



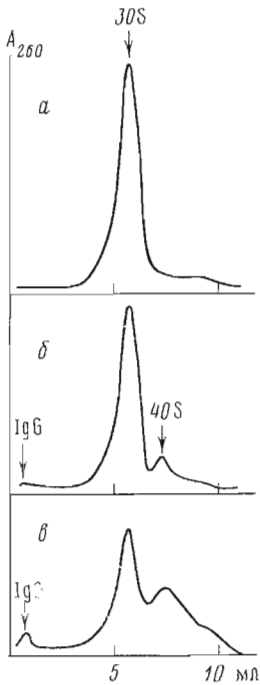
УДК 577.112.4 : 577.217.345

МОДИФИКАЦИЯ СУЛЬФИДРИЛЬНЫХ ГРУПП
РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ ДИНИТРОФЕНИЛЬНЫМ ГАПТЕНОМ*Кожухарова М. С.**Софийский университет, биологический факультет, София, НРБ**Быстрова Т. Ф., Шатский И. Н.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория
молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. П. Белозерского*

Синтезирован динитрофенильный гаптен — 4-(2,4-динитроанилино)бутиламид иодуксусной кислоты, модифицирующий сульфидрильные группы белков. Исследована специфичность реакции синтезированного гаптена с SH-группами рибосомных белков *E. coli*. На примере рибосомного белка S12 продемонстрирована возможность включения модифицированного белка в состав рибосомных субчастиц путем их реконструкции *in vitro*. Показано, что Dnp-гаптен, ковалентно фиксированный на белке S12, располагается на поверхности реконструированной 30S субчастицы и доступен для взаимодействия с Dnp-специфичными антителами. Проведенное исследование представляет собой разработку подхода для введения антигенной группировки в состав белковых компонентов надмолекулярных структур.

В последние годы для изучения топографии рибосомных компонентов все большее распространение получает метод иммунной электронной микроскопии [1, 2]. Метод основан на идентификации с помощью электронного микроскопа места прикрепления к рибосомным субчастицам молекул иммуноглобулинов, выработанных на индивидуальные рибосомные белки. Для РНК этот метод в своем первоначальном виде оказался неприменимым из-за невозможности получения высокоспецифических антител на отдельные участки РНК. Поэтому в дальнейшем мы предложили новый вариант иммунной электронной микроскопии, который основан на модификации определенных участков изолированной рРНК низкомолекулярными антигенными группировками (гаптенами) с последующим включением модифицированной РНК в состав рибосомных субчастиц путем их реконструкции *in vitro* [3]. Этот подход вполне может быть применим и для белковых компонентов рибосом, причем он обладает в этом случае рядом преимуществ по сравнению с традиционной иммунной электронной микроскопией, использующей антитела, выработанные непосредственно на рибосомный компонент. Эти выгодные стороны предлагаемого подхода будут обсуждены в заключительной части работы.

Непосредственной целью настоящего исследования явилась разработка метода введения антигенной группировки в состав рибосомных белков *E. coli*. Для ковалентного присоединения гаптена к белку выбрана сульфидрильная группа. Такой выбор был продиктован следующими причинами: 1) большинство рибосомных белков содержит не более одного остатка цистеина [4]; 2) SH-группа обладает большой нуклеофильностью и может быть легко модифицирована в водных растворах при физиологических значениях pH; 3) для ряда рибосомных белков известно, что модификация SH-групп не искажает серьезным образом их структуру и не влияет на их взаимодействие с рибосомной РНК [5]. К модифицирующему реагенту были предъявлены следующие требования: 1) группировка атомов, связанная с атомом серы в результате модификации, не должна быть объемистой, так как это могло бы привести к нарушению нативной конформации белка и препятствовать его последующему включению в рибосомную субчастицу; 2) модифицирующая группировка реагента должна быть достаточно удалена от его антигенной группы с тем, чтобы гарантировать выход послед-



Седиментация контрольных реконструированных 30S субчастиц (0,8 ОЕ₂₆₀) (а) и этих же частиц в присутствии 20 (б) и 40 мкг анти-Dnp (в). Центрифугирование в градиенте концентрации сахарозы 5→20% (26 000 об/мин, ротор SW 41, Beckman, 12 ч, 2° С)

SH-группы в положениях, структуру субчастицы.

Наличие антигенной группировки в составе собранной субчастицы было проверено иммунологическими методами (см. рисунок). Видно, что добавление анти-Dnp влечет за собой появление в профиле сахарозного градиента димерного пика субчастиц, что обусловлено бивалентной природой молекулы IgG. Добавление в смесь модифицированных субчастиц и анти-Dnp свободного гаптена (динитрофенилглицина) приводит к исчезновению димерного пика и профиль седиментации становится неотличимым от контрольного, что доказывает специфичность взаимодействия анти-Dnp с молекулой гаптена, связанной с 30S субчастицей.

