

УДК 541.144.8

## **ФОТОАФФИННАЯ МОДИФИКАЦИЯ ТЕТРАЦИКЛИНОВОГО РЕПРЕССОРА TETR<sup>D</sup> ТЕТРАЦИКЛИНОМ**

**М. М. Белякова, Е. В. Петрова, В. А. Спиридонова, Е. Н. Добров, А. М. Копылов, Ц. А. Егоров\*, Б. Виттманн-Либольд\*\*, В. Сэнгер \*\*\***

*(кафедра химии природных соединений)*

Исследована возможность использования тетрациклина (Тс) как прямого фотоаффинного реагента на системе: комплекс тетрациклина с тетрациклиновым белком-репрессором TetR<sup>D</sup>. При облучении светом с длиной волны 366 нм Тс модифицирует полипептидную цепь белка на участках I59–E73 и/или A173–E183. Оба пептида содержат аминокислотные остатки, по данным рентгеноструктурного анализа участвующие в образовании нековалентных взаимодействий с Тс в комплексе. Впервые показано, что Тс может быть использован как фотоактивируемый модифицирующий реагент для изучения структуры центров связывания мишеней действия этого антибиотика.

Несмотря на то что тетрациклин (Тс) уже много лет широко используется в медицине, молекулярные механизмы его действия на бактериальные клетки точно не изучены, что препятствует рациональному проведению работ по созданию новых антибиотиков этой группы. В чувствительных к Тс клетках антибиотик взаимодействует с малой субчастицей рибосом и ингибирует синтез белка [1]. В клетках, имеющих наиболее распространенный и изученный тип системы устойчивости к Тс, антибиотик взаимодействует с тетрациклиновым белком-репрессором TetR<sup>D</sup>, который активирует синтез трансмембранного белка TetA, обеспечивающего транспорт Тс из бактериальной клетки [2]. Для выяснения молекулярных основ механизма действия антибиотика необходимо установить структуру комплексов антибиотик – мишень. Метод рентгеноструктурного анализа (РСА) имеет свои ограничения, поэтому необходима разработка других подходов, позволяющих получать информацию на молекулярном уровне. Таким комплементарным подходом является метод фотоаффинной модификации.

Для выявления участков полипептидной цепи, находящихся в непосредственном контакте с Тс, мы решили применить метод так называемой сшивки нулевой длины: УФ-индуцированного ковалентного сшивания при облучении комплекса светом с длиной волны 366 нм, при которой копланарная сопряженная система связей колец В–С–D в молекуле Тс (рис. 1) обеспечивает мощное поглощение [3], в то время как молекулы белка не поглощают.

Метод УФ-индуцированного ковалентного сшивания Тс был использован ранее для определения компонентов, участвующих во взаимодействии с антибиотиком, например для такого сложного надмолекулярного комплекса как рибосома [4, 5]. Тем не менее, широкое использование этого метода для изучения молекулярной структуры центров связывания Тс станет возможным только после того, как будет обнаружена прямая корреляция между данными модификации и РСА. Сэнгером с коллегами [6] была установлена третичная структура белка TetR<sup>D</sup> в комплексе с Тс методом РСА с разрешением 2.4 Å и предложена схема контактов Тс с аминокислотными остатками белка (рис. 2). Именно поэтому в качестве объекта для исследования продуктов фотовстраивания тетрациклина в данной работе был выбран комплекс Тс с белком-репрессором TetR<sup>D</sup>. Исследование такого комплекса методом УФ-индуцированного ковалентного сшивания позволит

определить возможность получения данных на атомном разрешении.

### Экспериментальная часть

В работе использовали 7-[<sup>3</sup>H]-тетрациклин с удельной активностью 18 ГБк/ммоль (New England Nuclear, США) и препарат белка TetR<sup>D</sup>, полученный в Институте кристаллографии Свободного университета Берлина (Германия), с концентрацией 33 мг/мл. Стандартный буфер А – 50 мМ трис-НСl рН 8.0, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 150 мМ NaCl, 2 мМ дитиотрейтол.

