



УДК 577.112.012.6:577.322.7

ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ ФИБРИТИНА БАКТЕРИОФАГА T4 И ЕГО ДЕЛЕЦИОННЫХ МУТАНТОВ

© 1999 г. Ю. Я. Лондер, В. В. Месянжинов*#

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

* Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва

Поступила в редакцию 15.05.98 г.

Принята к печати 01.12.98 г.

Изучена стабильность при инкубации при разных температурах в интервале 40–90°C в присутствии детергента (2% SDS) серии ранее полученных мутантов фибритина бактериофага T4 (суперспирального фибриллярного гомотримера параллельно упакованных субъединиц, содержащего по 486 а.о. на мономер) с нарастающими делециями с N-конца полипептидной цепи мономеров. Мутантные фибритины содержат: фибритин G – 443, B – 276, C – 231 и E – 120 а.о. Сконструирован еще один делеционный мутант, названный фибритин S1 (108 а.о.). Показано, что в присутствии 2% SDS при электрофорезе в ПААГ без предварительного прогрева все эти белки мигрируют как образцы с кажущейся молекулярной массой, существенно большей, чем в случае с прогреванием (3 мин, 100°C). Прогрев интактного фибритина и мутанта G в интервале температур 50–70°C в течение 10 мин приводит к образованию формы с кажущейся молекулярной массой свыше 200 кДа. Эта форма, по-видимому, представляет собой тримерный белок с частично денатурированной N-концевой частью. Фибритины B и C более устойчивы и даже в интервале 70–90°C лишь частично денатурируют на мономеры. Для коротких мутантов E и S1 диссоциация на мономеры происходит в интервале 45–50°C. Мутанты B, C, E и S1 денатурируют в один переход без образования промежуточной формы. Стабильность тримерных молекул нативного фибритина в денатурирующих условиях электрофореза и характер поведения полноразмерного белка при нагревании в интервале температур 50–70°C могут быть использованы при идентификации промежуточных форм фибритина при фолдинге *in vivo*. Обнаружена способность денатурированных нагреванием фибритина и его мутантов к рефолдингу при низких температурах в присутствии 2% SDS.

Ключевые слова: бактериофаг T4; фибритин; белки, инженерия; денатурация; термостабильность; рефолдинг; белок суперспиральный.

Одним из важных направлений биохимии является изучение причин, обеспечивающих стабильность белков в присутствии различных денатурирующих агентов. Роль отдельных аминокислотных остатков или участков последовательности белка в процессе формирования его надмолекулярной структуры (фолдинге) и ее стабилизации легче выяснять при изучении фибриллярных белков, которые содержат повторяющиеся структурные мотивы. Один из таких модельных объектов – фибритин – фибриллярный белок частицы бактериофага T4 *Escherichia coli*, выполняющий роль молекулярного шаперона при сборке длинных хвостовых фибрилл и присоединении их к вирусной частице [1, 2]. Фибритин – продукт гена *wac* (*whiskers antigen control*) [3, 4]: его полипептидная цепь содержит 486 а.о. (M 52 кДа) [5]. В последовательности фибритина были обнаружены характерные для суперспиральных (coiled coil) бел-

ков семичленные (гептадные) повторы (bcdefga)_n, где в позициях **a** и **d** расположены преимущественно гидрофобные остатки Leu, Ile и Val [6].

Исследование физико-химических свойств фибритина показало, что он является тримером параллельно упакованных субъединиц [7]. Однако, в отличие от других суперспиральных белков, структура фибритина сегментирована и короткие альфа-спиральные фрагменты разделены участками, не имеющими суперспиральной упаковки (рис. 1). Белок имеет небольшие глобулярные N- и C-концевые домены, а остальная часть его аминокислотной последовательности представлена 13 суперспиральными сегментами, соединенными короткими петлями [5–8]. Делеционные мутанты фибритина, укороченные с N-конца или же имеющие протяженные делеции в середине полипептидной цепи, как и нативный белок, способны при экспрессии с плазмидных векторов собираться *in vivo* в тримерные суперспиральные структуры [7].

Автор для переписки (тел./факс: (095) 336-60-22; e-mail: vvm@ibch.siocb.ras.ru).

