

## МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

УДК: 577.112+577.22

## КОМПЛЕКС ШАПЕРОНА GroEL С ФЛУОРЕСЦЕИН-МЕЧЕНЫМ ДЕНАТУРИРОВАННЫМ ПЕПСИНОМ: СТЕХИОМЕТРИЯ И РОЛЬ ЛИГАНДОВ

Н. Ю. Марченко<sup>1</sup>, В. В. Марченков<sup>2</sup>, Н. В. Котова<sup>2</sup>, П. А. Калиман<sup>1</sup>,  
Г. В. Семисотнов<sup>2</sup>1. Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина, пл. Свободы, 4, г. Харьков, Украина.  
lita@phys.protres.ru2. Институт белка РАН, ул. Институтская, 4, г. Пуццоно, Россия. nina@vega.protres.ru  
01 апреля 2005

Одной из основных функций молекулярного шаперона GroEL (14-ти субъединичного белка клеток *E.coli*) является связывание полипептидных цепей, не имеющих жесткой упаковки боковых групп, и предотвращение их неспецифической агрегации. В настоящей работе с помощью гель-фильтрации и флуориметрического титрования исследовано взаимодействие GroEL с флуоресцеин-меченым ненативным пепсином (рН 7.5) в отсутствие и в присутствии различных лигандов GroEL (ионов  $Mg^{2+}$ , АДФ, АТФ и 7-ми субъединичного ко-шаперона GroES). Показана определяющая роль ионов  $Mg^{2+}$  в образовании комплекса GroEL с ненативным пепсином при умеренной ионной силе раствора (100мМ KCl). Адениловые нуклеотиды (АДФ или АТФ) в присутствии ионов  $Mg^{2+}$  уменьшают сродство GroEL к ненативному пепсину, и это уменьшение зависит как от природы нуклеотида и его концентрации, так и от присутствия ко-шаперона GroES. Флуориметрическое титрование показало, что в присутствии ионов  $Mg^{2+}$  одна молекула GroEL связывает две молекулы денатурированного пепсина со средней константой диссоциации  $K_{diss}=3.6 \times 10^{-9}M$ .

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** белок-белковые взаимодействия; шапероны; GroEL; GroES; флуориметрическое титрование.

Олигомерный (14-ти субъединичный) белок клеток *Escherichia coli* GroEL является наиболее изученным представителем семейства молекулярных шаперонов. Эти белки обладают способностью связывать широкое разнообразие ненативных полипептидных цепей, предотвращая их неспецифическую агрегацию и обеспечивая приобретение ими нативной конформации [1,2,3,4]. Очевидно, благодаря именно этому свойству синтез шаперонов резко возрастает при тепловом шоке, а также других клеточных стрессах [5,6,7]. Известно, что кроме ненативных полипептидных цепей GroEL связывает адениловые нуклеотиды (АТФ, АДФ) и другой олигомерный (7-ми субъединичный) белок теплового шока – ко-шаперон GroES. Кроме того, GroEL обладает слабой АТФ-азной активностью и гидролизует АТФ до АДФ [2,5,8].

Предполагается, что основными силами, стабилизирующими комплекс GroEL-ненативный белок, являются гидрофобные взаимодействия [9,10], однако есть данные, что электростатические взаимодействия тоже вносят определенный вклад [11,12]. Известно также, что лиганды GroEL, такие как АДФ, АТФ и ко-шаперон GroES, ослабляют сродство ненативных полипептидов к GroEL [13,14].

Исследования взаимодействия GroEL с ненативной белковой мишенью и влияния на это взаимодействие лигандов проводятся обычно с ренатурирующими белками, ранние кинетические промежуточные состояния которых прочно взаимодействуют с GroEL [3,15,16]. Однако, в этом случае исследования осложняются тем, что в присутствии GroEL и его лигандов происходит дальнейшее сворачивание белковой мишени в нативную конформацию и её диссоциация с GroEL. Более удобными для такого рода исследований являются белки, нативная конформация которых может быть нарушена в ненативных для GroEL условиях. Одним из таких белков является пепсин, который при рН 7.5 находится в ненативной конформации типа «расплавленная глобула», не агрегирует в этих условиях и взаимодействует с GroEL [17].