Комплексообразование 7-[<sup>3</sup>H]-Тс с TetR<sup>D</sup> проводили в объеме 200 мкл. Различное количество белка инкубировали в буфере А при комнатной температуре в течение 15 мин, добавляли Тс до конечной концентрации 0.05 мкМ. Образцы перемешивали, инкубировали при комнатной температуре еще 10 мин и помещались в лед. Степень комплексообразования определяли методом сорбции на нитроцеллюлозных фильтрах *Millipore GS* с размером пор 0.22 мкм. Фильтры промывали дважды 0.5 мл 0.25 М раствором ЭДТА рН 8.0, трижды деионизованной водой и буфером А. Образец наносили на фильтр, трижды промывали 0.5 мл буфером А при скорости 1 мл/мин, фильтры тщательно высушивали на воздухе. Количество связавшегося меченого Тс определяли методом жидкостного сцинтилляционного счета в 5 мл сцинтиллятора ЖС-106 на счетчике «Tracor Analytic» (Франция). По данным связывания определяли оптимальное мольное соотношение Тс:белок для экспериментов по УФ-индуцированному ковалентному сшиванию.

Облучение комплекса проводили дуговой ртутной лампой ДРШ–250 (СССР) с максимумом испускания 366 нм и электрической мощностью 250 Вт в одноразовых пластиковых кюветках с длиной оптического пути 1 см, пропускающей свет с расстояния 25 см только с  $\lambda > 320$  нм. Кювету охлаждали водой со льдом. Концентрация Тс составляла 0.85 мкМ, концентрация белка TetR<sup>D</sup> – 6.7 мкМ.

Выделение комплекса сшитого Тс с белком TetR<sup>D</sup> из реакционной смеси после облучения и разделение пептидов после протеолиза проводили методом ВЭЖХ на колонке с октилсиликагелем в обращенной фазе на хроматографе «Gilson 802-C», детекция при 214 нм. Как элюент использовали раствор 0.1% трифторуксусной кислоты (ТФУ) в ацетонитриле. Выделение комплекса проводили в градиенте концентрации ацетонитрила 10–60% (40 мин) и 60–75% (20 мин). Скорость элюции составляла 0.5 мл/мин. Комплекс высушивали на вакуумном испарителе «Speedvac» (Savant, США), осадок растворяли в 200 мкл 25 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> рН 7.8. Для гидролиза белка добавляли 10 мкг протеиназы V8 и инкубировали при непрерывном перемешивании в течение 17 ч при 25°.

Полученный гидролизат фракционировали на пептиды методом ВЭЖХ. Разделение пептидов проводили в градиенте концентрации ацетонитрила 0–40 % в течение 90 мин с последующим увеличением концентрации ацетонитрила до 60% за 35 мин, далее концентрация ацетонитрила была постоянной. Во фракциях элюата объемом

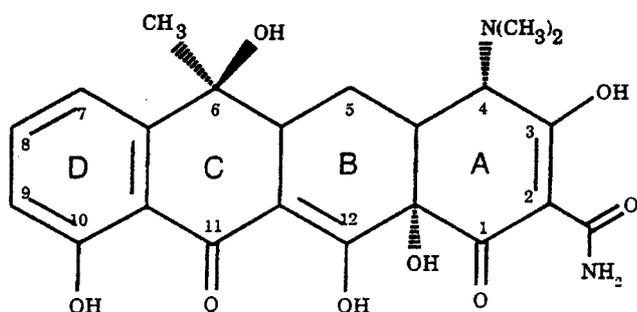


Рис. 1. Структурная формула молекулы тетрациклина

0.5 мл после высушивания и растворения в воде определяли значение радиоактивности, внося пробу в 5 мл сцинтиллятора ЖС-8. Фракции пептидов собирали по поглощению отдельно и определяли значения радиоактивности. Секвенирование пептидов, содержащих радиоактивную метку, проводили на автоматическом газо-жидкостном секвенаторе «Knauer-816» по методике фирмы.

### Результаты и обсуждение

Целью работы является установление прямой корреляции между данными рентгеноструктурного анализа (РСА) центра связывания Тс белком TetR<sup>D</sup> и данными фотоиндуцированного химического сшивания Тс с отдельными аминокислотами белка (рис. 2). Следует отметить, что, несмотря на популярность метода фотоиндуцированного химического сшивания, для многих реагентов (в том числе нулевой длины) подобные корреляции в литературе отсутствуют.

При химической модификации существенным моментом является выбор отношения реагент–мишень. В большинстве случаев использование избытка реагента может приводить к дополнительной неспецифической модификации белка. Чтобы этого избежать, мы определили условия максимального образования комплекса TetR<sup>D</sup>–Тс методом сорбции на нитроцеллюлозных фильтрах в обратном варианте [7]: заданное количество Тс титруется возрастающими количествами белка. На рис. 3 приведена изотерма связывания Тс белком TetR<sup>D</sup>. При увеличении концентрации белка удерживание комплекса на мембране возрастало и достигало постоянного значения на уровне 70% связывания при соотношении Тс : белок = 1:8. Именно это соотношение, практически полностью обеспечивающее отсутствие избытка модифицирующего реагента, и было использовано в опытах по УФ-индуцируемому ковалентному сшиванию.

