



УДК 577.112.012.6

## МОНОМЕРНАЯ ФОРМА МОЛЕКУЛЯРНОГО ШАПЕРОНА GroEL: СТРУКТУРА, СТАБИЛЬНОСТЬ И ОЛИГОМЕРИЗАЦИЯ

© 1999 г. А. К. Сурин, Н. В. Котова, С. Ю. Марченкова, В. В. Марченков, Г. В. Семисотнов<sup>#</sup>

Институт белка РАН, 142292, Пущино Московской обл.

Поступила в редакцию 08.09.98 г. Принята к печати 27.10.98 г.

Исследованы структура и стабильность в растворе мономерной формы молекулярного шаперона GroEL с использованием методов кругового дихроизма, связывания гидрофобного зонда, ограниченного протеолиза, модификации SH-групп, седиментации и гель-фильтрации. Показано, что при 23°C мономерная форма GroEL является глобулярным белком с выраженной вторичной и жесткой третичной структурами, и в отсутствие адениловых нуклеотидов не проявляет заметной тенденции к олигомеризации. Вместе с тем, стабильность мономерной формы GroEL по отношению к мочевины и тепловому воздействию существенно ниже, чем стабильность субъединиц в составе нативной олигомерной частицы. Отличие от олигомерной формы проявляется также и в способности к связыванию гидрофобного зонда, которая для мономерной формы на порядок выше, чем для олигомерной частицы. Исследован, иницируемый АТР, процесс формирования олигомерной частицы как из “нативной”, так и из полностью развернутой мономерных форм. Показано, что скорость этого процесса одинакова для обеих мономерных форм и, следовательно, лимитируется не стадией спонтанного сворачивания мономерной формы, а АТР-зависимой “подстройкой” участков, ответственных за специфическую олигомеризацию свернутых мономеров.

*Ключевые слова:* молекулярные шапероны; GroEL; стабильность; сборка олигомерной структуры.

Олигомерный белок GroEL из *Escherichia coli* относится к семейству белков теплового шока (hsp 60) и назван молекулярным шапероном благодаря способности связывать различные белковые цепи, находящиеся в ненативной конформации, облегчая достижение ими “правильной” (нативной) структуры [1–5]. Из данных электронной микроскопии [6] и рентгеноструктурного анализа [7, 8] следует, что GroEL-частица состоит из 14 идентичных субъединиц с молекулярной массой 57 кДа каждая. Субъединицы объединены в две кольцевые структуры по 7 субъединиц каждая, формирующие цилиндр с внутренней полостью диаметром 45 Å [7], на поверхности которой находятся участки связывания ненативных белковых молекул [6, 9]. GroEL-субъединица имеет три четко выраженных домена: экваториальный, промежуточный и апикальный [7, 8]. Экваториальный домен обеспечивает наибольшее число межсубъединичных контактов и связывание адениловых нуклеотидов (АТР и АДР) [7–9]. Промежуточный домен, по-видимому, осуществляет роль шарнира при аллостерической перестройке структуры GroEL в процессе его функционирования как молекулярного шаперона [8]. Апикальный домен обеспечивает связывание ненативных белковых молекул и белкового кошаперона GroES [6, 9–11], который представляет собой олигомерный белок, состоящий из семи идентичных субъединиц с молекулярной мас-

сой 10 кДа каждая [12, 13]. Небольшое количество межсубъединичных контактов в GroEL дает основание предполагать высокую конформационную “пластичность” его олигомерной структуры в растворе [7, 8].

Сложность олигомерной структуры GroEL (как и других GroEL-подобных шаперонов [1, 3, 4]) часто связывают с необходимостью существования в ней внутренней полости, в которой, как предполагается, другие белки приобретают “правильно” свернутую (нативную) конформацию [3, 4]. Однако вопрос о том, зачем необходима такого рода олигомерная организация GroEL-частицы, еще далек от своего решения. Достаточно указать, что другие шапероны, осуществляющие сходную функцию, такие как DnaK (hsp 70), не имеют сложной олигомерной структуры [1, 5]. Представляет интерес и сам процесс формирования таких сложных олигомерных структур как у GroEL-частицы.

Одним из подходов к решению этих вопросов может быть исследование структурных и функциональных свойств свернутой мономерной формы GroEL в растворе, а также процесса ее специфической олигомеризации (формирования GroEL-частицы). Показана возможность получения мономерной формы GroEL с помощью гель-фильтрации в неденатурирующих условиях белка, предварительно развернутого в присутствии 5 М мочевины [14], и с помощью ионообменной хроматографии олигомерной GroEL-частицы, дестабилизированной присутствием АТР, т.е. без использования денатурантов [15]. Одним из свойств

<sup>#</sup> Автор для переписки (факс: (095) 924-04-93; e-mail: nina@vega.protnes.ru).

