

ВЛИЯНИЕ ШАПЕРОНИНА, КОДИРУЕМОГО ГЕНОМ 146, НА ТЕПЛОВУЮ АГРЕГАЦИЮ ЛИТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ БАКТЕРИОФАГА EL *P. aeruginosa**

© 2015 П.И. Семенюк^{1**}, В.Н. Орлов¹, Л.П. Курочкина^{1,2}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
119991 Москва; факс: +7(495)939-3181,
электронная почта: psetenyuk@belozersky.msu.ru,
orlovvn@belozersky.msu.ru

² Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва; факс: +7(495)336-6022,
электронная почта: lpk@ibch.ru

Поступила в редакцию 17.06.14
После доработки 17.09.14

Продолжено изучение ранее охарактеризованного нами шаперонина, кодируемого геном 146 бактериофага EL *Pseudomonas aeruginosa*. Для выяснения механизма его функционирования были получены и охарактеризованы новые рекомбинантные белки-субстраты – фрагменты продукта гена (пг) 183, содержащие лизоцимный домен; исследовано их взаимодействие с пг 146. С помощью динамического светорассеяния исследовано влияние фагового шаперонина на тепловую агрегацию одного из фрагментов пг183 и эндолизина (пг188) как в присутствии, так и в отсутствие АТФ. Показано, что в отсутствие АТФ фаговый шаперонин образует стабильные комплексы с белками-субстратами, тем самым защищая их от тепловой агрегации. Проведен сравнительный анализ экспериментальных данных, полученных на разных белках-субстратах.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фаговый шаперонин, бактериофаг EL, эндолизин, агрегация белка.

Шаперонины – белки-помощники, осуществляющие сворачивание только что синтезированных полипептидных цепей в функционально активную структуру за счет энергии гидролиза АТФ и подавляющие агрегацию денатурированных в условиях теплового шока белков. Представители этого класса шаперонов были найдены как у бактерий (шаперонины группы I, в том числе наиболее изученный GroEL), так и у архей и эукариот (шаперонины группы II), а также в эндосимбионтных органеллах (группа I) [1, 2]. Вирусы же (например, бактериофаги λ, T4 и RB49), как считалось до недавнего времени, используют для сворачивания некоторых своих белков шаперонин GroEL клетки-хозяина. В отличие от фага λ, использующего бактериальную систему GroEL/GroES [3], фаги T4 [4] и RB49 [5]

кодируют собственные кошаперонины – ортологи GroES, которые функционируют в паре с «хозяйским» GroEL.

Однако оказалось, что и вирусы бактерий также могут кодировать GroEL-подобные белки [6–9]. Ранее мы впервые получили и охарактеризовали один из представителей этой группы белков – продукт гена (пг) 146 бактериофага EL *P. aeruginosa* [10]. С помощью различных физико-химических методов нами был изучен рекомбинантный белок, продуцированный клетками *E. coli*. Установлено, что по своей архитектуре этот белок похож на бактериальный шаперонин GroEL: он состоит из двух колец, содержащих по семь субъединиц, и имеет внутреннюю полость. Используя сыворотку на пг146, методом иммунопреципитации из инфицированных фагом клеток были выделены его комплексы с белками-субстратами и с помощью масс-спектрометрии идентифицирован один из них – пг188 (эндолизин). В опытах *in vitro* впервые было продемонстрировано, что пг146 выполняет функцию шаперонина: он защищает эндолизин от термической инактивации и подавляет агрегацию развернутых под воздействи-

Принятые сокращения: ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия; ДСР – динамическое светорассеяние; ИТК – изотермическая титрационная калориметрия; пг – продукт гена; а.о. – аминокислотные остатки.

* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, BM 14-173, 25.01.2015.

** Адресат для корреспонденции.

ем температуры молекул субстрата. Установлено, что фаговый шаперонин может функционировать как АТФ-зависимым, так и АТФ-независимым способом [10].

Для дальнейшего исследования фагового шаперонина и выяснения механизма его функционирования в качестве потенциального субстрата был выбран другой белок фага EL. Известно, что для проникновения в клетку грамотрицательной бактерии *P. aeruginosa*, а также выхода из нее вновь синтезированных фаговых частиц литический бактериофаг EL использует целый комплекс ферментов с различной субстратной специфичностью. Один из них — ранее охарактеризованный нами эндолизин (пг188) — участвует в клеточном лизисе в конце репликационного цикла фага и необходим для разрушения наиболее труднопреодолимой преграды — пептидогликанового слоя. Другой белок, выполняющий подобную функцию — пг183, содержит лизоцимный домен и ответственен за локальную деградацию пептидогликана при инфицировании фагом бактериальной клетки в начале репликационного цикла EL [6]. Аминокислотные последовательности литических доменов пг188 и пг183 сходства не имеют.

В данной работе были получены и охарактеризованы фрагменты пг183, содержащие лизоцимный домен, и изучено их взаимодействие с фаговым шаперонином. С целью выяснения механизма функционирования шаперонина было проведено сравнительное исследование влияния пг146 на тепловую агрегацию фрагмента пг183 и эндолизина (пг188) как в отсутствие, так и в присутствии АТФ.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клонирование и экспрессия фрагментов гена 183. Фрагменты ДНК гена 183, кодирующие делеционные варианты пг183-1 и пг183-2, амплифицировали с геномной ДНК фага EL с помощью ПЦР, используя обратный праймер: 5'-taa gat ctc gag att caa acg gac ggt ttt atc gg-3' (подчеркнут сайт рестрикции *Xho* I) и прямые праймеры: 5'-aaa ttt cat atg gga cgg tcg gat aaa gtt gac-3' и 5'-aaa ttt cat atg tcg gac acc agt cat ttg gat-3' (подчеркнуты сайты рестрикции *FauND* I), соответственно. Фрагменты гена 183 клонировали в вектор pET-28b(+) («Novagene», США) по *FauND* I/*Xho* I и экспрессировали в BL21(DE3) *E. coli*. Трансформанты наращивали в среде 2 × TY, содержащей 1%-ную глюкозу и канамицин (50 мкг/мл), до $A_{600} = 0,6$ (при 37°), после чего осаждали центрифугированием при 2500 g (Megafuge 2.0 R; «Heraeus Instruments», Германия) в течение 10 мин. Осад-

ки ресуспендировали в свежей среде с антибиотиком, затем добавляли изопропил-1-тио-β-D-галактозид («Хеликон», Россия) до концентрации 1 mM и инкубировали 3 ч при 37°. Клетки осаждали центрифугированием при 2500 g 10 мин.