Основной задачей настоящей работы явилось исследовать взаимодействие ненативного пепсина с GroEL при различных концентрациях его лигандов (ионов  $Mg^{2+}$ , АДФ, АТФ и GroES), используя гель-фильтрацию и флуориметрическое титрование. Для этого к пепсину была ковалентно присоединена флуоресцентная метка (флуоресцеин).

Показано, что для образования прочного комплекса GroEL с ненативным пепсином (со стехиометрией 1:2) необходимо присутствие ионов  $Mg^{2+}$ . Адениловые нуклеотиды (АДФ и АТФ) ослабляют сродство шаперона к ненативному пепсину, и это ослабление зависит как от природы нуклеотида (АДФ или АТФ), так и от их концентрации и присутствия ко-шаперона GroES.



Полученные данные демонстрируют важную роль лигандов GroEL в формировании и диссоциации его комплекса с ненативными белковыми мишенями.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Реактивы и белки.** В работе использованы аденозин-5'-дифосфат (АДФ) Na-соль, аденозин-5'-трифосфат (АТФ) Na-соль, хроматографически очищенный пепсин слизистой оболочки свиньи, флуоресцеин 5(6)-изотиоцианат, L-гистидин (L-His) ("Sigma", США); хлористые натрий, калий и магний, углекислые кислоты натрий и калий ("Reaxim", Россия); этилендиаминтетраацетат (ЭДТА), N,N-диметилформамид, трис(гидроксиэтил)аминометан (Tris) ("Serva", Германия). GroEL и GroES выделяли по известной методике [18] после экспрессии в клетках *E. coli* (штамм HB101) мультикопийной плазмиды pGroE4 (полный groE оперон *E. coli*, клонированный в EcoRI сайте вектора pACYC184) [18]. Чистоту препарата определяли электрофорезом в полиакриламидном геле [19]. Концентрацию белков определяли спектрофотометрически по поглощению на 280 нм, используя коэффициенты экстинкции ( $A_{1\text{см}}^{0,1\%}$ ), равные 1.48 для нативного пепсина, 0.25 для GroEL и 0.14 для GroES [18]. Флуоресцентно меченый пепсин был приготовлен следующим образом. Пепсин (13.3мг) растворили в 1.9мл 0.15М K-Na-CO<sub>3</sub> (pH 9.1) и добавили 100μл 40мМ флуоресцеин изотиоцианата. Раствор инкубировали в течение 5 часов при 20°C. Препарат обессолили на колонке PD-10 в 25мМ L-His (pH 5.85). Дополнительную очистку меченого пепсина от низкомолекулярных компонентов и разделение в разной степени меченого пепсина проводили на колонке MonoQ HR5/5 в 25мМ L-His (pH 5.85), с элюцией в градиенте 0-1М NaCl. Образец диализовали против 500 мл 20мМ Tris-HCl (pH 7.5). Количество флуоресцентных меток на молекулу пепсина определяли, используя коэффициент экстинкции флуоресцеина ( $E_{490\text{нм}}^{1M} = 87000$  о. е.). В дальнейшей работе использовали пепсин, содержащий одну флуоресцеиновую метку на молекулу белка.

**Гель-фильтрация.** Связывание флуоресцеин-меченого пепсина с GroEL анализировали при помощи FPLC гель-фильтрации. Меченый пепсин (1.5μМ) инкубировали с GroEL (1.5μМ) в буфере элюции (20 мМ Tris-HCl, 100мМ KCl, pH 7.5; где указано, в состав буфера элюции входили также 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5мМ ЭДТА, АДФ, АТФ и 3 μМ GroES) 20 минут при 20°C. Образец наносили на гель-фильтрационную колонку Superose 6 HR 10/30, уравновешенную тем же буфером. Элюцию производили буфером, которым была уравновешена колонка, со скоростью 0.4мл/мин при 20°C. Элюцию флуоресцеин-меченого пепсина регистрировали по флуоресценции на 520нм с использованием проточного флуориметра FLD-6A ("Shimadzu", Япония). Количество пепсина, связанного с GroEL, определяли по площадям под пиками в областях элюции GroEL и свободного пепсина.