1 T D I V L N D L P F V D G P P A E G Q S R I S W I K N G E E I L G A D T Q Y G S E G S M N R P T V S 50																	
	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	<i>g</i>	<i>a</i>										
51			V	L	R	N	V										
56	E	V	L	D	K	N	I	263		S	I	I	T	S	V		
63	G	I	L	K	T	S	L	($\alpha 1$)	269	N	T	N	T	D	N	I	($\alpha 6$)
70	E	T	A	N	S	D	I		276	A	S	I	N	L	E	L	
77	K	T	I	Q	G	I	L									NQSGG	(L6)
									288			I	K	Q	R ⁺	L	($\alpha 7$)
									293	T	V	I	E ⁻	T	S	I	
97		I	N	K	K	D ⁻	I									GSDD	(L7)
103	S	D	L	K ⁺	T	L	T	($\alpha 2$)								IPSS	
110	S	E	H	T	E	I	L		308			I	K	G	Q	I	
117	N	G	T	N	N	T	V		313	K	D	N	T	T	S	I	($\alpha 8$)
124	D	S	I	L	A	D	I		320	E	S	L	N	G	I	V	
																GENT	(L8)
																SSG	
144			I	R	N	D ⁻	L	($\alpha 3$)	334			L	R	A	N	V	($\alpha 9$)
149	L	W	I	K ⁺	R	E	L		339	S	W	L	N	Q	I	V	
																GTDSSG	(L9)
																GQPSPPG	
									359		S	L	L	N	R ⁺	V	
176		M	K	H	R	I	I		365	S	T	I	E ⁻	T	S	V	($\alpha 10$)
181	I	N	N	T	D	V	I	($\alpha 4a$)	372	S	G	L	N	N	A	V	
188	T	S	Q	G	I	R ⁺	L		379	Q	N	L	Q	V	E	I	
																GNNNSAG	(L10)
									392			I	K	G	Q	V	($\alpha 11$)
208		S	L	T	I	E ⁻	V	($\alpha 4b$)	397	V	A	L	N	T	L	V	
214	G	N	L	R ⁺	E	E	L									NGTNPNG	(L11)
																STVEERG	
									418			L	T	N	S	I	
									423	K	A	N	E	T	N	I	
231			V	Y	S	R ⁺	L		430	A	S	V	T	Q	E ⁻	V	($\alpha 12$)
236	N	E	I	D ⁻	T	K ⁺	Q		437	N	T	A	K ⁺	G	N	I	
243	T	T	V	E ⁻	S	D ⁻	I	($\alpha 5$)	444	S	S	L	Q	G	D	V	
250	S	A	I	K ⁺	T	S	I		451	Q	A	L	Q	E	A		
																GYPGNN	(L5)
458 G Y I P E A P R D G Q A Y V R K D G E W V L L S T F L S P A 486																	

Рис. 1. Предсказанное [8] периодическое распределение остатков в аминокислотной последовательности фибритина по гептадам. Аминокислотные остатки в колонках, обозначенных *bcd e f g a*, соответствуют участкам, образующим α -спираль ($\alpha 1$ - $\alpha 12$). Остатки справа от колонок образуют петли (L1-L11), соединяющие соседние α -спиральные сегменты. Жирным шрифтом обозначены гидрофобные остатки в позициях *a* и *d*. Двумя чертами подчеркнуты остатки Met44, Ile211, Ile256 и Ile367, с которых начинаются мутантные фибритины G, B, C и E, соответственно. Начало фибритина S1 совпадает с началом фибритина E, но в S1 делегирован участок Asn404-Glu415 (подчеркнут).

Предсказанный тип строения фибритина [6] был недавно подтвержден нами рентгеноструктурным анализом делеционного мутанта E. Кристаллографические данные для этого белка, содержащего только по 120 C-концевых аминокислотных остатков на мономер, показали, что он действительно является параллельно-тримерным суперспиральным белком, причем глобулярный C-концевой домен имеет структуру типа β -пропеллера. α -Спиральная часть фибритина E содержит три суперспиральных сегмента ($\alpha 10$, $\alpha 11$ и

$\alpha 12$), разделенных короткими петлями L10 и L11 [8, 9].

