

ISSN 0002–354X (print)

УДК 577.112

Поступило в редакцию 03.02.2017

Received 03.02.2017

Е. В. Панкратова, В. В. Бритиков, член-корреспондент С. А. Усанов*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь***ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАНСМЕМБРАННОГО БЕЛКА CD79B МЕТОДОМ
МНОГОМЕРНОЙ ИМПУЛЬСНОЙ ЯМР СПЕКТРОСКОПИИ**

В настоящей работе с использованием системы бесклеточной экспрессии получены меченые стабильными изотопами углерода-13 и азота-15 белки CD79A/CD79B. Установлено, что целевые белки обнаруживаются в осадке бесклеточной системы экспрессии, что согласуется с их мембранной природой и наличием трансмембранного домена в их составе. Определены физико-химические параметры образцов CD79A/CD79B с целью получения многомерных корреляционных ЯМР спектров высокого разрешения. Анализ полученных корреляционных спектров свидетельствует, что CD79B при выбранных условиях находится в неупорядоченном состоянии. Расщепление сигнала от NH-группы боковой цепи единственного остатка триптофана указывает на наличие медленных конформационных превращений в этой области полипептидной цепи. Добавление трифтороуксусной кислоты к раствору CD79B в диметилсульфоксиде приводит к разрушению межмолекулярных связей «белковой мицеллы» и образованию его мономерной формы, хорошо детектируемой ЯМР спектроскопией.

Ключевые слова: неупорядоченные белки, вспомогательный белковый гетеродимер b-клеточного рецептора CD79A/CD79B, система бесклеточной экспрессии белков, пространственная структура белка, ЯМР спектроскопия белков.

E. V. Pankratova, V. V. Britikov, Corresponding Member S. A. Usanov*Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus***STUDY OF THE TRANSMEMBRANE PROTEIN CD79B BY MULTIDIMENSIONAL
PULSE NMR SPECTROSCOPY**

In the present work, using the cell-free expression system, we prepared the proteins CD79A/CD79B labeled by stable isotopes of carbon-13 and nitrogen-15. It is shown that target proteins are mostly localized in the pellet of the cell-free expression system, which is consistent with their membrane nature and the presence of a transmembrane domain in their structure. Physicochemical parameters of the CD79A/CD79B samples were defined to obtain the multidimensional correlation NMR spectra of high resolution. The analysis of the obtained correlation spectra shows that under experimental conditions, CD79B exists in the disordered state. The splitting of the signal from the NH-group of single tryptophan residue indicates the presence of slow conformational transitions in this region of the polypeptide chain. The addition of the trifluoroacetic acid to the solution of CD79B in DMSO leads to the destruction of the intermolecular bonds of “protein micelles” and the formation of its monomeric form that is well detectable by NMR.

Keywords: the disordered proteins, auxiliary heterodimeric protein of the B-cell receptor CD79A/CD79B, the cell-free protein expression system, the spatial structure of a protein, protein NMR spectroscopy.

Введение. Начиная с 2000-х годов было обнаружено, что некоторые белки выполняют свои функции в неупорядоченном состоянии. Это показано на примере существования истинно неупорядоченных белков (ИНБ) или неупорядоченных участков полипептидной цепи. Такие белки широко представлены в природе и сильно отличаются от структурированных на различных уровнях организации, а также имеют хорошо узнаваемые композиции аминокислотных последовательностей. Характерным свойством этих белков является их исключительная структурная гетерогенность, где различные участки полипептидной цепи могут быть структурированы (или не структурированы) в разной степени, в результате чего они обладают способностью к множественным потенциальным способам укладки. Распределение конформеров постоянно изменяется во времени, а также в ответ на изменения условий окружающей среды [1]. Мозаичная структура организации таких белков имеет решающее значение для их функционирования, они вовлечены в биологические процессы, которые полагаются на конформационную гибкость, недоступную

для структурированных белков. Подсчитано, что ИНБ составляют около 30 % от общего числа белков человека и выполняют важные регуляторные функции в ключевых клеточных процессах [2–4].

Было отмечено, что низкое содержание гидрофобных аминокислотных остатков и пролина, изменяющего пространственное направление полипептидной цепи, в комбинации с высоким содержанием заряженных аминокислот представляет собой характерную особенность большинства ИНБ [5; 6]. Тот факт, что последовательности структурированных и неупорядоченных белков значительно отличаются, делает возможным выделить ИНБ в отдельный класс внутри «царства белковых» молекул и предсказать с использованием различных вычислительных средств с большой вероятностью их принадлежность [7; 8]. Из-за свойств полипептидной последовательности очищенные ИНБ обычно хорошо растворимы и спонтанно не агрегируют, в отличие от их тенденции формировать патологические фибриллы в клетке [9]. Большое количество белков являются гибридами между структурированными и неструктурированными доменами, такая организация имеет решающее значение для их функционирования [10].

CD79A и CD79B являются передающими сигнал трансмембранными белками В-клеточного рецептора. Эти два белка нековалентно связываются с тяжелыми цепями иммуноглобулина М (IgM) через их трансмембранные участки и формируют гетеродимерный комплекс. Ассоциация CD79A/В гетеродимера с тяжелыми цепями иммуноглобулина требуется для поверхностной экспрессии В-клеточного рецептора. CD79A и CD79B имеют экстраклеточный иммуноглобулиновый домен, трансмембранный и короткий, истинно неструктурированный, цитоплазматический домен (ИНБ домен). Цитоплазматический домен CD79A состоит из 61 аминокислоты, CD79B – из 48. Цитоплазматические домены этих белков имеют множественные сайты фосфорилирования, а также консервативную последовательность сигнального мотива (ITAM). В условиях *in vivo* тирозины ITAM мотива CD79A синергируют с ITAM мотивами CD79B в процессе опосредованного перехода от про- к пре-В-клеткам, что было предположено на основе анализа мышей с направленными мутациями ITAM мотива CD79A и CD79B [11; 12].

До момента открытия гетеродимера CD79A/CD79B, иммунологи терялись в догадках, как IgM передает сигнал внутрь клетки, не имея достаточно протяженного цитоплазматического «хвоста». Открытие CD79A/CD79B гетеродимера и его ключевой роли в передаче сигнала внутрь клетки Майклом Ретом в начале 1990-х значительно расширило понимание механизмов активации В-лимфоцита [13]. Молекулярная архитектура IgM и CD79A/CD79B является критической проблемой в понимании, каким образом В-клеточный рецептор проводит сигнал в клетку. Для В-клеточного рецептора только CD79A имеет заряженные аминокислоты в его трансмембранном домене, а IgM и CD79B содержат только две полярные аминокислоты в ТД [14]. Наличие заряженного глутаминового остатка в ТД CD79A позволяет предположить, что взаимодействие между IgM и CD79A/CD79B гетеродимером в основном осуществляется через CD79A. Мутационные исследования подтвердили решающую роль полярных аминокислот в трансмембранном участке IgM и выявили, что мутация YS-VV в μ -цепи препятствует ассоциации с CD79A/CD79B гетеродимером.