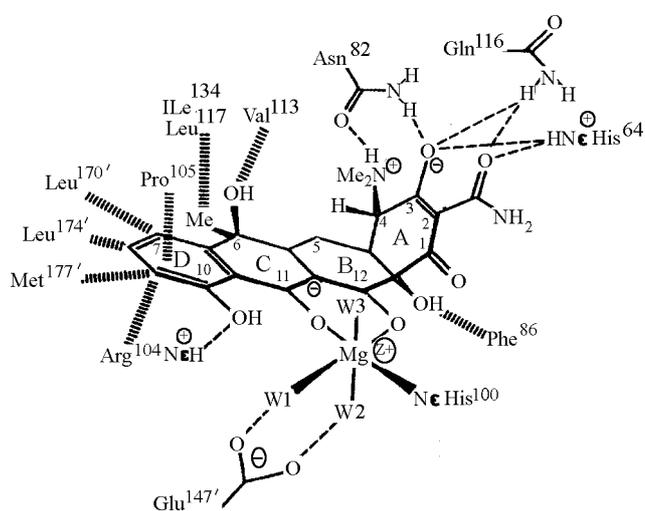


Рис. 2. Схема возможных контактов Тс с аминокислотными остатками белка TetR<sup>D</sup> по данным РСА [6]. Числовые индексы со штрихами обозначают аминокислотные остатки, принадлежащие второй молекуле белка TetR<sup>D</sup> в димере

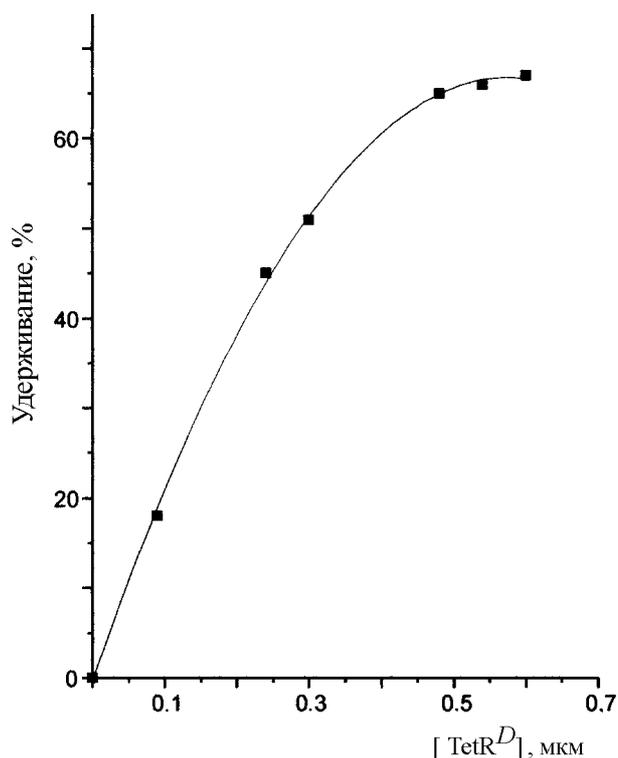


Рис. 3. Изотерма связывания тетрациклина с белком TetR<sup>D</sup> в буфере А (данные 5 экспериментов). Концентрация тетрациклина 0.05 мкМ

### Результаты N-концевого секвенирования V8 пептидов фракции 7 (в пикомолях указано количество аминокислоты, идентифицируемой на каждом шаге отщепления)

Номер шага	Аминокислота	Содержание кислоты, пмоль
1	A	204
	I	15
2	L	152
3	Q	104
	A	17
4	I	84
	R	6
5	M	84
	H	3
6	D	51
	H	2
7	S	12
8	D	38
9	D	40

