

ВЛИЯНИЕ ШАПЕРОНОВ IbpAB и ClpA НА DnaKJE-ЗАВИСИМЫЙ РЕФОЛДИНГ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЛЮЦИФЕРАЗ В КЛЕТКАХ *Escherichia coli*

© 2011 г. О. Е. Мелькина, В. Ю. Котова, И. В. Манухов, Г. Б. Завильгельский

Государственный научный центр “ГосНИИ генетика”, Москва, 117545

Поступила в редакцию 22.10.2010 г.

Принята к печати 16.11.2010 г.

Измерены скорость и уровень DnaKJE-зависимого рефолдинга термоинактивированной люциферазы *Aliivibrio fischeri* (ранее *Vibrio fischeri*). Показано, что в клетках *Escherichia coli* K12, мутантных по генам *ibpA*, *ibpB* и *clpA*, значительно снижены начальная скорость и максимальный уровень рефолдинга. Недостаток шаперона IbpB сильнее влияет на эффективность рефолдинга по сравнению с недостатком IbpA. В отличие от IbpAB недостаток шаперона ClpA проявляется при рефолдинге лишь при длительной инкубации клеток при высокой температуре. Введение плазмиды с генами *ibpAB* в клетки, мутантные по гену *clpA*, не компенсирует недостаток шаперона ClpA. Следовательно, малые шапероны IbpAB и шаперон ClpA, принадлежащий семейству Hsp100, участвуют в DnaKJE-зависимом рефолдинге термоденатурированных белков независимо и на разных стадиях процесса.

Ключевые слова: шаперон, IbpAB, ClpA, DnaKJE, рефолдинг, люцифераза.

EFFECTS OF THE IbpAB AND ClpA CHAPERONES ON DnaKJE-DEPENDENT REFOLDING OF BACTERIAL LUCIFERASES IN *Escherichia coli* CELLS, by O. E. Melkina, V. Yu. Kotova, I. V. Manukhov, G. B. Zavilgelsky* (State Research Center “GosNII Genetika”, Moscow, 117545 Russia; *e-mail: zavilgel@genetika.ru). The rate and level of DnaKJE-dependent refolding of the thermoinactivated *Aliivibrio fischeri* luciferase are considerably lower in *Escherichia coli* *ibpA* and *ibpB* mutants than in wild type cells. The rate and level of refolding are lower in *E. coli* *ibpB::kan* than in *ibpA::kan* cells. The decline of refoldings level in *E. coli* *clpA::kan* makes progress only with the increase of thermoinactivation time of luciferase. Plasmids with the genes *ibpAB* don't compensate *clpA* mutation. It is supposed that small chaperones IbpAB and chaperone ClpA operate independently in a process of DnaKJE-dependent refolding of proteins at the different stages.

Keywords: chaperone, IbpAB, ClpA, DnaKJE, refolding, luciferases.

В бактериальных клетках в процессе роста образуются неправильно собранные и денатурированные белки, количество которых значительно возрастает в условиях стресса, а также при суперпродукции гетерологичных белков. В результате в клетке образуются нерастворимые белковые агрегаты и даже так называемые “тела включения”, что приводит к инаktivации бактерий [1]. В бактериях *Escherichia coli* процессы дезагрегации и восстановления нативной структуры (рефолдинга) белков связаны с активностью АТР-зависимой бишаперонной системы DnaKJE-ClpB [2–4].

При этом рефолдинг белков осуществляет комплекс DnaKJE (DnaK-DnaJ-GrpE), а шаперон ClpB (принадлежащий семейству Hsp100) активно участвует в процессе дезагрегации, особенно крупных белковых агрегатов [4, 5].