Структура экстраклеточного домена CD79B определена методом рентгеноструктурного анализа. Его точная роль в сборке В-клеточного рецептора и передаче сигнала до сих пор остается не выясненной [15]. В свою очередь структуру остальной части белка, в состав которой входят цитоплазматический и трансмембранный домены при помощи рентгеноструктурного анализа установить не удастся из-за невозможности получения кристаллического состояния. Считается, что взаимодействие трансмембранных участков CD79A с CD79B играет важную роль в дальнейшей передаче сигнала через их цитоплазматические домены. Поэтому установление структуры и конформационных превращений для этих областей позволит понять полный молекулярный механизм передачи сигнала В-клеточным рецептором. Установление структуры в данном случае возможно только при помощи методов ЯМР спектроскопии.

ЯМР спектроскопия является первичной экспериментальной техникой для характеристики структурных ансамблей и переходных взаимодействий между истинно неупорядоченными белками и их партнерами в растворе. Однако традиционный биомолекулярный ЯМР инструмента-

рий, который был разработан в последние три десятилетия для исследования структурированных глобулярных белков, требует адаптации для истинно неупорядоченных белков.

Стабильная локальная трехмерная структура или частично населенная вторичная структура создают уникальное локальное электронное окружение и поэтому вносят свой вклад в химический сдвиг, меняя изотропное экранирование для каждого ядерного спина. Отсутствие стабильной структуры в ИНБ приводит к усреднению большей части вкладов от локального химического окружения в химические сдвиги и это является причиной низкой дисперсии сигналов в ЯМР спектрах.

Конформационная динамика и переходные структуры ИНБ высоко чувствительны к экспериментальным условиям, таким как pH, состав буферной среды, концентрация солей и температура. При определенных условиях некоторые участки ИНБ могут испытывать конформационную динамику во временном масштабе, что ведет к интенсивному уширению спектральных линий и исчезновению корреляционных пиков. Оптимизация условий измерений образца, таким образом, является более важным фактором, чем для глобулярных белков. Дальнейшие проблемы появляются из-за высокого содержания пролиновых остатков в аминокислотной последовательности ИНБ. Так как пролины не имеют амидных протонов, они не детектируются при помощи протонных ЯМР спектров.

Цель работы – получение меченных стабильными изотопами белков CD79A и CD79B и определение условий для получения высококачественных многомерных корреляционных ЯМР спектров с целью дальнейшего их использования для определения пространственной структуры мембран-связанного состояния белков.

Материалы и методы исследования. *Внеклеточная экспрессия белков CD79A и CD79B.* Плазмидный вектор экспрессии с T7 промотором, кодирующий белки CD79A и CD79B, нарабатывали в клетках *E. coli* штамма BL21(DE3). Плазмидная ДНК выделялась с использованием реактивов из коммерческого набора PlasmidPlusMidiKit фирмы QIAGEN (Германия).

Концентрацию плазмидной ДНК определяли спектрофотометрически с использованием спектрофотометра NanoDrop 2000 фирмы ThermoScientific (США). **Коррекцию базовой линии** выполняли по поглощению при 340 нм. Концентрацию рассчитывали по оптическому поглощению на длине волны 260 нм с использованием коэффициента молярной экстинкции $0,020 \text{ (мкг/мл)}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

S12 экстракт для бесклеточной системы экспрессии получали по методике [16] с изменениями. Первоначально растили прекультуру бактерий *E. coli* штамма BL21(DE3) **Rosetta при температуре 37 °C** (200 об/мин) в 2xYTPG среде в присутствии 30 мкг/мл каномидина. Ферментер инокулировали полученной культурой в соотношении 1 : 100. В ферментере клетки растили при 37 °C (800 об/мин) при поддержании постоянного pH 7,0 путем добавления 2M NaOH с постоянной аэрацией со скоростью 8 л/мин. Оптическая плотность среды контролировалась по поглощению при 600 нм (OD_{600}) каждые 3 ч. При достижении OD_{600} 3,5 единиц, температура опускалась до 10 °C и сбор клеток проводился путем пропускания культурального раствора через нержавеющую металлическую катушку, предварительно охлажденную водой со льдом (для поддержания температуры 10–15 °C). Клеточную суспензию центрифугировали 15 мин при 4000g, затем ресуспендировали в 3 л экстракционного буфера. Полученный раствор клеток замораживали в жидком азоте и хранили при –80 °C до момента получения S12 экстракта.

Для получения S12 экстракта размораживали подготовленные клетки, добавляли DTT до концентрации 1 mM и раствор ингибитора протеаз (Complete EDTA-free, SigmaAldrich). Клетки разрушали с использованием френч-пресса под давлением в 24000 psi. **Полученный лизат** центрифугировали 10 мин при 12000g (4 °C). Супернатант инкубировали 120 мин при температуре 30 °C. Диализ экстракта проводили против диализного буфера в соотношении 1 : 40 с использованием мембран 6–8 кДа в течение 4 ч. Раствор полученного экстракта быстро замораживали в жидком азоте, используя криопробирки, и хранили их при температуре –80 °C.

Экспрессия выполнялась по методике из работы [16] с изменениями. Реакционная среда для внеклеточной экспрессии состояла из S12 экстракта, смеси низкомолекулярных соединений, смеси 20 аминокислот (стандартные и меченные по углероду-13 и азоту-15), ацетата магния, T7-РНК-полимеразы, креатин киназы и деионизированной воды. К полученной реакционной

смеси добавляли плазмидную ДНК экспрессионного вектора. Конечную реакционную смесь помещали в термостатируемый шейкер и инкубировали 3 ч при температуре 30 °С (800 об/мин). По окончании реакции, смесь центрифугировали 10 мин при 20000g (4 °С) для осаждения липидной фракции. Осадок и супернатант хранили отдельно при температуре –20 °С, предварительно отобрав аликвоты для последующего анализа наличия целевого белка. В качестве отрицательного контроля реакции использовали реакционную смесь, не содержащую плазмидной ДНК.

Детекция продуктов реакции внеклеточной экспрессии. Для определения наличия целевых белков использовали электрофоретическое разделение в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, а также Вестерн-блоттинг. Использовались электрофорезная камера Mini-PROTEAN TetraCell и Mini-PROTEAN сборные гели (7,2 × 8,6 см) фирмы BioRad (США), предназначенные для выполнения электрофореза в полиакриламидном геле (PAGE). Электрофоретическое разделение проводили при постоянном напряжении 100 В в течение 40 мин. Белковые полосы проявляли методом коллоидного окрашивания с использованием реагента SimplyBlue ThermoScientific (США).

Вестерн-блоттинг проводился с использованием набора реагентов ONE-HOUR Western фирмы QIAGEN (Германия). Для переноса белка с полиакриламидного геля использовали нитроцеллюлозную бумагу. Перенесенные белковые полосы детектировали по хемилюминесценции. Использовали реагенты LumiSensor фирмы GenScript (США). Хемилюминесцентный HRP субстрат смешивали с 1,5 мл реагента А и 1,5 мл реагента В, перемешивали в течение нескольких секунд. 0,05 мл рабочего раствора достаточно для покрытия 1 см² мембраны.

Масс-спектрометрический анализ меченых белков CD79A и CD79B. Анализ молекулярной массы меченого образца проводили с помощью МАЛДИ масс-спектрометрии на приборе MicroFlex (Bruker, Германия). Осадок бесклеточной системы экспрессии после завершения реакции растворяли 20 мин в диметилсульфоксиде (ДМСО) при температуре 65 °С и тщательном перемешивании. К полученному образцу добавляли этиловый спирт в соотношении 1 : 10. Прecipитированные под воздействием спирта белки из образца осаждали центрифугированием. Полученный осадок растворяли в 80 %-ной муравьиной кислоте. Далее смешивали 1 мкл образца с 1 мкл насыщенного раствора синапиновой кислоты и наносили на металлическую подложку. Сокристаллизацию проводили до полного высыхания капли. Масс-спектр измеряли с использованием линейного детектора в режиме положительно заряженных ионов.

