что доступность для растворителя не влияла на вероятность модификации аминокислотного остатка.

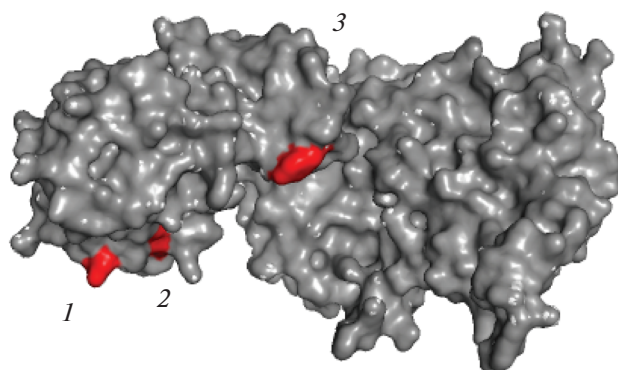


Рис. 5. Поверхность белка GroEL доступная для растворителя с отмеченными аминокислотными остатками тирозина: 1 – 202 (100% модифицировано), 2 – 198 (17%), 3 – 359 (47%).



Разница в результатах для лизина и тирозина может быть обусловлена наличием заряда или подвижностью боковой цепи аминокислотного остатка лизина.

Работа была выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, уникальный идентификатор проекта RFMEFI57517X0151

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Dentan C., Tselepis A.D., Chapman M.J., Ninio E.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1996. V. 1299. № 3. P. 353–357.
2. *Powers J.C., Asgian J.L., Ekici Ö.D., James K.E.* // *Chem. Rev.* 2002. V. 102. № 12. P. 4639–4750.
3. *Narayanan A., Jones L.H.* // *Chem. Sci.* 2015. V. 6. № 5. P. 2650–2659.
4. *Han Q., Robinson H., Li J.* // *Biochem. J.* 2012. V. 446. № 2. P. 253–260.
5. *Manzetti S.* // *Masters by Research Thesis, Queensland University of Technology.* 2005. P. 1–175.
6. *James G.T.* // *Anal. Biochem.* 1978. V. 86. № 2. P. 574–579.
7. *Schuchard M.D., Mehig R.J., Cockrill S.L., Lipscomb G.T., Stephan J.D., Wildsmith J., Valdes-Camin R., Kappel W.K., Rai A.J., Scott G.B.I.* // *BioTechniques.* 2005. V. 39. № 2. P. 239–247.
8. *Shimamura T., Koike-Takeshita A., Yokoyama K., Masui R., Murai N., Yoshida M., Taguchi H., Iwata S.* // *Structure.* 2004. V. 12. № 8. P. 1471–1480.
9. *Kornbrot D.* // *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online* / Ed. N. Balakrishnan et al. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2014. P. 6227.
10. *Klenin K.V., Tristram F., Strunk T., Wenzel W.* // *J. Comput. Chem.* 2011. V. 32. № 12. P. 2647–2653.

## Chemical Modification of Chaperone GroEL *T. thermophilus* Based Fused Protein by AEBSF Protease Inhibitor

V. A. Zenin<sup>a, b</sup>, L. A. Novikova<sup>b</sup>, M. S. Yurkova<sup>a, b</sup>, O. I. Savvin<sup>a</sup>,  
K. A. Kurov<sup>b</sup>, and A. N. Fedorov<sup>a, b, \*</sup>

<sup>a</sup>*Peoples' Friendship University of Russia,  
Moscow, 117198 Russia*

<sup>b</sup>*Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences",  
Moscow, 119071 Russia*

\**e-mail: a.fedorov@fbras.ru*

Received May 14, 2019; revised June 03, 2019; accepted June 20, 2019

Production of functional full-size proteins is often involving the use of protease inhibitors. Modifications due to the interaction of the protein with the common, irreversible inhibitor of the sulfonyl fluoride class of 4-(2-amino-ethyl)-benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF) were registered and described during the sample preparation. The obtained forms of the protein after preliminary purification were studied by the MALDI-TOF-TOF method with trypsinolysis from a gel. The dependence of the presence of a modification of the amino acid residue of tyrosine on the degree of its availability for the reaction mixture is shown.

**Keywords:** protein production, AEBSF, GroEL, protease inhibitors, protein chemical modifications