

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 548.55

ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ ГТФАЗЫ ERA ИЗ ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА

© 2023 г. Э. А. Ключкова¹, Д. Р. Исламов¹, А. Д. Биктимиров¹, А. В. Рогачев^{2,6}, Ш. З. Валидов¹,
А. Г. Бикмуллин¹, А. В. Симакин³, Г. С. Петерс⁴, М. М. Юсупов⁵, К. С. Усачев^{1,*}

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

²Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

³Институт общей физики им. А. М. Прохорова РАН, Москва, Россия

⁴Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

⁵Институт генетики, молекулярной и клеточной биологии (IGBMC), Илькириш-Граффенштаден, Франция

⁶Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия

*E-mail: k.usachev@kpfu.ru

Поступила в редакцию 01.07.2022 г.

После доработки 20.07.2022 г.

Принята к публикации 11.08.2022 г.

Изучение кристаллической структуры белков является важным инструментом для разработки новых лекарств. Наиболее трудоемким этапом в получении структурных данных является выращивание хорошо дифрагирующих кристаллов белка. Представлены выделение, очистка и кристаллизация белка ГТФаза Era из патогенной бактерии золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*). ГТФаза Era в клетках бактерий является одним из факторов сборки рибосомы. Фермент отвечает за рост и деление клетки, однако его структура мало изучена. Получены кристаллы белка Era из *Staphylococcus aureus*, которые могут быть использованы в дальнейших структурных исследованиях методом монокристалльного рентгеноструктурного анализа.

DOI: 10.31857/S0023476123010137, EDN: GBATXG

ВВЕДЕНИЕ

Золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) является возбудителем многих инфекционных заболеваний, возглавляет список бактерий, чаще всего вызывающих внутрибольничные инфекции и поражающих послеоперационные раны. Этот патогенный микроорганизм чрезвычайно устойчив к антибиотикам пенициллинового ряда, антисептикам, высоким температурам, прямым солнечным лучам. Наиболее опасными для человека являются штаммы *S. aureus*, устойчивые к метициллину (MRSA), ванкомицину (VRSA) и гликопептидам (GISA) [1–3].

Большее половины всех известных антибиотиков оказывают бактериостатический или бактерицидный эффект за счет нарушения или остановки белоксинтезирующего аппарата клетки бактерии. Ключевым звеном в процессе синтеза белка является рибосома.

Рибосомы (важнейшие органеллы клетки) представляют собой нуклеопротеид, собирающийся из одной (в малой 30S-субъединице) или нескольких (в большой 50S-субъединице) молекул рибосомальной РНК (рРНК) и специфиче-

ских рибосомных белков. Сборка или созревание каждой частицы рибосомы — очень сложный и высококоординированный процесс, каждый этап которого зависит от целого ряда вспомогательных молекул — факторов сборки [4]. Даже небольшие нарушения в процессах сборки рибосом могут значительно уменьшить скорость синтеза всех белков в клетке или полностью остановить клеточное функционирование [5, 6].

Созревание малой 30S-субъединицы рибосомы в бактериальной клетке регулируется определенными факторами сборки, работающими в строгой последовательности [7, 8]. Одним из таких факторов является гуанозинтрифосфатсвязывающая гидролаза (ГТФаза) Era (*Escherichia coli* Ras-like protein), отвечающая за поздние этапы сборки рибосомной частицы и контролирующая таким образом клеточный рост и деление [9]. В настоящее время имеется мало информации об особенностях пространственного строения ГТФаз Era из различных микроорганизмов, в том числе из патогенной бактерии *S. aureus* [6].

ГТФаза Era относится к семейству гидролаз, но с характерным наличием в С-концевом регионе специфического домена, содержащего после-

довательность GxxG, ответственного за связывания с рРНК.