Ранее мы обнаружили, что фибритин дикого типа устойчив к действию SDS в концентрациях, применяемых для денатурирующего электрофореза в ПААГ (2%). Белок, не прогретый перед электрофорезом, имеет при электрофорезе в денатурирующем ПААГ кажущуюся молекулярную массу, существенно большую, чем образцы, прогретые 3 мин при 100°C, как этого требует стан-

дартная методика электрофореза [10, В.П. Ефимов и В.В. Месянжинов, неопубликованные данные]. В данной работе мы изучили термостабильность интактного фибритина и пяти его мутантов с деляциями различной протяженности в *N*-концевой части. Четыре мутанта были сконструированы нами ранее [5, 7]. Это фибритин G (443 а.о. в цепи мономера, *M* 49 кДа), фибритин В (276 а.о., *M* 29.5 кДа), фибритин С (231 а.о., *M* 25 кДа) и фибритин Е (120 а.о., *M* 12.4 кДа). Они были получены путем амплификации соответствующих фрагментов гена *wac* и последующего клонирования в экспрессионный вектор рЕТ-19b (Novagen) по сайтам рестрикции *Nco*I и *Bam*HI. Пятый мутант – фибритин S1 (108 а.о., *M* 11.2 кДа) сконструирован в данной работе на основе фибритина Е удалением петли L11, содержащей 12 а.о. (Asn404-Glu415). Ниже приведен фрагмент аминокислотной последовательности фибритина Е Val397-Phe422, содержащий эту петлю (остатки, образующие петлю, выделены жирным шрифтом):

...VALNTLVNGTNPNGSTVEERGLTNSI...

Для удаления участка нуклеотидной последовательности, кодирующей петлю, мы воспользовались методом перекрывающейся амплификации (overlap PCR) [11]. Схема амплификаций представлена на рис. 2. Для амплификации фрагмента I в качестве 5'-концевого праймера применялся праймер № 4005 и в качестве 3'-концевого праймера – LD-Rev-праймер. В результате амплификации был получен фрагмент длиной 129 п.о. Для амплификации фрагмента II в качестве 5'-концевого праймера использовался праймер LD-For и в качестве 3'-концевого – праймер № 3990. В результате был получен фрагмент длиной 328 п.о. Полученные фрагменты I и II перекрываются на 15 нуклеотидов, что позволило рекомбинировать их путем перекрывающейся амплификации с праймерами № 4005 и № 3990. В этих праймерах были генерированы точечные мутации для создания сайтов рестрикции *Nco*I и *Bam*HI (соответственно). В результате был получен фрагмент длиной 442 п.о., который затем был проклонирован в вектор рЕТ-19b по этим сайтам.

Рекомбинантные белки были получены в клетках *E. coli*, штамм BL21(DE3) [12]. Последовательности ДНК, кодирующие мутантные фибритины, были проверены путем секвенирования. Анализ продуктов экспрессии показал, что все белки присутствуют в растворимой фракции клеточного экстракта, что свидетельствует об их правильном фолдинге и тримеризации [5, 7]. Все белки, кроме S1, очищали с помощью высаливания сульфатом аммония и последующей хроматографии на гидроксиапатите, как описано в работе [7]. Фибритин S1 был очищен хроматографией на гидроксиапатите непосредственно из растворимой фракции клеточного экстракта.

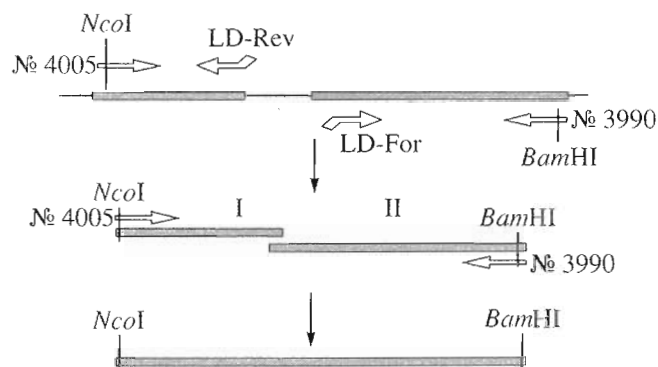


Рис. 2. Схема получения фрагмента ДНК, кодирующего фибритин S1. 5'-Концевые фрагменты праймеров LD-Rev и LD-For комплементарны друг другу. В результате полученные амплификаты I и II перекрываются на 15 нуклеотидов. Праймеры № 4005 и № 3990 содержат замены для получения соответствующих сайтов рестрикции.

Для изучения термостабильности препараты белков (концентрация 1–3 мг/мл) прогревали в течение 10 мин при разных температурах и после добавления SDS до конечной концентрации 2% подвергали анализу электрофорезом в SDS-ПААГ при комнатной температуре. Мы предположили, что термоденатурация будет происходить в узком интервале температур (кооперативно), и что до достижения этого интервала белок будет сохранять тримерность в присутствии SDS. Мы выяснили, что устойчивость фибритинов к нагреванию зависит от размера полипептидной цепи, и по этому критерию их можно разбить на три группы.

