



УДК 577.112.012.6

ДЕНАТУРАЦИОННЫЕ ПЕРЕХОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОГО ШАПЕРОНА GroEL ИЗ *Escherichia coli*

© 1997 г. А. К. Сурин, Н. В. Котова, С. Ю. Марченкова, И. В. Соколовский,
Н. А. Родионова, С. Ю. Якличкин, Г. В. Семисотнов[#]

Институт белка РАН, 142292, Пушкино Московской обл.

Поступила в редакцию 13.09.96 г. Принята к печати 19.12.96 г.

С помощью методов КД, светорассеяния, сканирующей микрокалориметрии, связывания гидрофобного зонда и контроля за АТФ-азной активностью исследованы денатурационные конформационные изменения олигомерной частицы молекулярного шаперона GroEL из *E. coli* в растворе при увеличении концентрации мочевины, повышении температуры и изменении pH. Определены диапазоны изменения внешних условий, в которых GroEL сохраняет свою структуру и функцию. Денатурационные переходы являются кооперативными (резко выраженными) и необратимыми. Показано, что в интервале pH 6.0–9.6 происходит трехстадийное изменение АТФ-азной активности GroEL (с полупереходами $pH_{1/2}$ 6.3, 8.5 и 9.3), которое не сопровождается существенными структурными изменениями и связано, по-видимому, с титрованием аминокислотных остатков, важных для осуществления АТФ-азной активности данного белка.

Ключевые слова: молекулярный шаперон, GroEL, денатурационные переходы.

Открытие класса белков теплового шока, участвующих в приобретении другими белками правильной (функционально активной) структуры [1], – один из существенных аргументов, ставящих под сомнение основной принцип самоорганизации белков, утверждающий, что вся необходимая и достаточная информация для сворачивания белка заложена в его аминокислотной последовательности [2]. Именно этот вопрос интересует сейчас большинство ученых, работающих в области исследования процесса сворачивания белков.

К таким “помощникам” (называемым часто молекулярными шаперонами [3, 4]) относится белок GroEL из *E. coli* [4]. Согласно данным электронной микроскопии [5] и последним данным рентгеноструктурного анализа [6, 7], GroEL представляет собой олигомерную частицу, состоящую из 14 идентичных субъединиц с молекулярной массой около 60 кДа каждая. Субъединицы организуются в два упакованных в стопку гептамерных кольца, образуя тороид с внешним диаметром 137 Å, внутренним диаметром 45 Å и толщиной 146 Å. GroEL – слабая АТФ-аза [8, 9], однако роль АТФ-азной реакции в функционировании GroEL как молекулярного шаперона пока окончательно не выяснена. Способность GroEL содействовать правильному сворачиванию других белков [10, 11] делает привлекательным его использование в биотехнологии для реактивации вновь синтезируемых белков из “тел включения” [12]. Сложная

олигомерная организация структуры GroEL, наличие ряда лигандов, участвующих в осуществлении его функции [13, 14], затрудняет выяснение механизма его участия в процессе сворачивания белков. В этой ситуации возникают вопросы, ответы на которые могут внести ясность во взаимосвязь функции GroEL с его структурной организацией. К таким вопросам относятся, в частности, выяснение стабильности и конформационной подвижности GroEL по отношению к изменению условий внешней среды (температуры, pH, концентрации денатурантов), выяснение природы внутримолекулярных взаимодействий, стабилизирующих внутри- и межмолекулярную структуру GroEL. Определение диапазонов изменения внешних условий, при которых GroEL сохраняет свою структуру и функцию, важно и для использования GroEL в реактивации вновь синтезируемых белков из “тел включения”, которые обычно растворяются при экстремальных внешних условиях (экстремальные pH и концентрации денатурантов).

Настоящая работа посвящена исследованию денатурационных переходов GroEL под воздействием внешней среды (повышении концентрации денатуранта, температуры, изменении pH раствора). Для этого был привлечен ряд физико-химических методов, дающих информацию как о внутри- и межсубъединичной структурной организации GroEL (КД, связывание гидрофобного зонда, сканирующая микрокалориметрия и светорассеяние), так и о его функциональных свойствах (измерение АТФ-азной активности).

[#] Автор для переписки.