Era из *S. aureus* — низкомолекулярная ГТФаза (300 аминокислотных остатков, 35.3 кДа), состоящая из двух доменов: ГТФазный домен на N-конце (высококонсервативный среди семейства ГТФаз) и С-концевой домен, содержащий характерную для *S. aureus* последовательность GKGG. Согласно [10] ГТФаза Era благодаря участку GKGG распознает участок 16S рРНК в районе спирали 45 (h45) около 3'-конца с последовательностью ¹⁵³¹AUCACCUCCUUA¹⁵⁴², образует комплекс с рРНК, и это действие стимулирует ГТФазную активность Era. В свою очередь, гидролиз гуанозинтрифосфата (ГТФ) позволяет белку Era освободиться от зрелой 30S-субъединицы рибосомы [11]. Таким образом, ГТФаза Era отслеживает наличие достаточного количества ГТФ в клетке бактерии, необходимого для дальнейшей жизнедеятельности микроорганизма. Тем самым ГТФаза Era контролирует скорость роста клетки через регуляцию созревания рибосомной 30S-субъединицы [12].

Для некоторых бактерий ГТФаза Era жизненно необходима для клетки [13]. Поэтому ГТФаза Era из *S. aureus* может послужить отличной моделью для конструирования новых противомикробных препаратов на основе информации о ее трехмерной структуре.

Одним из современных методов точного определения структуры вещества является рентгеноструктурный анализ (РСА) кристаллов. Однако проблема таких исследований заключается в трудности получения кристаллов белков, что значительно увеличивает время эксперимента [14, 15]. Для получения информации о форме, размере, пространственной ориентации доменов белка в растворе используют метод малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР, или SAXS, small angle X-ray scattering). В данной работе проведены выделение, очистка, исследование структуры белка Era ГТФаза из *S. aureus* в растворе и выращивание кристаллов этого белка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клонирование и экспрессия Era. Ген *era* клонировали из генома *S. aureus* и на основе вектора pET28a создали конструктор Era_{Sa}::pET28a, несущий ген *era* с шестью гистидинами на С-конце (His₆-Era) под контролем LacI^q-промотора. Конструктор подтвержден секвенированием. Культуру трансформированных полученной плазмидой клеток (*E. coli* штамм BL21(DE3)pLysS) выращивали на богатой питательной среде LB при 37°C на шейкере со скоростью вращения 180 об./мин до OD₆₀₀ = 0.6. Индукцию синтеза His₆-Era проводили с помощью добавления изопропил-β-D-

тиогалактопиранозид (IPTG) с дальнейшей культивацией клеточной культуры в течение 4 ч при этих же условиях. Далее клетки осаждали центрифугированием 10 мин при частоте вращения 5000 об./мин при 4°C (центрифуга “Beckman”, Avanti JXN-26, ротор JLA-9.1000, США), замораживали и хранили при –24°C.

Для выделения белка Era полученные замороженные клетки размораживали, ресуспендировали в специально подобранном буфере 1 (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.8 M NaCl) в присутствии ингибиторов протеаз и разрушали с помощью ультразвукового гомогенизатора HD2070 (“Bandelin”, Германия). Полученный лизат центрифугировали при 45 000 об./мин при 4°C в течение 45 мин (центрифуга Optima XPN, ротор 45Ti) для осаждения клеточного дебриса.

Очистка Era. Очистку His₆-Era от супернатанта проводили в два этапа: сначала методом металл-хелатной аффинной хроматографии (Immobilised Ion Affinity Chromatography, IMAC), затем с помощью гель-фильтрации. Для этого супернатант наносили на Ni-NTA-сорбент (Ni-NTA Agarose, QIAGEN, Германия), последовательно промывали смолу буферами 2 (50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 M NaCl), 3 (50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 0.8 M NaCl; 20 mM имидазол) и элюировали белок буфером 4 (50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 0.8 M NaCl; 0.3 M имидазол). Гель-фильтрацию проводили с помощью хроматографической системы NGC Discover (“BioRad”, США) на колонке Enrich Sec 650 (“BioRad”, США) в буфере 1. Пиковые фракции были отобраны и сконцентрированы в концентраторах с отсечением 10 кДа (Amicon Ultra, Merk KGaA, Германия) центрифугированием при 14 500 об./мин, 4°C в течение 10 мин, многократно. Чистоту полученного образца оценивали с помощью денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) (SDS-PAGE) в Tris-глициновом буферном растворе, pH 8.3 (25 mM Tris-буфер; 250 mM глицина; 0.1% додецилсульфат натрия) при температуре 20°C и рабочем напряжении 140 В.