**Флуориметрическое титрование.** Флуоресцеин-меченый пепсин с концентрацией 50нМ титровали олигомером GroEL в буфере, содержащем 40мМ Tris-HCl, pH7.5, 100мМ KCl, 10мМ MgCl<sub>2</sub>. Анизотропию флуоресценции флуоресцеин-меченого пепсина измеряли на спектрофлуориметре RF-5301 PC ("Shimadzu", Япония) при длинах волн возбуждения – 490нм и испускания – 520нм. Ширина щелей монохроматоров возбуждения и излучения составляла 3 и 10 нм, соответственно. Концентрацию связанного пепсина определяли по формуле:  $P_b = P_0(r_f - r_b) / (r_b - r_f)$ , где  $P_0$  – общая концентрация пепсина,  $r$  – наблюдаемая анизотропия пепсина,  $r_f$  и  $r_b$  – анизотропии свободного и связанного пепсина, соответственно [20]. Параметры связывания определяли из зависимости  $v/L_f$  от  $v$  (графиков Скэтчарда), где  $v$  – количество молей пепсина, связанного с молем олигомера GroEL, а  $L_f$  – концентрация свободного пепсина. При этом пересечение линейного графика Скэтчарда с осью абсцисс показывает количество мест связывания пепсина на поверхности олигомера GroEL, а наклон прямой – величину  $(-1/K_d)$ , где  $K_d$  – константа диссоциации комплекса GroEL с пепсином [21].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### Влияние лигандов GroEL на его взаимодействие с ненативным пепсином

В качестве метода для исследования влияния лигандов GroEL на его взаимодействие с ненативным пепсином был выбран метод гель-фильтрации на Superose 6 (см. Материалы и методы). На рис. 1 представлены профили элюции ненативного флуоресцеин-меченого пепсина в отсутствие и в присутствии GroEL и его лигандов. Видно, что пик элюции ненативного пепсина не является гомогенным. Разложение этого пика на составляющие компоненты показало, что ненативный пепсин сам по себе элюирует в виде мономеров (М.в. 35кДа), димеров (М.в. 70кДа) и тримеров (М.в. 105кДа). Димеры и тримеры очень лабильны и при уменьшении концентрации белка диссоциируют до мономеров (не показано). GroEL (М.в. 800кДа) образует прочный комплекс с ненативным пепсином только в присутствии ионов Mg<sup>2+</sup> (см. также табл. 1). Этот результат согласуется с данными о влиянии двухвалентных катионов на сродство GroEL к денатурированному пепсину, полученными флуоресцентной корреляционной спектроскопией [22]. Еще одним важным результатом,



## Комплекс шаперона GroEL с флуоресцеин-меченым денатурированным ...

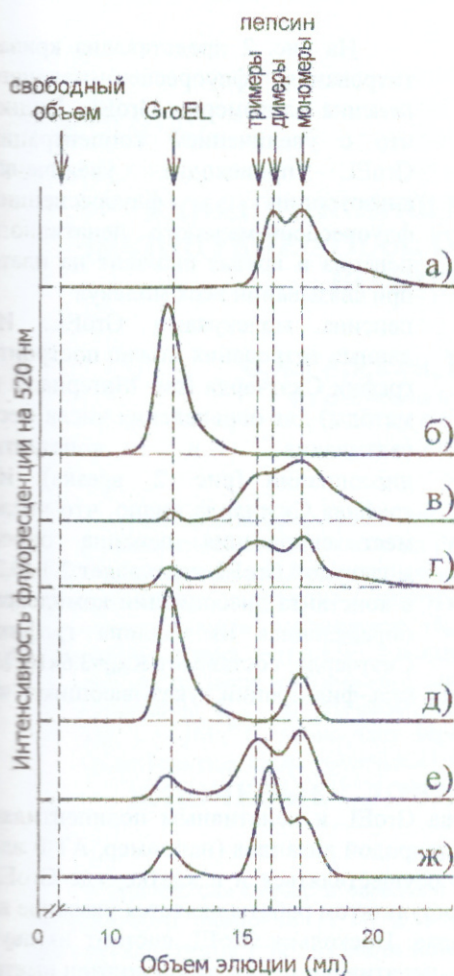


Рис. 1. Профили элюции флуоресцеин-меченого денатурированного пепсина (pH 7.5) в отсутствие и в присутствии GroEL (молярное соотношение 1:1) и его лигандов (см. Материалы и методы):

- а) пепсин +  $Mg^{2+}$ ;  
 б) пепсин + GroEL +  $Mg^{2+}$ ;  
 в) пепсин + GroEL + ЭДТА;  
 г) пепсин + GroEL +  $Mg^{2+}$  + 0.1 мМ АТФ;  
 д) пепсин + GroEL +  $Mg^{2+}$  + 0.1 мМ АДФ;  
 е) пепсин + GroEL +  $Mg^{2+}$  + 1 мМ АДФ;  
 ж) пепсин + GroEL +  $Mg^{2+}$  + 0.1 мМ АДФ + GroES.