1) Фибритин G и полноразмерный фибритин проявили аномальное поведение. При анализе в денатурирующем геле без предварительного прогревания они дают главную полосу с кажущейся массой около 100 кДа, минорную полосу с кажущейся массой свыше 200 кДа и набор еще более слабых полос между ними (рис. 3, дорожки 1 и 8). Оба белка устойчивы к прогреванию при температуре до 55°C (рис. 3, дорожки 2–5 и 9–12). При предварительном прогреве при 60°C электрофоретическая картина резко меняется: по меньшей мере треть белка оказывается в виде мономера, остальная часть присутствует в виде формы с кажущейся массой свыше 200 кДа (рис. 3, дорожки 6 и 13). Мы считаем, что полоса с кажущейся массой около 100 кДа соответствует компактному тримерному белку, а образование высокомолекулярной (свыше 200 кДа) формы связано с денатурацией *N*-концевой части фибритина.

2) Белки второй группы – фибритины В и С – показали более высокую устойчивость, чем полноразмерный фибритин и фибритин G. Даже после прогрева при 60°C фибритины В и С присутствуют, по данным SDS-электрофореза, в виде гомогенных тримеров с кажущимися массами

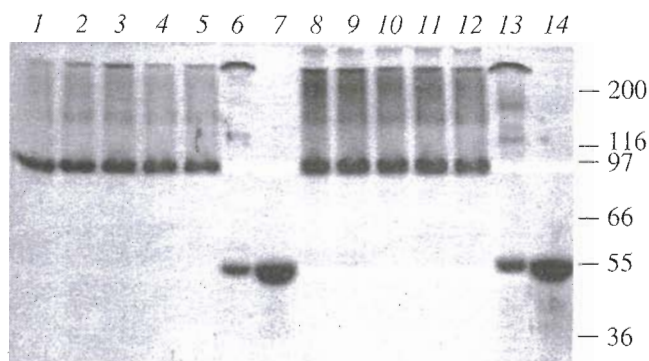


Рис. 3. Анализ электрофорезом в 8% ПААГ с 2% SDS термоденатурации фибритина G (1–7) и полноразмерного фибритина (8–14). Нативные белки – 1, 8; белки, прогретые 10 мин: при 40 (2, 9), 45 (3, 10), 50 (4, 11), 55 (5, 12), 60°C (6, 13); денатурированные белки – 7, 14. Справа указано положение маркеров молекулярных масс.