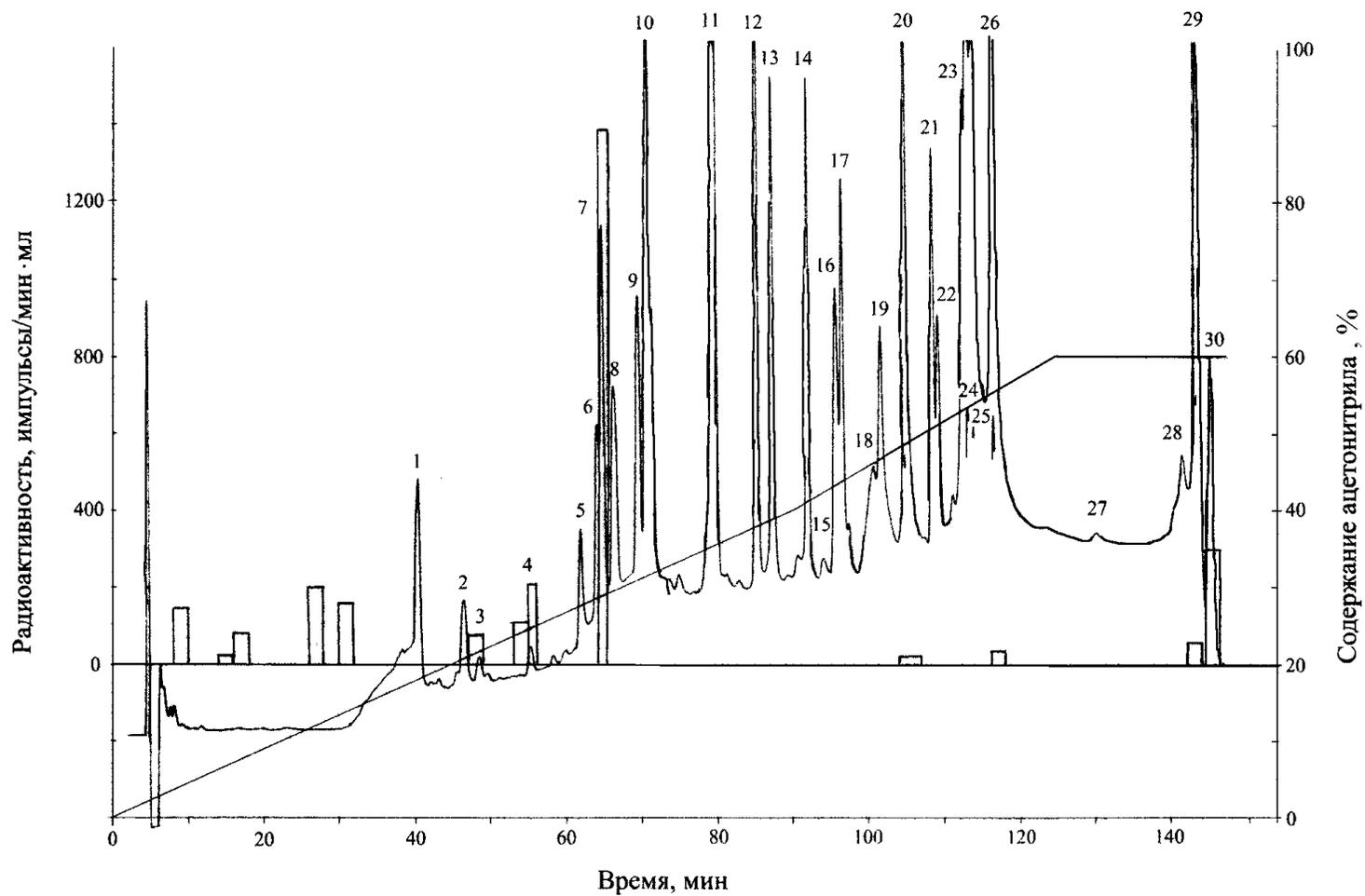


Рис. 5. Профиль элюции V8 пептидов модифицированного Tc белка TetR<sup>D</sup> на колонке RP-300. Детекция при 214 нм, чувствительность 0.2. Прямоугольниками обозначены значения радиоактивности в имп/мин·мл за вычетом фона (60 имп/мин·мл)

