

УДК 577. 112. 855

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ рРНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗ ДЛЯ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ВВЕДЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МЕТКИ

О.В. Сергеева, Д.Е. Бураковский, П.В. Сергиев, Т.С. Зацепин, М. Томкувиене\*,  
С. Климасаускас\*, О.А. Донцова

(кафедра химии природных соединений; e-mail: olga.sergeeva.v@gmail.com)

Исследована возможность использования аналога S-аденозилметионина – пент-2-ен-4-инилS-аденозилгомоцистеина (AdoEnYn) в качестве кофактора для рРНК метилтрансферазы. Проведен подбор условий для реакции циклоприсоединения азидо флуоресцентной метки к аналогу S-аденозилметионина. В различных условиях протестирована функциональная активность рибосом *E. coli*. Обнаружено, что встраивание алкильного радикала проходит успешно и не влияет на функциональную активность рибосом, но в условиях последующей реакции циклоприсоединения происходит инактивация рибосом.

**Ключевые слова:** рибосома *E. coli*, метилтрансфераза, флуоресцентное мечение, реакция циклоприсоединения.

В настоящее время технологии включения флуоресцентных меток в биологические объекты повсеместно замещают технологии использования радиоактивных изотопов. Причем наиболее распространены способы, не нарушающие структуру и функциональную активность биомолекул. Известны несколько флуоресцентных групп, которые можно вводить в биомолекулы для изучения их роли в клеточных процессах [1]. Например, широко применяются флуоресцентные белки, имеющие разное происхождение и различные спектральные характеристики. Флуоресцентные белки имеют достаточно крупные молекулы по сравнению с низкомолекулярными флуорофорами и могут менять структуру биологических макромолекул при присоединении. Кроме того, невозможно введение флуоресцентных белков в РНК. Перспективным инструментом, который можно использовать для введения флуорофоров в биомолекулы, могут служить клеточные ферменты-трансферазы. Например, РНК метилтрансферазы используют S-аденозил-L метионин (SAM) в качестве донора метильной группы для процесса метилирования РНК. Причем рРНК метилтрансферазы обладают уникальным свойством – они способны узнавать и модифицировать один нуклеотид из 4500 нуклеотидных остатков рибосомы. Известно, что некоторые метилтрансферазы способны связывать и использовать в качестве кофактора аналоги SAM, содержащие ненасыщенные связи, сопряженные с атомом углерода, соседствующим с атомом

серы и эквивалентным метильной группе SAM [2]. В результате появляется возможность ферментативно вводить в субстраты метилтрансфераз различные органические радикалы. Особенно перспективным является введение функциональных групп, не встречающихся в живых клетках и способных в дальнейшем селективно присоединять флуорофорные группы. Исходя из этого мы предположили, что рРНК метилтрансферазы могут использовать модифицированный аналог SAM, что можно применить для флуоресцентного мечения рибосом. Этот аналог содержит не встречающийся в биологических макромолекулах алкин, способный вступать в специфические реакции циклоприсоединения.

Одним из способов введения флуорофора в макромолекулу, модифицированную алкином, стала реакция 3+2-циклоприсоединения с участием азидогруппы. Она привлекательна тем, что является специфичной, быстрой и использует слабополяризованные реагенты [3]. Реакция 1,3-циклоприсоединения (реакция Хьюсена) лучше всего подходит для биологических объектов, куда легко вводится азидная или алкильная группа, а их функциональные свойства при этом не изменяются. Основным катализатором этой реакции является одновалентная медь, образующаяся при восстановлении Cu(II). При этом возможно образование радикал-ионов, которые могут повредить биомолекулы, да и сама по себе одновалентная медь в определенных концентрациях токсична для клеток

\*Институт Биотехнологии, Вильнюсский университет, Литва.

[4]. Для решения этой проблемы были предложены различные способы стабилизации Cu(I) в водных растворах: подбор концентраций реагентов, добавление ацетонитрила и подбор лигандов к Cu(I) [1, 4]. Использование рРНК метилтрансфераз как агентов для введения алкинильной группы в рРНК, объединенное с реакцией Хьюсгена (присоединением азидного производного флуоресцентной метки), могло бы стать отличным способом для флуоресцентного мечения рибосом и рРНК.