Структурные характеристики мономерной и олигомерной форм GroEL

Структурные характеристики	Мономерная форма**			Олигомерная форма
	1	2	3	
Содержание элементов вторичной структуры (%):*				
α-спиральная составляющая	50	49	–	58
β-структурная составляющая	23	22	–	31
неупорядоченная составляющая	27	28	–	11
Молекулярная масса (кДа) методом:				
равновесного центрифугирования	–	55	57	–
гель-фильтрации	60	60	–	850
Число мест связывания гидрофобного зонда 8-анилин-1-нафталинсульфокислоты (на субъединицу)	3	–	–	0.3
Число доступных модификации реагентом Элмана свободных SH-групп (на субъединицу)	1	–	3	1
Доступность ограниченному протеолизу	нет	нет	да	нет

\* Данные получены из разложения спектров дальнего КД по методу Провенчера [22].

\*\* Мономерная форма получена: 1 – гель-фильтрацией в неденатурирующих условиях развернутой в присутствии 5 М мочевины GroEL-частицы [14]; 2 – ионообменной хроматографией олигомерной GroEL-частицы в присутствии АТФ [15] и 3 – денатурацией GroEL-частицы в присутствии 5 М мочевины.

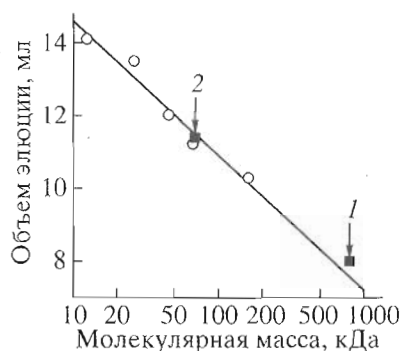
мономерной формы GroEL является ее более низкая термостабильность по сравнению с субъединицами в составе олигомерной частицы [14, 16]. При температуре ниже 10°C мономерная форма GroEL подвергается “холодовой” денатурации, проявляющейся в уменьшении содержания вторичной структуры [14] и увеличении гидродинамического объема [16]. В отношении функциональной активности мономерной формы GroEL существуют противоречивые данные. В ряде работ отмечалось, что мономерная форма GroEL не взаимодействует с белками в нативной конформации и не может “помогать” их сворачиванию [15, 17, 18]. С другой стороны, имеются данные, свидетельствующие о том, что GroEL в мономерной форме способен связывать АТФ [16] и что даже фрагменты GroEL-субъединицы могут “промотировать” сворачивание других белков [10, 19, 20].

Настоящая работа посвящена исследованию основных структурных характеристик и стабильности свернутой мономерной формы GroEL, полученной как в денатурирующих условиях, так и без использования денатурантов. Показано, что мономерная форма GroEL, полученная разными способами, обладает идентичными структурными характеристиками, является глобулярной и характеризуется выраженной вторичной структурой и жесткой упаковкой. Однако ее стабильность по отношению к действию мочевины и повышенной температуры значительно ниже, чем в составе олигомерной частицы. Был исследован процесс олигомеризации как из полностью развернутой в присутствии 5 М мочевины мономерной формы, так и из свернутой мономерной формы. Показано, что характерное время процесса специфической олигомеризации не зависит от конформации исходной мономерной формы и, по-видимому, определяется АТФ-зависимой “подстройкой” свернутой мономерной формы.

СТРУКТУРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МОНОМЕРНОЙ ФОРМЫ GroEL

GroEL в мономерной форме был получен двумя способами: 1) в денатурирующих условиях (5 М мочевины) с последующей гель-фильтрацией на колонке с Superose 12, уравновешенной неденатурирующим буфером [14], и 2) в неденатурирующих условиях (рН 9.0) путем дестабилизации олигомерной структуры связыванием АТФ в присутствии ионообменной смолы [15]. Условия, предложенные авторами работы [15], не приводили в нашем случае к хорошему выходу мономерной формы. Однако при изменении рН буферной системы с 7.5 до 9.0 (при этом GroEL сохраняет свою нативную олигомерную структуру [21]) выход мономерной формы с ионообменника (Mono-Q) резко увеличивался и составлял около 30%. Ряд структурных параметров мономерной формы, полученной разными методами (см. также “Эксперимент. часть”), хорошо совпадали (таблица), что свидетельствует о полной обратимости процесса разворачивания мономерной формы GroEL.