Неожиданный результат был также получен при двукратном повышении молярного избытка денатурированного пепсина над GroEL (табл. 1). Оказалось, что одна молекула GroEL может связывать две молекулы денатурированного белка, в то время как ранее считалось, что только одна молекула денатурированного белка связывается с одной тетрадекамерной молекулой GroEL [23]. Чтобы проверить этот результат гель-фильтрации, нами было проведено флуориметрическое титрование флуоресцеин-меченого денатурированного пепсина избытком GroEL.

#### Определение стехиометрии и константы диссоциации комплекса GroEL с денатурированным пепсином методом флуориметрического титрования

Поскольку молекула ненативного пепсина имеет существенно меньшие размеры, чем молекула GroEL, удобным параметром для регистрации их комплекса в равновесных условиях является анизотропия флуоресценции флуоресцеин-меченого пепсина, которая должна увеличиваться при взаимодействии пепсина с GroEL за счет уменьшения вращательной деполаризации флуоресценции.

Таблица 1  
 Взаимодействие флуоресцеин-меченого ненативного пепсина с GroEL в присутствии его лигандов по данным гель-фильтрации (см. Материалы и методы)

пепсин/GroEL	$Mg^{2+}$	АДФ, мМ	АТФ, мМ	GroES	% связанного пепсина
1:1	+	-	-	-	100
2:1	+	-	-	-	95
1:1	-	-	-	-	5
1:1	+	0.1	-	-	67
1:1	+	0.1	-	+	16
1:1	+	1	-	-	10
1:1	+	1	-	+	3
1:1	+	-	0.1	-	11
1:1	+	-	0.1	+	1

представленным на рис. 1 и в табл. 1, является зависимость сродства GroEL к денатурированному пепсину от природы аденилового нуклеотида, его концентрации и наличия кошаперона GroES. Так, АТФ значительно сильнее чем АДФ ослабляет взаимодействие GroEL с денатурированным пепсином при равных концентрациях, а увеличение концентрации АДФ на порядок (с 0.1 мМ до 1 мМ) приводит к примерно такому же ослаблению комплекса GroEL-пепсин, как и 0.1 мМ АТФ. Добавление GroES значительно усиливает дестабилизирующее действие адениловых нуклеотидов на комплекс GroEL-пепсин (см. рис. 1 и табл. 1). Этот результат согласуется с ранее полученными нами данными о влиянии лигандов GroEL на его сродство к лизоциму с восстановленными дисульфидными связями [14]. Из представленных результатов следует интересное наблюдение, отмеченное нами ранее [14] и представленное также другими авторами без обсуждения [17]. Оно заключается в том, что полная шаперонная система, состоящая из GroEL,  $Mg^{2+}$ -АТФ или  $Mg^{2+}$ -АДФ, GroES и ненативного белка, не удерживает ненативный белок, который не может свернуться, в полости GroEL под «крышкой» GroES, как это следует из популярных моделей функционирования GroEL как молекулярного шаперона (см., например, [23]). Более того, образование комплекса GroEL с GroES в присутствии ионов  $Mg^{2+}$  и адениловых нуклеотидов приводит к значительному ослаблению взаимодействия GroEL с ненативным белком (см. рис. 1, табл. 1).



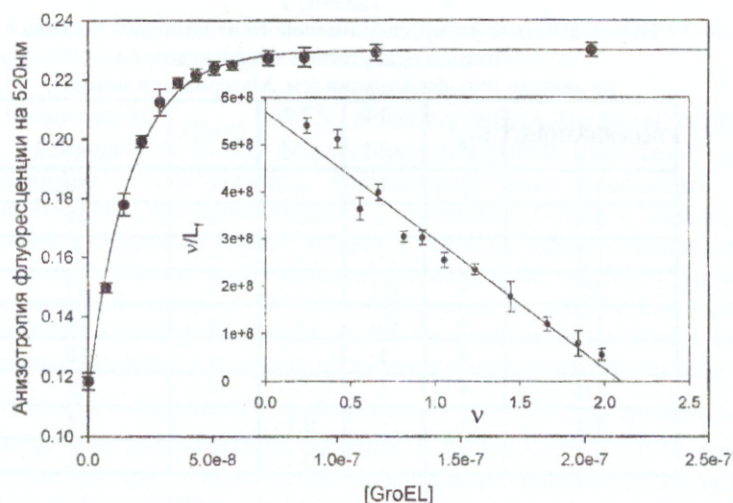


Рис. 2. Титрование 50нМ флуоресцеин-меченого пепсина ( $5 \times 10^{-8}$ М) олигомером GroEL с регистрацией анизотропии флуоресценции на 520нм. На врезке данные по титрованию представлены в виде графика Скэтчарда (см. Материалы и методы).