Кристаллизация Era. Раствор очищенного белка сконцентрирован до значения 30 мг/мл в буфере 1. К объему белка Era, рассчитанному на кристаллизационный эксперимент, добавили нерасщепляемый аналог ГТФ (GppCp, Guanosine-5'-[(β,γ)-methyleno]triphosphate, Sodium salt, Jena Bioscience, Германия) до конечной концентрации 10 mM. Поиск кристаллизационных условий был выполнен с использованием наборов JBScreen JCSG++1, ++2, ++3 и ++4 (Jena Bioscience, Германия) методом диффузии в парах в варианте висячей капли при 22°C в 24-луночных планшетах (Hampton Research, США). 1.25 мкл буфера с белком His₆-Era+GppCp смешивали с 1.25 мкл про-

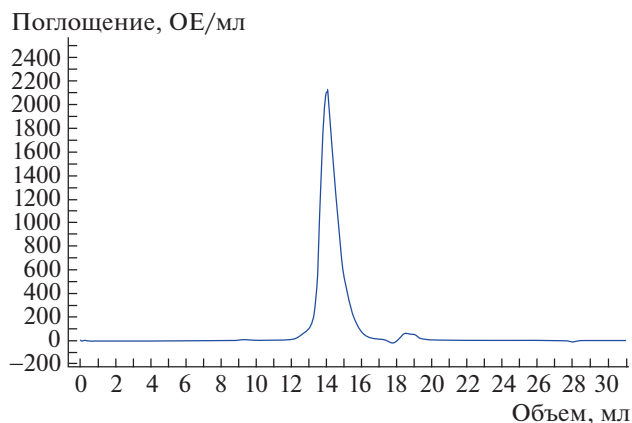


Рис. 1. Пик элюции His₆-Era после нанесения на гель-фильтрационную колонку Enrich Sec 650.

тивораствора и уравнивали 250 мкл противораствора.

Малоугловое рентгеновское рассеяние. Для исследований методом МУРР использовали образец белка His₆-Era из *S. aureus* с концентрацией 12 мг/мл в буфере 1. Предварительный анализ данных выполняли с использованием дифрактометра Nanostar SAXS (Bruker AXS GmbH, Германия) ФИЦ КазНЦ РАН. Дальнейшие эксперименты выполнены на установке Rigaku HighFlux HomeLab (Rigaku, Япония) [16] с вращающимся медным анодом MicroMax 007-HF. Длина волны генерируемого рентгеновского излучения 1.54 Å (CuK_α). Расстояние от позиции образца до детектора составляло 2.0 м (диапазон q составляет 0.006–0.19 Å⁻¹). Измерения выполнены при температуре 20°C. Азимутальное интегрирование полученных 2D-изображений с детектора выполнено с использованием программного обеспечения SaxsGui (Rigaku Innovative Technologies, Inc., Токио, Япония) и JJ X-ray System Aps (Хорсхольм, Дания).

Получение дифракционных данных. Данные рентгеновской дифракции были собраны при 100 K (криопротекция в градиенте концентрации глицерина 1–10% с шагом 1%) на дифрактометре Rigaku XtaLAB Synergy-S, оснащенный детектором HyPix-6000HE. Длина волны генерируемого рентгеновского излучения 1.54 Å (CuK_α). Данные рентгеновской дифракции были собраны с шагом 0.5° при расстоянии от кристалла до детектора 40 мм и времени экспозиции 100 с. Дифракционные изображения обработаны с помощью пакета программ XDS [17].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения препарата белка, удовлетворяющего требованиям кристаллизации, провели

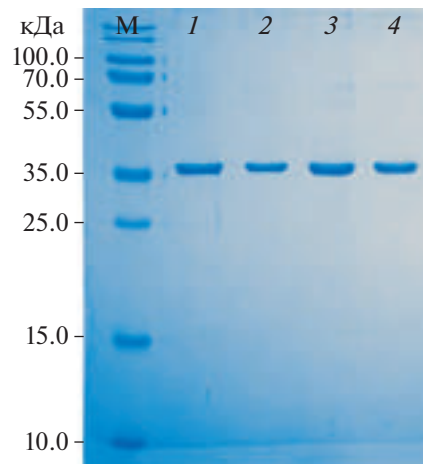


Рис. 2. Электрофоретический анализ в ПААГ в денатурирующих условиях нескольких пиковых фракций His₆-Era после гель-фильтрации (М – маркер, 1, 2 – фракции His₆-Era с левого плеча пика, 3, 4 – фракции с правого плеча пика).

