



УДК 547.962.04

ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ  
ЦИСТЕИНОВЫХ ОСТАТКОВ БЕЛКА ОБОЛОЧКИ ФАГА MS2  
НА ОБРАЗОВАНИЕ РЕПРЕССОРНОГО КОМПЛЕКСА С РНК MS2

*Берзинь В. М., Циманис А. Ю., Грен Э. Я.*

*Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига*

*Загурски В., Шафрански П.*

*Институт биохимии и биофизики Польской Академии наук, Варшава*

В нативной молекуле белка оболочки фага MS2 действию дисульфидных реагентов (5,5'-дитио-бис(2-нитробензойная кислота), 4,4'-дитиодипиридин) при pH 8,0 и 4-хлор-7-нитробензо-2-окса-1,3-диазола (pH 3,2) подвергается только одна SH-группа цистеинового остатка Cys-46, что приводит к полной потере способности белка специфически связывать РНК MS2. Модификация 4,4'-дитиодипиридином при pH 3,2 доступны оба цистеиновых остатка Cys-46 и Cys-101 белка оболочки, причем первой с реагентом взаимодействует SH-группа Cys-46. Этого достаточно для инактивации белка. Следовательно, SH-группа Cys-46 белка оболочки фага MS2 имеет важное значение при образовании репрессорного комплекса с РНК MS2.

В процессе репликации белок оболочки РНК-содержащих бактериофагов помимо своей структурной функции образования фаговой капсиды участвует также в репрессии трансляции цистрона репликазы. Репрессорное действие белка оболочки осуществляется путем его избирательного присоединения к короткой последовательности в начале цистрона репликазы фаговой РНК, что препятствует образованию рибосомного комплекса инициации трансляции [1].

Одним из подходов в изучении данного белково-нуклеинового взаимодействия является локализация важных для комплексообразования остатков аминокислот белка оболочки.

В настоящее время белки оболочки фагов серологической группы I (MS2, R17, f2) изучены достаточно подробно. Установлена их аминокислотная последовательность [2—4], рассчитана вторичная структура [5], исследовано пространственное расположение некоторых остатков аминокислот и их роль в образовании капсиды [6—8]. Известно, что свободные SH-группы обоих экспонированных остатков Cys-46 и Cys-101 белка оболочки не участвуют в образовании дисульфидных мостиков как в самой молекуле, так и между молекулами в капсиде фага [7, 8]. Однако, с другой стороны, окисление SH-групп приводит к агрегации белка оболочки и нарушению его репрессорной функции [9].

---

Принятые сокращения: DTNB — 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойная кислота), DTDP — 4,4'-дитиодипиридин, NBD-Cl — 4-хлор-7-нитробензо-2-окса-1,3-диазол.

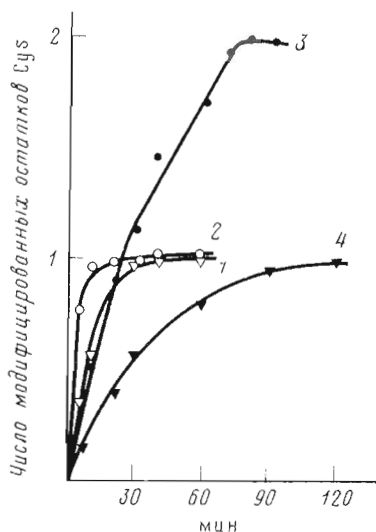


Рис. 1

Рис. 1. Модификация белка оболочки MS2 при 20° С с помощью DTNB (1), DTDB (2, 3) и NBD-Cl (4) в 0,1 М фосфатном буфере, pH 8,0 (1, 2), и в 1 мМ CH<sub>3</sub>COOH, pH 3,2 (3, 4)

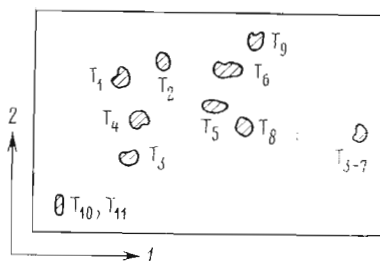


Рис. 2

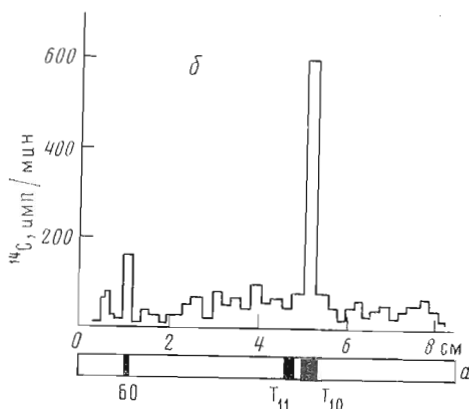


Рис. 3

Рис. 3. Электрофоретическое разделение в 17,5% полиакриламидном геле [16] триптических пептидов T<sub>10</sub> и T<sub>11</sub> модифицированного NBD-Cl белка оболочки MS2. БО – белок оболочки. Анализ в УФ-свете (а) и радиометрический (б)