Нами также была проверена возможность получения модифицированных белков путем обработки соединением (III) целых 30S рибосомных субчастиц. Известно, что ряд рибосомных белков 30S субчастицы обладает экспонированными в окружающую среду сульфгидрильными группами, которые легко модифицируются простыми SH-специфичными реагентами [5]. В число этих белков входят прежде всего S1, S12, S17 и S21. Методика модификации белков в составе целых 30S субчастиц особенно удобна для белка S12, который, как уже было сказано, содержит четыре остатка цистеина. Можно было надеяться, что в составе субчастиц модификации будут подвергаться только те из SH-групп, которые не существуют для включения белка в состав 30S субчастицы. Действительно, белок S12, выделенный из субчастиц, обработанных соединением (III), гораздо лучше, чем белок, модифицированный в индивидуальном виде, включается в их состав при реконструкции *in vitro*. При этом достаточно 2–3 мольных избытков белка для получения 30S субчастиц с высоким содержанием гаптена. Анализ смесей таких субчастиц с анти-Dnp путем центрифугирования в сахарозном градиенте привел к тем же результатам, что и в случае мо-

доступность для реагента была полностью обеспечена проведением реакции в растворах мочевины. Такая степень специфичности вполне достаточна для целей иммунной электронной микроскопии.

Для проверки способности включения модифицированного белка в состав 30S субчастицы путем реконструкции *in vitro* был выбран белок S12 из 30S субчастиц рибосом. Выбор этого белка был продиктован как важностью его функций в процессе трансляции [6], так и отсутствием надежных данных иммунной электронной микроскопии по его локализации на поверхности 30S субчастицы. Сборка 30S субчастиц проводилась путем инкубации смеси индивидуальных рибосомных белков, за исключением S12, модифицированного S12 и 16S рРНК согласно методике, описанной Хелдом и Номурой [7]. Дополнительную трудность создавало наличие в белке S12 четырех сульфгидрильных групп [8], полная модификация которых могла привести к его инактивации и потере способности включаться в состав 30S субчастиц при реконструкции. Чтобы избежать этого, модификацию белка проводили при мольных соотношениях реагент — белок ниже оптимального значения (~5 моль/моль), а при реконструкции добавляли 5–8-кратный мольный избыток модифицированного белка. Тем самым создавались условия для естественного отбора при реконструкции субчастиц тех молекул белка S12, которые содержали модифицированные

не существенных для встраивания белка в

дификации изолированного белка (см. рисунок). Несмотря на то что для полноты протекания реакции гаптена (III) с целыми 30S субчастицами требуется продолжительная инкубация при 37° С, мы не обнаружили сколько-нибудь заметного включения реагента в состав рибосомных белков, не содержащих цистеина. По-видимому, в составе рибосом другие функциональные группы белков, потенциально способные взаимодействовать с подистыми алкилами (прежде всего остатки лизина), вовлечены в белок-белковые и РНК-белковые взаимодействия (для лизина, например, по фосфатным группам РНК) и недоступны для атаки использованным реагентом.

Предложенный нами подход для введения антигенной группировки, связанной с белком, в состав рибосомных субчастиц для целей иммунной электронной микроскопии имеет свои выгодные стороны по сравнению с традиционным подходом, который предусматривает получение специфических антител непосредственно на рибосомный компонент:

1) метод может быть использован для белков, антигенные детерминанты которых «закрыты» для взаимодействия с антителами по стерическим причинам. В нашем случае достаточно присутствия на поверхности рибосомы только одной доступной SH-группы. Это особенно касается белков, которые в составе рибосомы вовлечены во множественные РНК-белковые и белок-белковые взаимодействия;

2) с помощью предложенного подхода могут быть локализованы те участки белков, собственные антигенные детерминанты которых изменяются после включения в состав рибосомы;

3) возможна локализация участка белка, обладающего слабыми антигенными свойствами;

4) чистота белка в нашем случае имеет меньшее значение, чем в случае традиционного подхода. Известно, что в последнем случае даже незначительные примеси посторонних белков, но с сильными антигенными свойствами могут привести к непропорционально высокому содержанию в популяции IgG молекул другой специфичности;

5) вся работа может быть проведена с антителами одной специфичности. Возможности предложенного подхода имеют и понятные ограничения, однако в сочетании с обычно используемыми методиками он может дать ценные сведения о топографии поверхности рибосомы. Метод вполне может быть использован и для исследования других самособирающихся надмолекулярных структур.