Подготовка образцов раствора белка для ЯМР спектроскопии. После центрифугирования реакционной смеси бесклеточной системы экспрессии отбирали осадок, содержащий меченный стабильными изотопами искомым белок. Осадок растворяли при температуре 50 °С 2–4 ч при тщательном перемешивании в ДМСО требуемого объема в зависимости от массы осадка. Остаток не растворившегося осадка осаждали центрифугированием. К супернатанту добавляли воду и трифторуксусную кислоту различных концентраций. Полученные образцы растворов переносили в ЯМР-ампулу Шигеми типа диаметром в 5 мм.

Эксперименты по ЯМР спектроскопии. Измерения ЯМР спектров проводили 12 ч с использованием ЯМР спектрометра фирмы Varian с рабочей частотой 600 МГц, оснащенного четырехканальным криодатчиком (температура 19 К) тройного резонанса (¹H/¹³C/¹⁵N). Программирование используемых импульсных последовательностей, сбор и анализ полученных данных проводили, используя программное обеспечение VnmrJ 3.2.

Сигнал стабилизации поля (сигнал лока) захватывали по сигналу дейтерия от ДМСО. Калибровку длительности 90-градусного импульса для ¹H/¹³C/¹⁵N ядер проводили по изменению сигнала воды. Для измерения двумерного корреляционного спектра N15-HSQC использовали импульсную программу gNhsqc, входящую в VnmrJ 3.2. Количество комплексных точек для H1 и N15 измерения составило 2048 и 188 соответственно. Для экспериментов по тройному резонансу использовали импульсную последовательность HNCO спектра.

Полученный двумерный массив данных в виде набора временного затухания сигнала (спад свободной индукции) преобразовывался в двумерный частотный спектр при помощи программы NMRpipe [17] с использованием преобразования Фурье, аподизации и фазовой коррекции спектра. Визуализацию и сохранение спрессированных спектров осуществляли в программе NMRDraw, которая поставляется вместе с NMRpipe.

Результаты и их обсуждение. Синтез CD79A и CD79B с использованием бесклеточной системы экспрессии. Оптимизацию внеклеточной экспрессии CD79A и CD79B осуществляли с использованием стандартных аминокислот. Чистота полученной плазмидной ДНК для экспрессии целевых белков была оценена спектрофотометрически по поглощению на длине волны 260 нм. Отношение поглощения при 260/280 нм составляет 1,91 и 1,92, для отношения 260/230 нм – 2,32 и 2,31 для pCD79a и pCD79b соответственно. Данные значения соответствуют высокой степени очистки плазмидной ДНК и свидетельствуют об отсутствии загрязнения белками и липидами.

С учетом аминокислотной последовательности исследуемых белков можно предположить, что они будут преимущественно концентрироваться в осадочной фракции среды бесклеточной системы экспрессии. Данное предположение было нами подтверждено в результате анализа полученных образцов методом вестерн-блоттинга (рис. 1).

По экспериментальным данным, в отличие от CD79A, CD79B преимущественно концентрируется в осадочной фракции. Это можно связать с большей гидрофобностью CD79B. Нами была определена теоретическая гидрофобность аминокислотной последовательности по индексу гидрофобности с использованием онлайн-программы GPMW lite [18].

Для CD79B и CD79A рассчитанные индексы гидрофобности составили $-0,26$ и $-0,50$ соответственно. Для сравнения, индексы гидрофобности, рассчитанные для мембранного белка аквапорина и водорастворимого бычьего сывороточного альбумина, составляют $0,49$ и $-0,43$ соответственно.

Для получения меченных стабильными изотопами белков CD79A и CD79B заменяли стандартные аминокислоты в инкубационной среде на их полностью меченные по атомам углерода-13 и азота-15 аналоги. В данной работе использовали полное мечение по всем 20 аминокислотам (неселективное мечение) в целях получения спектральных сигналов от всех остатков полипептидной цепи исследуемых белков. Концентрации аминокислот были подобраны с учетом их встречаемости в синтезируемых последовательностях и эффективности их встраивания в синтезируемую полипептидную цепь [19]. Образование меченных белков также определили при помощи вестерн-блоттинга (рис. 2). Количество синтезированного CD79B в осадочной фракции, определенное по вестерн-блоттингу, превышает количество CD79A. Такую разницу в концентрациях можно объяснить разницей аминокислотного состава двух исследуемых белков. Концентрационное соотношение для меченных аминокислот отличалось от соотношения для стандартных, поэтому скорость синтеза для CD79A меньше, чем для CD79B. Дальнейшие эксперименты на данном этапе проводили только с CD79B, так как его количество значительно превышало количество CD79A.

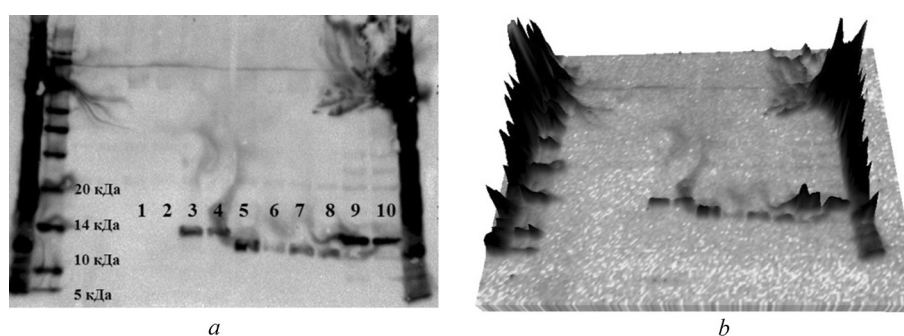


Рис. 1. *a* – Вестерн-блоттинг образцов, содержащих белки CD79A и CD79B, полученные методом внеклеточной белковой экспрессии с использованием стандартных немеченных аминокислот. Вторая дорожка слева соответствует стандартным белкам с известной массой (стандарты молекулярной массы). 1, 2 – отрицательный контроль; 3, 4, 9, 10 – CD79A; 5–8 – CD79B. Нечетные номера соответствуют образцам осадочной фракции, а четные – образцам надосадочной фракции (супернатант); *b* – трехмерное представление полученного вестерн-блоттинга для полуколичественного анализа

Fig. 1. *a* – Western-blotting of the samples containing the proteins CD79A and CD79B obtained by the cell-free protein expression system with the use of standard non-labeled amino acids. The track on the left corresponds to the standard proteins of known mass (standard molecular mass). 1, 2 – negative test; 3, 4, 9, 10 – CD79A; 5–8 – CD79B. Odd numbers denote the samples of sedimentary fraction, even numbers – samples of supernatant fraction (supernatant); *b* – three-dimensional representation of the obtained western-blotting for the semi-quantitative analysis