Очистка рекомбинантных фрагментов пг183. Осадки клеток ресуспендировали в 50 mM Tris-HCl-буфере, pH 8,0, обрабатывали ультразвуком в течение 3–5 мин (по 0,5 мин с перерывом 1–2 мин) с помощью дезинтегратора Virsonic 100 («Virtis», США) и центрифугировали при 12 000 g («Eppendorf», Германия) в течение 10 мин для удаления клеточного дебриса. Рекомбинантные белки, содержащие полигистидиновую последовательность на N-конце молекулы, были очищены с помощью металлохелатной хроматографии (His-Select nickel affinity gel, «Sigma», США). Очищенные белки диализовали против 50 mM Tris-HCl-буфера, pH 8,0, и концентрировали центрифугированием на фильтрах Amicon Ultra-15 (MWCO 30000) («Millipore», США). Концентрацию рекомбинантных белков определяли спектрофотометрически при 280 нм, используя теоретически рассчитанные коэффициенты экстинкции 32 320 и 23 840 M⁻¹ cm⁻¹ для пг183-1 и пг183-2 соответственно.

Определение ферментативной активности белка. Ферментативную активность фрагментов пг183 определяли, как описано ранее [11], используя в качестве субстрата суспензию клеток РАО 1 *P. aeruginosa* с проницаемой внешней мембраной, полученных в результате обработки хлороформом.

Получение и анализ комплекса пг146 с пг188. Рекомбинантные пг146 и пг188 получали как описано ранее [10]. Смесь пг146 (1,5 мкМ) и пг188 (3 мкМ) инкубировали в 50 mM Tris-HCl-буфере, pH 7,5, содержащем 100 mM KCl и 10 mM MgCl₂, при 45° в течение 1,5 ч. Образцы после центрифугирования (12 000 g, 10 мин) смешивали с 4-кратным буфером для образцов и наносили на градиентный ПААГ (3–6%). Белки разделяли в нативных условиях, используя в качестве буфера 80 mM Mops, pH 7,2, с 1 mM ацетата магния. Иммуноблоттинг проводили как описано ранее [12]. Комплексы антиген–антитело окрашивали 0,02%-ным 3,3'-диаминобензидином («Sigma», США).

Динамическое светорассеяние (ДСР). Кинетику тепловой агрегации белков изучали с помощью измерения динамического светорассеяния с использованием прибора ZetaSizer NanoZS («Malvern», Великобритания). Концентрация белка-субстрата во всех экспериментах составляла 3 мкМ. Концентрацию шаперонина варьировали для достижения молярных соотношений субстрат/шаперонин, равных 1 : 0,05, 1 : 0,2 и 1 : 0,5. Суммарное время накопления автокорреляци-

онной функции, затраченное на получение каждой точки кривой, составляло 150 с. Экспериментальные кривые были сглажены с использованием быстрого фильтра Фурье в пакете MicroCal Origin 7.0.

Для моделирования процесса агрегации субстратов были рассмотрены два различных механизма: диффузионно-ограниченный и реакционно-ограниченный. Рост гидродинамического диаметра агрегатов в первом случае описывался уравнением:

$$D_h = D_{h,0} (1 + K_1 t)^{1/d_f},$$

где $D_{h,0}$ – диаметр стартовых агрегатов, K_1 – кажущаяся константа агрегации, d_f – фрактальная размерность, равная для белковых систем 1,8 [13, 14], во втором – $D_h = D_{h,0} \exp(K_2(t - t_0))$ [15, 16].

Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК). Эксперименты проводили с использованием микрокалориметра ДАСМ-4 («Био-прибор», Россия) с капиллярными платиновыми ячейками, скорость прогрева составляла 1°/мин. В качестве приборной базовой линии использовали повторный прогрев образца в силу необратимости денатурации белков. Обработку данных, в том числе вычитание химической базовой линии, проводили в программе Arina 2, разработанной в НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ. Эксперименты проводили в 50 мМ Tris-HCl-буфере, pH 8,0, содержащем 100 мМ KCl и 10 мМ MgCl₂. Концентрация индивидуальных белков в растворе составляла 0,5 мг/мл. При изучении взаимодействия пг146 с субстратом концентрацию шаперонина увеличивали до 1 мг/мл.

Изотермическая титрационная калориметрия (ИТК). Взаимодействие шаперонина с денатурированной формой субстрата было изучено с использованием изотермического титрационного микрокалориметра VP-ITC («MicroCal», США). Для этого раствор пг146 титровали раствором пг183-1 в 50 мМ Tris-HCl-буфере, pH 8,0, содержащем 100 мМ KCl и 10 мМ MgCl₂, при 37°. Исходные концентрации белков составляли 0,5 мг/мл, объем инъекций – 20 мкл, интервал между ними – 5 мин. Растворы исходных белков предварительно дегазировали. Для описания результатов титрования применяли модель «набор одинаковых центров связывания», используя программу MicroCal Origin 7.0.

АТФазная активность пг146 была определена по количеству выделенного при гидролизе АТФ неорганического фосфата (P_i) с использованием колориметрического метода на основе малахитового зеленого [17]. Раствор пг146 (0,75 мкМ)

инкубировали в 50 мМ Tris-HCl-буфере, pH 7,5, содержащем 100 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂ и 1 мМ АТФ при различных температурах. Из реакционной смеси отбирали аликвоты, реакцию останавливали добавлением раствора малахитового зеленого в кислоте и через 10 мин измеряли поглощение при 630 нм на спектрофотометре Genesys 10uv («Thermo Electron Corporation», США). За единицу АТФазной активности принимали 1 наномоль выделенного P_i на 1 наномоль тетрадекамера шаперонина за 1 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение и характеристика фрагментов пг183.