Экспериментальная часть

В работе использованы 1,4-бутилендиамин (Sigma, США), динитрофторбензол (Sigma, США), N-гидроксисукцинимид (Fluka, Швейцария), N,N'-дициклогексилкарбодимид (DCC) (Serva, ФРГ), фосфоцеллюлоза Mannex P, 1,04 мг-экв/г (Schwarzmann, ФРГ). Остальные реактивы отечественного производства.

Dnp-1,4-Бутилендиамин (I) синтезировали по методике, использованной нами ранее для синтеза Dnp-этилендиамина [9]; его электрофорез проводили на бумаге FN-1 (Filtrak, ГДР) в 0,1 М уксусной кислоте (20 В/см). Хроматографию в тонком слое синтезированных 4-(2,4-динитроанилино)-бутиламидов хлоруксусной (II) и иодуксусной (III) кислот осуществляли на пластинках Silufol (Chemapol, ЧССР) в системе бутанол — 1,5 М NH₄OH, 1 : 1.

70S рибосомы и их 30S субчастицы выделяли по методике [10]. Рибосомные белки 30S субчастиц предварительно фракционировали путем их обработки раствором 1,3 М LiCl в присутствии 0,01 М MgCl₂ в течение 5 ч при 0° С с последующим разделением диссоциированных белков и обедненных белком рибонуклеопротеидных частиц ультрацентрифугированием (5 ч при 2° С, 50 000 об/мин, ротор Ti 50, центрифуга Beckman). Отделение остальной части белков от рибонуклеопротеидных частиц достигалось обработкой 3 М LiCl в 4 М мочевины. Полное отделение каждой фракции

белков на индивидуальные компоненты проводили по методу Курланда и сотр. [11]. Чистоту белков контролировали одно- и двумерным электрофорезом в полиакриламидном геле; она составляла не менее 95%. 16S РНК выделяли из 30S рибосомных субчастиц методом фенольной депротенизации.

4-(2,4-Динитроанилино)бутиламид хлоруксусной кислоты (II). Реакцию проводили в абсолютном диметилформамиде. Смешивали растворы хлоруксусной кислоты (0,33 ммоль, 0,75 мл), N,N'-дициклогексилкарбодимид (0,365 ммоль, 1,5 мл) и N-гидроксисукцинимид (0,365 ммоль, 0,75 мл) при 0° С. Смесь перемешивали 15 мин, после чего также при перемешивании добавляли Dnp-1,4-бутилендиамин в диметилформамиде (0,22 ммоль, 2 мл) тремя порциями через 15-мин интервалы. Смесь размешивали еще 1 ч при 0° С и оставляли на 16 ч при 20° С. Выпавшую дициклогексилмочевину отделяли фильтрованием, раствор частично упаривали на ротаторном испарителе и продукт осаждали водой. Осадок отделяли центрифугированием и промывали 4–5 раз водой, подкисленной до pH 3 соляной кислотой. Последнюю промывку проводили при нейтральном значении pH. Вещество перекристаллизовывали из спирта. Выход не менее 50%. Продукт индивидуален по данным ТСХ ($R_f \approx 0,74$).

4-(2,4-Динитроанилино)бутиламид иодуксусной кислоты (III). К раствору соединения (II) в 85% спирте (300 ОЕ₃₆₇/мл) добавляли 50-кратный мольный избыток иодистого калия в виде тонко растертого порошка. Смесь нагревали 2 ч в термостате при 45° С с периодическим встряхиванием. По окончании реакции продукт осаждали водой и промывали до полного удаления солей. Выход ~90%. После перекристаллизации из спирта соединение (III) было индивидуально по данным ТСХ ($R_f \approx 0,79$).

Модификация рибосомных белков. Белки с концентрацией 0,03–0,1 мМ диализовали против буфера pH 7,8 (0,05 М Na-фосфат — 6 М мочевины — 0,5 мМ тиогликолевая кислота). Далее к раствору белка добавляли последовательно диметилсульфоксид и 0,01 М раствор гаптена (III) в диметилсульфоксиде до конечных концентраций диметилсульфоксида и гаптена (III) соответственно 25% и 2 мМ. Реакцию проводили в течение 20 мин при 20° С и останавливали добавлением 1/10 объема 0,2 М тиогликолевой кислоты, доведенной NaOH до нейтрального значения pH. Далее раствор белка наносили на колонку с фосфоцеллюлозой (0,3×2 см), уравновешенной буфером pH 6,5 (0,03 М Na-фосфат — 6 М мочевины). После тщательной промывки колонки для удаления свободного гаптена белок элюировали тем же буфером, но содержащим 0,5 М NaCl. Степень модификации определяли, измеряя поглощение элюата при 230 нм (A_{230} — концентрация белка) и 367 нм (A_{367} — концентрация гаптена). Значение $E_{230}^{1\text{мг/мл}}$ принималось равным 5,3 [11]. В полученную величину A_{230} вносили поправку на поглощение гаптена при 230 нм. Согласно спектру поглощения (III), $E_{230} \approx \epsilon_{367} \approx 16 \cdot 10^3$.