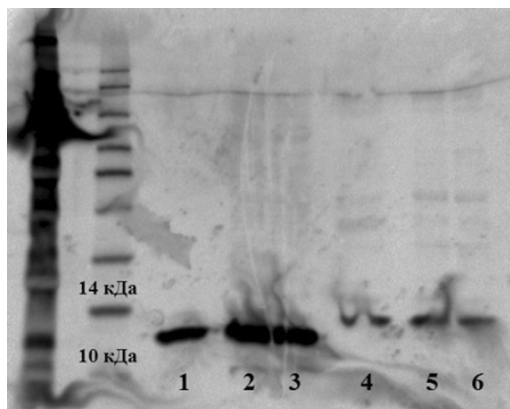


Рис. 2. Вестерн-блоттинг образцов, содержащих меченные по углероду-13 и азоту-15 белки CD79A и CD79B, полученные методом внеклеточной белковой экспрессии. Вторая дорожка слева соответствует стандартным белкам с известной массой (стандарты молекулярной массы). 1–3 – меченный CD79B; 4–6 – CD79A

Fig. 2. Western-blotting of the samples containing the proteins CD79A and CD79B labeled by carbon-13 and nitrogen-15 obtained by the cell-free protein expression system. The second track on the left corresponds to the standard proteins of known mass (standard molecular mass). 1–3 – labeled CD79B; 4–6 – CD79A

групп полипептидной цепи CD79B, поэтому мы предположили, что белок находится в частично растворенной форме, формирует межмолекулярные комплексы, вероятно через связывание между трансмембранными участками полипептидной цепи. Из-за этого на спектре появляются только пики, относящиеся к цитозольной неупорядоченной части, которая имеет большую степень подвижности. Подвижность цитозольной части позволяет ядерным спином, входящим в ее состав, медленно релаксировать и проявляться в спектре в виде узких сигналов. Сигналы трансмембранной части в свою очередь сильно уширяются из-за быстрой спин-спиновой релаксации и не обнаруживаются в спектре.

После добавления воды к образцу до концентрации 5 % не происходит видимых спектральных изменений (рис. 5) по сравнению с образцом без воды. На полученном спектре имеется арте-

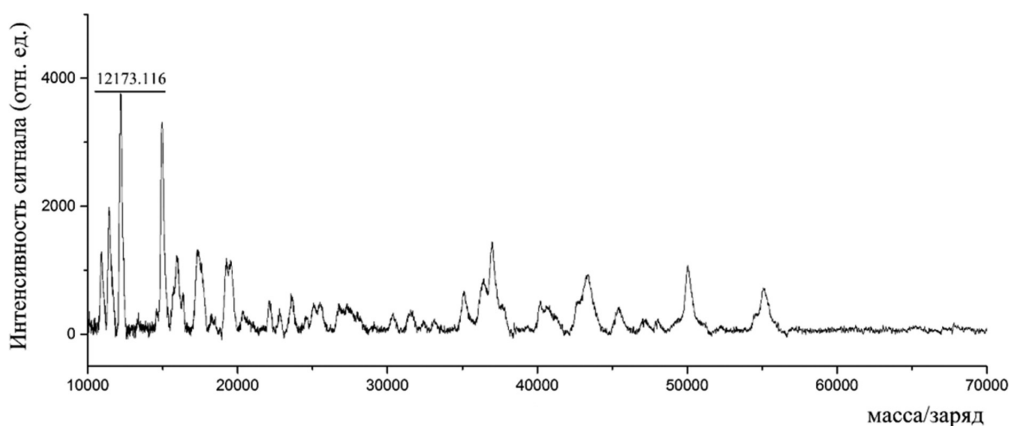


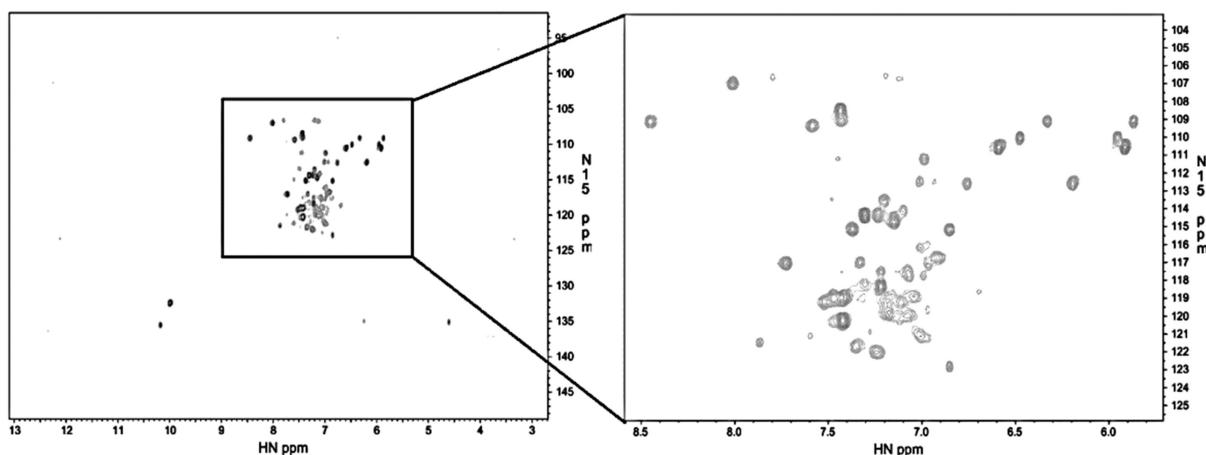
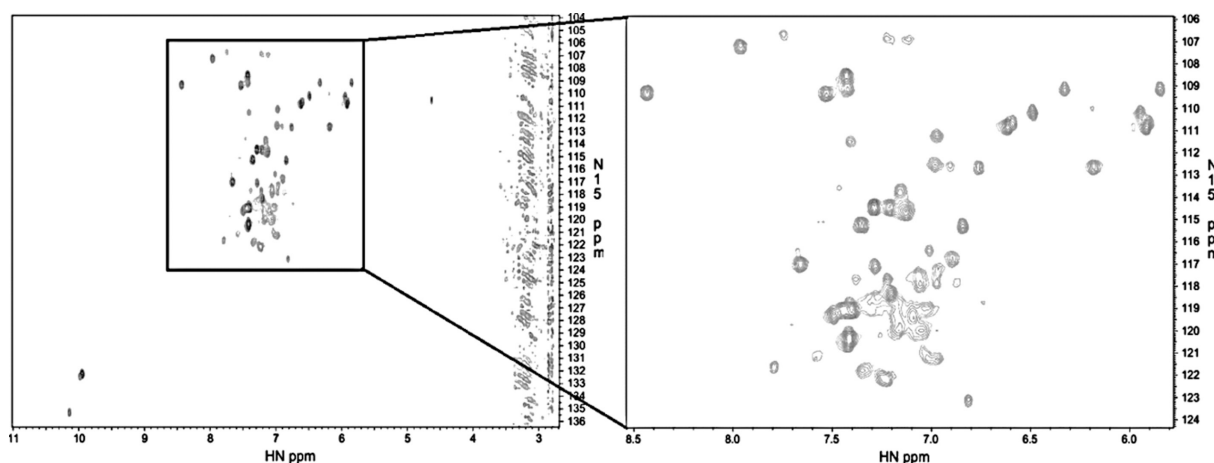
Рис. 3. MALDI масс-спектр образца осадка после внеклеточной экспрессии CD79B. Отмеченный сигнал на спектре соответствует однозарядному положительному иону CD79B, полностью меченному по углероду-13 и азоту-15

Fig. 3. MALDI mass-spectrum of the residue after the cell-free expression of CD79B. The marked signal on the spectrum denotes a single-charged positive ion of CD79B fully labeled by carbon-13 and nitrogen-15

Для подтверждения молекулярной массы CD79B, меченного стабильными изотопами, полученные образцы анализировали с использованием MALDI масс-спектрометрии (рис. 3). Теоретически ожидаемая молекулярная масса для данного белка в полностью меченном углеродом-13 и азотом-15 состоянии составляет 12173,190 Да. Результаты сравнения теоретической массы с массой, определенной экспериментально (12173,116 Да) с учетом погрешности измерения ($\pm 0,5$ Да), указывают на соответствие полученного нами белка полностью меченному CD79B по углероду-13 и азоту-15.