В рамках данной работы алкинильная группа входила в состав пент-2-ен-4-инил-S-аденозингомоцистеина (AdoEnYn) (рис. 1) – кофермента для реакции метилирования рРНК при помощи метилтрансферазы RsmD [2, 5]. Субстратом для фермента служит собранная 30S-субчастица рибосомы. Следующей стадией является реакция циклоприсоединения азидогруппы флуоресцентной метки к алкину в составе 30S-субчастицы. Основная задача состоит в том, чтобы не только ввести флуоресцентную метку в рРНК, но и сохранить функциональную активность рибосомы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Выделение 30S-субчастиц рибосомы $\Delta$ RsmD

Субчастицы 30S  $\Delta$ RsmD выделены из штамма *E. coli*, где ген *yhhF* был заменен на ген устойчивости к антибиотику канамицину [6]. Клетки выращивали в среде LB в присутствии канамицина (50 мкг/мл) до установления оптической плотности 0,6. После разрушения клеток путем механического перетирания с окисью алюминия в буфере (20 мМ Трис; 100 мМ хлорид аммония; 10,5 мМ ацетат магния; 3 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол) и после осаждения дебриса рибосомы их осаждали ультрацентрифугированием через 40%-ю сахарозную подушку (28000 г $\times$ м) в течение 13 ч. Рибосомы были получены зональным ультрацентрифугированием в градиенте концентрации сахарозы 10–40% при 28000 г $\times$ м (19 ч), после чего были дополнительно очищены ультрацентрифугированием через 40%-ю сахарозную подушку (28000 г $\times$ м) в течение 13 ч. Отдельные субчастицы были вы-

делены с помощью зонального ультрацентрифугирования в диссоциирующем буфере (20 мМ Трис; 60 мМ хлорид аммония; 1,25 мМ ацетат магния; 3 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол). Фракции, содержащие 30S-субчастицы рибосомы собрали, а затем осадили субчастицы ультрацентрифугированием при 50000 г $\times$ м в течение 24 ч. Для проверки функциональной активности рибосом измеряли связывание fMet–тРНК в присутствии факторов инициации.

### Выделение метилтрансферазы RsmD

Рекомбинантная метилтрансфераза RsmD была выделена из клеток *E. coli* (штамм M15), содержащих плазмиду pCA24N-RsmD. В этой плазмиде ген *rsmD* находится под контролем T5lac-промотора, индуцируемого изопропил- $\beta$ -тиогаллактопиранозидом (IPTG) [7]. Клетки растили в среде LB при температуре 37°C до установления оптической плотности 0,6, затем добавляли индуктор IPTG (0,5 мМ) и растили еще 2 ч. Затем клетки разрушали с помощью ультразвука в буфере (20 мМ Хепес (pH 7,5); 200 мМ ацетат аммония; 10 мМ имидазол; 0,1% тритон, 1 мг/мл лизоцим). Белок очищали методом афинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе. После трех промывок градиентом 10–80 мМ имидазола белок элюировали буфером, содержащим имидазол (500 мМ). Для очистки от совыделяющегося SAM проводили серию диализов в течение 4 ч в буфере (20 мМ Хепес (pH 7,5); 200 мМ ацетат аммония; 1 мМ ацетат магния; 0,1%-й тритон, 5 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол; 10%-й глицерин); в таком же буфере, но в присутствии 200 мкМ S-аденозилгомоцистеина; в буфере с 20 мМ Хепес (pH 7,5); 200 мМ ацетат аммония; 1 мМ ацетат магния; 0,1% тритон; 5 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол; 10%-й глицерин. Чистоту белка проверяли на SDS–ПААГ.

### Алкилирование *in vitro*

Алкилирование *in vitro* проводили в буфере, содержащем 50 мМ Хепес (pH 7,6); 70 мМ хлорид аммония; 30 мМ хлорид калия; 7 мМ ацетат магния; 4 мкМ AdoEnYn. Концентрация 30S-субчастиц, немодифицированных по нуклеотидному остатку G966, и белка составляла 0,5 и 1,0 мкМ соответственно. Смесь инкубировали 10, 30, 60, 120, 180, 240 мин при 37°C. Для определения выхода алкилирования к реакционным смесям добавляли радиоактивный [ $^{14}$ C] SAM, инкубировали еще 1 ч при 37°C. Из всех образцов выделяли рибосомную РНК (при помощи набора Qiagen) и по уменьшению количества встроившихся радиоактивных метильных групп, измеренному с по-

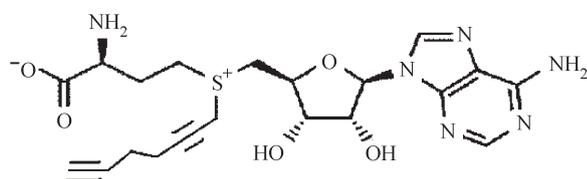


Рис. 1. Пент-2-ен-4-инил-S-аденозингомоцистеин (AdoEnYn)



вий направлено на стабилизацию Cu(I), которая легко окисляется до Cu(II), образуя при этом опасные для рибосомы радикал-ионы. Было предложено несколько лигандов ионов меди, но наибольшее распространение для применения к клеточным системам получили ТВТА и обладающий большей растворимостью в воде ТНРТА – трис-(3-гидроксипропилтриазолилметил) амин [9] (рис. 3).