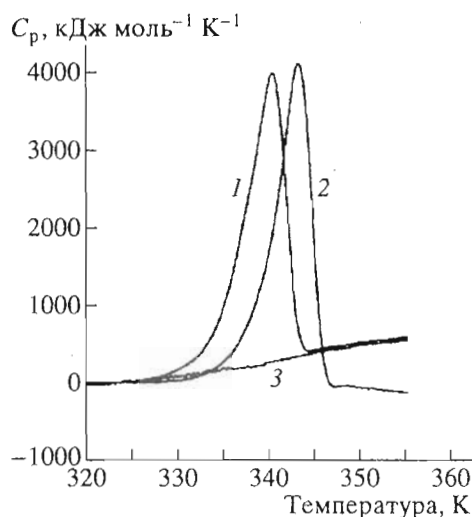


Рис. 1. Влияние ионов K^+ и Mg^{2+} на температурную зависимость удельной теплоемкости GroEL. 1 — 50 мМ Na_2HPO_4 -цитрат, pH 7.5; 2 — буфер А, pH 7.5; 3 — повторное плавление образца 1. Концентрация белка 2 мг/мл.

В результате определены диапазоны внешних условий, при которых GroEL сохраняет свои структурные и функциональные характеристики, и показана высокая кооперативность денатурационных переходов. Установлено, что изменение АТФ-азной активности GroEL в интервале pH 6.0–9.6 не связано с крупномасштабными изменениями структуры GroEL.

Температурная денатурация GroEL

В присутствии функционально важных ионов Mg^{2+} и K^+ [9, 14] максимум теплопоглощения GroEL при нагревании сдвигается в сторону более высоких температур (рис. 1). Этот результат согласуется с опубликованными ранее данными о стабилизирующем эффекте ионов Mg^{2+} и K^+ на структуру GroEL по отношению к денатурации мочевиной [15].

Анализ термодинамических характеристик температурного денатурационного перехода GroEL осложняется из-за необратимости этого перехода. Повторное плавление белка после охлаждения (рис. 1) не сопровождается кооперативным теплопоглощением, характеризующим наличие же-

стой третичной структуры [16]. Таким образом, жесткая третичная структура белка не восстанавливается после ее первоначального плавления. Такая необратимость температурных переходов наблюдается достаточно часто, особенно в случае субъединичных глобулярных белков, где ее обычно связывают с межмолекулярной ассоциацией “расплавленных” конформеров белка [17]. Вместе с тем в последнее время был предложен ряд эмпирических подходов к оценке влияния скоростей межмолекулярной ассоциации белка в “расплавленном” состоянии на термодинамические величины: температуру полуперевода, калориметрическую и эффективную энтальпии, получаемые при обработке кривых калориметрического плавления. В таблице приведены данные оценочных расчетов калориметрических ($\Delta H^{кал}$) и эффективных ($\Delta H^{эфф}$) энтальпий и температур денатурации (T_d) в отсутствие и присутствии ионов K^+ и Mg^{2+} в приближении, что температурное плавление GroEL является переходом “все или ничего”. Как видно из рис. 1 и таблицы, ионы K^+ и Mg^{2+} не вносят существенного изменения в величины калориметрической и эффективной энтальпий (разницы между соответствующими энтальпиями не превышают погрешность в определении соответствующих величин, см. таблицу). В то же время присутствие ионов приводит к заметному повышению температуры плавления GroEL, что свидетельствует о повышении его термостабильности при связывании ионов K^+ и Mg^{2+} .

pH-Зависимые денатурационные переходы

Исследование pH-зависимых переходов в белках позволяет оценить роль электростатических взаимодействий в стабилизации различных уровней структурной организации белков. Из рис. 2 видно, что в интервале pH 7.0–9.2 GroEL сохраняет свою АТФ-азную активность, максимальные значения которой достигаются при pH 8.5–9.0. Уменьшение АТФ-азной активности при повышении pH от 9.2 до 9.7 не является следствием щелочной денатурации белка в этой области. На это указывает неизменность спектров КД в дальнем и ближнем УФ (рис. 3а и 3б соответственно) и наличие пика на кривой теплопоглощения в широком интервале значений pH (рис. 4). Кроме того, в этих пределах pH белок сохраняет свою олигомерную структуру, о чем свидетельствует отсутствие уменьшения интенсивности светорассеяния (рис. 5). Незначительное увеличение интенсивности светорассеяния в интервале pH 8.0–9.4 связано, по-видимому, с межмолекулярной ассоциацией олигомерных частиц.