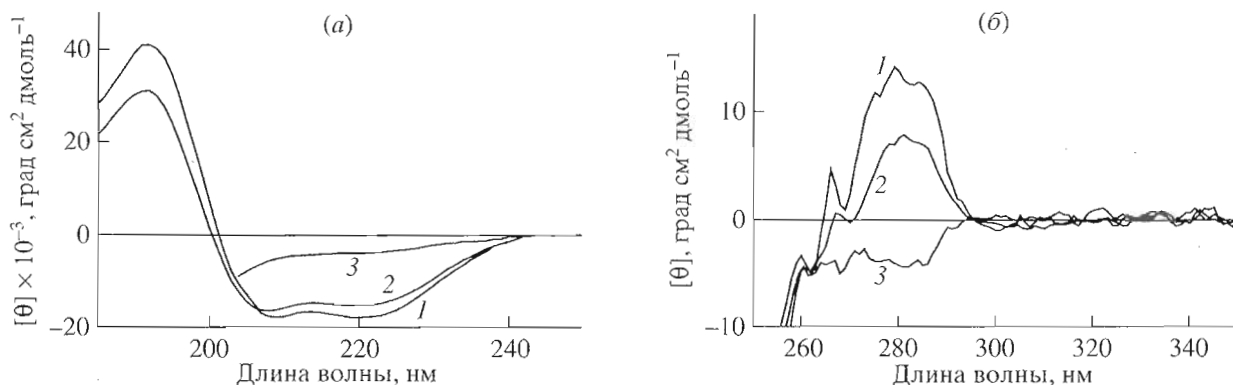
Глобулярность и молекулярная масса полученной мономерной формы GroEL оценивались методом гель-фильтрации на колонке с Superose 12, откалиброванной глобулярными белками (рис. 1), и методом равновесной седиментации (таблица). Из рис. 1 видно, что мономерная форма GroEL элюируется с колонки в объеме, соответствующем молекулярной массе 60 кДа, в то время как хроматографическая подвижность олигомерной формы GroEL соответствует молекулярной массе 850 кДа. Данные по равновесной седиментации подтверждают значение молекулярной массы мономерной формы GroEL (таблица). Таким образом, “свернутая” мономерная форма GroEL по своим гидродинамическим размерам соответствует глобулярным белкам такой же молекулярной массы.



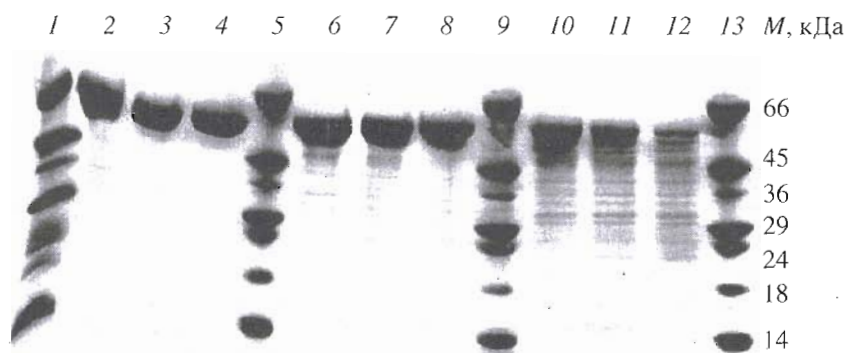
**Рис. 1.** Зависимость объема элюции маркерных глобулярных белков от их молекулярной массы при гель-фильтрации на колонке Superose 12 HR 10/30, скорость подачи буфера 0.5 мл/мин. Стрелками показаны объемы элюции пиков олигомерной (1) и мономерной (2) форм GroEL. Регистрация по поглощению при длине волны 280 нм.

Из представленных на рис. 2 спектров кругового дихроизма (КД) видно, что в области поглощения пептидных связей спектр КД мономерной формы GroEL несколько меньше по амплитуде

спектра олигомерной формы [14]. Разложение спектров на  $\alpha$ -спиральные,  $\beta$ -структурные и неупорядоченные составляющие, проведенное по методу Провенчера [22] (таблица), показывает, что содержание  $\alpha$ -спиральной и  $\beta$ -структурной составляющих в спектре КД мономерной формы на 16–17% меньше, чем в случае олигомерной частицы GroEL. Таким образом, часть элементов вторичной структуры субъединицы GroEL стабилизируется межсубъединичными контактами при специфической олигомеризации мономерной формы. Спектр КД мономерной формы в области поглощения ароматических групп, хотя и заметно меньше по амплитуде соответствующего спектра для олигомерной частицы, по форме близок к нему и сильно отличается от спектра GroEL в полностью развернутой конформации (рис. 2б). Это свидетельствует о том, что ароматические остатки в мономерной форме GroEL имеют достаточно плотное окружение, жесткость которого, по-видимому, еще больше увеличивается при специфической олигомеризации.