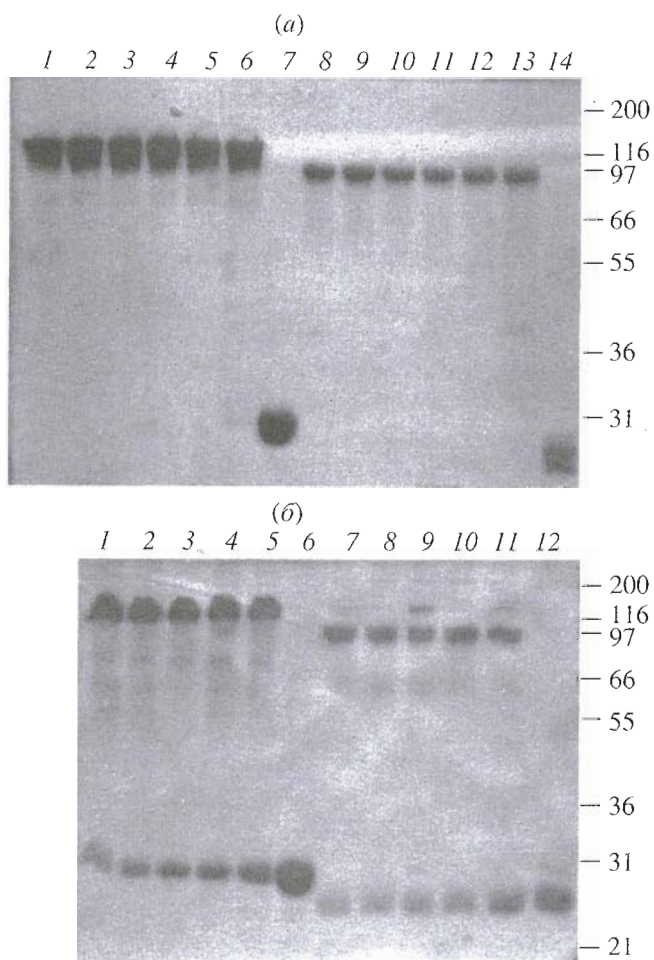


Рис. 4. Анализ электрофорезом в 12% ПААГ с 2% SDS термоденатурации фибритинов В (1–7 (а) и 1–6 (б)) и С (8–14 (а) и 7–12 (б)). Нативные белки – 1, 8 (а); белки, прогретые 10 мин (а): при 40 (2, 9), 45 (3, 10), 50 (4, 11), 55 (5, 12), 60°C (6, 13); (б): при 70 (1, 7), 75 (2, 8), 80 (3, 9), 85 (4, 10), 90°C (5, 11); денатурированные кипячением белки – 7, 14 (а) и 6, 12 (б). Справа указано положение маркеров молекулярных масс.

120–150 и около 100 кДа, соответственно (рис. 4а, дорожки 1–6 и 8–13). При дальнейшем повышении температуры прогрева происходит постепенная диссоциация на мономеры, но даже при 90-градусном прогреве не менее половины белка остается в виде тримера (рис. 4б, дорожки 5 и 11).

3) Третью группу составляют фибритины Е и S1. Результаты их плавления представлены на рис. 5. Видно, что при 45°C фибритин Е существует в виде тримера и мономера в примерно равном соотношении (дорожка 3), т.е. его точка плавления соответствует примерно этой температуре. В то же время фибритин S1 при 45°C полностью является тримером (дорожка 8), а при 50°C полностью мономером (дорожка 9), что позволяет отнести его точку плавления к 47–48°C. Этот небольшой сдвиг температуры плавления по сравнению с мутантом Е может быть объяснен тем, что в фибритине S1 восстанавливается протяженный суперспиральный сегмент, содержащий 8 полных гептад. Однако в целом стабильность мутантов Е и S1 существенно снижена по сравнению с другими фибритинами, по-видимому, из-за укорочения суперспиральной части.

Препараты первой и второй групп фибритинов были прогреты при 40°C и 50°C непосредственно в буфере, содержащем 2% SDS (рис. 6). При таких условиях полноразмерный фибритин и фибритин G уже при 40°C дают 2 полосы – слабую полосу мономера и основную высокомолекулярную полосу (дорожки 2 и 5). При повышении температуры прогрева до 50°C менялось только соотношение интенсивностей полос и большая часть белка оказывалась в мономерной фракции (дорожки 3 и 6). Фибритины В и С при 40°C на 80–90% сохраняли тримерность (дорожки 8 и 11), а при 50°C почти полностью диссоциировали на мономеры (дорожки 9 и 12). Таким образом, при прогреве в присутствии 2% SDS диссоциация белков на мономеры происходит при более низких температурах, в то же время добавление детергента непосредственно после прогревания препарата, как было показано в первой серии опытов, приводит к стабилизации либо мономерной, либо тримерной форм белка, либо частично денатурированных тримеров.

Обнаруженная устойчивость тримерных молекул к денатурирующим воздействиям и характер поведения полноразмерного фибритина при электрофорезе в денатурирующем ПААГ могут быть удобными при идентификации интермедиатов фолдинга фибритина *in vivo*.

В процессе выполнения данной работы мы обнаружили, что фибритин и ряд его делеционных мутантов, денатурированные в присутствии 2% SDS при 100°C и затем хранившиеся в течение ночи при –20°C, имеют подвижность в денатурирующем ПААГ без прогревания, соответствующую