Получение и анализ ЯМР спектров CD79B. Первый двумерный ^{15}N -HSQC корреляционный ЯМР спектр был получен при растворении осадка, содержащего CD79B в DMSO-d_6 и инкубации в течение 2 ч при температуре 65 °C при постоянном перемешивании (рис. 4). Температура в 65 °C не должна оказывать разрушающего воздействия на CD79B, так как этот белок является термостабильным из-за своей неупорядоченной природы [20]. Данный спектр позволяет получить информацию о протонах, непосредственно связанных с атомами азота амидных групп полипептидной цепи, по корреляции их химических сдвигов.

^{15}N -HSQC спектр (рис. 4) беден сигналами от NH-

Рис. 4. ^{15}N -HSQC корреляционный ЯМР спектр CD79B в ДМСО-d6Fig. 4. ^{15}N -HSQC correlation NMR spectrum of CD79B in DMSO-d6Рис. 5. ^{15}N -HSQC корреляционный ЯМР спектр CD79B в ДМСО-d6 при добавлении 5 % H_2O Fig. 5. ^{15}N -HSQC correlation NMR spectrum of CD79B in DMSO-d6 added with 5 % H_2O

фактный шум от подавленного сигнала воды в правой его части. На основании данного спектра можно заключить, что возможное протонирование CD79B не приводит к распаду комплекса (мицеллы, состоящей из множества CD79B) и изменению его конформации. Каждый раз перед и по окончании накопления длительного HSQC спектра записывали контрольные «короткие» спектры (длительность 40 мин). Данные спектры измерялись для подтверждения стабильности белка в растворе за все время эксперимента (общее время накопления трех спектров приблизительно 14 ч).

Существенного изменения ^{15}N -HSQC спектра в сторону его улучшения удалось достичь при добавлении в образец трифторуксусной кислоты (ТФК) до концентрации 0,3 % (рис. 6). В данном случае положение большинства сигналов и их химических сдвигов изменилось, количество сигналов возросло приблизительно в 2 раза, увеличилась их интенсивность. Расположение сигналов в данном спектре указывает на состояние белка, близкое к денатурированному, что равносильно разупорядоченности полипептидной цепи и ее распрямлению, где химическое окружение для NH-групп теперь варьирует в меньшей степени. Наблюдаемая плохая дисперсия сигналов (кросс-пиков) указывает на принадлежность данного белка к истинно неупорядоченным. Появление новых сигналов и рост интенсивностей указывает на переход белка в мономерное состояние. Предполагается, что ТФК, в силу своего химического строения, связывается с гидрофобными аминокислотами трансмембранных доменов и препятствует их взаимодействию из-за электростатического отталкивания.

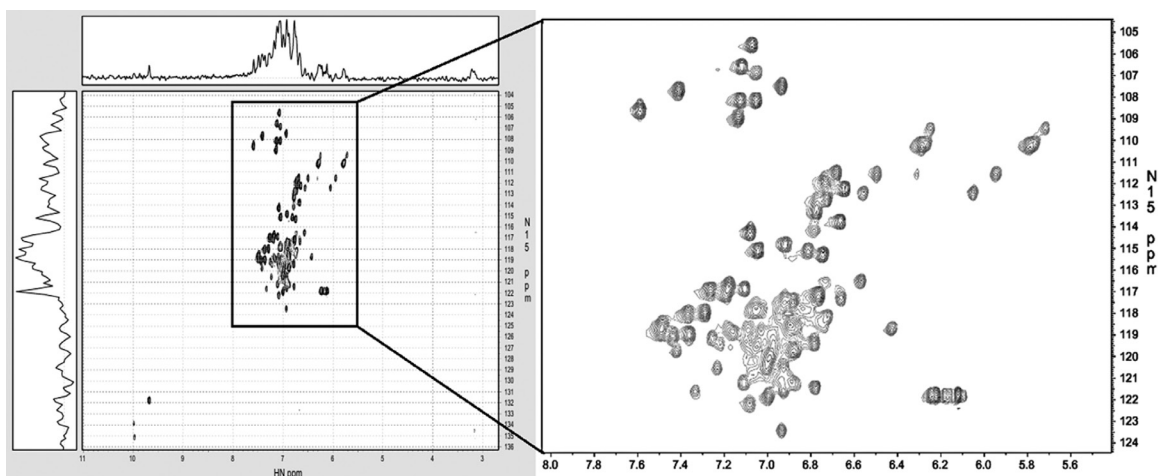


Рис. 6. ^{15}N -HSQC корреляционный ЯМР спектр CD79B в ДМСО-d6 при добавлении 5 % H_2O и 0,3 % ТФК
 Fig. 6. ^{15}N -HSQC correlation NRM spectrum of CD79B in DMSO-d6 added with 5 % H_2O and 0.3 % trifluoroacetic acid

Анализ полученного спектра (рис. 7) выявил наличие разных состояний единственного остатка триптофана, сигналы NH-группы (один мажорный и два минорных пика) которого располагаются в нижней левой части спектра, так как протон амидной группы его боковой цепи сильно дезэкранирован воздействием кольцевого тока ароматической электронной системы. Расщепление сигнала от NH-группы боковой цепи единственного триптофана указывает на наличие медленных конформационных превращений в этой области полипептидной цепи для минорной фракции белка из общего пула. Данный триптофан располагается вблизи С-концевой части аминокислотной последовательности. При интегрировании сигналов в программе CARA [21] (рис. 7) было установлено, что доля мажорного пика составляет 0,64, а двух минорных в сумме 0,36. Данные сигналы отражают два возможных конформационных состояния минорной доли CD79B. Соотношение двух минорных пиков составляет 0,45 и 0,55.

Также нами был получен трехмерный HNCO спектр (рис. 8) по корреляции химических сдвигов между протонами амидной группы, атомом азота-15 и углеродом-13 карбонильной группы. При подсчете числа пиков в данном спектре установлено, что количество пиков меньше общего числа аминокислот в полипептидной последовательности. Из 100 аминокислот, которые теоретически могут давать сигналы от CO-групп, за исключением пролиновых аминокислотных остатков, было выявлено 60 сигналов. Вероятно, такое поведение связано с определенной локальной структурой в области взаимодействия ТФК с боковыми группами некоторых аминокислот. Из-за кето-енольной таутомеризации пептидной группы и делокализации протона NH-группы на боковую цепь аминокислот происходит исчезновение возможных сигналов (это равносильно быстрому обмену протона с окружением и значительному уширению его резонансной линии).