Поскольку пг183 фага E1 является достаточно большим белком (2543 а.о., 280 кДа), а его литический домен локализован в C-концевой области молекулы, нами были созданы две плазмидные конструкции, позволяющие экспрессировать в клетках *E. coli* фрагменты гена 183, делетированные с 5'-конца. Фрагменты пг183 – пг183-1 (688 а.о., 72,9 кДа) и пг183-2 (581 а.о., 61,4 кДа), укороченные с N-конца полипептидной цепи на 1872 и 1979 а.о., соответственно – продуцировались клетками в растворимой форме. Рекомбинантные белки, содержащие полигистидиновую последовательность на N-конце молекулы, были очищены металлохелатной хроматографией. Оба фрагмента пг183 обладали способностью лизировать клетки РАО1 *P. aeruginosa* с проницаемой внешней мембраной, однако их ферментативная активность была на порядок ниже активности ранее охарактеризованного нами пг188 (эндолизина) [10].

С помощью ДСК установлено, что оба полученных фрагмента пг183 термолабильны по сравнению с пг188 (рис. 1). Действительно, температура максимума пика плавления пг183-1 и пг183-2 составляла 39,6 и 38,7° соответственно (рис. 1, а и б), в то время как для пг188 она была существенно выше (54,8°) [10]. Для дальнейшей работы был выбран пг183-1 из-за его более высокой энтальпии плавления, составляющей 300,7 против 99,3 кДж/моль у пг183-2. Кроме того, для основной компоненты пика плавления пг183-1 характерна более высокая кооперативность по сравнению с пиком плавления пг188, что облегчает его использование в качестве потенциального субстрата для исследования механизма работы фагового шаперонина.

Исследование комплексов шаперонина с субстратами. Ранее нами было изучено влияние пг146 на агрегацию эндолизина (пг188), и было высказано предположение, что в отсутствие

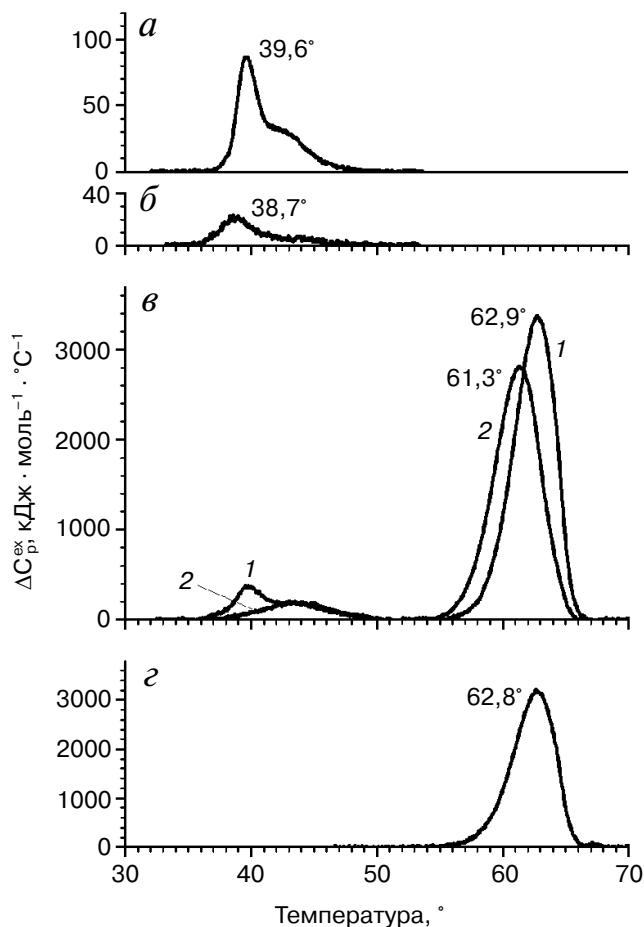


Рис. 1. Профили ДСК пг183-1 (*a*), пг183-2 (*б*) и смеси пг183-1 и пг146 (*в*) до (кривая 1) и после (кривая 2) инкубации при 39° в течение 30 мин, а также свободного пг146 (*г*). Концентрация белка – 0,5 мг/мл, термограммы на панели *г* приведены в расчете на тетрадекамер шаперонина

АТФ пг146 защищает субстрат от агрегации, образуя с ним стабильный комплекс. Образование такого комплекса было подтверждено в данной работе экспериментально. Смесь пг146 и пг188 после инкубации при 45°, а также индивидуальные белки в качестве контроля разделяли нативным электрофорезом в градиенте ПААГ (данные не представлены). После окрашивания геля Кумасси R-250 наряду с основной полосой пг146 в смеси белков была детектирована дополнительная минорная полоса с меньшей, чем у шаперонина, электрофоретической подвижностью. При этом свободный положительно заряженный пг188 мигрировал в противоположную сторону и не детектировался на геле. Полосы белков вырезали из нативного геля, инкубировали в Ds-Na-содержащем буфере для образцов и подвергали электрофорезу в денатурирующих условиях [18]. Белки после разделения де-

тектировали двумя способами: окрашивали в геле Кумасси R-250 (данные не представлены), а также переносили на нитроцеллюлозу и окрашивали сывороткой на рекомбинантный пг188. При окрашивании геля Кумасси R-250 во всех полосах был обнаружен пг146, однако в минорной полосе опытного образца его концентрация была существенно ниже, чем в основной полосе пг146. Окрашивание иммуноблота сывороткой на пг188 показало, что дополнительная минорная полоса наряду с пг146 содержит также и субстрат (рис. 2, дорожка 5), что свидетельствует о наличии комплекса пг146/пг188 в смеси белков, подвергнутой нагреванию. Основная полоса пг146 этого же образца также содержала незначительное количество пг188 (рис. 2, дорожка 4). К сожалению, при 45° денатурация пг188 и соответственно связывание денатурированного белка с шаперонином происходит медленно, что не позволило получить комплекс пг146/пг188 в больших количествах. Повышение температуры не помогло достичь желаемого результата из-за высокой склонности пг188 к агрегации и термоинактивации самого шаперонина. Поэтому для изучения взаимодействия пг146 с субстратом был выбран пг183-1, который плавится с более высокой кооперативностью и при более низкой температуре, чем пг188.