Малые белки-шапероны IbpA и IbpB (принадлежащие семейству АТР-независимых шаперонов sHsp) образуют комплексы с белковыми агрегатами, что приводит к ускорению дезагрегации, причем в рефолдинге, как таковом, IbpAB-шапероны не участвуют [6–9]. Согласно данным, полученным в опытах *in vitro*, присутствие IbpAB в смеси с белком-субстратом защищает белки от термоденатурации, снижая уровень агрегации, что фиксируется методом светорассеяния [8]. Интересно, что при проведении подобного опыта с шапероном ClpA также наблюдается эффект защиты белка-субстрата (малатдегидрогеназы и светлячковой люциферазы) от термоагрегации [10].

Показано [11], что *in vitro* в присутствии белка ClpA в процессе термоинаktivации люциферазы светлячка DnaKJE-зависимый рефолдинг проходит с высокой эффективностью и практически отсутствует, если термоинаktivацию фермента проводить без ClpA. Недавно мы показали, что в бактери-

* Эл. почта: zavilgel@genetika.ru

альной клетке белок ClpA значительно влияет на уровень DnaKJE-рефолдинга термоинактивированной бактериальной люциферазы. Это влияние тем сильнее, чем продолжительнее время инкубации клеток при высокой температуре, т.е. в условиях, когда термоинактивированные белки формируют агрегаты все большего размера [12].

Представляло интерес сравнить влияние шаперонов IbpAB и ClpA на DnaKJE-зависимый рефолдинг денатурированных белков и оценить возможность компенсации недостатка шаперона ClpA малыми шаперонами IbpAB. В представленной работе мы сравнили влияние малых белков-шаперонов IbpAB и шаперона ClpA на DnaKJE-зависимый рефолдинг термоинактивированных ферментов (бактериальных люцифераз) в клетках *E. coli*. Оказалось, что основной вклад в усиление эффективности рефолдинга вносит белок IbpB, а избыток белков IbpAB в клетке не компенсирует дефект в гене *clpA*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Бактериальные штаммы и плазмиды. Штаммы *E. coli* K12 SG20250 $\Delta lacU169 araD flbB relA$ и SG22199 *clpA::kan* (остальные маркеры, как у SG20250) получены от S. Gottesman и Y. Zhou, США [13]. Мутантный штамм MG1655 *clpA::kan* сконструирован с использованием переноса мутантного гена из генома штамма SG22099 с помощью P1-трандукции согласно [14].

Штаммы *E. coli* K12 BW25113 *rmB3* $\Delta lacX4787 hadR5114 \Delta(araBAD)567 \Delta(rhaBAD)568 rph-1$ и его мутанты JW3664 *ibpA::kan*, JW3663 *ibpB::kan*, JW0013 *dnaK::kan* (остальные маркеры, как у исходного BW25113) – из “Keio collection” – получены от С.В. Машко (Закрытое Акционерное Общество “Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика”, Москва).

Клетки росли в жидкой или агаризованной среде Луриа-Бертани (LB) с добавлением соответствующих антибиотиков (ампициллин – 100 мкг/мл, канамицин – 40 мкг/мл, хлорамфеникол – 15 мкг/мл) при 30°C.

Векторы pUC19, pTZ57R (“Fermentas UAB”). Гибридная плаزمида pF2 с генами *luxAB Aliivibrio fischeri*, расположенными под промотором P_{lac} , получена в результате переклонирования в вектор pUC19 фрагмента ДНК XhoI–SalI из плазмиды pF1, содержащей полный *lux*-оперон *A. fischeri* [15].

Гибридная плазмида pOMIbpAB Cm^r, содержащая гены *ibpAB*, расположенные под промотором P_{tetO-1} , сконструирована с использованием следующих праймеров:

IbpAD, 5'-gtcaggagctattgattatgcgta-3';

IbpBR, 5'-gttagctatttaacgcgggac-3'.

Аmplифицированный фрагмент ДНК встраивали в вектор pTZ57R по сайту EcoRV. Далее фрагмент

ДНК переклонировали по сайтам KpnI–ApaI в вектор pZS33 Cm^r под промотор P_{tetO-1} . Вектор pZS33 содержит репликон pSC101 (8–10 копий на клетку) и промотор P_{tetO-1} , состоящий из промоторной части P_i из генома фага λ и операторной части *tetO2* из регуляторной области оперона тетрациклиноустойчивости транспозона Tn10 [16].