**Рис. 2.** Спектры КД в области поглощения пептидных связей (а) и в области поглощения ароматических групп (б) олигомерной (1), "нативной" мономерной (2) и развернутой в присутствии 5 М мочевины мономерной (3) форм GroEL. Концентрация белка 0.3 мг/мл и 1 мг/мл для (а) и (б) соответственно.



**Рис. 3.** Электрофоретический анализ продуктов ограниченного трипсинолиза олигомерной (2, 3, 4), свернутой мономерной (6, 7, 8) и развернутой в присутствии 5 М мочевины мономерной (10, 11, 12) форм GroEL. Отношение молярных концентраций трипсина и субъединиц GroEL составляло 1 : 50. Время инкубации с трипсином в случае олигомерной и свернутой мономерной форм составляло 1 (2, 6), 5 (3, 7) и 10 мин (4, 8), а в случае развернутой мономерной формы – 0.5 (10), 1 (11) и 2 мин (12). 1, 5, 9, 13 – стандарты молекулярных масс.

Из рис. 3 видно, что в то время как развернутая форма GroEL быстро деградирует под действием трипсина, свернутая мономерная и олигомерная формы практически не подвергаются протеолизу в течение 10 мин инкубации с трипсином. Степень флукуационной лабильности мономерной формы GroEL оценивалась также по доступности модификации тиоловыми реагентами свободных SH-групп белка. Из приведенных в таблице данных видно, что в развернутой мономерной форме GroEL все три свободные SH-группы белка доступны модификации реагентом Элмана. Однако в нативных мономерной и олигомерной формах модификации доступна лишь одна SH-группа (т.е. находится на поверхности), в то время как остальные две не подвергаются модификации, по-видимому, вследствие их погруженности в белковую глобулу.

Приведенные выше данные позволяют считать, что мономерная форма GroEL представляет собой глобулярный белок с выраженной вторичной и жесткой третичной структурами. Можно предположить, что укладка полипептидной цепи белка в мономерной форме не сильно отличается от ее организации в составе олигомерной частицы. Действительно, схожие по форме спектры КД в области поглощения ароматических групп белка, близкие значения содержания элементов вторичной структуры и одинаковая доступность SH-групп белка модификации дают основания для такого предположения. Вместе с тем, существенное отличие мономерной и олигомерной форм GroEL проявляется в степени экспонированности гидрофобных кластеров белка, которая в мономерной форме существенно выше, чем в олигомерной. Результаты исследования связывания гидрофобного зонда 8-анилин-1-нафталинсульфокислоты (ANS) мономерной и олигомерной формами GroEL показывают (рис. 4), что мономерная форма GroEL связывает 3 молекулы ANS, в то время как сродство к ANS субъединицы в составе олигомерного комплекса на порядок ниже (таблица, см. также [24]). Можно предположить, что часть экспонированных гидрофобных кластеров мономерной формы участвует в формировании межсубъединичных контактов олигомерной частицы либо в результате специфической олигомеризации происходят конформационные изменения, в результате которых уменьшается доступность гидрофобных кластеров субъединиц растворителю.

#### СТАБИЛЬНОСТЬ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ МОНОМЕРНОЙ ФОРМЫ GroEL

Для анализа стабильности мономерной и олигомерной форм GroEL мы исследовали денатурационные переходы белка, вызванные действием повышенной температуры и мочевины. Кривые температурного плавления мономерной и олигомерной форм, зарегистрированные по изменению