Влияние шаперонина пг146 на термоиндуцированную агрегацию пг183-1 при 38° было

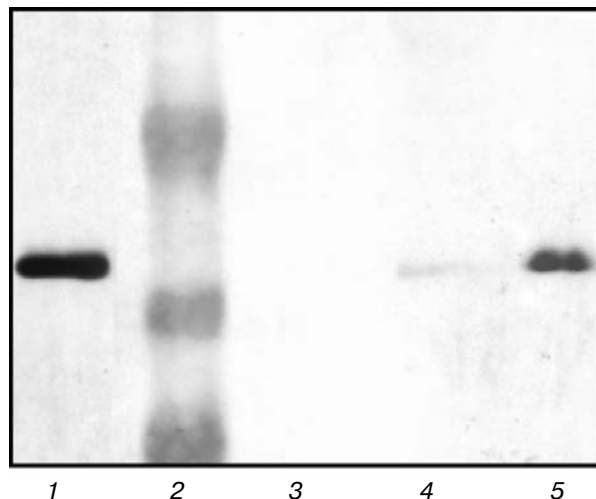


Рис. 2. Анализ полос белка из нативного геля в 10%-ном Ds-Na-ПААГ. Белковые полосы окрашивали 3,3'-диаминобензидином на нитроцеллюлозной мембране после иммуноблоттинга и инкубации с сывороткой на пг188: 1 – контрольный пг188, 2 – белки-маркеры (48, 34 и 26 кДа), 3 – контрольный пг146, 4 – пг146 из основной полосы образца, 5 – пг146 из минорной полосы образца

изучено с помощью метода ДСР (рис. 3). В свободном виде пг183-1 агрегировал достаточно быстро по сравнению с пг188 (рис. 3, *a* и *б*), образуя частицы диаметром более 600 нм за 9 мин. В присутствии пг146 скорость роста размера частиц значительно снижалась, причем степень подавления агрегации коррелировала с концентрацией шаперонина в растворе: с ростом молярного соотношения пг146/пг183-1 эффект подавления агрегации усиливался (рис. 3, *a*). По-видимому, это связано с образованием бинарного комплекса между шаперонином и частично

развернутым под воздействием температуры субстратом, как и в случае пг188 [10].

На рис. 4 представлена зависимость интенсивности светорассеяния от времени для агрегации как свободных белков-субстратов, так и их смесей, с пг146 в разных молярных соотношениях. В случае пг183-1 кривые интенсивности светорассеяния достаточно быстро выходят на плато по сравнению с кривыми для пг188, что, по-видимому, является следствием разной кинетики денатурации субстратов (рис. 4, *a* и *б*). Наблюдаемая интенсивность светорассеяния