Среды, ферменты, реактивы. В опытах с клонированием культуры выращивали на среде LB и LB-агаре. Реакции расщепления и лигирования проводили с помощью ферментов фирмы “Fermentas UAB” (Литва). В качестве субстрата люциферазы использовали *n*-деканаль (“Sigma”).

Измерение интенсивности биолюминесценции. Бактериальные люциферазы (Е) катализируют реакцию окисления алифатического альдегида (RCHO) кислородом воздуха (O₂) при участии восстановленного флавиномононуклеотида (FMNH₂):



Интенсивность биолюминесценции (мкВ) суспензии клеток (200 мкл) измеряли на люминометре LMA01 (“Beckman”) с добавлением в качестве субстрата реакции *n*-деканала (3 мкл 0.001%-го спиртового раствора) при комнатной температуре.

Термоинактивация и рефолдинг люциферазы. Термоинактивацию люциферазы проводили в водяной бане при фиксированной температуре [17]. К суспензии клеток для ингибирования синтеза белка добавляли хлорамфеникол в концентрации 167 мкг/мл. Рефолдинг люцифераз проводили при комнатной температуре [17]. Через определенные интервалы времени отбирали пробу (200 мкл) и сразу после добавления *n*-деканала (субстрат люциферазной реакции) измеряли интенсивность биолюминесценции.

Предварительный “тепловой шок” проводили, инкубируя клетки *E. coli* в среде LB в термостате при 42°C в течение 30 мин без добавления хлорамфеникола.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Рефолдинг термоинактивированной люциферазы в бактериях E. coli, мутантных по генам ibpA и ibpB

Кинетику и уровень рефолдинга термоинактивированных люцифераз измеряли *in vivo* в клетках *E. coli* K12 BW25113 *ibpA⁺ ibpB⁺ dnaK⁺*, JW3664 *ibpA::kan*, JW3663 *ibpB::kan* и JW0013 *dnaK::kan*, содержащих гибридную плазмиду pF2 с генами *luxAB*, кодирующими α - и β -субъединицы люциферазы *A. fischeri*. Бактерии росли при 30°C с аэрацией до $OD = 0.4–0.5$ и с последующей инкубацией при 42°C в течение 30 мин для индукции белков “теплого шока”.