Уменьшение АТФ-азной активности в интервале pH 7.0–6.0 также не связано с заметными конформационными изменениями в структуре GroEL.

Термодинамические характеристики GroEL в растворе*

Объект	$\Delta H^{кал}$, кДж моль ⁻¹	$\Delta H^{эфф}$, кДж моль ⁻¹	T_d , К
GroEL	16400 ± 1000	720 ± 50	340.0 ± 0.5
GroEL + K^+ + Mg^{2+}	16300 ± 1000	700 ± 50	343.3 ± 0.5

* Условия и концентрации указаны в подписи к рис. 1.

Наличие пика теплопоглощения при тепловой денатурации белка как при pH 6.2, так и 5.6 (рис. 4), отсутствие существенного изменения спектров КД в дальнем и ближнем ультрафиолете (рис. 3а и 3б) и интенсивности флуоресценции гидрофобного зонда АНС (характеризующей степень доступности гидрофобных кластеров белка растворителю, рис. 6) свидетельствуют о сохранении вторичной и жесткой третичной структуры GroEL в этом интервале pH. Неизменность же интенсивности светорассеяния является аргументом в пользу сохранения олигомерной структуры белка (рис. 5).

Дальнейшее понижение pH от 5.5 до 2.5 сопровождается резким увеличением сродства GroEL к гидрофобному зонду АНС (интенсивность флуоресценции АНС увеличивается практически на порядок относительно нейтральных pH, рис. 5), что свидетельствует о существенном увеличении степени доступности гидрофобных кластеров GroEL растворителю при низких значениях pH. Кроме того, исчезает пик теплопоглощения при температурной денатурации GroEL в кислой области pH (рис. 4). Таким образом, при pH ниже 3.5 утрачивается жесткость третичной структуры белка. Тем не менее кислая денатурация не сопровождается существенным разрушением вторичной структуры белка. На рис. 3а приведены спектры КД в дальнем ультрафиолете нативной, полностью развернутой (в присутствии 4.5 М мочевины) и "кислой" (pH 3.5) форм GroEL. Хорошо видно, что при pH 3.5 спектр КД достаточно выражен и по амплитуде сильно отличается от спектра белка, развернутого в 4.5 М растворе мочевины. Такие свойства характерны для белков, находящихся в состоянии "расплавленной глобулы" [16, 18]. Заметим, что в интервале pH 3.5–2.0 интенсивность светорассеяния существенно не уменьшается по сравнению с интенсивностью при нейтральных значениях pH (рис. 5). Сравнение спектров светорассеяния для pH 7.4, 2.5 и 7.4 в присутствии 4.5 М мочевины (мономерной развернутой формы GroEL) (вставка на рис. 5) свидетельствует о том, что распад GroEL на мономерные субъединицы не происходит вплоть до экстремальных значений pH. Таким образом, вклад электростатических взаимодействий в стабилизацию межсубъединичных контактов GroEL невелик. Резкое изменение рассеяния в интервале pH 3.5–5.0 связано, по-видимому, с ассоциацией молекул GroEL в области изоэлектрической точки (расчет изоэлектрической точки GroEL по первичной структуре дает значение pI 4.7).

Таким образом, в диапазоне pH 7.0–9.2 олигомерная частица GroEL обладает АТФ-азной активностью, которая резко падает вне этого диапазона. Вместе с тем белок не претерпевает существенных внутрисубъединичных конформационных изменений в интервале pH 5.5–9.7, сохраняя жесткость

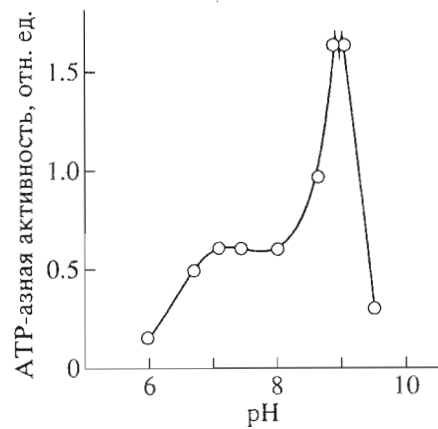


Рис. 2. Зависимость АТФ-азной активности GroEL от pH. Время инкубации GroEL с АТФ 10 мин при 23°C. Концентрация белка 1 мг/мл. При измерении использовали буферы А (pH 2.5–7.9), Б (pH 7.9–9.0), В (pH 9.0–10.5).