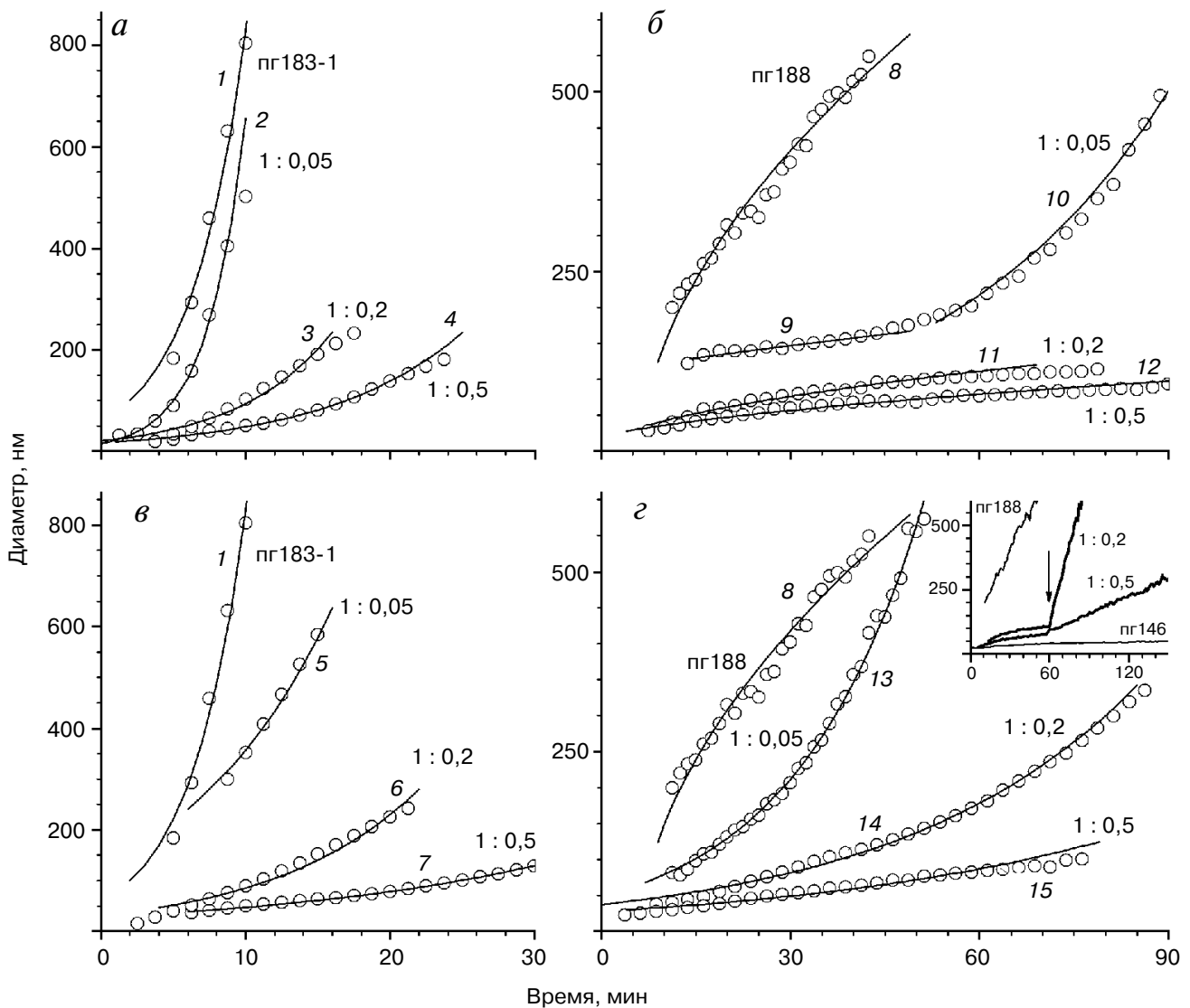


Рис. 3. Влияние пг146 на агрегацию пг183-1 при 38° (*a* и *в*) и пг188 при 45° (*б* и *г*) при разных молярных соотношениях субстрат/шаперонин в отсутствие (*a* и *в*) и в присутствии (*б* и *г*) АТФ. На вставке рис. 3, *г* показаны результаты эксперимента с добавлением АТФ к смеси пг188 и пг146, момент введения АТФ отмечен стрелкой. Кружками показаны экспериментальные данные, линиями представлены результаты оптимизации моделей агрегации. Кривые 1–7, 10 и 13–15 соответствуют реакционно-ограниченной агрегации, линии 8, 9, 11 и 12 – диффузионно-ограниченной агрегации

при высоких концентрациях пг146 оказалась выше, чем при агрегации свободных субстратов. Учитывая, что размер частиц при добавлении шаперонина рос медленнее, чем в случае свободного субстрата, можно предположить, что шаперонин так или иначе вовлечен в процесс агрегации – в противном случае при добавлении шаперонина менялась бы только кинетика агрегации, а общая картина оставалась бы прежней. Скорее всего, образующиеся комплексы шаперонина с субстратом также агрегируют – подобную картину наблюдали при взаимодействии шаперонина GroEL с глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой [19].

Образование комплекса шаперонина с пг183-1 было продемонстрировано с помощью ДСК (рис. 1, в). Действительно, если при смешении образцов пг183-1 и пг146 термограмма плавления представляла собой сумму термограмм плавления отдельных белков, то после предварительной инкубации смеси белков при 39° в течение 30 мин пик плавления шаперонина смещался на полтора градуса влево, а основной пик пг183-1 с температурой максимума 39,6° исчезал. Это свидетельствует о денатурации части субстрата и его связывании с пг146 в процессе предварительной инкубации смеси белков. В опытах по определению ферментативной активности пг183-1 было

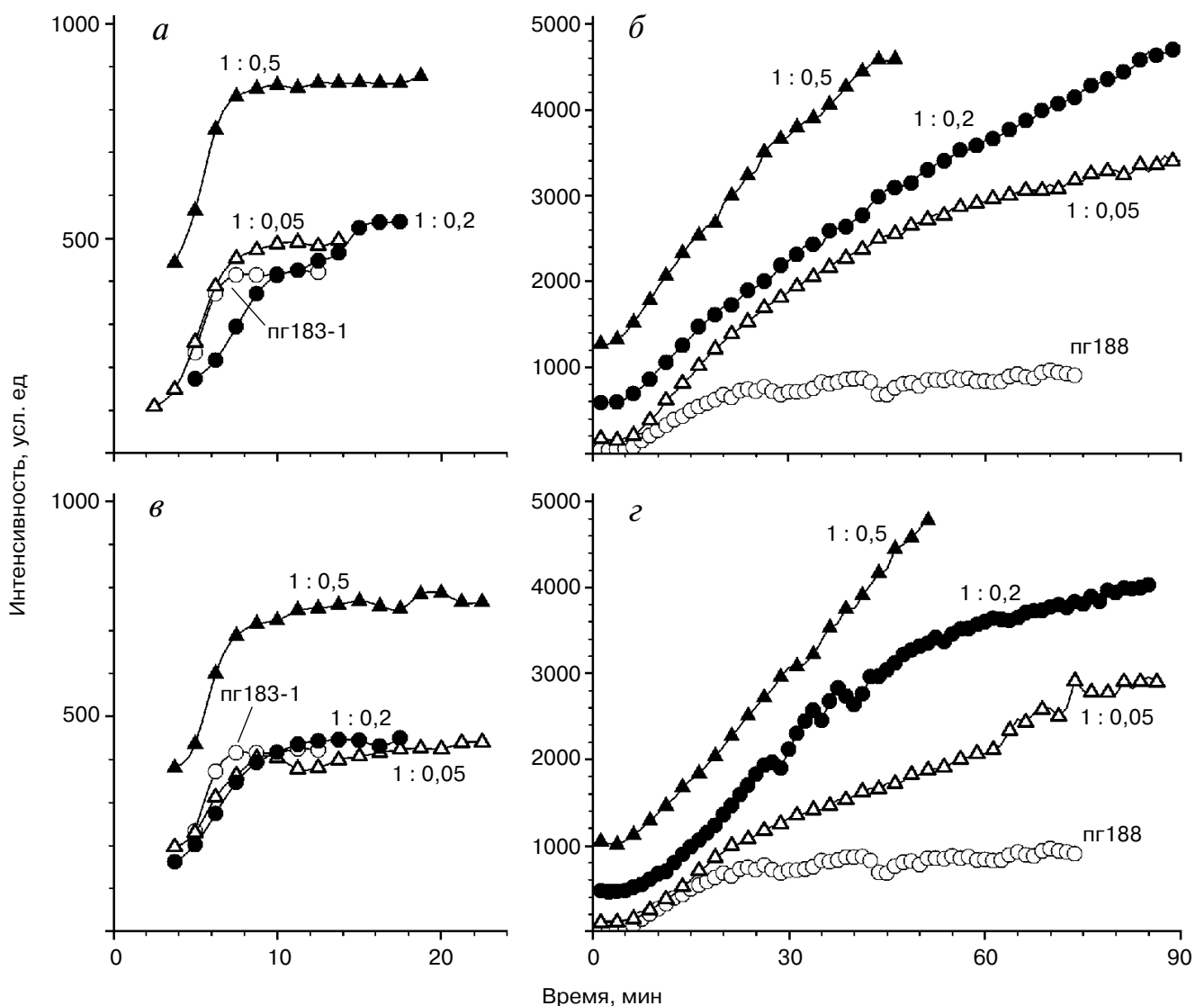


Рис. 4. Зависимость интенсивности светорассеяния от времени для агрегации пг183-1 при 38° (а и в) и пг188 при 45° (б и г) при разных молярных соотношениях субстрат/шаперонин в отсутствие (а и б) и в присутствии (в и г) АТФ

установлено, что часть субстрата при этом инактивируется. Заметим, что отсутствие основного пика субстрата на термограмме плавления означает, что и в комплексе с шаперонином пг183-1 остается в денатурированном состоянии.