подбор и оптимизацию условий получения белка His₆-Era в культуре клеток *E. coli*, подбор состава и pH буфера на этапах разрушения клеток и очистки белка. В итоге были использованы буферные условия: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 200 mM NaCl [18]. Профиль гель-фильтрации приведен на рис. 1. Чистоту полученного после гель-фильтрации препарата белка анализировали с помощью электрофореза в ПААГ (рис. 2).

При концентрировании белка свыше 3 мг/мл наблюдалась его агрегация. Агрегации удалось избежать, повысив концентрацию NaCl до 0.8 M (буферы 1, 3, 4) и до 1 M (буфер 2), как это было сделано в [10]. В результате удалось сконцентрировать His₆-Era до значения 30 мг/мл. Перед кристаллизацией к образцу белка добавляли негидролизующий аналог ГТФ GppCp до 10 mM для стабилизации структуры целевого белка и проводили поиск условий кристаллизации. В результате в условиях: 20% PEG 3350; 0.2 M цитрата калия; pH 8.3 (JBScreen JCSG++1/B12, Jena Bioscience, Германия), через 4 нед выросли монокристаллы белка His₆-Era размером 80 × 50 × 40 мкм (рис. 3). Для подтверждения того, что полученные кристаллы являются кристаллами целевого недеградировавшего белка His₆-Era, использовали методику отмывки, растворения кристаллов в воде и анализ полученного раствора с помощью денатурирующего электрофореза в ПААГ (рис. 4).

Данные по исследованию размера, формы и пространственного расположения молекул белка His₆-Era из *S. aureus* в растворе методом МУРР обработаны в пакете программ ATSAS [19]. Проекция полученной формы частиц показаны на рис. 5. Полученная 3D-модель электронной плот-

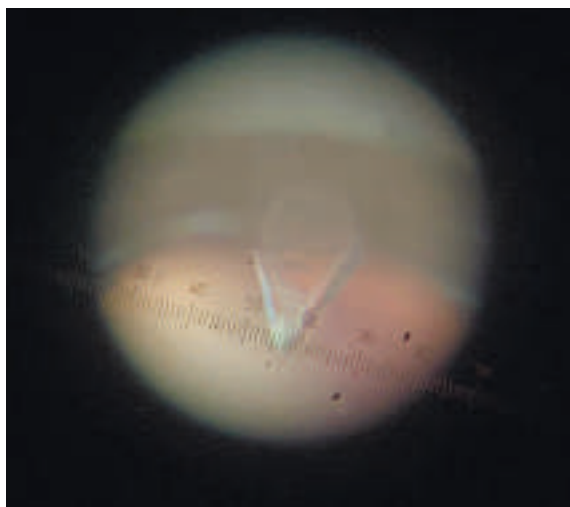


Рис. 3. Кристалл His₆—Era.

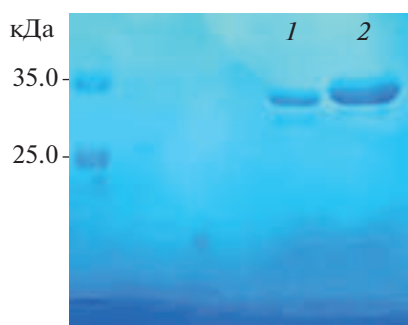


Рис. 4. ПААГ электрофорез кристаллов His₆—Era; 2 — растворенные кристаллы, 1 — весь оставшийся маточный раствор из кристаллизационной капли.

ности имеет форму цилиндра с параметрами радиуса гирации $R_g = 23.1 \text{ \AA}$ и наибольшей длиной $D_{\max} = 57.7 \text{ \AA}$. Рассчитанная структура Era ГТФаза из *S. aureus* с помощью проекта AlphaFold2 [20] имеет размеры $62 \text{ \AA} \times 56 \text{ \AA} \times 47 \text{ \AA}$. Для этой структуры в программном пакете CRYSOLO был проведен теоретический расчет радиуса гирации, он составил $R_g = 21.5 \text{ \AA}$. Отметим, что согласно экспериментам РСА белок Era из *E. coli* кристаллизуется в виде димера [21]. Однако параметры полученной в настоящей работе формы свидетельствуют о том, что в исследуемом растворе при заданной концентрации белок Era ГТФаза из золотистого стафилококка находится в виде мономера.