В настоящей работе методом химической модификации исследована роль сульфгидрильных групп цистеиновых остатков белка оболочки фага MS2 в образовании репрессорного комплекса с РНК MS2.

В качестве тиоловых реагентов были использованы DTNB, DTDP и NBD-Cl. Учитывая необратимую инактивацию белка оболочки при значениях pH ≥ 9,0, а также в присутствии денатурирующих агентов (мочевина, гуанидин·HCl), реакции модификации проводили в условиях, когда немодифицированный белок оболочки сохраняет свою активность в комплексе-образовании с РНК.

При исследовании реакции белка оболочки MS2 с дисульфидными реагентами DTNB и DTDP было установлено, что степень модификации SH-групп цистеиновых остатков зависит главным образом от pH реакционной смеси. Как видно из рис. 1, продолжительная инкубация белка оболочки MS2 с 6-кратным избытком DTNB или DTDP в 0,1 М фосфатном буфере (pH 8,0) приводит к модификации лишь одной SH-группы. При использовании 15-кратного мольного избытка реагентов или предварительной денатурации белка оболочки 8 М мочевиной степень модификации не повышается, однако реакция протекает гораздо быстрее. DTDP выгодно отличается от DTNB тем, что реагирует с SH-группами белков в широком интервале pH от 1 до 8 [10] и в 1 мМ уксусной кислоте (pH 3,2) дейст-

**Влияние модификации SH-групп остатков цистеина белка оболочки MS2 на его активность в образовании репрессорного комплекса с РНК MS2**

Белок оболочки	Количество остатков Cys, моль/моль		Активность в образовании комплекса с РНК MS2, % *
	свободного	модифицированного	
Нативный	2	—	100
Модифицированный при pH 8,0			
DTNB, 45 мин	1	1	1,3
DTDP, 60 мин	1	1	2,4
при pH 3,2			
DTDP, 25 мин	1	1	11,4
DTDP, 80 мин	—	2	0,42
NBD-Cl, 90 мин	1	1	2,9

\* В условиях комплексообразования (см. «Экспериментальную часть») с немодифицированным белком оболочки связываются 3 моль РНК MS2.

вию DTDP доступны SH-группы обоих цистеиновых остатков белка оболочки MS2, хотя скорости их модификации различаются (рис. 1, 2, 3). NBD-Cl является не столь специфичным реагентом и в зависимости от условий проведения реакций может взаимодействовать как с NH<sub>2</sub>- и OH-, так и с SH-группами аминокислотных остатков [11]. С SH-группами NBD-Cl избирательно реагирует в кислой среде [12]. Как видно, в отличие от модификации белка оболочки MS2 с помощью DTDP в реакции с NBD-Cl при pH 3,2 участвует всего один остаток цистеина, причем модификация протекает в 2—3 раза медленнее (рис. 1, 4).

После завершения реакций модифицированный белок оболочки MS2 отделяли от реагента гель-фильтрацией на сефадексе G-25 и исследовали его активность в комплексообразовании с РНК MS2.

Способность нативного и модифицированного белка оболочки связывать РНК изучена методом фиксации комплексов белка с меченой РНК на нитроцеллюлозных мембранных фильтрах. Представленные в таблице данные свидетельствуют о том, что независимо от реагента модификация SH-группы только одного, более доступного цистеинового остатка белка оболочки MS2 вызывает практически полную потерю активности белка в образовании комплекса с РНК MS2. С другой стороны, непродолжительная обработка модифицированного дисульфидными реагентами белка оболочки избытком дитиотрепта на 40—60% восстанавливает его способность к связыванию с РНК, что указывает на незначительные конформационные изменения молекулы белка, происшедшие в процессе модификации.