Взаимодействие шаперонина с денатурированным субстратом было изучено также с помощью ИТК при 37° (рис. 5). Выбор температурного режима титрования был обусловлен результатами ДСК, согласно которым нагревание до температуры 37°, соответствующей началу пика плавления пг183-1 (рис. 1, б), инициировало денатурацию субстрата, но не влияло на структуру более термостабильного пг146 (рис. 1, г). Показано, что в 50 мМ Tris-HCl-буфере, рН 8,0, 100 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂ при 37° денатурированный пг183-1 активно связывается с шаперонином (константа ассоциации $2,4 \pm 0,5$ мкМ⁻¹) в стехиометрическом соотношении, близком к 1 : 1. По-видимому, только одно гептамерное кольцо шаперонина способно образовывать стабильный комплекс с субстратом, что хорошо согласуется с полученными ранее данными о стехиометрии взаимодействия шаперонина с нуклеотидами, которая была близка к 1 : 7 [10], и может быть связано с асимметричным механизмом работы колец шаперонина, характерным, в частности, для системы GroEL/GroES [20].

Влияние шаперонина на агрегацию субстрата в присутствии АТФ. Итак, в отсутствие АТФ шаперонин способен подавлять агрегацию денатурированных при нагревании молекул обоих субстратов за счет образования с ними стабильных комплексов, при этом белки-субстраты не сохраняют свою ферментативную активность.

Ранее нами было установлено, что фаговый шаперонин может функционировать и АТФ-зависимым способом [10]. В данной работе было показано, что фаговый шаперонин при физиологических условиях обладает АТФазной активностью. Ее величина на порядок ниже, чем для GroEL [21], но сравнима со значениями для некоторых других шаперонинов группы II [22]. АТФазная активность пг146, как и других известных шаперонинов, растет с повышением температуры. Для пг146 она достигает своего максимального значения в районе 50° (рис. 6). При дальнейшем повышении температуры активность гидролиза АТФ резко снижается вследствие термоинактивации шаперонина.

При добавлении в систему АТФ, по-видимому, запускается другой (энергозависимый) механизм функционирования фагового шаперонина. В этом случае шаперонин, скорее всего, функционирует по АТФазному циклу, приводя к образованию правильно собранных и ферментативно активных молекул субстрата. В пользу

этого предположения свидетельствуют данные опытов по определению ферментативной активности субстратов: оба исследуемых белка (пг188 и пг183-1) сохраняют свою литическую активность при повышенных температурах в присутствии пг146 только при наличии в системе АТФ.

Оказалось, что в присутствии АТФ влияние пг146 на тепловую агрегацию исследуемых субстратов принципиально различно (рис. 3, в и г). Фаговый шаперонин в системе с АТФ подавляет агрегацию пг183-1 эффективнее, чем без него, причем эта закономерность прослеживается для разных молярных соотношений пг146/пг183-1 (рис. 3, в). Совершенно иная картина наблюдалась в случае пг188 (рис. 3, г). Как было показано ранее [10], агрегация пг188 в присутствии пг146 в системе, содержащей АТФ, происходит даже быстрее, чем в отсутствие АТФ, причем характер кривых роста размера частиц был принципиально различным (рис. 3, г и б). Более того,

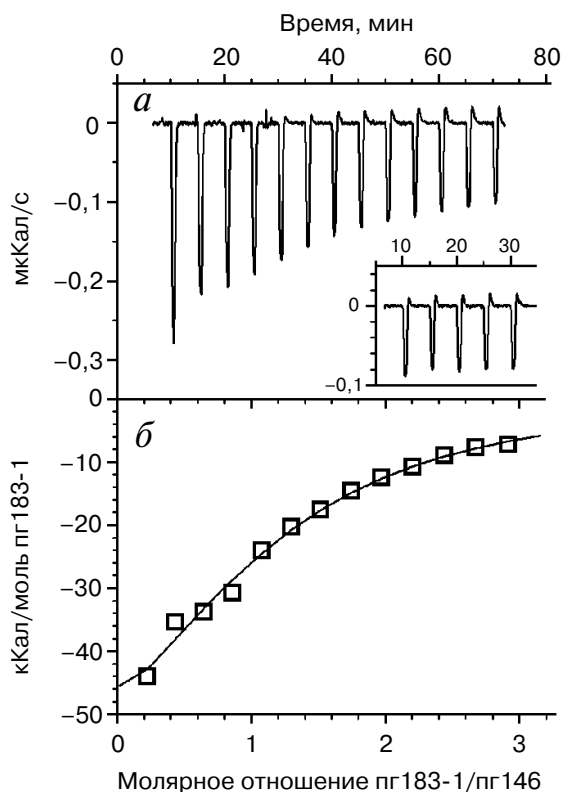


Рис. 5. Калориметрическое титрование шаперонина пг146 субстратом пг183-1 при 37°. а – Исходные данные титрования, на вставке показаны результаты титрования пг183-1 в буфер; б – зависимость тепловыделения каждой инъекции от достигнутого молярного соотношения субстрат/шаперонин (квадраты) и результат оптимизации модели «набор одинаковых сайтов связывания» (линия)

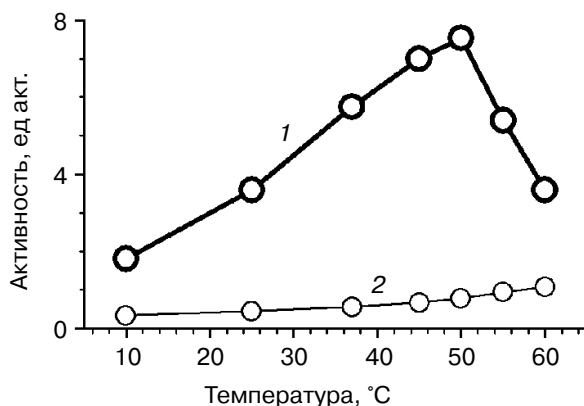


Рис. 6. Кривая 1 – зависимость АТФазной активности пг146 от температуры; кривая 2 – спонтанный гидролиз АТФ