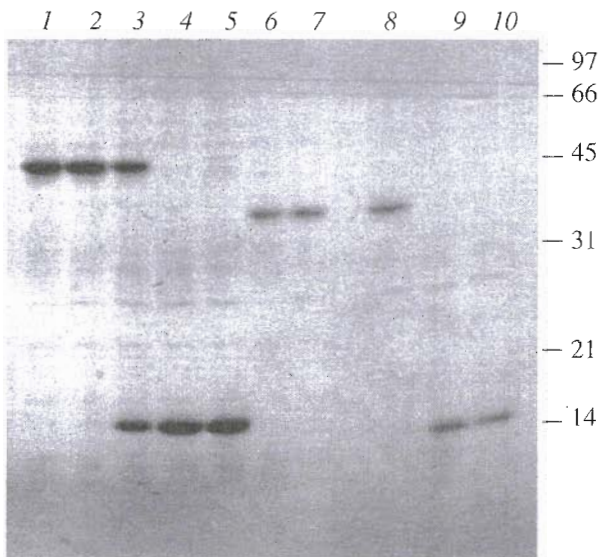


Рис. 5. Анализ электрофорезом в 15% ПААГ с 2% SDS термоденатурации фибритинов E (1–5) и S1 (6–10). Нативные белки – 1, 6; белки, прогретые 10 мин при 40 (2, 7), 45 (3, 8), 50°C (4, 9); денатурированные кипячением белки – 5, 10. Справа указано положение маркеров молекулярных масс.

тримерному белку. Это наблюдение указывает, что фибритин способен к рефолдингу в присутствии SDS. Данный феномен наблюдается как для препаратов очищенных белков, так и для клеточных экстрактов. На рис. 7 представлены результаты рефолдинга очищенного фибритина В. Белок после денатурации в SDS-содержащем буфере для электрофореза при 100°C собирается в тример только при инкубации при –20°C в течение ночи (дорожка 2), в то время как образцы,



Рис. 6. Денатурация intactного фибритина (1–3) и фибритинов G (4–6), B (7–9) и C (9–12) в присутствии 2% SDS. 1, 4, 7, 10 – нативные белки; белки, прогретые при 40 (2, 5, 8, 11) и 50°C (3, 6, 9, 12). Электрофорез выполняли в 10% ПААГ с 2% SDS.

выдержанные 2 сут при комнатной температуре (18°C) или ночь при 4°C, не образуют стабильных тримеров. Глицерин, присутствующий в буфере для образцов при электрофорезе в ПААГ, не оказывает влияния на низкотемпературный рефолдинг фибритина (данные не представлены).

Явление низкотемпературного рефолдинга фибритина можно объяснить как кинетическими, так и термодинамическими причинами. При понижении температуры энергия стабилизации, соответствующая гидрофобным взаимодействиям, уменьшается [13]. Это верно как для формирования гидрофобных областей в структуре белка, так и для взаимодействия гидрофобных боковых цепей аминокислотных остатков с SDS, которое стабилизирует денатурированное состояние полипептидной цепи. Это значит, что понижение температуры приводит, вероятно, к относительной дестабилизации денатурированного мономера, точнее, комплекса денатурированного мономера с SDS (по сравнению с обычными условиями). Это может иметь два следствия:

1) скорость рефолдинга возрастает при –20°C по сравнению с более высокими температурами, так как снижается энергия активации процесса, которая представляет собой разницу между свободной энергией денатурированного белка и свободной энергией переходного состояния, находящегося на вершине потенциального барьера. В пользу этой гипотезы свидетельствуют данные о том, что нативный белок не денатурирует при добавлении SDS, а также что денатурированный белок в этих же условиях не ренатурирует. Это позволяет предположить высокую энергию активации для этих процессов. При снижении температуры уменьшается энергия активации, т.е. возрастает скорость реакции рефолдинга;



Рис. 7. Рефолдинг денатурированного при 100°C фибритина В в присутствии SDS при температуре 4 (1), –20 (2) и 18°C (3); 4 – неденатурированный белок. Электрофорез выполняли в 10% ПААГ с 2% SDS.

2) взаимодействие детергента с белком при низких температурах уменьшается. Кроме того, снижается растворимость SDS. При этих условиях, возможно, термодинамически более устойчивое состояние отвечает денатурированному белку.