ТНРТА успешно использовали в качестве лиганда Cu(I) при флуоресцентном мечении мембранных гликанов клеток млекопитающих [1]. В связи с этим мы попробовали начать наши эксперименты с таких же концентраций реагентов для циклоприсоединения: 50 мкМ CuSO<sub>4</sub>, 250 мкМ ТНРТА, 1 мМ амингуанидина, 2,5 мМ аскорбата натрия, 25 мкМ азид флуоресцентной метки Alexa 555, 40 мкМ алкинил-30S. Рассчитанное по калибровочной кривой стандартных концентраций Alexa 555 количество флуоресцентных

групп в 25 нМ растворе 16S рРНК составило 19,4 нМ, что соответствует 77% включения метки (рис. 4). При проверке функциональной активности, оказалось, что флуоресцентно-меченые Alexa555-30S не способны связывать fMet-тРНК в инициаторном комплексе 70S в отличие 30S wt (рис. 5). Это может происходить по нескольким причинам. Во-первых, поскольку нуклеотид G966 16S рРНК находится в непосредственной близости к Р-участку рибосомы, то добавление объемной флуоресцентной метки может мешать связыванию тРНК. Во-вторых, компоненты реакции циклоприсоединения могут повреждать рибосомную РНК или рибосомные белки. Для решения этого вопроса был проведен тест функциональной активности рибосом на каждой стадии (рис. 6).

Из результатов теста следует, что алкинирование рРНК не влияет на функциональную активность инициаторного комплекса 70S. Причиной инактив-

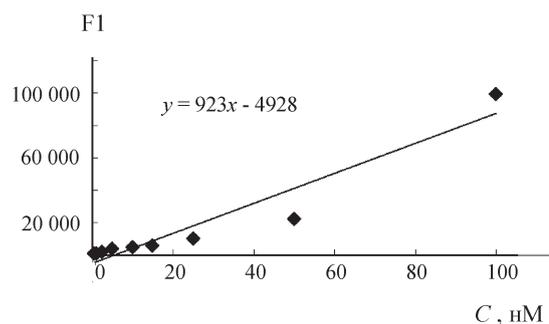


Рис. 4. Калибровочная кривая стандартных концентраций Alexa 555

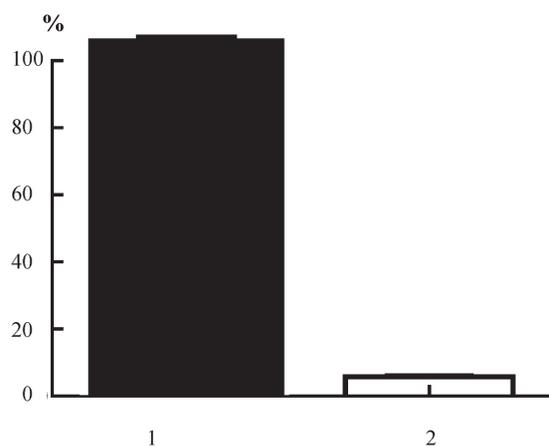


Рис. 5. Тест функциональной активности флуоресцентно-меченых рибосом: 1 – 70S wt, 2 – 70S Fluo

вации Alexa555-30S служит не само введение флуорофора, а повреждение рибосомных субчастиц при инкубации в условиях реакции циклоприсоединения (сравнить 2 и 3 на рис. 6). Условия, подобранные для реакции присоединения флуоресцентной метки к гликанам не подходят для использования в экспериментах с рибосомами *in vitro*. Для определения соединений, которые повреждают рибосомы, были отдельно проверены все компоненты реакционной смеси. Наибольшее повреждение рибосом вызывает смесь сульфата меди и аскорбата натрия (рис. 7). Поэтому для оптимизации методики в первую очередь решили понизить концентрации  $\text{CuSO}_4$  и аскорбат натрия.