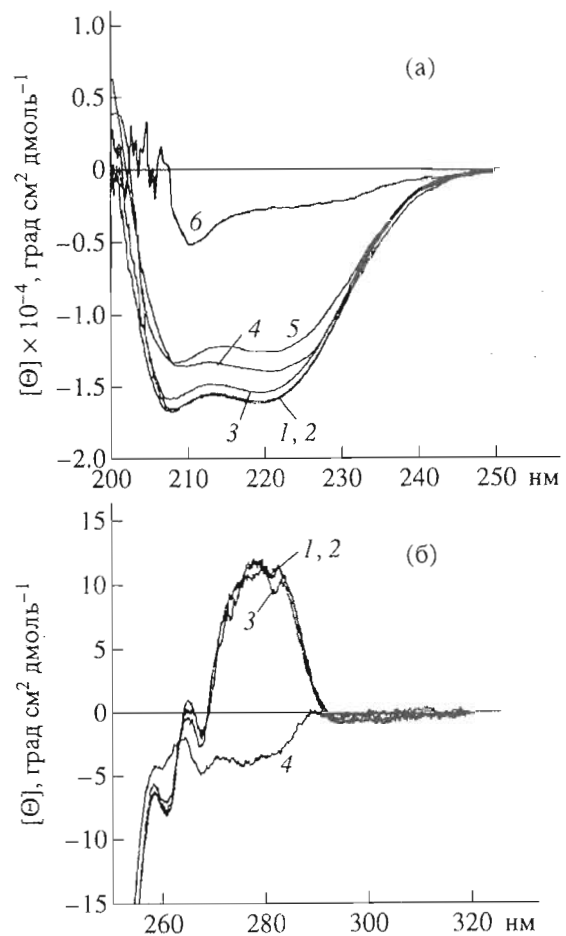


Рис. 3. Влияние pH на спектры КД GroEL: (а) — в дальнем ультрафиолете при pH 9.8 (1), 7.5 (2), 5.5 (3), 4.1 (4), 3.5 (5), 7.5 в присутствии 4.5 М мочевины (6). Концентрация белка 0.2 мг/мл; (б) — в ближнем ультрафиолете при pH 9.8 (1), 7.5 (2), 5.5 (3), 7.5 в присутствии 4.5 М мочевины (4). Концентрация белка 0.8 мг/мл. В случаях 2–6 использовали буфер А, в случае 1 — буфер В.

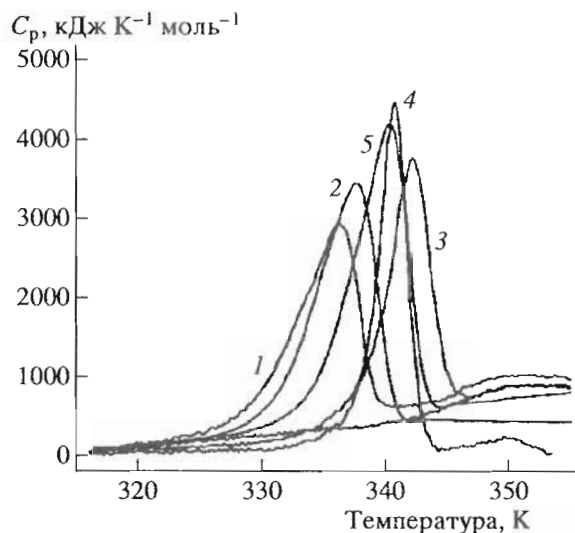


Рис. 4. Температурные зависимости удельной теплоемкости GroEL при pH 9.6 (1), 8.9 (2), 7.5 (3), 6.2 (4), 5.6 (5), 2.5, 3.1, 3.5, 3.8 (6). Концентрация белка 2 мг/мл. В случаях 3–6 использовали буфер А, в случаях 1, 2 – буфер В.