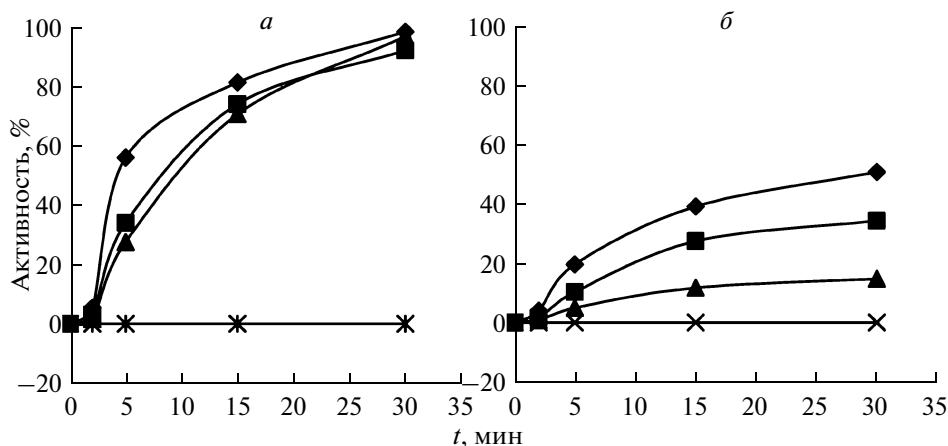


Рис. 1. Влияние мутаций *ibpA::kan* и *ibpV::kan* на кинетику и уровень DnaKJE-зависимого рефолдинга термоинактивированной люциферазы *A. fischeri*. Кинетика рефолдинга люциферазы *A. fischeri* в клетках *E. coli* после 5 мин (а) и 60 мин (б) инкубации клеток при температуре 46°C. По оси ординат отложена активность люциферазы (в процентах от исходного уровня), по оси абсцисс — время рефолдинга люциферазы при 20°C. (♦) — BW25113 *ibpA*⁺ *ibpV*⁺ *dnaK*⁺; (■) — JW3664 *ibpA::kan*; (▲) — JW3663 *ibpV::kan*; (+) — JW0013 *dnaK::kan*.

Затем к суспензии клеток для ингибирования синтеза белка добавляли хлорамфеникол (167 мкг/мл) и переносили в водяную баню при температуре 46°C для инактивации люциферазы. Рефолдинг термоинактивированной люциферазы проводили при комнатной температуре. На рис. 1 приведены кинетические кривые зависимости уровня рефолдинга (ренатурации) люциферазы *A. fischeri* (в % от исходного уровня) от времени инкубации при температуре 20°C. Отметим, что в клетках мутантного штамма JW0013 *dnaK::kan* рефолдинг белка полностью отсутствует. В клетках *E. coli* BW25113 *dnaK*⁺ *ibpAB*⁺ происходит быстрый и практически полный рефолдинг — до 80–90% от исходного уровня, если время термоинактивации при 46°C равно 5 мин (рис. 1а). При термоинактивации в течение 60 мин при 46°C уровень рефолдинга снижается примерно в 2 раза (рис. 1б). Иная картина наблюдается в случае мутантных штаммов JW3663 *ibpV::kan* и JW3664 *ibpA::kan*. Как видно из данных, представленных на рис. 1, процесс рефолдинга замедляется, снижается также уровень рефолдинга, что особенно проявляется при термоинактивации в течение 60 мин. Видно также, что мутантные штаммы различаются по способности к рефолдингу люциферазы: у штамма JW3663 *ibpV::kan* замедление скорости и снижение уровня рефолдинга выражены значительно сильнее, чем у штамма JW3664 *ibpA::kan*.

Введение в мутантные клетки JW3663 *ibpV::kan* и JW3664 *ibpA::kan* плазмиды рОМIbpAB (вектор рZS33, содержащий гены *ibpAB* под промотором P_{litO-1}) полностью компенсирует дефекты генома и даже так усиливает процесс рефолдинга, что он превышает уровень, наблюдаемый в штамме дикого

типа, и, по-видимому, определяется копийностью плазмиды (рис. 2).

Рефолдинг термоинактивированной люциферазы в бактериях *E. coli clpA::kan* и *E. coli clpA::kan* (рОМIbpAB)

На рис. 3 приведены кинетические кривые ренатурации люциферазы *A. fischeri* (в % от исходного уровня) в зависимости от времени инкубации при температуре 20°C в клетках *E. coli* MG1655 *clpA*⁺ и MG1655 *clpA::kan*.

Как видим, при длительной термоинактивации при 46°C (60 мин) уровень рефолдинга люциферазы в мутантном штамме MG1655 *clpA::kan* значительно ниже, чем в штамме MG1655 *clpA*⁺. Этот результат соответствует ранее полученным данным о важности шаперона ClpA для рефолдинга белков при продолжительной инкубации клеток при высокой температуре [12].