Таким образом, данные титрования согласуются с данными по гель-фильтрации, указывающими на связывание двух молекул пепсина одной молекулой GroEL (табл. 1).

### ВЫВОДЫ

Результаты работы указывают на то, что степень сродства GroEL к ненативным полипептидам регулируется его лигандами. Эта регуляция обеспечивается как природой лигандов (например, АТФ или АДФ), так и их концентрацией. Такого рода регуляция может осуществляться и в клетке, где GroEL функционирует в присутствии своих лигандов. Другим важным результатом работы является указание на то, что GroEL может связывать две молекулы ненативного белка. Поскольку GroEL состоит из двух колец, имеющих одинаковую структуру и способность связывать ненативные белки, то он должен иметь, по крайней мере, два места связывания ненативных белков.

Работа поддержана грантами Московской области и РФФИ (№ 04-04-47293-Р и № 03-04-49123), грантом ННМИ № 55000305, программой МКБ РАН – № 10002-251/П//145-161/140503-089, грантом Президента РФ - № НШ-1968.2003.4.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ellis R.J. // Cell Stress. Chaperones. 1996. 1. P. 155-160.
2. Gething M.J. and Sambrook J. // Nature. 1992. 355. P. 33-45.
3. Martin J., Langer T., Boteva R. et al. // Nature. 1991. 352. P. 36-42.
4. Viitanen P.V., Gatenby A.A. and Lorimer G.H. // Protein Sci. 1992. 1. P. 363-369.
5. Lindquist S. and Craig E.A. // Annu. Rev. Genet. 1988. 22. P. 631-677.
6. Christman M.F., Morgan R.W., Jacobson F.S. et al. // Cell. 1985. 41. P. 753-762.
7. Schlesinger M.J. // J. Biol. Chem. 1990. 265. P. 12111-12114.
8. Fenton W.A. and Horwich A.L. // Protein Sci. 1997. 6. P. 743-760.
9. Hayer-Hartl M.K., Ewbank J.J., Creighton T.E. et al. // EMBO J. 1994. 13. P. 3192-3202.
10. Lin Z., Schwartz F.P. and Eisenstein E. // J. Biol. Chem. 1995. 270. P. 1011-1014.
11. Viitanen P.V., Lubben T.H., Reed J. et al. // Biochemistry. 1990. 29. P. 5665-5671.
12. Katsumata K., Okazaki A., Tsurupa G.P. et al. // J. Mol. Biol. 1996. 264. P. 643-649.
13. Todd M.J., Viitanen P.V. and Lorimer G.H. // Science. 1994. 265. P. 659-666.
14. Marchenko N.Yu., Marchenkov V.V., Kotova N.V. et al. // Ukr. Biokhim. Zh. 2003. 75. P. 88-94.
15. Goloubinoff P., Christeller J.T., Gatenby A.A. et al. // Nature. 1989. 342. P. 884-889.
16. Chen J., Walter S., Horwich A.L. et al. // Nat. Struct. Biol. 2001. 8. P. 721-728.
17. Aoki K., Taguchi H., Shindo Y. et al. // J. Biol. Chem. 1997. 272. P. 32158-32162.
18. Lissin N.M., Venyaminov S.Y. and Girshovich A.S. // Nature. 1990. 348. P. 339-342.
19. Laemmli U.K. // Nature. 1970. 227. P. 680-685.
20. Lakowicz J.R. Principles of fluorescence spectroscopy. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York. 1999.
21. Schulz G.E., Schirmer R.H. Principles of protein structure. Springer-Verlag, New York - Heidelberg - Berlin, 1979.
22. Pack C.G., Nishimura G., Tamura M. et al. // Cytometry. 1999. 36. P. 247-253.
23. Hayer-Hartl M.K., Martin J. and Hartl F.U. // Science. 1995. 269. P. 836-841.