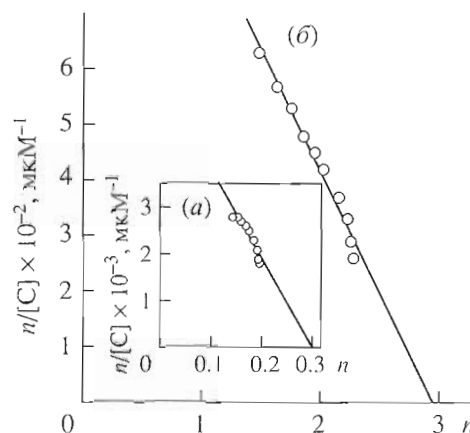


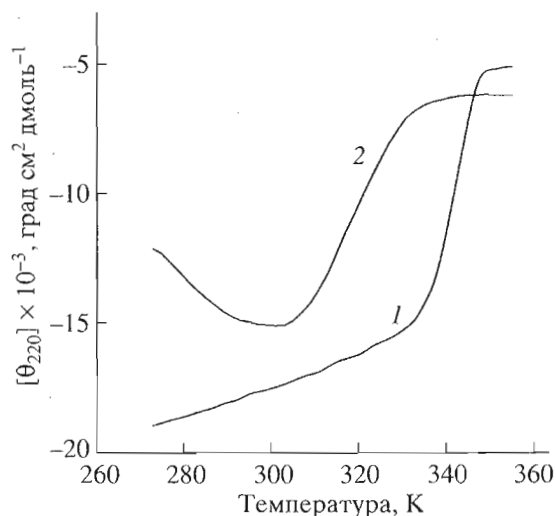
Рис. 4. Графики Скетчарда [23] связывания ANS олигомерной (а) и свернутой мономерной (б) формами GroEL. Графики Скетчарда рассчитаны из данных прямого и обратного титрования (не показано).  $n$  – число связанных молекул ANS в расчете на субъединицу,  $[C]$  – концентрация свободного ANS.

амплитуды спектра КД при длине волны 220 нм (т.е. по уменьшению содержания элементов вторичной структуры), показывают (рис. 5), что точка полуперехода для мономерной формы соответствует 46, в то время как для олигомерной – 70°C. Плавление мономерной формы хотя и имеет кооперативный (S-образный) характер, но происходит в более широком интервале температур, чем плавление олигомерной формы GroEL. Кроме того, для мономерной формы наблюдается характерное явление холодной денатурации при температуре ниже 10°C [14, 16].

Денатурация под действием мочевины, представленная на рис. 6, дает картину, аналогичную температурному плавлению. Денатурационный переход для мономерной формы GroEL характеризуется точкой полуперехода при концентрации мочевины 2.3 М и осуществляется в пределах концентрации от 1 до 3 М, в то время как денатурация олигомерной формы является более кооперативным процессом и происходит в концентрационных пределах мочевины от 2.5 до 3.5 М с точкой полуперехода 2.9 М. Все это свидетельствует о существенно меньшей стабильности структурной организации мономерной формы GroEL по сравнению с олигомерной частицей. Возможно, что повышенная доступность растворителю гидрофобных кластеров белка в мономерной форме является причиной снижения ее стабильности к изменениям внешних условий.

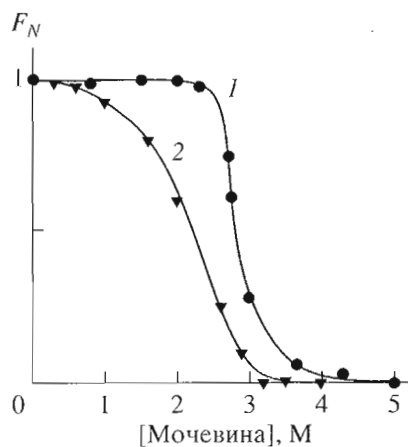
#### СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ОЛИГОМЕРИЗАЦИЯ МОНОМЕРНОЙ ФОРМЫ GroEL

В отсутствие АТФ мономерная форма GroEL не имеет заметной тенденции к олигомеризации. Добавление 5 мМ АТФ инициирует специфическую олигомеризацию мономерной формы [14, 15].



**Рис. 5.** Кривые температурного плавления, зарегистрированные по изменению эллиптичности при длине волны 220 нм олигомерной (1) и свернутой мономерной (2) форм GroEL. Концентрация белков 0.3 мг/мл. Уменьшение эллиптичности мономерной формы при температуре ниже 10°C отражает известное [14] явление ее холодной денатурации.

Кинетику этого процесса удобно регистрировать по увеличению интенсивности светорассеяния, которая для олигомерной формы на порядок выше, чем для мономерной (рис. 7а, см. также [21]). На рис. 7б представлены кинетические кривые восстановления интенсивности светорассеяния в процессе олигомеризации мономерных форм GroEL в присутствии 5 мМ АТФ. Кинетика олигомеризации, инициированной как из “нативной” (свернутой) (кривая 1), так и из развернутой мономерной формы (кривая 2), имеет сходный характер с одинаковым временем полупревращения около 20 мин. Таким образом, можно заключить, что скорость специфической олигомеризации GroEL не зависит от исходной конформации его мономерной формы и определяется, по-видимому, “медленными” АТФ-зависимыми конформационными изменениями свернутых субъединиц. К сожалению, контроль процесса олигомеризации по изменению других структурных параметров (например, с помощью спектров КД) в настоящее время не представляется возможным ввиду незначительности этих изменений (см. рис. 2) и необходимости использования высоких концентраций белка. Повышение концентрации белка от 0.1 до 0.5 мг/мл приводит к резкому увеличению неспецифической ассоциации в процессе перевода развернутой в присутствии 5 М мочевины мономерной формы в неденатурирующие условия, а в случае инициации олигомеризации из свернутой мономерной формы – к двухкратному увеличению скорости олигомеризации. Однако образование олигомерной формы GroEL контролировалось с помощью высокоэффективной гель-фильтрации по увеличению