структурной организации. Изменение АТФ-азной активности в этом интервале pH связано, по-видимому, с титрованием аминокислотных остатков GroEL, входящих в активный центр или находящихся в непосредственной близости от него. Ими предположительно могут быть гистидиновые, цистеиновые и лизиновые остатки, рК которых в белках (6.5–7.0, 8.5–8.8 и 9.8–10.2 соответственно [19]) находятся в районе точек полупереходов изменения АТФ-азной активности GroEL (6.3, 8.5 и 9.3). Важность цистеиновых остатков для осуществления АТФ-азной реакции GroEL отмечалась в литературе и ранее [20].

Денатурация мочевиной

Исследования денатурационных переходов с использованием таких денатурантов, как мочевина, позволяют получать информацию о степени кооперативности структурной организации белка, стабильности различных уровней организации белковой молекулы и возможных промежуточных состояниях на пути денатурации.

Денатурация GroEL мочевиной, зарегистрированная по изменению АТФ-азной активности, эллиптичности при 220 нм и интенсивности светорассеяния при 330 нм (рис. 7), свидетельствует о том, что при повышении концентрации мочевины до 2.5 М GroEL сохраняет АТФ-азную активность и, следовательно, нативную структуру белка в этом интервале концентраций денатуранта. Дальнейшее увеличение концентрации мочевины инициирует резкий денатурационный переход, который полностью завершается при увеличении

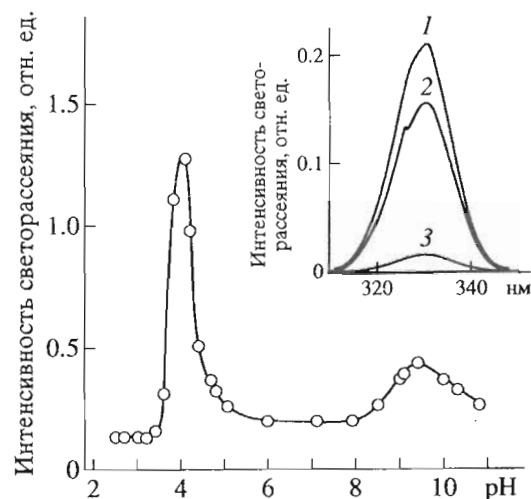


Рис. 5. Зависимость от pH интенсивности светорассеяния для растворов GroEL. Концентрация белка 1 мг/мл. Для приготовления растворов использовали буферы А (pH 2.5–7.9), Б (pH 7.9–9.0), В (pH 9.0–10.5). На вставке приведены спектры светорассеяния для растворов GroEL при pH 7.4 (1), 2.5 (2), 7.4 в присутствии 4.5 М мочевины (3).

концентрации мочевины до 4.0 М. Заметим, что интенсивность рассеяния света и эллиптичность в дальнем ультрафиолете уменьшаются синхронно с уменьшением АТФ-азной активности белка по мере возрастания концентрации мочевины. Это говорит о том, что разрушение четвертичной, третичной и вторичной структур белка происходит одновременно при отсутствии накопления каких-либо промежуточных состояний. S-образный характер изменения параметра F_N в очень узком интервале концентрации мочевины указывает на

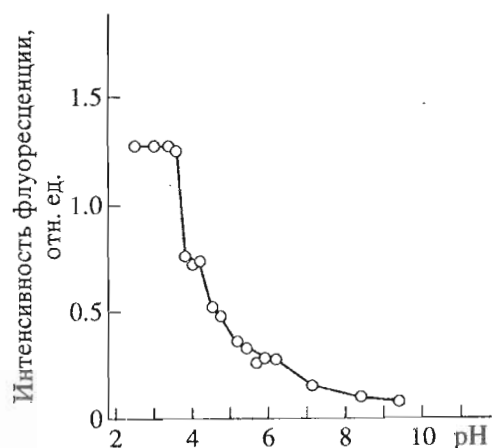


Рис. 6. Зависимость от pH интенсивности флуоресценции АНС для растворов GroEL. Концентрация белка 0.01 мг/мл. Для приготовления растворов использовали буферы А (pH 2.5–7.9), Б (pH 7.9–9.0), В (pH 9.0–10.5).