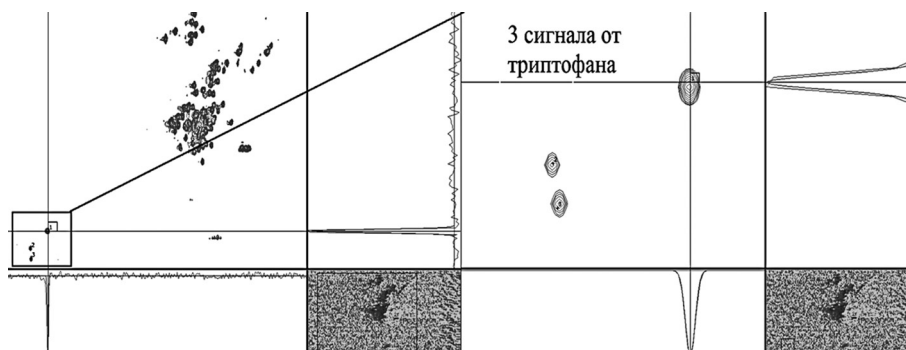


Рис. 7. Визуализация участка ^{15}N -HSQC спектра CD79B, содержащего сигналы от триптофанового аминокислотного остатка, в программе CARA для определения интегральной интенсивности пиков

Fig. 7. Visualization of the section of ^{15}N -HSQC spectrum of CD79B containing the signal of tryptophan amino acid residue, in the CARA program for definition of the integral intensity of peaks

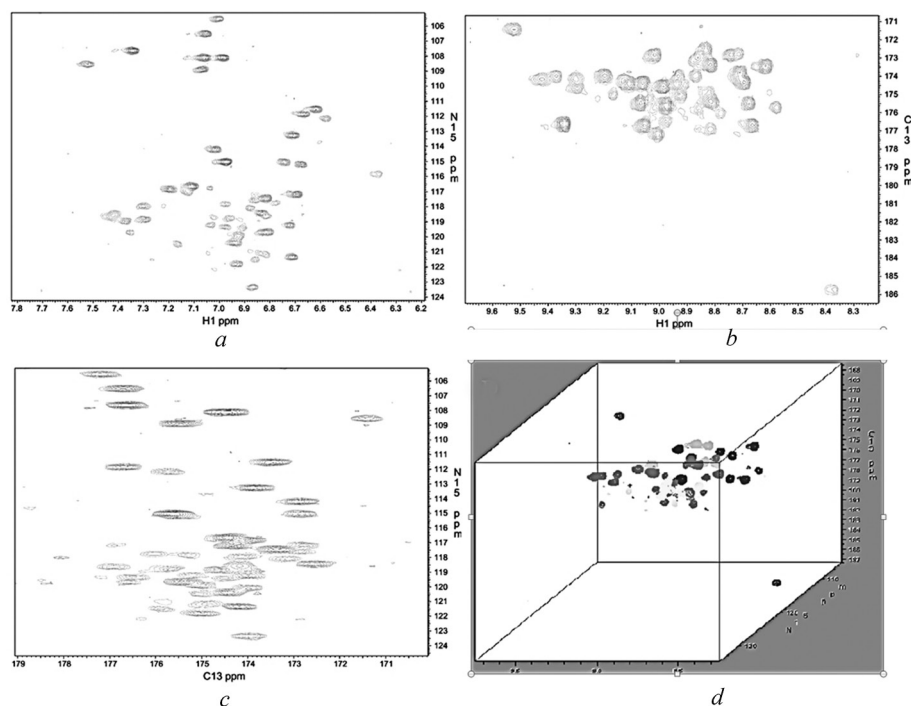


Рис. 8. Трехмерный HNCO корреляционный ЯМР спектр CD79B в ДМСО-d6 при добавлении 5 % H₂O и 0,3 % ТФК: *a* – двухмерная проекция – ¹H/¹⁵N, *b* – ¹H/¹³C, *c* – ¹³C/¹⁵N, *d* – трехмерное представление

Fig. 8. Three-dimensional HNCO correlation NMR spectrum of CD79B in DMSO-d₆ with 5 % H₂O and 0.3 % trifluoroacetic acid: *a* – two-dimensional projection – ¹H/¹⁵N, *b* – ¹H/¹³C, *c* – ¹³C/¹⁵N, *d* – three-dimensional representation

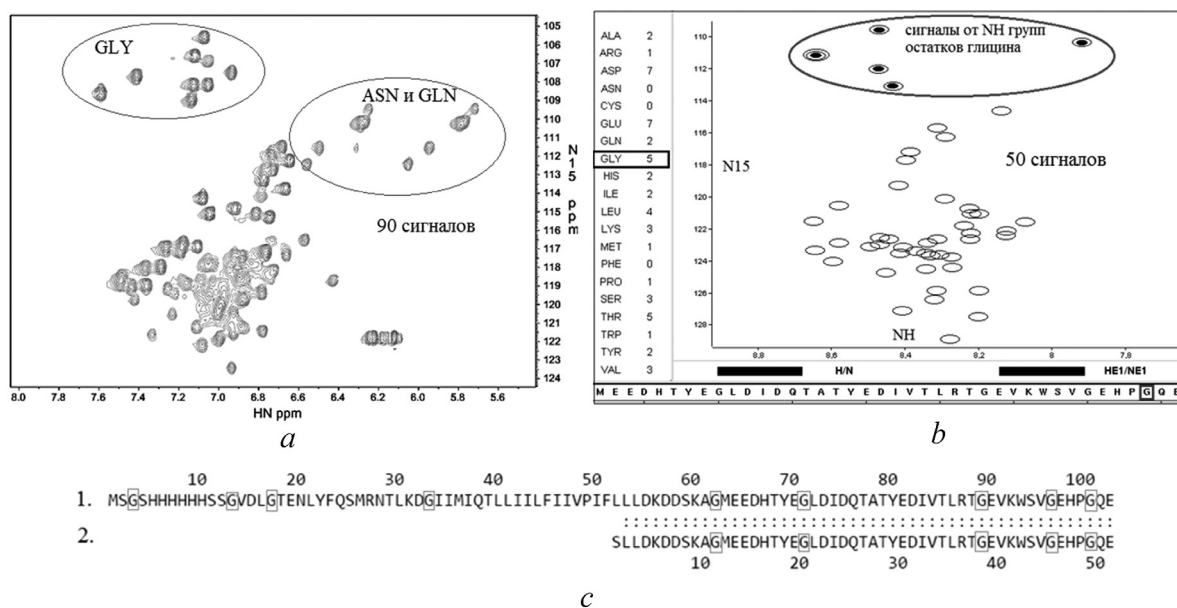


Рис. 9. Сравнение сигналов полученного ¹⁵N-HSQC спектра CD79B (*a*) с данными ¹⁵N-HSQC спектра цитозольного домена CD79B (*b*) из работы [22]. Спектр на рис. *b* смоделирован на основе значений химических сдвигов из базы данных ЯМР спектров белков и нуклеиновых кислот (<http://www.bmrb.wisc.edu>), *c* – выравнивание аминокислотных последовательностей: *1* – полученного в данной работе CD79B, состоящего из части экстраклеточного, трансмембранного и цитозольного доменов; *2* – цитозольного домена CD79B из работы [22]. Оранжевым цветом в последовательностях выделены глициновые аминокислотные остатки

Fig. 9. Comparison of the signals of the obtained ¹⁵N-HSQC spectrum of CD79B (*a*) with the data of the ¹⁵N-HSQC spectrum of the cytosol domain of CD79B (*b*) [22]. The spectrum in Fig. 9*b* is modeled using the chemical shift values from the database of the NMR spectra of proteins and nucleic acids (<http://www.bmrb.wisc.edu>), *c* – sequence alignment: *1* – present work, CD79B consisting of some part of extracell, transmembrane and cytosol domains; *2* – cytosol domain of CD79B [22]. Orange color shows the glycine amino acid pellets in the sequences

Для дополнительного анализа полученный спектр ^{15}N -HSQC для CD79B сравнивали со спектральными данными для цитозольного домена CD79B из работы [22], состоящего из 51 аминокислотного остатка (рис. 9). Полученный нами спектр содержит девять сигналов от NH-групп глициновых (Gly) аминокислотных остатков, которые распределены по всей цепи, в свою очередь цитозольный домен имеет только пять остатков глицина (рис. 9, b). Это согласуется с имеющимися аминокислотными последовательностями (рис. 9, c). Таким образом, можно сказать, что нами получен спектр для CD79B, в состав которого входит часть экстраклеточного, трансмембранный и цитозольный домен, в отличие от результатов работы [22]. Положение сигналов для общих аминокислот сильно различается, химические сдвиги сигналов в спектре смещены в область сильного поля. Это указывает на значительную разницу в структуре CD79B в ДМСО по сравнению с водным окружением.