На рис. 6 приведена дифрактограмма кристалла белка His₆—Era, полученная при исследовании методом РСА. Дифракционная картина соответствует дифракции рентгеновского излучения на элементарной ячейке белкового кристалла с разрешением $\sim 4 \text{ \AA}$, что не позволяет решить структуру белка с высоким разрешением. Необходимы дальнейший подбор условий кристаллизации, криопротекции кристалла и сбор данных на более интенсивном синхротронном источнике излучения, что планируется при дальнейших исследованиях.

В данной работе впервые оптимизированы условия выделения, очистки и кристаллизации ГТФазы Era из *S. aureus* в комплексе с негидролизуемым аналогом ГТФ GppCp и найдены условия кристаллизации комплекса.

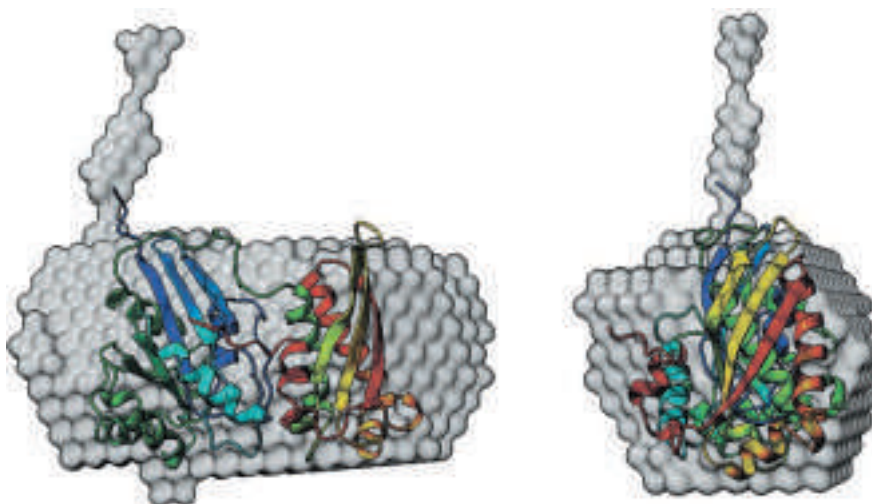


Рис. 5. Формы белка His₆—Era из *S. aureus* в двух проекциях по данным МУРР. Для сопоставления размеров показана Era ГТФаза из *S. aureus*, полученная с помощью программы AlphaFold 2.0 (UniProt A51T95).