**Рис. 6.** Разворачивание мочевиной олигомерной (1) и свернутой мономерной (2) форм GroEL, зарегистрированное по уменьшению амплитуды спектра КД при длине волны 220 нм. Параметр  $F_N$  соответствует доле нативных молекул и определяется формулой  $F_N = (f - f_u) / (f_n - f_u)$ , где  $f$  – текущее значение  $[\theta]_{220}$ ,  $f_u$  и  $f_n$  – значения  $[\theta]_{220}$  для полностью развернутого и нативного состояний соответственно. Концентрация белка – 0.3 мг/мл.

пика элюции, соответствующего олигомерной частице GroEL (см. “Эксперимент. часть”). Из рис. 7б видно, что при использованных условиях полного восстановления интенсивности светорассеяния, характерного для исходно олигомерной частицы (рис. 7а, кривая 1), не происходит. Высокоэффективная гель-фильтрация белка по окончании реакции олигомеризации регистрирует наличие около 50% олигомерной формы в случае инициации процесса из свернутой конформации, а в случае инициации процесса олигомеризации из полностью развернутой конформации помимо глобулярных мономерных и специфически олигомеризованных молекул регистрируются и неспецифические ассоциаты (~20%) с широким молекулярно-весовым распределением (данные не представлены). Неспецифическая ассоциация происходит значительно быстрее специфической олигомеризации, что приводит к увеличению интенсивности светорассеяния за мертвое время эксперимента (рис. 7б). Следует отметить, что в отсутствие АТФ заметного роста интенсивности светорассеяния мономерной формы не происходит (рис. 7б, кривая 3).

Представленные в работе экспериментальные данные свидетельствуют о том, что мономерная форма GroEL в неденатурирующих условиях и при температуре 15–25°C имеет структурные характеристики обычного глобулярного белка, хотя и отличается по некоторым параметрам от субъединиц в составе олигомерной частицы. Во-первых, мономерная форма обладает повышенной экспонированностью в растворитель гидрофобных кластеров белка [24], часть которых, по-видимому, участвует в формировании межсубъеди-

ничных контактов олигомерной GroEL-частицы. Во-вторых, мономерная форма характеризуется несколько меньшим (на 16–17%) содержанием элементов вторичной структуры. По-видимому, элементы вторичной структуры, неустойчивые в мономерной форме, стабилизируются в процессе АТР-зависимой олигомеризации. В-третьих, мономерная форма характеризуется меньшей стабильностью к действию повышенной температуры и мочевины по сравнению с олигомерной формой. Особый интерес представляет участие АТР в инициации процесса олигомеризации мономерной формы GroEL. Хотя механизм этого действия остается загадкой, приведенные в работе данные по АТР-зависимой инициации процесса олигомеризации мономерной формы GroEL, находящейся в различных конформационных состояниях, свидетельствуют о том, что олигомеризация лимитируется не сворачиванием самой мономерной формы, а, по-видимому, контролируется АТР-зависимыми конформационными изменениями уже свернутой субъединицы.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

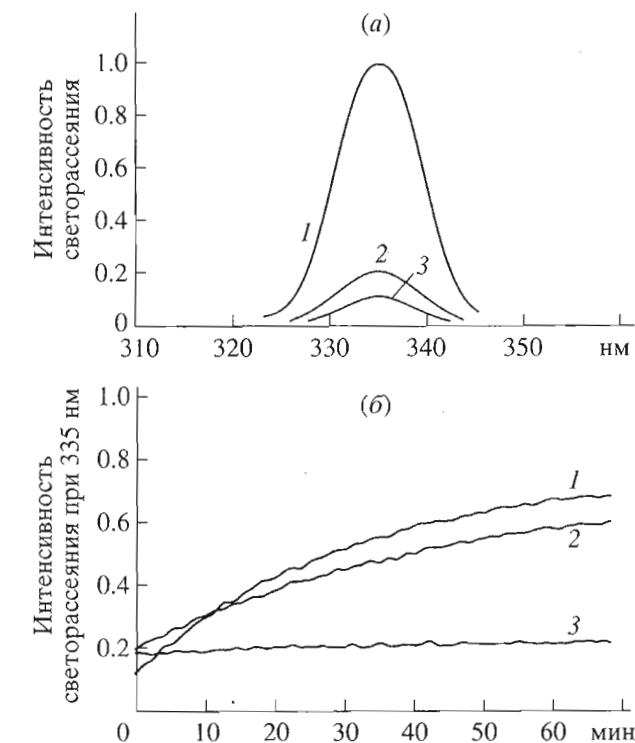
GroEL выделяли из клеток *E. coli* HB101, трансформированных мультикопийной плазмидой rGroE4 (полный groE-оперон *E. coli*, клонированный по *EcoRI*-сайту вектора pACYC184) [14]. Чистоту препарата определяли электрофорезом в полиакриламидном геле [25].