Поскольку продукты модификации — производные по SH-группам, особенно NBD-производные, — неустойчивы и разлагаются в процессе трипсинолиза и разделения пептидов [11], для локализации модифицированного цистеинового остатка в молекуле белка оболочки нами был использован косвенный метод, заключающийся во введении радиоактивной метки по второй, свободной SH-группе (карбоксиметилирование <sup>14</sup>C-меченой подуксусной кислотой) с последующим гидролизом белка трипсином и разделением пептидов в двумерной системе на бумаге или дополнительно электрофорезом в полиакриламидном геле. Пептиды обнаруживали в УФ-свете после обработки фингерпринта флуорескамином (рис. 2) и идентифицировали сравнением их распределения с известной пептидной картой триптического гидролизата белка оболочки фага MS2 [13].

В некоторых случаях (для идентификации пептидов T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>4</sub>, T<sub>6</sub> с помощью дансильного метода Эдмана) проводили дополнительный анализ N-концевых последовательностей пептидов.

Как известно, в результате триптического гидролиза белка оболочки MS2 образуются 11 пептидов, в состав двух пептидов T<sub>4</sub> и T<sub>10</sub> входят остатки цистеина Cys-46 и Cys-101 соответственно [2]. Анализ распределения радиоактивности показал, что пептид T<sub>4</sub> на пептидных картах модифицированных белков не содержит метки и во всех случаях радиоактивность обнаруживается во фракции нерастворимых в стартовом буфере двумерной системы пептидов T<sub>10</sub> и T<sub>11</sub>. Для их разделения был применен электрофорез в 17,5% полиакриламидном геле, содержащем 0,1% додецилсульфат натрия [14]. Пептиды, обработанные перед электрофорезом флуорескаминам, локализовали в геле по флуоресценции зон и определяли их радиоактивность (рис. 3). Поскольку основная <sup>14</sup>C-радиоактивность в геле сконцентрирована во флуорескамин-положительной зоне, соответствующей по подвижности пептиду T<sub>10</sub>, полученные данные свидетельствуют о том, что <sup>14</sup>C-подуксусной кислотой в модифицированном белке оболочки MS2 карбоксиметилирована SH-группа остатка Cys-101. При модификации белка оболочки NBD-Cl, DTNB и DTDP были получены аналогичные результаты.

Таким образом, действию дисульфидных реагентов (рН 8,0) и NBD-Cl в нативном белке оболочки MS2 доступна SH-группа цистеинового остатка Cys-46, которая, очевидно, имеет важное значение для связывания белка оболочки с РНК MS2.

Причиной недоступности SH-группы Cys-101 в нейтральной и слабосредной среде является, по нашему мнению, электростатическое действие отрицательно заряженных соседних аминокислотных остатков Asp-100 и Glu-102. В кислой среде, когда карбоксильные группы Asp и Glu протонированы, DTDP модифицирует обе SH-группы.

### Экспериментальная часть

В работе использовали сефадекс G-25 (Pharmacia, Швеция), бумагу 3MM (Whatman, Англия), 24-миллиметровые нитроцеллюлозные фильтры BA85 (Schleicher und Schüll, ФРГ), 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойную кислоту) (Gee Lawson, Англия), 4-хлор-7-нитробензо-2-окса-1,3-диазол (Pierce, США), 4,4'-дитиодипиридин (Serva, ФРГ), под[2-<sup>14</sup>C]уксусную кислоту (уд. акт. 57 мКи/ммоль, Amersham, Англия), гуанидин·НСl (Schwarz-Mann, США), реактивы для электрофореза в полиакриламидном геле (Reanal, ВНР), трипсин (ТРСК-обработанный, Worthington, США), флуорескамин отечественного производства, набор Dns-производных аминокислот (Serva, ФРГ). Все остальные реактивы имели квалификацию ос.ч. или х.ч.

Спектры поглощения снимали на спектрофотометрах «Specord UV VIS» (ГДР) и «Pye Unicam SU 1800» (Англия).

Радиоактивность измеряли в жидкостном сцинтилляционном спектрометре «Tri Carb 3380» (Packard, США).

*Модификация белка оболочки (при 20°). DTNB:* к раствору белка оболочки (0,2 мг/мл) в 0,1 М фосфатном буфере, рН 8,0, содержащем 1 мМ EDTA, при перемешивании прибавляли спиртовой раствор DTNB (4 мг/мл) до 6-кратного мольного избытка по отношению к общему количеству остатков цистеина в белке и продолжали инкубацию. Количество модифицированных SH-групп белка оболочки рассчитывали по приросту оптического поглощения образующегося аниона нитробензоата ( $\epsilon_{412}$  13 600 [15]).