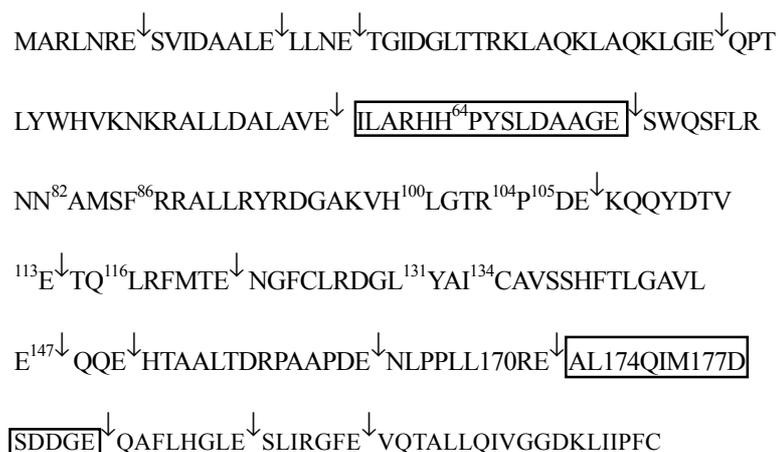


Рис. 4. Аминокислотная последовательность белка TetR<sup>D</sup>. Стрелками обозначены пептидные связи, гидролизуемые протеиназой V8:E-X. Верхними индексами обозначены аминокислотные остатки, сближенные с Tc по данным PCA. В рамку заключены 2 пептида, идентифицированные во фракции 7 (рис. 5)

Для УФ-облучения использовали дуговую ртутную лампу ДРШ-250 с максимумом излучения при 366 нм и электрической мощностью 250 Вт. Препараты комплекса Tc с белком TetR<sup>D</sup> в буфере А облучали в течение 10 мин, комплекс отделяли от несвязанных Tc, продуктов фотолиза и солей методом ВЭЖХ. Выход модификации составлял около 6% по Tc.

Очищенный модифицированный белок гидролизовали протеиназой V8, расщепляющей полипептидную цепь после остатков глутаминовой кислоты. Возможный набор пептидов, получаемый гидролизом протеиназой V8, представлен на рис. 4. По данным PCA, как видно из рис. 4, в комплексе с репрессором с Tc сближено более 10 аминокислотных остатков из различных пептидов белка. Смесь пептидов модифицированного TetR<sup>D</sup> после гидролиза протеиназой V8 фракционировали методом ВЭЖХ и в полученных фракциях определяли поглощение при 214 нм и радиоактивность (рис. 5). Практически вся радиоактивность обнаружена во фракции 7.

При N-концевом ступенчатом секвенировании пептидов фракции 7 были идентифицированы два пептида: основной и минорный (таблица). N-концевая последовательность основного пептида соответствовала пептиду V8: A173–E183 белка TetR<sup>D</sup>, а N-концевая последовательность минорного – последовательности V8: I59–E73 (рис. 4, таблица). К сожалению, при данных условиях разделения

время выхода обоих пептидов совпадает. Более того, положение модифицированного пептида может совпадать (или не совпадать) с исходным пептидом. Поэтому в условиях данного эксперимента не представляется возможным однозначно определить, какой из двух пептидов (или оба) модифицируется Tc. Несмотря на это, оба найденных пептида содержат в своем составе аминокислотные остатки, по данным PCA сближенные в комплексе с молекулой Tc [6] (рис. 2). В состав этих пептидов входят аминокислоты H64 и M177, обладающие сильными нуклеофильными свойствами. Именно они могут рассматриваться как наиболее вероятные места атаки продуктами фотолиза Tc.

В настоящей работе впервые получена прямая корреляция между данными PCA и результатами фотоаффинной модификации Tc в комплексе с белком TetR<sup>D</sup>, что позволяет сопоставить данные для кристаллического состояния комплекса с данными о его поведении в растворе. Полученные результаты открывают принципиально новые возможности для изучения структуры центров связывания Tc в других молекулярных мишенях.

Работа поддержана грантами РФФИ 98-04-49005 и «Университеты России» 5099 и 5157.

Выражаем благодарность Б.М. Сергееву за помощь при проведении фотолиза и А.Х. Мусолямову за секвенирование пептидов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Suzuka J., Kaji H., Kaji A. // Proc. Nat. Acad. Sie. USA. 1966. **55**. P. 483.
2. Hillen W., Berens C. // Annu. Rev. Microbiol. 1994. **48**. P. 345.
3. Стрельцов С. А., Куханова М. К., Гурский Г. В. и др. // Молекулярная биология. 1975. **9**. С. 910.
4. Goldman R. A., Hasan T., Hall C. C., Strycharz W. A., Cooperman B. S. // Biochemistry. 1983. **22**. P. 359.
5. Oehler R., Polacek N., Steiner G., Barta A. // Nucl. Acid Res. 1997. **25**. P. 1219.
6. Kisker C., Hinrichs W., Tovar K., Hillen W., Saenger W. // J. Mol. Biol. 1995. **247**. P. 260.
7. Hillen W., Klock G., Kaffenberger I., Wray L. V., Reznikoff W. S. // J. Biol. Chem. 1982. **257**. P. 6605.