Все реактивы имели квалификацию ос. ч. или х. ч. В качестве буфера использовали раствор, содержащий 50 мМ Трис-НСl, 100 мМ КСl и 10 мМ Mg(АсО)<sub>2</sub> (рН 7.5–9.0). Концентрацию мочевины (“Биохим”, Россия) определяли рефрактометрически с использованием рефрактометра ИРФ-454Б (Россия). Значение рН контролировали с помощью цифрового рН-метра (Radelkis, Венгрия).

**Выделение мономерной формы GroEL** осуществляли двумя способами. Первый заключался в разрушении олигомерной структуры белка разворачиванием в присутствии 5 М мочевины с последующим переводом белка в неденатурирующие условия путем гель-фильтрации на Superose 12 [14]. Выход мономерной формы составлял в этом случае около 60%. Неспецифические ассоциаты, которые неизбежно образовывались при таком методе, удаляли рехроматографией.

Второй способ, исключающий денатурирующие условия, был предложен в работе [15]. Его суть заключалась в АТР-индуцированной дестабилизации олигомерной структуры GroEL, которая затем частично разрушалась при ионообменной хроматографии. Выход мономерной формы в этом случае достигал 30%. Отделение от олигомерной формы осуществлялось гель-фильтрацией на Superose 12.

**Молекулярную массу определяли** методами гель-фильтрации на Superose 12 (система FPLC-500, Pharmacia, Швеция) и равновесного центрифугирования (аналитическая центрифуга УЦА-10, Россия).



**Рис. 7.** Спектры светорассеяния при длине волны 335 нм (а) олигомерной (1), свернутой мономерной (2) и развернутой в присутствии 5 М мочевины мономерной (3) форм GroEL. Кинетика олигомеризации (б), инициируемая 5 мМ АТР, из свернутой (1) и развернутой в присутствии 5 М мочевины (2) мономерных форм GroEL. 3 – Зависимость интенсивности светорассеяния от времени при инициации процесса ренатурации полностью развернутой формы в отсутствие АТР. Концентрация белка – 0,1 мг/мл.

гирования (аналитическая центрифуга УЦА-10, Россия).

**Концентрацию белков** измеряли спектрофотометрически с помощью спектрофотометра Shimadzu UV-1601 (Япония) с использованием удельного коэффициента поглощения  $A_{276.5\text{nm}}^{0.1\%}$ , равного 0.25 для олигомерной частицы и 0.21 для мономерной формы [14].

**Модификацию SH-групп** проводили реагентом Элмана (5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота)) [26].

**Высокоэффективную гель-фильтрацию** проводили с помощью системы HPLC Shimadzu LC-10 (Япония) с использованием колонки TSK-2000SW.

**Круговой дихроизм** измеряли на спектрополяриметре Jasco-600 (Япония). Длина оптического пути при записи спектров в дальнем и ближнем ультрафиолете составляла 0.185 и 10 мм соответственно.

**Рассеяние света и флуоресценцию** измеряли с помощью спектрофлуориметра Aminco SPF-1000CS (США) под углом 90° к падающему свету. Рассеяние света регистрировали на длине волны

335 нм при ширине щелей 10 нм. Сродство белка к гидрофобному зонду 8-анилин-1-нафталинсульфонокислоте (ANS) (Sigma, США) определяли по увеличению интенсивности флуоресценции при длине волны 480 нм (возбуждение облучением при длине волны 370 нм), используя прямое и обратное титрования [27]. Титрование проводили в флуоресцентной кварцевой кювете объемом 2 см<sup>3</sup> с учетом разбавления. Число мест связывания ANS в расчете на субъединицу оценивалось с использованием метода Скетчарда [23]. Все измерения проводили при 23°C.