*DTDP:* к раствору (0,2 мг/мл) белка оболочки в 0,1 М фосфатном буфере (рН 8,0), 1 мМ EDTA или в 1 мМ уксусной кислоте (рН 3,2) при перемешивании добавляли 6-кратный мольный избыток раствора DTDP в этаноле (2,2 мг/мл). Степень модификации белка оболочки рассчитывали по приросту оптического поглощения образующегося 4-тиопиридона ( $\epsilon_{324}$  19 800 [10]).

*NBD-Cl*: модификацию проводили добавлением к раствору (0,2 мг/мл) белка оболочки в 1 М уксусной кислоты (рН 3,2) спиртового раствора *NBD-Cl* (15 мг/мл) до 20-кратного мольного избытка. Число модифицированных SH-групп белка определяли по оптическому поглощению продукта реакции —S-NBD ( $\epsilon_{420}$  13 000 [11]).

*Комплексообразование модифицированного белка оболочки с РНК MS2*. Модифицированный белок отделяли от непрореагировавшего агента гель-фильтрацией 1 мл реакционной смеси на сефадексе G-25 (1,2×25 см), уравновешенном соответствующим буфером. Комплексообразование проводили в 100 мкл 0,1 М буфера, трис-HCl, рН 7,5, содержащего 0,08 М KCl и 0,01 М MgCl<sub>2</sub> (буфер ТМК). Обычно 10 пмоль [<sup>14</sup>C]РНК MS2 (уд. акт. 20 100 имп/мин/пмоль) инкубировали 10 мин при 2°С с 6—7-кратным мольным избытком белка оболочки. Реакционную смесь разбавляли до 1 мл холодным буфером ТМК и немедленно фильтровали через нитроцеллюлозный мембранный фильтр. Фильтры промывали дважды по 1 мл буфера ТМК, высушивали и вносили в толуоловый сцинтиллятор для измерения радиоактивности.

*Карбоксиметилирование модифицированного белка оболочки и триптический гидролиз*. Объем реакционной смеси, использовавшейся для получения препаративных количеств модифицированного белка, составлял 100 мл. По окончании реакции белок оболочки осаждали 2,5 объемами этанола. Раствор выдерживали 12 ч при —20°С. Осадок отделяли центрифугированием, белок дважды переосаждали этанолом из раствора в 0,1 М буфере трис-HCl (рН 8,5), 8 М гуанидин·HCl (буфер А) и лиофилизировали. Раствор 28 мг белка в 2 мл буфера А продували азотом. Затем при перемешивании прибавляли 10,6 мг <sup>14</sup>C-меченой изодусусной кислоты (уд. акт. 1,9 МКл/ммоль), выдерживали 1 ч при 20°С и карбоксиметилированный белок осаждали этанолом. Дважды переосажденный белок суспендировали в 3 мл 0,1 М раствора NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, добавляли трипсин (соотношение фермент — субстрат 1 : 33) и гидролизовали 4 ч при 37°С. По окончании гидролиза смесь подкисляли до рН 3,0 и лиофильно высушивали.

*Получение пептидных карт*. 150—200 мкг смеси растворимых триптических пептидов в 20 мкл электродного буфера наносили на лист (68×50 см) бумаги Whatman 3ММ. Электрофорез проводили 1 ч при 3000 В в пиридин-ацетатном буфере, рН 3,5. Бумагу высушивали и хроматографировали восходящим способом в перпендикулярном направлении в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — пиридин — вода (15 : 3 : 10 : 12). Пептиды обнаруживали в УФ-свете после обработки бумаги 0,01% раствором флуорескамина в ацетоне. Флуорескамин-положительные пятна вырезали с листа бумаги и просчитывали их радиоактивность в толуольном сцинтилляторе. Для анализа аминокислотной последовательности найденные пептиды элюировали с бумаги 1 М уксусной кислотой.

*N-Концевые аминокислотные последовательности пептидов определяют ручным методом Эдмана (дансильная модификация)* [16].

*Электрофорез в 17,5% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (DCH)*. Анализ нерастворимых триптических пептидов T<sub>10</sub> и T<sub>11</sub> проводили по методике, описанной в работе [16]. На гель наносили 10—12 мкг (~5000 имп/мин) смеси пептидов, меченой флуорескамином. Электрофорез проводили в течение 5 ч. Зоны пептидов T<sub>10</sub> и T<sub>11</sub> локализовали в УФ-свете. Далее гель фракционировали по 1 мм, радиоактивный материал экстрагировали 0,4 мл 0,5% додецилсульфата натрия в течение 48 ч при 37°С и просчитывали в диоксановом сцинтилляторе.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Bernardi A., Spahr P.-F. Nucleotide sequence at the binding site for coat protein on RNA of bacteriophage R17.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, v. 69, № 10, p. 3033—3037.
2. Lin J. Y., Tsung C. M., Fraenkel-Conrat H. The coat protein of the RNA bacteriophage MS2.—J. Mol. Biol., 1967, v. 24, № 1, p. 1—14.