высокую степень кооперативности исследуемых переходов и, следовательно, структурной организации GroEL.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

GroEL выделяли из клеток *E. coli*, штамм HB101, трансформированный мультикопийной плазмидой pGroE4 (полный groE-оперон *E. coli*, клонированный в *EcoRI*-сайте вектора pACYC184), по методу, описанному в работе [21]. Чистоту препарата определяли электрофорезом в полиакриламидном геле [22].

Все реактивы имели квалификацию ос. ч. или х. ч. При исследовании денатурационных переходов готовились запасные растворы с различной концентрацией мочевины или значением pH. Концентрацию мочевины ("Биохим", Россия) определяли с помощью рефрактометра ИРФ-454Б (Россия). Значения pH контролировали с помощью цифрового pH-метра (Radelkis, Венгрия). Все растворы готовили на бидистиллированной воде. В качестве буферных систем использовали растворы, содержащие 50 мМ Na₂HPO₄-цитрат, 100 мМ KCl и 10 мМ Mg(AcO)₂ (pH 2.2–8.0) (А); 50 мМ трис-HCl, 100 мМ KCl и 10 мМ Mg(AcO)₂ (pH 7.8–9.7) (Б); 50 мМ глицин-NaOH, 100 мМ KCl и 10 мМ Mg(AcO)₂ (pH 8.6–10.6) (В). Эксперименты проводились при 23°C.

АТФ-азную активность определяли как скорость прироста пирофосфата при GroEL-зависимом гидролизе АТФ (Sigma, США) до ADP и пирофосфата по методике, описанной в работе [23]. В каждом случае параллельно ставили контрольные опыты на автолиз АТФ.

Концентрацию белка измеряли спектрофотометрически с помощью спектрофотометра Shimadzu UV-1601 (Япония) с использованием коэффициента поглощения $A_{276.5}^{0.1\%} = 0.25$ [24].

Спектры кругового дихроизма измеряли на спектрополяриметре Jasco-600 (Япония). Длина оптического пути при записи спектров в дальнем и ближнем ультрафиолете равнялась 0.185 и 10 мм соответственно.

Рассеяние света при 330 нм и флуоресценцию измеряли с помощью спектрофлуориметра Aminco SPF-1000cs (США) под углом 90° к падающему свету. Изменение сродства GroEL к гидрофобному зонду 1-анилин-8-нафталинсульфонат (АНС) (Sigma, США) определяли по изменению интенсивности флуоресценции при 480 нм, возбужденной облучением при 370 нм [18].

Калориметрические исследования проводили на дифференциальном сканирующем калориметре ДАСМ-4 ("Биоприбор", Россия) с объемом ячейки 0.5 мл. Скорость сканирования составляла 1 град/мин при избыточном давлении 2.5 атм. Пе-

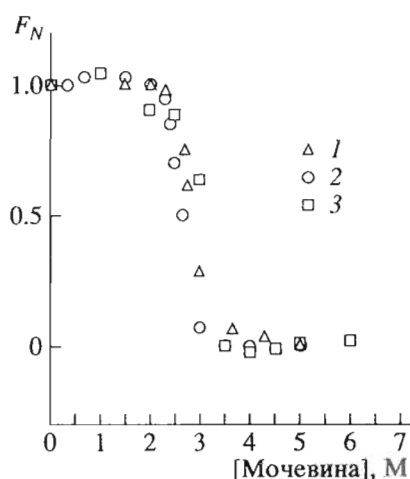


Рис. 7. Нормированные зависимости АТФ-азной активности (1), величины эллиптичности при 220 нм (2), рассеяния света при 330 нм (3) в растворах GroEL от концентрации мочевины. Параметр F_N соответствует доле нативных молекул и определяется формулой $F_N = (f - f_U)/(f_N - f_U)$, где f – текущее значение, а f_U и f_N – значения данного параметра для денатурированного и нативного состояний соответственно. Погрешность определения F_N составляла ± 0.1 . Концентрации белка: 1 (1), 0.2 (2) и 1 мг/мл (3). Во всех случаях использовали буфер А, pH 7.5.

ред измерениями белок переводили в соответствующий буферный раствор на колонке NAP-5 (Pharmacia, Швеция).