Для тестирования возможности включения флуорофора в мягких условиях концентрации сульфата меди и аскорбата были снижены в 10 раз (с 50 до 5 мкМ  $\text{CuSO}_4$  и с 2,5 до 0,25 мМ аскорбата натрия). Для тестирования целостности рибосомных субчастиц в условиях реакции был проведен анализ ВЭЖХ 30S-субчастиц после инкубации (4–43 мин) со смесью 50 мкМ  $\text{CuSO}_4$  + 250 мкМ ТНРТА + 2,5 мМ аскорбата натрия. Наблюдаемое перераспределение оптической плотности позволяет предположить, что происходит деградация рРНК. Пик максимума оптической плотности 30S-субчастиц расширяется и сдвигается влево (рис. 8, а). При снижении концентрации всех реагентов ( $\text{CuSO}_4$  до 5 мкМ, ТНРТА до 50 мкМ, аскорбата натрия до 0,25 мкМ) с течением времени (4–19 мин) в 30S-субчастицах также происходят структурные изменения, однако максимум пика совпадает с максимумом 30S  $\Delta\text{RsmD}$  без обработки (рис. 8, б). При проведении реакции циклоприсоединения в мягких условиях Alexa 555 включилась в 30% рРНК (рис. 8, в).

При проверке функциональной активности 30S-субчастиц, 30% из которых содержали флуоресцентную метку Alexa 555, только 20% оказались способными к взаимодействию с инициаторной рРНК. Проведение реакции циклоприсоединения в инертной атмосфере, изменение концентрации лиганда меди, добавление соразтворителей DMSO и ацетонитрила, попытки использования другого лиганда (ТВТА) не приводят к увеличению доли активного инициаторного комплекса 70S. Возможно, использование реакции Хьюсгена в случае таких макрокомплексов, как рибосома, состоящих из белков и рРНК, требует других, более специфических условий реакции или внесения дополнительных компонентов.

Таким образом, оптимизация условий встраивания флуоресцентной метки в рРНК не увенчалась успехом. Условия, в которых встраивание метки было

эффективным, способствовали инактивации рибосом. В условиях, когда эффективность встраивания метки заметно снижалась, лишь немногие из рибосомных субчастиц оставались активными. По-видимому, для создания эффективного неповреждающего метода встраивания флуорофора в рРНК необходимо отказаться от использования солей меди.

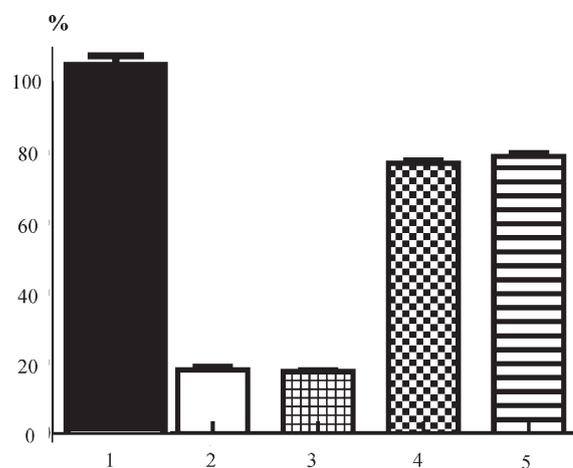


Рис. 6. Проверка функциональной активности 30S-субчастиц по выходу образования инициаторного комплекса 70S. Использовали следующие варианты обработки 30S-субчастиц, лишенных модификации G966: 1 – алкинил-30S (30SAdoEnYn); 2 – Alexa555-30S; 3 – 30S, инкубированные со всеми компонентами смеси для реакции циклоприсоединения, кроме Alexa555; 4 – 30S, инкубированная с RsmD; 5 – 30S без обработки

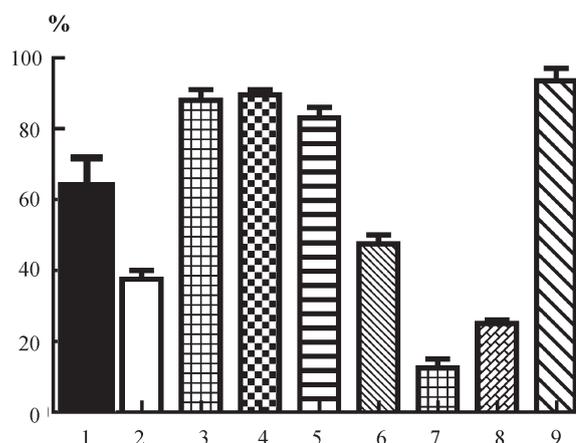


Рис. 7. Проверка функциональной активности инициаторного комплекса 70S  $\Delta\text{RsmD}$  после инкубации 30SAdoEnYn с каждым или сочетаниями компонентов реакции циклоприсоединения в течение стандартного времени флуоресцентного мечения: 1 –  $\text{CuSO}_4$ ; 2 – ТНРТА; 3 –  $\text{NH}_2\text{-G}$ ; 4 – ask Na; 5 – Alexa 555; 6 –  $\text{CuSO}_4$  + ТНРТА; 7 –  $\text{CuSO}_4$  + ask Na; 8 – смесь всех компонентов; 9 – 30S без обработки