3. Weber K., Konigsberg W. Amino acid sequence of the f2 coat protein.— J. Mol. Biol., 1967, v. 242, № 15, p. 3563–3578.
4. Weber K. Amino acid sequence studies on the tryptic peptides of the coat protein of the bacteriophage R17.— Biochemistry, 1967, v. 6, № 10, p. 3144–3154.
5. Thomas G. F., Prescott B., McDonald-Ordzic P. E., Hartman K. A. Studies of virus structure by Laser-Raman spectroscopy. II. MS2 Phage, MS2 capsids and MS2 RNA in aqueous solutions.— J. Mol. Biol., 1976, v. 102, № 1, p. 103–124.
6. Kitchell B. B., Merrill S. P., Henkens R. W. Optical and hydrodynamic studies of the structure of bacteriophage f2. II. Fluorescence of the capsid.— Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 475, № 3, p. 536–547.
7. Matthews K. S., Cole R. D. Shell formation by capsid protein of f2 bacteriophage.— J. Mol. Biol., 1972, v. 65, № 1, p. 1–15.
8. Langbeheim H., Arnon R., Sela M. Antiviral effect on MS2 coliphage obtained with a synthetic antigen.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, v. 73, № 12, p. 4636–4640.
9. Zagorska L., Chroboczek J., Zagorski W. Template activity of complexes formed between bacteriophage f2 RNA and coat protein.— J. Virology, 1975, v. 15, № 3, p. 509–514.
10. Grassetti D. R., Murray J. F., Jr. Determination of sulfhydryl groups with 2,2'- or 4,4'-dithiodipyridine.— Arch. Biochem. and Biophys., 1967, v. 119, p. 41–49.
11. Price N. C., Cohn M., Schirmer R. H. Fluorescent and spin label probes of the environments of the sulfhydryl groups of porcine muscle adenylate kinase.— J. Biol. Chem., 1975, v. 250, № 2, p. 644–652.
12. Birkett D. J., Price N. C., Radda G. K., Salmon A. G. The reactivity of SH groups with a fluorogenic reagent.— FEBS Lett., 1970, v. 6, № 4, p. 346–348.
13. Mitra S. K., Lustig F., Akesson B., Lagerkvist V. Codon-anticodon recognition in the valine codon family.— J. Biol. Chem., 1977, v. 252, № 2, p. 471–478.
14. Vandekerckhove J., Van Montagu M. Sequence analysis of fluorescamine-stained peptides and proteins purified in a nanomole scale. Application to proteins of bacteriophage MS2.— Eur. J. Biochem., 1974, v. 44, № 1, p. 279–288.
15. Ellman G. L. Tissue sulfhydryl groups.— Arch. Biochem. and Biophys., 1959, v. 82, № 1, p. 70–77.
16. Bruton C. J., Hartley B. S. Chemical studies on methionyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli*.— J. Mol. Biol., 1970, v. 52, № 2, p. 165–178.

Поступила в редакцию  
23.X.1980

## EFFECT OF CHEMICAL MODIFICATION OF CYSTEINE RESIDUES IN THE PHAGE MS2 COAT PROTEIN ON THE REPRESSOR COMPLEX FORMATION WITH MS2 RNA

BERZIN V. M., TSIMANIS A. Yu., GREN E. J., ZAGÓRSKI W.,  
SZAFRANSKI P.

*Institute of Organic Synthesis, Academy of Sciences of the  
Latvian SSR, Riga; Institute of Biochemistry and Biophysics,  
Polish Academy of Sciences, Warsaw*

In the native phage MS2 coat protein the SH group of only one cysteine residue, Cys-46, reacts with disulphide reagents 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) and 4,4'-dithiodipyridine at pH 8,0 or with 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole at pH 3,2. Its modification completely abolishes the ability of the protein to bind MS2 RNA. Thiol groups of both cysteine residues, Cys-46 and Cys-101, of the coat protein are susceptible to reaction with 4,4'-dithiodipyridine at pH 3,2, whereby modification of Cys-46, which reacts the first, suffices to inactivate the protein. Consequently, the SH group of Cys-46 appears to be of prime importance in the repressor complex formation between phage MS2 coat protein and RNA.