Авторы благодарят проф. О.Б. Птицына за полезные обсуждения в ходе работы. Работа была поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант 94-04-12050а от 4.11.1993) и Международным научным фондом (SFI, гранты MUL 000 от 26.04.1994 и MUL 300 от 29.03.1995).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hartl F.-U., Hlodan R., Langer T. // Trends Biochem. Sci. 1994. V. 19. P. 20–25.
- Anfinsen C.B. // Science. 1973. V. 181. P. 223–230.
- Laskey R.A., Honda B.M., Mills A.D., Finch J.T. // Nature. 1978. V. 275. P. 416–420.
- Ellis J. // Nature. 1987. V. 328. P. 378–379.
- Chan S., Roseman A.M., Hunter A.S., Wood S.P., Burston S.G., Ranson N.A., Clarke A.R., Saibil H.R. // Nature. 1994. V. 371. P. 261–264.
- Braig K., Otwinowski Z., Hegde R., Boisvert D.C., Joachimiak A., Horwich A., Sigler P.B. // Nature. 1994. V. 371. P. 578–586.
- Braig K., Adams P.D., Brunger A.T. // Nature Struct. Biol. 1995. V. 2. P. 1083–1094.
- Bochkareva E.S., Girshovich A.S. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 25672–25675.

9. Bochkareva E.S., Lissin N.M., Flinn G.C., Rothman J.E., Girshovich A.S. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 6796–6800.
10. Todd M.J., Lorimer G.H. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 5388–5394.
11. Gray T.E., Fersht A.R. // *FEBS Lett.* 1991. V. 292. P. 254–258.
12. Keresztessy Z., Hughes J., Kiss L., Hughes A. // *Biochem. J.* 1996. V. 314. P. 41–47.
13. Goloubinoff P., Christeller J.T., Gatenby A.A., Lorimer G.H. // *Nature.* 1989. V. 342. P. 884–889.
14. Vitanen P.V., Lubben T.H., Reed J., Goloubinoff P., O'Keefe D.P., Lorimer G.H. // *Biochemistry.* 1990. V. 29. P. 5665–5671.
15. Gorovits B.M., Horowitz P.M. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 28551–28556.
16. Ptitsyn O.B. // *Adv. Protein Chem.* 1995. V. 47. P. 83–229.
17. Privalov P.L. // *Adv. Protein Chem.* 1979. V. 33. P. 167–241.
18. Semisotnov G.V., Rodionova N.A., Razgulyaev O.I., Uversky V.N., Gripas A.F., Gilmanshin R.I. // *Biopolymers.* 1991. V. 31. P. 119–128.
19. Кантор Ч., Шиммель П. Биофизическая химия. М.: Мир, 1984. Т. 1. С. 50.
20. Bochkareva E.S., Horowitz A., Girshovich A.S. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 44–46.
21. Hayer-Hartl M.K., Ewbank J.J., Creighton T.E., Hart F.U. // *EMBO J.* 1994. V. 13. P. 3192–3202.
22. Laemmli U.K. // *Nature (London).* 1970. V. 227. P. 680–685.
23. Todd M.J., Vitanen P.V., Lorimer G.H. // *Biochemistry.* 1993. V. 32. P. 8560–8567.
24. Lissin N.M., Venyaminov S.Yu., Girshovich A.S. // *Nature.* 1990. V. 348. P. 339–342.

Denaturation Transitions of the Molecular GroEL Chaperone from *Escherichia coli*

A. K. Surin, N. V. Kotova, S. Yu. Marchenkova, I. V. Sokolovskii,
N. A. Rodionova, S. Yu. Yaklichkin, and G. V. Semisotnov

Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142292 Russia

Abstract—Conformational changes of oligomeric particle of GroEL chaperone from *E. coli* in solution were studied, which proceed during its denaturation upon the action of elevated urea concentration, temperature, and extremal pH values by the methods of CD, light scattering, scanning microcalorimetry, hydrophobic probe binding, and ATPase activity measurements. The ranges of changing the external conditions, within which GroEL retains its structure and functions, were determined. Denaturation transitions were found to be cooperative, pronounced, and irreversible. In the pH range from 6.0 to 9.6, the three-step change of the ATPase activity of GroEL was shown to occur with half-transition $\text{pH}_{1/2}$ of 6.3, 8.5, and 9.3. It does not result in any essential structural changes and is probably associated with a protonation/deprotonation of amino acid residues important for the GroEL ATPase activity.

Key words: molecular chaperone, GroEL, denaturation transitions.