Модификация белка в составе 30S субчастицы. Субчастицы с концентрацией 3–5 мг/мл диализовали против буфера pH 7,8 (0,03 М триэтанол-амин — 1 мМ MgCl₂ — 0,05 М KCl — 0,25 мМ тиогликолевая кислота). Далее добавляли диметилсульфоксид и гаптен (III) до конечных концентраций соответственно 25% и 1 мМ и смесь инкубировали 3 ч при 37° С. Реакцию останавливали добавлением 1/10 объема 0,2 М тиогликолевой кислоты, раствор охлаждали до 0° С, добавляли раствор MgCl₂ до 0,01 М и субчастицы осаждали добавлением 0,7 объема этанола. Осадок растворяли в буфере pH 7,8 (0,01 М трис-HCl — 0,01 М MgCl₂ — 0,06 М NH₄Cl — 6 мМ меркаптоэтанол) и диализовали против того же буфера в течение 16 ч. Выделение модифицированных белков и их фракционирование проводили аналогично немодифицированным белкам (см. выше).

Реконструкцию 30S субчастиц из индивидуальных компонентов осуществляли согласно методике Хелда и Номуры [7]. Индивидуальные рибосомные белки использовали в 3-кратном мольном избытке по отношению к 16S рРНК, а модифицированный белок добавляли в 3–8-кратном мольном избытке в зависимости от метода модификации белка (в изолирован-

ном состоянии или в составе субчастиц). Очистка реконструированных субчастиц, получение специфичных к Dnp-группе антител, условия образования и анализ комплексов модифицированных субчастиц с антителами описаны ранее [12].

ЛИТЕРАТУРА

1. Lake J. A. In: Ribosomes. Structure, function and genetics/Eds Chambliss G., Craven G. R., Davies J., Davis K., Kahan L., Nomura M. Baltimore: University Park Press, 1980, p. 207-236.
2. Stöffler G., Bald R., Kastner B., Lührmann R., Stöffler-Meilicke M., Tischendorf C., Tesche B. In: Ribosomes. Structure, function and genetics/Eds Chambliss G., Craven G. R., Davies J., Davis K., Kahan L., Nomura M. Baltimore: University Park Press, 1980, p. 171-206.
3. Shatsky I. N., Mochalova L. V., Kojouharova M. S., Bogdanov A. A., Vasiliev V. D. J. Mol. Biol., 1979, v. 133, № 4, p. 501-515.
4. Moore P. B. J. Mol. Biol., 1975, v. 98, № 2, p. 439-444.
5. Dugas H., Rodriguez A., Brisson N. Can. J. Biochem., 1979, v. 57, p. 1407-1415.
6. Held W. A., Gette W. R., Nomura M. Biochemistry, 1974, v. 13, № 10, p. 2115-2122.
7. Held M. A., Misushima S., Nomura M. J. Biol. Chem., 1973, v. 248, № 16, p. 5720-5730.
8. Funatsu G., Yaguchi M., Wittmann-Liebold B. FEBS Lett., 1977, v. 73, № 1, p. 12-17.
9. Мочалова Л. В., Шарский И. И., Богданов А. А. Биоорг. химия, 1982, т. 8, № 2, с. 239-242.
10. Kirillov S. V., Makhno V. I., Semenov Y. P. Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, № 1, p. 183-196.
11. Kurland C. G., Hardy S. J. S., Mora G. Methods Enzymol., 1971, v. 20 C, p. 381-391.
12. Mochalova L. V., Shatsky I. N., Bogdanov A. A., Vasiliev V. D. J. Mol. Biol., 1982, v. 159, № 4, p. 637-650.

Поступила в редакцию
5.1.1983

MODIFICATION OF SH-GROUPS IN RIBOSOMAL PROTEINS BY DINITROPHENYL HAPTENE

KOJOUHAROVA M. S., BYSTROVA T. F., SHATSKY I. N.

*Sofia University, Department of Biochemistry, Sofia;
A. N. Belozersky Laboratory, M. V. Lomonosov State University, Moscow*

A dinitrophenyl haptene capable of protein SH-group modification was synthesized and the specificity of its reaction with SH-groups of the *E. coli* ribosomal proteins was studied. The possibility of incorporation of the Dnp-modified protein into ribosomal subunits by in vitro reconstitution was demonstrated with the ribosomal protein S12. The Dnp-haptene attached to the protein S12 was found to be accessible for interaction with the Dnp-specific antibodies and therefore to be exposed on the surface of the reconstituted 30S subunit. Thus, the approach for incorporation of the antigenic groups into the protein components of supramolecular structures was proposed.