В любом случае, процесс низкотемпературного рефолдинга должен происходить за сравнительно короткое время (несколько минут) от понижения температуры раствора ниже нуля до замерзания (и/или в течение времени размораживания, т.к. при комнатной температуре в присутствии SDS рефолдинг не осуществляется) – пока вещество находится в жидкой фазе. По данным В.П. Ефимова и соавторов, время рефолдинга полноразмерного фибритина при 25°C составляет около 30 мин при концентрации белка 0.1 мг/мл [7]. При снижении температуры до 0°C скорость реакции должна снижаться на 1–2 порядка (правило Вант-Гоффа [14]). С другой стороны, в наших экспериментах концентрация фибритина была примерно на порядок больше (около 1 мг/мл). Если рассматривать процесс рефолдинга фибритина как бимолекулярную реакцию, т.е. лимитирующей стадией считать взаимодействие двух мономеров, которые затем присоединяют третью полипептидную цепь, то увеличение концентрации с 0.1 до 1 мг/мл должно привести к возрастанию скорости реакции в 100 раз, т.е. это приблизительно и соответствует минутному интервалу, в течение которого происходят процессы замораживания и оттаивания.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Полимеразную цепную реакцию проводили в автоматическом амплификаторе Dry Block PHC-1 ("Techne", Cambridge). При выполнении стандартной амплификации реакционная смесь содержала (в объеме 100 мкл): матрица (около 1 нг), приблизительно по 50 пмоль каждого праймера, 10 мкл 10-кратного буфера фирмы "Promega", dNTP (200 мкМ каждый), 2–5 ед. акт. *Taq*-полимеразы фирмы "Promega". В качестве матрицы была использована плаزمиды pZWR, взятая из коллекции нашей лаборатории. Плазмиды представляет собой вектор pTZ-19R, в который по сайтам *HindIII* и *EcoRI* был проклонирован фрагмент генома бактериофага T4, включающий часть гена 12, ген *wac* и большую часть гена 13. При проведении перекрывающейся амплификации вместо матрицы брали по 2.5 пмоль каждого из двух рекомбинируемых фрагментов. Последовательности праймеров приведены ниже (5' → 3'); жирным шрифтом изображены мутации, введенные для создания сайтов рестрикции (подчеркнуты):

№ 4005 cgagtttctaccatggaact

LD-Rev tccgcgtactaaagtatttaacgctac

LD-For acttttagtacgcgattaaccaattca

№ 3990 aattggaatcccctaactct

Во всех случаях реакцию начинали со стадии предварительной денатурации – 97°C, 3 мин, затем следовал собственно термоцикл: 94°C, 1 мин; $T_{отж}$, 1 мин; 72°C, 1 мин (30 циклов). Температуры отжига праймеров ($T_{отж}$) были следующими: при амплификации фрагмента I – 45°C, при амплификации фрагмента II – 42°C, при перекрывающейся амплификации – 45°C. Продукты амплификации анализировали в 1% агарозном геле.

Клонирование ДНК выполняли по стандартным методикам, описанным в руководстве Манитиса и соавт. [15]

Экспрессию и очистку рекомбинантных белков (фибритина дикого типа, фибритинов G, B, C и E) выполняли как в работе [7]. Для очистки фибритина S1 осадок с 0.1 л культуры клеток суспендировали в 3 мл буфера TE (10 мМ Трис-HCl, pH 8, 1 мМ EDTA), озвучивали и центрифугировали при 12000 об/мин. Супернатант наносили на колонку с 6 мл гидроксиапатита (Bio-Rad), уравновешенного 10 мМ натрий-фосфатным буфером, pH 7.6 и элюировали этим же буфером. Собирали фракции по 1 мл и анализировали их электрофорезом в 15% ПААГ.

Электрофорез белков выполняли в ПААГ в присутствии 2% SDS по стандартной процедуре, описанной Лэммли [16], включающей прогревание при 100°C в течение 3 мин. Часть экспериментов была выполнена в частично денатурирующих условиях, т.е. образцы перед нанесением на гель не прогревали.

Проверка термостабильности. Раствор белка (15 мкл) прогревали при требуемой температуре 10 мин, добавляли 15 мкл двукратного буфера для образцов (0.125 М Трис-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% (по объему) глицерин, 10% (по объему) 2-меркаптоэтанол, 0.01% (весовой) бромфеноловый синий) и наносили на гель. В других экспериментах белок сначала смешивали с буфером для образцов, а потом прогревали 10 мин при требуемой температуре.

Рефолдинг. Образцы белка смешивали с буфером для образцов, денатурировали 3–5 мин в кипящей воде и инкубировали при –20, 4 или 18°C в течение соответственно 16, 16 и 48 ч.