Можно было предположить, что при сходных эффектах (защита белков-субстратов от агрегации) ClpA и IbpAB, фиксируемых в опытах *in vitro* [5–8], малые шапероны IbpAB способны компенсировать дефект клетки по гену *clpA*. Однако, как это представлено на рис. 3, присутствие в мутантных по гену *clpA* клетках *E. coli* MG1655 *clpA::kan* плазмиды рОМIbpAB не повысило эффективность рефолдинга длительно термоинактивированной люциферазы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В опытах *in vitro* с использованием в качестве субстрата малатдегидрогеназы (MDH) и люциферазы светлячка показана необходимость в присут-

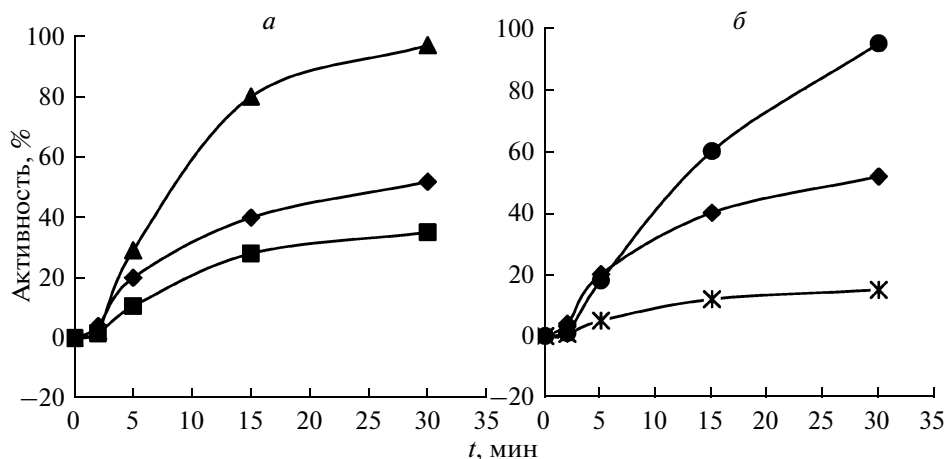


Рис. 2. Влияние плазмиды pOMibpAB на кинетику и уровень DnaKJE-зависимого рефолдинга термоинактивированной люциферазы *A. fischeri*. Кинетика рефолдинга люциферазы *A. fischeri* после 60 мин инкубации клеток при температуре 46°C в *E. coli* JW3664 *ibpA::kan* (а) и JW3663 *ibpB::kan* (б). По оси ординат отложена активность люциферазы (в процентах от исходного уровня), по оси абсцисс – время рефолдинга люциферазы при 20°C. (◆) – BW25113 *ibpA*⁺ *ibpB*⁺ *dnaK*⁺ (pF2); (■) – JW3664 *ibpA::kan* (pF2); (▲) – JW3664 *ibpA::kan* (pF2, pOMibpAB); (●) – JW3663 *ibpB::kan* (pF2, pOMibpAB); (✕) – JW3663 *ibpB::kan* (pF2).

ствии шаперонов ClpA и IbpAB в смеси с белком-субстратом во время термоинактивации для последующего успешного рефолдинга фермента, осуществляемого системой DnaKJE [9, 11].

В опытах *in vivo* результаты были следующими:

1) бактерии, мутантные по генам *clpA* или *ibpAB*, характеризуются небольшой задержкой роста на ранней стадии экспоненциальной фазы [18];

2) в клетках, в геноме которых делетирован оперон *ibpAB*, примерно в 2 раза увеличивается содержание внутриклеточных белков в нерастворимой фракции и замедляется процесс дезагрегации, осуществляемый системой DnaKJE-ClpB [8, 19];

3) в клетках, мутантных по гену *clpA*, не увеличивается содержание агрегированных форм эндогенных белков [10], однако при длительном выдерживании клеток при высокой температуре (46°C) уровень DnaKJE-зависимого рефолдинга люциферазы снижается [12].

В настоящей работе мы показали, что малые шапероны IbpA и IbpB обеспечивают *in vivo* в клетках *E. coli* повышенный уровень DnaKJE-зависимого рефолдинга денатурированных белков – бактериальных люцифераз.

Показано, что недостаток шаперона IbpB сильнее влияет на эффективность рефолдинга, чем недостаток IbpA. Отметим, что в опытах по DnaKJE-зависимому рефолдингу, проводимых *in vitro*, сравнить активности белков IbpA и IbpB не удалось, так как лишь IbpB смогли выделить в растворимой форме, удобной для проведения эксперимента [20].