Заключение. В результате настоящей работы нами получены меченные стабильными изотопами белки CD79A и CD79B с использованием бесклеточной системы экспрессии и подобраны физико-химические условия для получения высококачественных многомерных корреляционных ЯМР спектров (^{15}N -HSQC, HNCО) для CD79B. Добавление трифторуксусной кислоты (TFA) до концентрации 0,3 % к белку, растворенному в ДМСО с добавлением 5 % H_2O , приводит к значительному улучшению ЯМР спектров. Такое спектральное поведение белка, по-видимому, связано с взаимодействием гидрофобной части трифторуксусной кислоты с гидрофобными аминокислотными остатками CD79B, находящимися в его трансмембранном домене. После растворения в ДМСО вероятно белок все еще находится в агрегированном состоянии (в виде мицеллы), где трансмембранные участки связаны между собой, а цитозольные – находятся в свободном подвижном состоянии. Из-за роста времени вращательной корреляции агрегатов (из-за большой молекулярной массы), т. е. увеличения скорости ядерной спин-спиновой релаксации (R_2), происходит существенное уширение ЯМР сигналов, которые невозможно детектировать. Добавление TFA приводит к разрушению межмолекулярных связей в мицелле и образованию мономерной формы CD79B, хорошо детектируемой ЯМР спектроскопией.

Анализ полученных корреляционных спектров для CD79B позволил установить, основываясь на низкой дисперсии сигналов в спектре, что данный белок при выбранных условиях находится в неупорядоченном состоянии. Расщепление сигнала от NH-группы боковой цепи единственного триптофана указывает на наличие медленных конформационных превращений в этой области полипептидной цепи.

Разработанный способ получения корреляционных ЯМР спектров для CD79B в ДМСО может быть использован для последующего исследования его пространственной структуры методом дейтерообмена амидных групп с детекцией ЯМР спектроскопией.

Список использованных источников

1. Amino-acid-type selective isotope labeling of proteins expressed in Baculovirus-infected insect cells useful for NMR studies / A. Strauss [et al.] // *Journal of Biomolecular NMR*. – 2003. – Vol. 26, N 4. – P. 367–372. doi.org/10.1023/a:1024013111478.
2. Uversky, V. N. Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics / V. N. Uversky // *Protein science*. – 2002. – Vol. 11, N 4. – P. 739–756. doi.org/10.1110/ps.4210102.
3. Protein disorder and the evolution of molecular recognition: theory, predictions and observations / A. K. Dunker [et al.] // *Proc. Symp. Biocomput.* – 1998. – Vol. 3. – P. 473–484.
4. Uversky, V. N. Why are “natively unfolded” proteins unstructured under physiologic conditions? / V. N. Uversky, J. R. Gillespie, A. L. Fink // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. – 2000. – Vol. 41, N 3. – P. 415–427. doi.org/10.1002/1097-0134(20001115)41:3%3C415::aid-prot130%3E3.3.co;2-z.
5. Predicting disordered regions from amino acid sequence / E. Garner [et al.] // *Genome Informatics*. – 1998. – Vol. 9. – P. 201–213.
6. TOP-IDP-scale: a new amino acid scale measuring propensity for intrinsic disorder / A. Campen [et al.] // *Protein and Peptide letters*. – 2008. – Vol. 15, N 9. – P. 956–963. doi.org/10.2174/092986608785849164.
7. Uversky, V. N. A decade and a half of protein intrinsic disorder: biology still waits for physics / V. N. Uversky // *Protein Science*. – 2013. – Vol. 22, N 6. – P. 693–724. doi.org/10.1002/pro.2261.
8. Predicting intrinsic disorder from amino acid sequence / Z. Obradovic [et al.] // *Proteins: Structure, Function, and Genetics*. – 2003. – Vol. 53, N S6. – P. 566–572. doi.org/10.1002/prot.10532.
9. Uversky, V. N. What does it mean to be natively unfolded? / V. N. Uversky // *European Journal of Biochemistry*. – 2002. – Vol. 269, N 1. – P. 2–12. doi.org/10.1046/j.0014-2956.2001.02649.x.

10. Dunker, A. K. The protein trinity – linking function and disorder / A. K. Dunker, Z. Obradovic // *Nature Biotechnology*. – 2001. – Vol. 19, N 9. – P. 805–806. doi.org/10.1038/nbt0901-805.
11. Gazumyan, A. Ig β tyrosine residues contribute to the control of B cell receptor signaling by regulating receptor internalization / A. Gazumyan, A. Reichlin, M. C. Nussenzweig // *The Journal of Experimental Medicine*. – 2006. – Vol. 203, N 7. – P. 1785–1794. doi.org/10.1084/jem.20060221.
12. Cytoplasmic Ig α Serine/Threonines Fine-Tune Ig α Tyrosine Phosphorylation and Limit Bone Marrow Plasma Cell Formation / H. C. Patterson [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 2011. – Vol. 187, N 6. – P. 2853–2858. doi.org/10.4049/jimmunol.1101143.
13. *Immunology* / R. A. Goldsby [et al.]. – New York: W. H. Freeman and Company, 2003. – 603 p.
14. Lanier, L. L. NK cell recognition / L. L. Lanier // *Annu. Rev. Immunol.* – 2005. – Vol. 23, N 1. – P. 225–274. doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115526.
15. Structural and functional studies of Ig $\alpha\beta$ and its assembly with the B cell antigen receptor / S. Radaev [et al.] // *Structure*. – 2010. – Vol. 18, N 8. – P. 934–943. doi.org/10.1016/j.str.2010.04.019.
16. Rational improvement of cell-free protein synthesis / A. Pedersen [et al.] // *New biotechnology*. – 2011. – Vol. 28, N 3. – P. 218–224. doi.org/10.1016/j.nbt.2010.06.015.
17. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes / F. Delaglio [et al.] // *Journal of Biomolecular NMR*. – 1995. – Vol. 6, N 3. – P. 277–293. doi.org/10.1007/bf00197809.
18. Peri, S. GPMW – a software tool for analyzing proteins and peptides / S. Peri, H. Steen, A. Pandey // *Trends in Biochemical Sciences*. – 2001. – Vol. 26, N 11. – P. 687–689. doi.org/10.1016/s0968-0004(01)01954-5.
19. Thermal stability and folding kinetics analysis of disordered protein, securin / H. L. Chu [et al.] // *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. – 2014. – Vol. 115, N 3. – P. 2171–2178. doi.org/10.1007/s10973-013-3598-x.
20. Keller, R. Computer-aided resonance assignment (CARA) / R. Keller, K. Wuthrich. – Cantina, Switzerland: Verlag Goldau, 2004. – 81 p.
21. Highly efficient NMR assignment of intrinsically disordered proteins: application to B- and T-cell receptor domains / L. Isaksson [et al.] // *PloS One*. – 2013. – Vol. 8, N 5. – P. e62947. doi.org/10.1371/journal.pone.0062947.