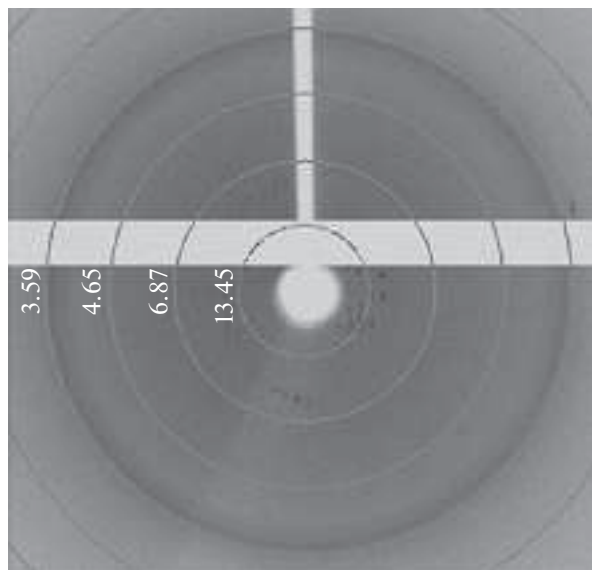


Рис. 6. Дифракционная картина белка His₆–Era.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен синтез рекомбинантного белка Era из патогенной бактерии *Staphylococcus aureus*. Достаточное для кристаллизации количество белка было очищено с помощью металл-хелатной и эксклюзионной хроматографии, также показано предпочтительное мономерное состояние белка в растворе. Проведен подбор условий для кристаллизации. Кристаллы получены методом диффузии в парах в варианте висячей капли с использованием противораствора, содержащего PEG 3350 и цитрат калия. Данные кристаллы белка Era из *Staphylococcus aureus* демонстрируют дифракционную картину, характерную для белковых кристаллов. Оптимизация найденных условий кристаллизации белка Era из *Staphylococcus aureus* позволит в дальнейшем получить кристаллы, пригодные для структурных исследований методом РСА.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-20034).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Stijn Blot R.N., Vandewoude K., Colardyn F.* // N. Engl. J. Med. 1998. V. 339 (27). P. 2025.
<https://doi.org/10.1056/nejm199812313392716>
2. *Jeljaszewicz J., Mlynarczyk G., Mlynarczyk A.* // Int. J. Antimicrob. Agents. 2000. V. 16 (4). P. 473.
[https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(00\)00289-2](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(00)00289-2)
3. *Fierobe L., Decré D., Müller C. et al.* // Clin. Infect. Dis. 1999. V. 29 (5). P. 1231.
<https://doi.org/10.1086/313454>
4. *Shajani Z., Sykes M.T., Williamson J.R.* // Annu. Rev. Biochem. 2011. V. 80. P. 501.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062608-160432>
5. *Kaczanowska M., Rydén-Aulin M.* // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2007. V. 71 (3). P. 477.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00013-07>
6. *Усачев К.С., Юсупов М.М., Валидов Ш.З.* // Биохимия. 2020. Т. 85 (11). С. 1690.
<https://doi.org/10.1134/S0006297920110115>
7. *Stern S., Powers T., Changchien L.I.-M., Noller H.F.* // Science. 1989. V. 244 (4906). P. 783.
<https://doi.org/10.1126/science.2658053>
8. *Davis J.H., Williamson J.R.* // Philos. Trans. R. Soc. 2017. V. 372 (1716). Art. 20160181.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0181>
9. *Bourne H.R.* // Philos. Trans. R. Soc. 1995. V. 349 (1329). P. 283.
<https://doi.org/10.1098/rstb.1995.0114>
10. *Tu C., Zhou X., Tropea J. et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2009. V. 106 (35). P. 14843.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0904032106>
11. *Simon Goto, Akira Muto, Hyouta Himeno* // J. Biochem. 2013. V. 153 (5). P. 403.
<https://doi.org/10.1093/jb/mvt022>
12. *Ji X.* // Postepy Biochem. 2016. V. 62 (3). P. 335.
13. *Xiaomei Zhou, Howard K. Peters III, Xintian Li et al.* // J. Bacteriol. 2020. V. 202. P. 21.
<https://doi.org/10.1128/JB.00342-20>
14. *Ren H., Liang Y., Li R. et al.* // Acta Cryst. D. 2004. V. 60. P. 1292.
<https://doi.org/10.1107/S0907444904010467>
15. *Meulenbroek E., Pannu N.* // Acta Cryst. F. 2011. V. 68. P. 45.
<https://doi.org/10.1107/S1744309111045842>
16. *Murugova T.N., Vlasov A.V., Ivankov O.I. et al.* // J. Optoelectron. Adv. Mater. 2015. V. 17. P. 1397.
17. *Kabsch W.* // Xds. Acta Cryst. D. 2010. V. 66. P. 125.
<https://doi.org/10.1107/S0907444909047337>
18. *Chen X., Chen S.-M., Powell B. et al.* // FEBS Lett. 1999. V. 445. P. 425.
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00178-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00178-7)
19. *Manalastas-Cantos K., Konarev P.V., Hajizadeh N.R. et al.* // J. Appl. Cryst. 2021. V. 54. P. 343.
<https://doi.org/10.1107/S1600576720013412>
20. *Jumper J., Evans R., Pritzel A. et al.* // Nature. 2021. V. 596 (7873). P. 583.
21. *Chen X., Court D.L., Ji X.* // PNAS. 1999. V. 96 (15). P. 8396.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.15.8396>