Авторы благодарят К.А. Мирошникову за ценные советы по очистке белков и Г.А. Наврузбекова за предоставление очищенного препарата фибритина дикого типа. Выполненная работа была поддержана грантом № 75196-551401 Howard Hughes Medical Institute "Structure, Folding and Assembly of Viral Proteins", грантом РФФИ № 96-04-48035 "Регуляция фолдинга и олигомеризации фибриллярных белков в клетке" и грантом Совета по белковой инженерии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dewey H., Wiberg J.S., Frankel F.R. // J. Mol. Biol. 1974. V. 84. P. 625–634.
2. Follansbee S.E., Vanderslice R.W., Chavez L.G., Ye-gian C.D. // Virology. 1974. V. 58. P. 180–199.
3. Selivanov N.A., Prilipov A.G., Efimov V.P., Maru-sich E.I., Mesyanzhinov V.V. // Biomedical Sciences. 1990. V. 1. P. 55–62.
4. Prilipov A.G., Selivanov N.A., Nikolaeva L.I., Mesyan-zhinov V.V. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. P. 10361.
5. Sobolev B.N., Shneider M.M., Marusich E.I., Mesyan-zhinov V.V. // Evolutionary Biochemistry and Related Areas of Physicochemical Biology / Eds B.F. Poglazov, B.I. Kurganov, M.S. Kritsky, K.L. Gladilin. Bakh Insti-tute of Biochemistry and ANKO, 1995. P. 351–374.
6. Sobolev B.N., Mesyanzhinov V.V. // J. Biom. Str. Dy-namics. 1991. V. 8. P. 953–965.
7. Efimov V.P., Nepluev I.V., Sobolev B.N., Zurabish-vili T.G., Schulthess T., Lustig A., Engel J., Haeper M., Aebi U., Venyaminov S.Y., Potekhin S.A., Mesyanzhi-nov V.V. // J. Mol. Biol. 1994. V. 242. P. 470–486.
8. Tao Y., Strelkov S.V., Mesyanzhinov V.V., Ross-mann M.G. // Structure. 1997. V. 5. P. 789–798.
9. Strelkov S.V., Tao Y., Shneider M.M., Mesyanzhi-nov V.V., Rossmann M.G. // Acta Crystallographica D. 1998. V. 54. P. 805–816.
10. Николаева Л.И., Манькин А.А., Клименко С.М., Прилипов А.Г., Месянжинов В.В. // Молекулярная биология. 1987. Т. 21. С. 1268–1275.
11. Horton R.M., Pease L.R. // Directed Mutagenesis / Eds M.J. McPherson. Oxford University Press, 1991. P. 217–247.
12. Studier F.W., Moffatt B.A. // J. Mol. Biol. 1986. V. 189. P. 113–130.
13. Попов Е.М., Демин В.В., Шибанова Е.Д. Проблема белка. Т. 2. Пространственное строение белка. М.: Наука, 1996. С. 237–243.
14. Еремин Е.Н. Основы химической кинетики. М.: Высшая школа, 1976. С. 83.
15. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Clon-ing: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
16. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.

The Thermal Stability of Fibrin from Bacteriophage T4 and Its Truncated Mutants

Yu. Ya. Londer* and V. V. Mesyanzhinov***

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

**Bakh Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 33, Moscow, 117071 Russia

The thermal stability of a series of recently obtained mutants of fibrin from bacteriophage T4 (a superhelical fibrous homotrimer with parallel-packed subunits each containing 486 amino acid residues) progressively truncated from the subunit *N*-end was studied during incubation at 40–90°C in the presence of a surfactant (2% SDS). The mutant fibrinins, G, B, C, and E, contained 443, 276, 231, and 120 amino acid residues, respectively. One more truncated mutant (fibrin S1, 108 amino acid residues) was obtained. The 2% SDS-PAGE showed that the migration mobilities of all these proteins corresponded to apparent molecular masses substantially greater than those of the preliminarily heated samples (3 min at 100°C). The heating of the intact fibrin and the mutant G at 50–70°C for 10 min resulted in the formation of a form with an apparent molecular mass higher than 200 kDa. This form probably represented a trimeric protein with a partly denatured *N*-terminal part. Fibrinins B and C were more stable and were only partly denatured into monomers even at 70–90°C. The short mutants E and S1 dissociated into monomers at temperatures from 45 to 50°C. The denaturation of mutants B, C, E, and S1 proceeded in one stage without formation of any intermediate form. The stability of the trimeric molecules of native fibrin under PAGE denaturing conditions and the behavior of the intact protein during heating in the temperature range of 50–70°C might be used for the identification of fibrin intermediate forms upon folding *in vivo*. The refolding capability was found for fibrin and its mutants denatured by heating at low temperatures in the presence of 2% SDS.

Key words: bacteriophage T4, denaturation, fibrin, protein engineering, refolding, superhelical proteins, thermal stability

To whom correspondence should be addressed; phone/fax: +7 (095) 336-6022; e-mail: vvm@ibch.siobc.ras.ru.