References

1. Strauss A., Bitsch F., Cutting B., Fendrich G., Graff P., Liebetanz J., Zurini M., Jahnke W. Amino-acid-type selective isotope labeling of proteins expressed in Baculovirus-infected insect cells useful for NMR studies. *Journal of biomolecular NMR*, 2003, vol. 26, no. 4, pp. 367–372. doi.org/10.1023/a:1024013111478.
2. Uversky V. N. Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics. *Protein science*, 2002, vol. 11, no. 4, pp. 739–756. doi.org/10.1110/ps.4210102.
3. Dunker A. K., Garner E., Guillot S., Romero P., Albrecht K. Protein disorder and the evolution of molecular recognition: theory, predictions and observations. *Pacific Symposium on Biocomputing*, 1998, vol. 3, pp. 473–484.
4. Uversky V. N., Gillespie J. R., Fink A. L. Why are “natively unfolded” proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2000, vol. 41, no. 3, pp. 415–427. doi.org/10.1002/1097-0134(20001115)41:3%3C415::aid-prot130%3E3.3.co;2-z.
5. Garner E., Cannon P., Romero P., Obradović Z., Dunker A. K. Predicting disordered regions from amino acid sequence. *Genome Informatics*, 1998, vol. 9, pp. 201–213.
6. Campen A., Williams R., Brown C., Meng J., Uversky V., Dunker A. TOP-IDP-scale: a new amino acid scale measuring propensity for intrinsic disorder. *Protein and Peptide letters*, 2008, vol. 15, no. 9, pp. 956. doi.org/10.2174/092986608785849164.
7. Uversky V. N. A decade and a half of protein intrinsic disorder: biology still waits for physics. *Protein Science*, 2013, vol. 22, no. 6, pp. 693–724. doi.org/10.1002/pro.2261.
8. Obradovic Z., Peng K., Vucetic S., Radivojac P., Brown C. J., Dunker A. K. Predicting intrinsic disorder from amino acid sequence. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 2003, vol. 53, no. S6, pp. 566–572. doi.org/10.1002/prot.10532.
9. Uversky V. N. What does it mean to be natively unfolded? *European Journal of Biochemistry*, 2002, vol. 269, no. 1, pp. 2–12. doi.org/10.1046/j.0014-2956.2001.02649.x.
10. Dunker A. K., Obradovic Z. The protein trinity – linking function and disorder. *Nature Biotechnology*, 2001, vol. 19, no. 9, pp. 805–806. doi.org/10.1038/nbt0901-805.
11. Gazumyan A., Reichlin A., Nussenzweig M. C. Ig β tyrosine residues contribute to the control of B cell receptor signaling by regulating receptor internalization. *The Journal of Experimental Medicine*, 2006, vol. 203, no. 7, pp. 1785–1794. doi.org/10.1084/jem.20060221.
12. Patterson H. C., Kraus M., Wang D., Shahsafaei A., Henderson J. M., Seagal J., Otipoby K. L., Thai T.-H., Rajewsky K. Cytoplasmic Ig α Serine/Threonines Fine-Tune Ig α Tyrosine Phosphorylation and Limit Bone Marrow Plasma Cell Formation. *The Journal of Immunology*, 2011, vol. 187, no. 6, pp. 2853–2858. doi.org/10.4049/jimmunol.1101143.
13. Goldsby R. A., Kindt T. J., Osborne B. A., Kuby J. *Immunology*. New York, W. H. Freeman and Company, 2003. 603 p.
14. Lanier L. L. NK cell recognition. *Annual Review of Immunology*, 2005, vol. 23, no. 1, pp. 225–274. doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115526.
15. Radaev S., Zhongcheng Z., Tolar P., Nguyen K., Nguyen A., Krueger P. D., Stutzman N., Pierce S., Sun P. D. Structural and functional studies of Ig $\alpha\beta$ and its assembly with the B cell antigen receptor. *Structure*, 2010, vol. 18, no. 8, pp. 934–943. doi.org/10.1016/j.str.2010.04.019.
16. Pedersen A., Hellberg K., Enberg J., Karlsson B. G. Rational improvement of cell-free protein synthesis. *New biotechnology*, 2011, vol. 28, no. 3, pp. 218–224. doi.org/10.1016/j.nbt.2010.06.015.

17. Delaglio F., Grzesiek S., Vuister G. W., Zhu G., Pfeifer J., Bax A. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *Journal of Biomolecular NMR*, 1995, vol. 6, no. 3, pp. 277–293. doi.org/10.1007/bf00197809.
18. Peri S., Steen H., Pandey A. GPMW – a software tool for analyzing proteins and peptides. *Trends in Biochemical Sciences*, 2001, vol. 26, no. 11, pp. 687–689. doi.org/10.1016/s0968-0004(01)01954-5.
19. Chu H. L., Chen T.-H., Wu C.-Y., Yang Y.-C., Tseng S.-H., Cheng T.-M., Ho L.-P., Tsai L.-Y., Li H.-Y., Chang C.-S., Chang C.-C. Thermal stability and folding kinetics analysis of disordered protein, securin. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2014, vol. 115, no. 3, pp. 2171–2178. doi.org/10.1007/s10973-013-3598-x.
20. Keller R., Wuthrich K. *Computer-aided resonance assignment (CARA)*. Cantina, Switzerland, Verlag Goldau, 2004. 81 p.
21. Isaksson L., Mayzel M., Saline M., Pedersen A., Rosenl w J., Brutscher B., Karlsson B. G., Orekhov V. Y. Highly efficient NMR assignment of intrinsically disordered proteins: application to B- and T-cell receptor domains. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 5, pp. e62947. doi.org/10.1371/journal.pone.0062947.

Информация об авторах

Панкратова Елена Вячеславовна – мл. науч. сотрудник, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: pankratovaelena3@gmail.com.

Бритиков Владимир Владимирович – науч. сотрудник, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: vvbritikov@gmail.com.

Усанов Сергей Александрович – член-корреспондент, д-р хим. наук, профессор, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: usanov@iboch.bas-net.by.

Для цитирования

Панкратова, Е. В. Исследование трансмембранного белка CD79B методом многомерной импульсной ЯМР спектроскопии / Е. В. Панкратова, В. В. Бритиков, С. А. Усанов // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2017. – Т. 61, № 2. – С. 39–50.

Information about the authors

Pankratova Elena Vyacheslavovna – Junior researcher, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: pankratovaelena3@gmail.com.

Britikov Vladimir Vladimirovich – Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vvbritikov@gmail.com.

Usanov Sergei Aleksandrovich – Corresponding Member, D. Sc. (Chemistry), Professor, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: usanov@iboch.bas-net.by.

For citation

Pankratova E. V., Britikov V. V., Usanov S. A. Study of the transmembrane protein CD79B by multidimensional pulse NMR spectroscopy. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi* [Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus], 2017, vol. 61, no. 2, pp. 39–50 (in Russian).