при добавлении АТФ к комплексу пг146/пг188, полученному после часовой инкубации при 45° в отсутствие АТФ, наблюдалась резкая агрегация пг188 (вставка на рис. 3, з), чего не происходило при добавлении АТФ к комплексу пг146/пг183-1 (данные не представлены). Одним из объяснений такой разницы в поведении шаперона по отношению к двум субстратам может быть то, что пг188 и пг183-1 имеют разное сродство к пг146, а также характеризуются различной кинетикой денатурации в выбранных условиях. Действительно, при небольших количествах денатурированного субстрата (как в случае с пг188) для выраженного антиагрегационного действия шаперона достаточно даже пассивной (в отсутствие АТФ) защиты субстрата от агрегации за счет образования стабильных долгоживущих комплексов, в составе которых пг146 не способен рефолдировать денатурированный пг188 (рис. 3, б). При добавлении АТФ пг146, скорее всего, начинает работать по АТФазному циклу, осуществляя рефолдинг субстрата. Однако под воздействием температуры часть нативного субстрата вновь денатурирует, поэтому в системе постоянно присутствует некоторое количество денатурированных молекул субстрата, способных либо связываться с шапероном, либо агрегировать между собой. При относительно низком сродстве субстрата к шаперону агрегация будет преобладать над комплексообразованием, что приведет к снижению кажущейся эффективности антиагрегационного действия шаперона. Именно такая картина и наблюдается при тепловой агрегации пг188 (рис. 3, з). Напротив, при избытке денатурированного субстрата, как в случае пг183-1, пассивное (в отсутствие АТФ) подавление агрегации

шапероном оказывается не столь эффективным (рис. 3, а). Однако активное взаимодействие шаперона с денатурированной формой субстрата повышает его суммарную антиагрегационную активность в присутствии АТФ (рис. 3, в). Высокое сродство денатурированного пг183-1 к шаперону позволило продемонстрировать образование комплекса пг146/пг183-1 методами ДСК и ИТК (рис. 1, в и рис. 5), чего не удалось сделать для пг188. Причиной же более активного, по сравнению с пг188, взаимодействия пг183-1 с шапероном могут быть особенности его структуры. Поскольку фрагмент пг183 обладает литической активностью, его C-концевая область, содержащая лизоцимный домен, по видимому, имеет компактную нативную структуру. Структура же N-концевой области молекулы, вероятнее всего, плохо упорядочена из-за протяженной делеции, что облегчает денатурацию этой части белка при нагревании и, следовательно, способствует его связыванию с шапероном.

Изложенные выше предположения подтверждаются результатами математического анализа кинетики агрегации. Механизм агрегации пг188 в присутствии пг146, в отличие от пг183-1, изменяется при добавлении АТФ (рис. 3). Так, кривые роста гидродинамического диаметра частиц при агрегации свободного пг188 описываются уравнением:

$$D_h = D_{h,0} (1 + K_1 t)^{1/d_f},$$

соответствующим диффузионно-ограниченному механизму агрегации, при котором каждое столкновение агрегирующих частиц приводит к их слипанию [13, 14]. Действие шаперона в присутствии АТФ меняет механизм агрегации на реакционно-ограниченный, при котором денатурированные молекулы субстрата агрегируют не при каждом столкновении с другими молекулами. Этот механизм описывается уравнением:

$$D_h = D_{h,0} \exp(K_2 (t - t_0))$$

[15, 16]. Схожее изменение механизма было показано для агрегации глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы в присутствии шаперонов α -кристаллина и GroEL [19]. Аналогичным образом, хотя и менее эффективно, пг146 подавляет агрегацию пг183-1 в системе, не содержащей АТФ, в то время как механизм агрегации пг188 снова становится диффузионно-ограниченным. По видимому, это объясняется относительно медленным при таких условиях накоплением в системе денатурированного пг188, который взаи-

модельствует с шаперонином значительно менее эффективно, чем пг183-1. В результате денатурированный пг188 активнее взаимодействует с уже сформированными агрегатами, чем со свободным шаперонином. Это предположение подтверждается и тем фактом, что скорость агрегации достаточно медленно понижается с уве-