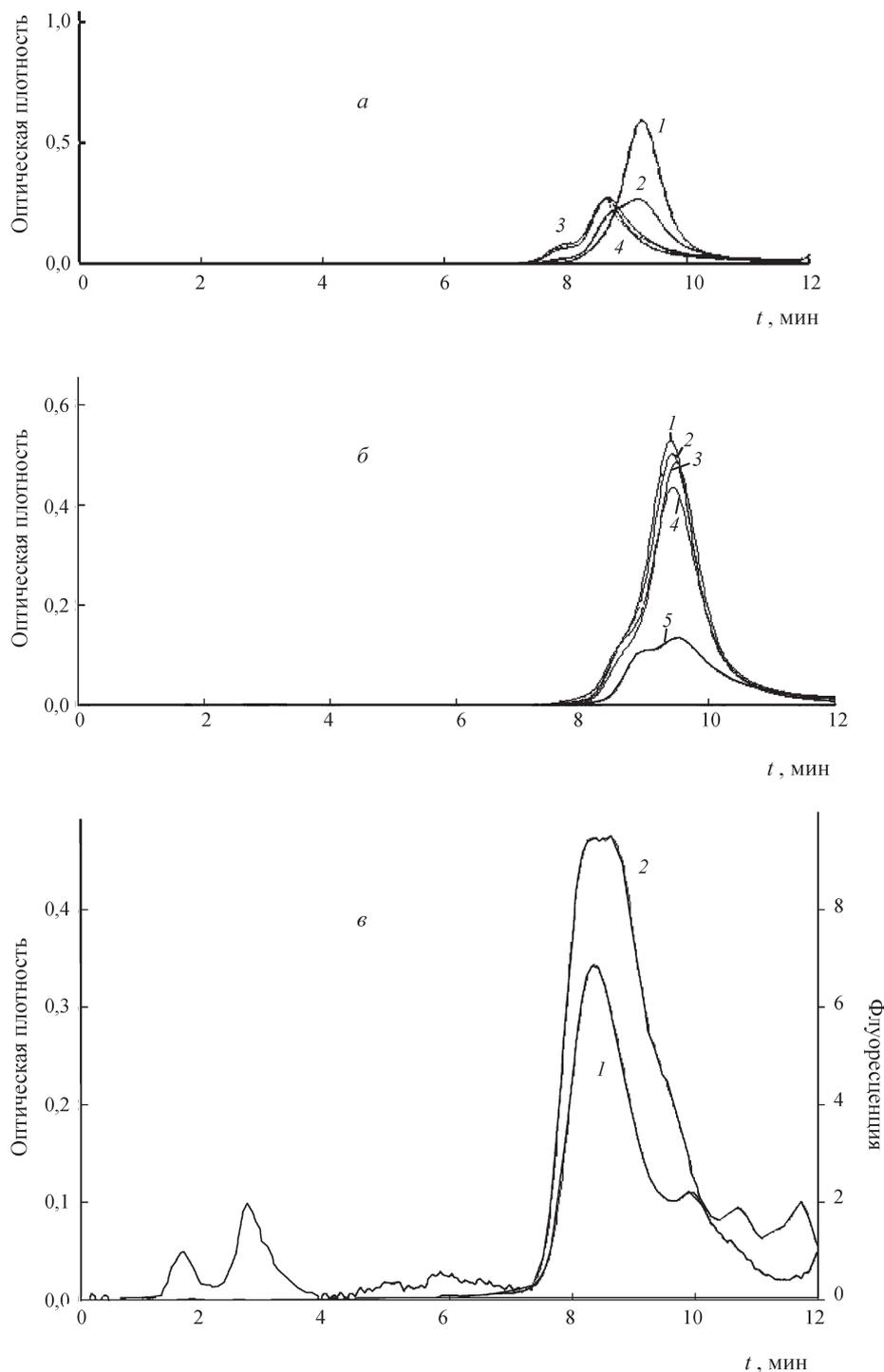


Рис. 8. ВЭЖХ-анализ целостности 30S-субчастиц: *a* – 30S AdoEnYn после инкубации с 50 мкМ CuSO<sub>4</sub>, 250 мкМ ТНРТА, 2.5 мМ аскорбатом натрия, 1 мМ аминокуанидином, 30 мкМ Alexa 555 (1 – 30S контроль, 2 – после 4 мин инкубации, 3 – после 19 мин инкубации, 4 – после 43 мин инкубации); *б* – 30S AdoEnYn после инкубации с 5 мкМ CuSO<sub>4</sub>, 50 мкМ ТНРТА, 0.25 мМ аскорбатом натрия, 1 мМ аминокуанидином, 30 мкМ Alexa 555 (1 – после 4 мин инкубации, 2 – после 15 мин инкубации, 3 – 30S контроль, 4 – после 19 мин инкубации, 4 – флуоресцентно меченые 30S); *в* – включение Alexa555 в 30S AdoEnYn (1 – оптическая плотность 30S, 2 – флуоресцентная активность 30S)

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hong V., Steinmetz N., Finn M. // Bioconjug. Chem. 2010. **21**. N 10. С. 1912.
2. Motorin Y., Burhenne J., Koynov K., Willnow S., Weinhold E., Helm A. // Nucleic Acids Res. 2011. **39**. N 5. С. 1943.
3. Huisgen R. // 1,3-Dipo Cycloaddition Chemistry. Ed. A. Padwa. N.Y., 1984. С. 1.
4. Paredes E., Das S. // Chembiochem. 2011. **12**. N 1. С. 125.
5. Lesnyak D., Osipiuk J., Skarina T., Sergiev P., Bogdanov A., Edwards A., Savchenko A., Joachimiak A., Dontsova O. // J. Biol. Chem. 2007. **282**. N 8. С. 5880.
6. Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Datsenko K.A., Tomita M., Wanner B.L., Mori H. // Mol. Syst. Biol. 2006. **2**. С. 2006.
7. Datsenko K., Wanner B. // Proc Natl Acad Sci U S A. 2000. **97**. N 12. С. 6640.
8. Ahsen U., Noller H. // Identification of bases in 16S rRNA essential for tRNA binding at the 30S ribosomal P site. 1995. FScience. V. 267. N 5195. С. 234.
9. Chan T., Hilgraf R., Sharpless K., Fokin V. // Org. Lett. 2004. **6**. N 17. С. 2853.