Авторы благодарят К.С. Василенко за помощь в измерении кругового дихроизма. Работа была поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (гранты № 94-04-12050-а и № 97-04-48614) и Международным научным фондом ISF (грант MUL 300 от 29.03.1995).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ellis R.J., van der Vies S.M. // *Annu. Rev. Biochem.* 1991. V. 60. P. 321–347.
2. Vitanen P.V., Gatenby A.A., Lorimer G.H. // *Protein Sci.* 1992. V. 1. P. 363–369.
3. Craig E.A. // *Science.* 1993. V. 260. P. 1902–1903.
4. Fenton W.A., Horwich A.L. // *Protein Sci.* 1997. V. 6. P. 743–760.
5. Bukau B., Horwich A. // *Cell.* 1998. V. 92. P. 351–366.
6. Chen Sh., Roseman A.M., Hunter A.S., Wood S.P., Burston S.G., Ranson N.A., Clarke A.G., Saibil H.R. // *Nature.* 1994. V. 371. P. 261–264.
7. Braig K., Otwinowski Z., Hegde R., Boisvert D.C., Joachimiak A., Horwich A.L., Sigler P.B. // *Nature.* 1994. V. 371. P. 578–586.
8. Braig K., Adams P.D., Brunger A.T. // *Nature Struct. Biol.* 1995. V. 2. P. 1083–1094.
9. Fenton W.A., Kashi Y., Furtak K., Horwich A.L. // *Nature.* 1994. V. 371. P. 614–619.
10. Zahn R., Buckle A.M., Perrett S., Jonson Ch.M., Corrales F.J., Golbik R., Fersht A.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. P. 15024–15029.
11. Xu Z., Horwich A.L., Sigler P.B. // *Nature.* 1997. V. 388. P. 741–750.
12. Craig E.A., Gross C.A. // *Biochem. Sci.* 1991. V. 16. P. 135–140.
13. Hunt J.F., Weaver A.J., Landry S.J., Gierasch L., Deisenhofer J. // *Nature.* 1996. V. 379. P. 37–45.
14. Lissin N.M., Venyaminov S.Yu., Girshovich A.S. // *Nature.* 1990. V. 348. P. 339–342.
15. Ybarra J., Horowitz P.M. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 22962–22967.
16. Lissin N.M., Hemmingsen S.M. // *FEBS Lett.* 1993. V. 324. P. 41–49.
17. White Z.W., Fisher K.E., Eisenstein E. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 20404–20409.
18. Mendoza J.A., Demeler B., Horowitz P.M. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 2447–2451.
19. Makino Y., Taguchi H., Yoshida M. // *FEBS Lett.* 1993. V. 336. P. 363–367.
20. Taguchi H., Makino Y., Yoshida M. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 8529–8534.
21. Сурин А.К., Котова Н.В., Марченкова С.Ю., Соколовский И.В., Родионова Н.А., Яклочкин С.Ю., Семисотнов Г.В. // *Биоорганическая химия.* 1997. Т. 23. С. 251–256.
22. Provencher S.W., Glockner J. // *Biochemistry.* 1981. V. 20. P. 33–37.
23. Кантор Ч., Шиммель П. *Биофизическая химия.* М.: Мир, 1985. Т. 3. С. 12–15.
24. Hayer-Hartl M.K., Ewbank J.J., Creighton T.E., Hart F.U. // *EMBO J.* 1994. V. 13. P. 3192–3202.
25. Laemmli U.K. // *Nature (London).* 1970. V. 227. P. 680–685.
26. Ellman G.L. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1959. V. 82. P. 70–77.
27. 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.

## The Monomeric Form of the Molecular Chaperone GroEL: Structure, Stability, and Oligomerization

A. K. Surin, N. V. Kotova, S. Yu. Marchenkova, V. V. Marchenkov, and G. V. Semisotnov<sup>#</sup>

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

The structure and stability in solution of the monomeric form of GroEL were studied by the methods of circular dichroism, binding of a hydrophobic probe, limited proteolysis, modification of thiol groups, sedimentation, and size-exclusion chromatography. The monomeric GroEL at 23°C was shown to be a globular protein with a pronounced secondary and a rigid tertiary structure. It exhibited no marked tendency to oligomerization in the absence of adenine nucleotides. However, the free monomeric GroEL was substantially less stable to urea and heat than the corresponding subunit in the composition of native oligomeric particles. The monomeric form also bound the hydrophobic probe, 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid, by an order of magnitude better than the subunit in the oligomeric particles. The ATP-induced oligomerization process of both folded and unfolded GroEL monomers was studied. The oligomerization rate was found to be the same for both monomers, and, therefore, should be limited by the ATP-dependent "arrangement" of the sites in the folded monomers responsible for the oligomerization rather than by the spontaneous refolding of monomers.

*Key words:* GroEL, stability, oligomeric structure assembling; molecular chaperones

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; fax: +7 (095) 924-0493; e-mail: nina@vega.protres.ru.