личением концентрации шаперонина и даже при молярном соотношении пг188/пг146, равным 1 : 1 (данные не представлены), агрегация субстрата все еще заметна.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 14-04-00832).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Horwich, A.L. (2013) Chaperonin-mediated protein folding, *J. Biol. Chem.*, **288**, 23622–23632.
- Iizuka, R., Yoshida, T., Ishii, N., Zako, T., Takahashi, K., Maki, K., Inobe, T., Kuwajima, K., and Yohda, M. (2005) Characterization of archaeal group II chaperonin-ADP-metal fluoride complexes: implications that group II chaperonins operate as a «two-stroke engine», *J. Biol. Chem.*, **280**, 40375–40383.
- Georgopoulos, C.P., Hendrix, R.W., Casjens, S.R., and Kaiser, A.D. (1973) Host participation in bacteriophage lambda head assembly, *J. Mol. Biol.*, **76**, 45–60.
- Van der Vies, S.M., Gatenby, A.A., and Georgopoulos, C. (1994) Bacteriophage T4 encodes a co-chaperonin that can substitute for *Escherichia coli* GroES in protein folding, *Nature*, **368**, 654–656.
- Ang, D., Richardson, A., Mayer, M.P., Keppel, F., Krisch, H., and Georgopoulos, C. (2001) Pseudo-T-even bacteriophage RB49 encodes CocO, a cochaperonin for GroEL, which can substitute for *Escherichia coli*'s GroES and bacteriophage T4's gp31, *J. Biol. Chem.*, **276**, 8720–8726.
- Hertveldt, K., Lavigne, R., Pleteneva, E., Sernova, N., Kurochkina, L., Korchevskii, R., Robben, J., Mesyanzhinov, V., Krylov, V.N., and Volckaert, G. (2005) Genome comparison of *Pseudomonas aeruginosa* large phages, *J. Mol. Biol.*, **354**, 536–545.
- Kiljunen, S., Hakala, K., Pinta, E., Huttunen, S., Pluta, P., Gador, A., Lonnberg, H., and Skurnik, M. (2005) Yersiniophage phiR1-37 is a tailed bacteriophage having a 270 kb DNA genome with thymidine replaced by deoxyuridine, *Microbiology*, **151**, 4093–4102.
- Cornelissen, A., Hardies, S.C., Shaburova, O.V., Krylov, V.N., Mattheus, W., Kropinski, A.M., and Lavigne, R. (2012) Complete genome sequence of the giant virus OBP and comparative genome analysis of the diverse φKZ-related phages, *J. Virol.*, **86**, 1844–1852.
- Jang, H.B., Fagutao, F.F., Nho, S.W., Park, S.B., Cha, I.S., Yu, J.E., Lee, J.S., Im, S.P., Aoki, T., and Jung, T.S. (2013) Phylogenomic network and comparative genomics reveal a diverged member of the φKZ-related group, marine vibrio phage φJM-2012, *J. Virol.*, **87**, 12866–12878.
- Kurochkina, L.P., Semenyuk, P.I., Orlov, V.N., Robben, J., Sykilinda, N.N., and Mesyanzhinov, V.V. (2012) Expression and functional characterization of the first bacteriophage-encoded chaperonin, *J. Virol.*, **86**, 10103–10111.
- Briers, Y., Lavigne, R., Volckaert, G., and Hertveldt, K. (2007) A standardized approach for accurate quantification of murein hydrolase activity in high-throughput assays, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **70**, 531–533.
- Zhemaeva, L.V., Sykilinda, N.N., Navruzbekov, G.A., Kurochkina, L.P., and Mesyanzhinov, V.V. (2000) Structure and folding of bacteriophage T4 gene product 9 triggering infection. II. Study of conformational changes of gene product 9 mutants using monoclonal antibodies, *Biochemistry (Moscow)*, **65**, 1068–1074.
- Lin, M.Y., Lindsay, H.M., Weitz, D.A., Ball, R.C., Klein, R., and Meakin, P. (1989) Universality of fractal aggregates as probed by light-scattering, *Proc. R. Soc. Lond. Series A*, **423**, 71–87.
- Khanova, H.A., Markossian, K.A., Kurganov, B.I., Samoilov, A.M., Kleimenov, S.Y., Levitsky, D.I., Yudin, I.K., Timofeeva, A.C., Muranov, K.O., and Ostrovsky, M.A. (2005) Mechanism of chaperone-like activity. Suppression of thermal aggregation of βL-crystallin by α-crystallin, *Biochemistry*, **44**, 15480–15487.
- Weitz, D.A., Huang, J.S., Lin, M.Y., and Sung, J. (1985) Limits of the fractal dimension for irreversible kinetic aggregation of gold colloids, *Phys. Rev. Lett.*, **54**, 1416–1419.
- Khanova, H.A., Markossian, K.A., Kleimenov, S.Y., Levitsky, D.I., Chebotareva, N.A., Golub, N.V., Asryants, R.A., Muronetz, V.I., Saso, L., Yudin, I.K., Muranov, K.O., Ostrovsky, M.A., and Kurganov, B.I. (2007) Effect of α-crystallin on thermal denaturation and aggregation of rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Biophys. Chem.*, **125**, 521–531.
- Baykov, A.A., Evtushenko, O.A., and Avaeva, S.M. (1988) A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay, *Anal. Biochem.*, **171**, 266–270.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680–685.
- Markossian, K.A., Golub, N.V., Chebotareva, N.A., Asryants, R.A., Naletova, I.N., Muronetz, V.I., Muranov, K.O., and Kurganov, B.I. (2010) Comparative analysis of the effects of α-crystallin and GroEL on the kinetics of thermal aggregation of rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Protein J.*, **29**, 11–25.
- Hartl, F.U., and Hayer-Hartl, M. (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein, *Science*, **295**, 1852–1858.
- Li, Y., Zheng, Z., Ramsey, A., and Chen, L. (2010) Analysis of Peptides and Proteins in Their Binding to GroEL, *J. Peptide Sci.*, **16**, 693–700.
- Gutsche, I., Essen, L.O., and Baumeister, W. (1999) Group II chaperonins: new TRiC(k)s and turns of a protein folding machine, *J. Mol. Biol.*, **293**, 295–312.

**EFFECT OF CHAPERONIN ENCODED
BY GENE 146 ON THERMAL AGGREGATION
OF LYTIC PROTEINS OF BACTERIOPHAGE**

EL *P. aeruginosa*

P. I. Semenyuk^{1*}, V. N. Orlov¹, L. P. Kurochkina^{1,2}

¹ *M. V. Lomonosov Moscow State University, A. N. Belozersky
Institute of Physico-Chemical Biology, 119991, Russia;
fax: +7(495)939-3181, E-mail: psemenyuk@belozersky.msu.ru,
orlovvn@belozersky.msu.ru*

² *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow 117997, Russia;
fax: +7(495)336-6022, E-mail: lpk@ibch.ru*

Received June 17, 2014

Revision received September 17, 2014

Investigation of the chaperonin encoded by gene 146 of bacteriophage EL *Pseudomonas aeruginosa*, which was earlier characterized by us, has been continued. To reveal the mechanism of its functioning, new recombinant substrate proteins, the fragments of gene product (gp) 183, containing a lysozyme domain, have been produced. Their interaction with gp146 has been studied. The influence of the phage chaperonin on the thermal aggregation of one of these gp183 fragments and endolysin (gp188) has been investigated in both the presence and absence of ATP by dynamic light scattering. In the absence of ATP, the phage chaperonin is shown to form stable complexes with substrate proteins, thereby protecting them against thermal aggregation. Comparative analysis of the experimental data obtained for the different substrate proteins has been carried out.

Key words: phage chaperonin, bacteriophage EL, endolysin, protein aggregation