В опытах с термоинактивацией белков-субстратов с последующим рефолдингом системой DnaKJE, проведенных *in vitro*, шапероны IbpAB и

ClpA действуют сходным образом, а именно, защищают от термоагрегации [10, 11]. Однако согласно данным, представленным на рис. 3, шапероны IbpAB не способны компенсировать недостаток ClpA у бактерий, мутантных по гену *clpA*, в процессе DnaKJE-зависимого рефолдинга. В качестве рабочей гипотезы можно предположить, что шапероны IbpAB и ClpA действуют на разных этапах процессов дезагрегации и ренатурации белков. Малые шапероны IbpAB формируют комплексы с денатури-

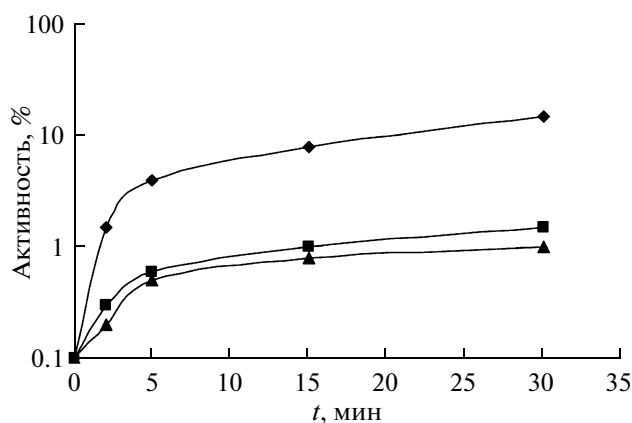


Рис. 3. Влияние плазмиды pOMibpAB на кинетику и уровень DnaKJE-зависимого рефолдинга термоинактивированной люциферазы *A. fischeri* в клетках MG1655 *clpA*⁺ и MG1655 *clpA::kan* после 60 мин инкубации клеток при температуре 46°C. По оси ординат отложена активность люциферазы (в процентах от исходного уровня), по оси абсцисс – время рефолдинга люциферазы при 20°C. (◆) – MG1655 *clpA*⁺; (■) – MG1655 *clpA::kan*; (▲) – MG1655 *clpA::kan* + pOMibpAB.

рованными белками уже на ранней стадии во время инкубации клеток при высокой температуре [6–8]. По-видимому, присутствие малых шаперонов IbpA и IbpB в агрегатах совместно с белком-субстратом снижает энергию взаимодействия между белками и тем самым обеспечивает повышенную способность системы DnaKJE проводить дезагрегацию субстрата и рефолдинг.

В связи с тем, что влияние шаперона ClpA на рефолдинг проявляется лишь при длительной инкубации клеток при высокой температуре [12], т.е. при условии, когда термоинактивированные белки формируют агрегаты все большего размера, можно предположить, что шапероны ClpA взаимодействуют с очень крупными агрегатами, снижая энергию взаимодействия между их частями.

Отметим, что белки ClpA синтезируются в клетке в значительно меньшем (примерно в 100 раз) количестве (100 молекул на клетку) по сравнению с белками DnaK, ClpB, IbpA и IbpB, гены которых экспрессируются при “тепловом шоке” [2].