10. Baskin J., Prescher J., Laughlin S., Agard N., Chang P., Miller I., Lo A., Codelli J., Bertozzi C. // Proc. Natl. Acad Sci. USA. 2007. **104**. N 43. С. 16793.

Поступила в редакцию 20.12.11

### METHYLTRANSFERASE AS THE METHOD OF FLUORESCENT LABEL SITE-SPECIFIC INDUCTION

O.V. Sergeeva, D.Ye. Burakovsky, P.V. Sergiev, T.S. Zatsepin, M. Tomkuviene, S. Klimasauskas, O.A. Dontsova

(Division of Chemistry of Natural Compounds)

We investigate the possibility of usage the analog of S-adenosylmethionine - pent-2-en-4-ynyl S-adenosylhomocysteine (AdoEnYn) as a co-factor for the rRNA methyltransferase. We select the conditions for the cycloaddition reaction of fluorescent label azide with the analog of SAM. The functional activity of ribosomes *E.coli* was tested in different conditions. It was found that incorporation of the alkynyl radical is successful and doesn't change the functional activity of the ribosomes, but next cycloaddition reaction lead to the inactivation of the ribosomes.

**Key words:** ribosome, *E.coli*, fluorescent labeling, 1,3-dipolar cycloaddition.

**Сведения об авторах:** *Сергеева Ольга Владимировна* – аспирант химического факультета МГУ (olga.sergeeva.v@gmail.com); *Бураковский Дмитрий Евгеньевич* – науч. сотр. Макс Планк Института биофизической химии (Германия); *Сергиев Петр Владимирович* – доцент кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ; *Зацепин Тимофей Сергеевич* – науч. сотр. кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ; *Мигле Томкувиене* – мл. науч. сотр. Института биотехнологии Вильнюсского университета, (Литва); *Саулиус Климасausкас* – профессор Института биотехнологии Вильнюсского университета (Литва); *Донцова Ольга Анатольевна* – профессор кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ, член корр. РАН.