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 гг. (государственные контракты № 14.740.11.0626 и № П1070) и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 10-04-00541-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Tomoyasu T., Mogk A., Langen H., Goloubinoff P., Bukau B. 2001. Genetic dissection of the roles of chaperones and proteases in protein folding and degradation in *Escherichia coli* cytosol. *Mol. Microbiol.* **40**, 397–413.
- Mogk A., Tomoyasu T., Goloubinoff P., Rudiger S., Roder D., Langen H., Bukau B. 1999. Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. *EMBO J.* **18**, 6934–6949.
- Goloubinoff P., Mogk A., Ben-Zvi A.P., Tomoyasu T., Bukau B. 1999. Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a chaperone network. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 13732–13737.
- Ben-Zvi A.P., Goloubinoff P. 2001. Review: mechanism of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones. *J. Struct. Biol.* **135**, 84–93.
- Diamant S., Ben-Zvi A.P., Bukau B., Goloubinoff P. 2000. Size-dependent disaggregation of stable protein aggregates by the DnaK chaperone machinery. *J. Biol. Chem.* **275**, 21107–21113.
- Laskowska E., Wawzynow A., Taylor A. 1996. IbpA and IbpB, the new heat-shock proteins, bind to endogenous *Escherichia coli* proteins aggregated intracellularly by heat shock. *Biochimie.* **78**, 117–122.
- Kuczynska-Wisnik D., Kedzierska S., Matuszewska E., Lind P., Taylor A., Lipinska B., Laskowska E. 2002. The *Escherichia coli* small heat shock proteins IbpA and IbpB prevent the aggregation of endogenous proteins denatured *in vivo* during extreme heat shock. *Microbiology.* **148**, 1757–1765.
- Mogk A., Deuerling E., Vorderwulbecke S., Vierling E., Bukau B. 2003. Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional trade in reversing protein aggregation. *Mol. Microbiol.* **50**, 585–595.
- Mogk A., Schlieker C., Friedrich K.L., Schonfeld H.-J., Vierling E., Bukau B. 2003. Refolding of substrates bound to small Hsps relies on a disaggregation reaction mediated most efficiently by ClpB/DnaK. *J. Biol. Chem.* **278**, 31033–31042.
- Dougan D.A., Reid B.G., Horwich A.L., Bukau B. 2002. ClpS, a substrate modulator of the ClpAP machine. *Mol. Cell.* **9**, 673–683.
- Wickner S., Gottesman S., Skowrya D., Hoskins J., McKenney K., Maurizi M.R. 1994. A molecular chaperone, ClpA, functions like DnaK and DnaJ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 12218–12222.
- Котова В.Ю., Манухов И.В., Мелькина О.Е., Завильгельский Г.Б. 2008. Мутация *clpA:kan* в гене, кодирующем шаперон семейства Hsp100, значительно снижает эффективность DnaK-зависимого рефолдинга белков в бактериях *Escherichia coli*. *Молекуляр. биология.* **42**, 1018–1022.
- Gottesman S., Roche E., Zhou Y., Sauer R.T. 1998. The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system. *Genes Dev.* **12**, 1338–1347.
- Миллер Дж. 1976. *Эксперименты в молекулярной генетике*. М.: Мир.
- Чернова Т.А., Завильгельский Г.Б. 1991. Клонирование и экспрессия *lux*-генов морских бактерий *Vibrio fischeri* в клетках *Escherichia coli*. *Биотехнология.* **3**, 37–40.
- Lutz R., Bujard H. 1997. Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I₁-I₂ regulatory elements. *Nucl. Acids Res.* **25**, 1203–1210.
- Manukhov I.V., Eroshnikov G.E., Vyssokikh M.Yu., Zavilgelsky G.B. 1999. Folding and refolding of thermolabile and thermostable bacterial luciferases: the role of DnaKJ heat-shock proteins. *FEBS Lett.* **448**, 265–268.
- Thomas J.G., Baneyx F. 1998. Roles of the *Escherichia coli* small heat shock proteins IbpA and IbpB in thermal stress management: comparison with ClpA, ClpB, and HtpG *in vivo*. *J. Bacteriol.* **180**, 5165–5172.
- Thomas J.G., Baneyx F. 2000. ClpB and HtpG facilitate *de novo* protein folding in stressed *Escherichia coli* cells. *Mol. Microbiol.* **36**, 1360–1370.
- Shearstone J.R., Baneyx F. 1998. Biochemical characterization of the small heat shock protein IbpB from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **274**, 9937–9945.