

УДК: 577.112+577.22

ОДНОСТАДИЙНАЯ ОЧИСТКА МОЛЕКУЛЯРНОГО ШАПЕРОНА GroEL МЕТОДОМ АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ НА ОСНОВЕ ДЕНАТУРИРОВАННОГО ПЕПСИНА**Н.Ю.Марченко¹, В.В.Марченков², А.Л.Кайшева³, И.А.Кашпаров², Н.В.Котова², П.А.Калиман¹, Г.В.Семисотнов²**¹ Харьковський національний університет імені В.Н.Каразіна (Харьков, Україна),² Інститут білка РАН (Пушино, Росія),³ Удмуртський державний університет (Іжевск, Росія).

GroEL (олигомерний білок теплового шока кліток *Escherichia coli*) являється представителем групи молекулярних шаперонів, які здатні повертати агрегацію ненативних конформаційних станів білкових молекул шляхом взаємодії з ними. В даній роботі продемонстрована можливість швидкої і високоєфективної очистки GroEL на хроматографічному носії (сефарозе) з ковалентно пришитим ненативним пепсином. Представлені умови, що дозволяють отримати високоочищений нативний GroEL (за даними SDS-електрофорезу в поліакриламідному гелі, флуоресцентної спектроскопії і АТФ-азної активності) з клітинного лізату в одну стадію очистки. Метод афінної хроматографії може бути використаний як для препаративного виділення GroEL і подібних йому шаперонів з різних типів кліток, так і для експрес-аналізу вмісту шаперонів в клітках після впливу на них різних стресів або патогенних факторів.

Ключові слова: білок-білкові взаємодії, шаперони, GroEL, афінна хроматографія.

Введение

Молекулярними шаперонами називають ряд неродствених родин білків, які можуть запобігати неспецифічній агрегації різних ненативних поліпептидних ланцюгів (як синтезованих *de novo*, так і втрачених нативну конформацію під впливом різних факторів) і забезпечувати зворотнє складання цих поліпептидних ланцюгів в нативні конформації (Ellis, 1996; Fenton, 2003). Олигомерний білок GroEL кліток *Escherichia coli* являється найбільш вивченим представителем молекулярних шаперонів. Він представляє собою гомотетрадекамер (молекулярна маса мономера ~57 кДа), що складається з двох ідентичних гептамерних кілець, укладених один на одного (Braig, 1994). Характерною властивістю GroEL є його здатність взаємодіяти з широким колом ненативних білків (Viitanen, 1992). Предполагается, что основными взаимодействиями, стабилизирующими комплексы GroEL с ненативными белковыми мишенями, являются гидрофобные взаимодействия (Fenton, 1994; Lin, 1995). Вместе с тем, известно, что общий расчетный заряд GroEL отрицателен (-19 на субъединицу), и есть ряд данных, свидетельствующих о том, что электростатические взаимодействия также вносят определенный вклад в стабилизацию комплекса GroEL с ненативными белками (Pack, 2000; Viitanen, 1990). Кроме этого, GroEL обладает слабой АТФ-азной активностью, для его функционирования как молекулярного шаперона требуется присутствие ко-шаперона GroES (гомогептамерный белок, молекулярная масса мономера ~10 кДа), ионов K^+ и Mg^{2+} и адениловых нуклеотидов (АТФ и АДФ) (Fenton, 2003; Goloubinoff, 1989; Viitanen, 1990).

Вследствие неослабевающего интереса к исследованию структуры и функционирования молекулярных шаперонов вопрос о быстрой и высокоэффективной очистке шаперонов стоит уже давно. Существует ряд известных методик выделения и очистки, базирующихся на гель-фильтрации, ионообменной и обратнофазной хроматографии и т. д. Эти методики достаточно трудоемки и включают в себя несколько последовательных стадий (Clark, 1998; Lissin, 1990; Motojima, 2000).

Существенной проблемой также является доочистка GroEL от примесей, которые практически не детектируются методами электрофореза, однако отчетливо детектируются флуоресцентной спектроскопией. Аминокислотная последовательность GroEL не содержит остатков триптофана (Hemmingsen, 1988), однако очищенные образцы шаперона часто обладают значительной триптофановой флуоресценцией (Price, 1991). Было показано, что триптофановая флуоресценция GroEL обусловлена наличием примесей (Naeyer-Hartl, 1993), и разработан ряд эффективных, но не простых методик очистки GroEL от «триптофан-содержащей примеси» (Clark, 1998; Murai, 1996; Todd, 1998).

Задачей настоящей работы является разработка простого и эффективного метода очистки GroEL. В качестве такого метода была выбрана афінна хроматографія на основі

денатурированного белка. Следует отметить, что попытки использовать для очистки GroEL аффинную хроматографию были и ранее. Так, использовали триптофан-аффинную колонку, с которой взаимодействовали примеси, а GroEL выходил в свободном объеме (Blennow, 1995). Для наилучшего эффекта требовалось пропустить образец GroEL через колонку несколько раз или провести дополнительную подготовку (например, инкубацию в присутствии GroES и АТФ, что существенно дестабилизировало комплекс GroEL с примесью) (Blennow, 1995). Использовали также аффинную хроматографию на основе иммобилизованной денатурированной алкоголь оксидазы (Evers, 1993) или иммобилизованного казеина (Nam, 2002), однако вместе с GroEL на колонку садились также другие шапероны, что не позволяло использовать эту методику для эффективной очистки GroEL.

В настоящей работе разработана методика очистки GroEL на сефарозе с ковалентно присоединенным к ней ненативным пепсином. Подобраны условия (ионная сила и концентрация ионов Mg^{2+}), в которых GroEL прочно связывается с аффинным носителем, а остальные белки клеток *E.coli* выходят в свободном объеме. GroEL снимается с аффинного носителя буфером, содержащим только Tris-HCl (pH 7.5), а остатки примесей, которые взаимодействуют с носителем, снимаются затем раствором 6.5 М мочевины. Высокоэффективная очистка GroEL происходит в одну стадию в мягких условиях.

Можно предположить, что в дальнейшем эту методику можно будет использовать не только для очистки GroEL, но и для быстрого анализа содержания GroEL-подобных шаперонов в клетках при различных клеточных стрессах.

Объекты и методы исследований

Реактивы и белки. В работе использованы: хроматографически очищенный пепсин слизистой оболочки свиньи ("Sigma", США); CNBr-активированная сефароза 4B ("Pharmacia Biotech", Швеция); хлористые аммоний, калий, кальций, магний и натрий ("Реахим", Россия); мочевины ("Реахим", Россия); трис(гидроксиметил)аминометан (Tris), этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) ("Serva", Германия). Ионную силу растворов рассчитывали по формуле: $I=1/2\sum(z_i^2 \times C_i)$, где z_i – это заряд i иона, а C_i – его концентрация.

Выделение и очистка GroEL. Стандартную очистку GroEL проводили после экспрессии в клетках *E.coli* (штамм HB101) мультикопийной плазмиды pGroE4 (полный groE оперон *E.coli*, клонированный в EcoR1 сайте вектора pACYC184) по известной методике (Lissin, 1990) с некоторыми изменениями. Клетки суспендировали в буфере, содержащем 20 мМ Tris-HCl pH 7.5, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ β -меркаптоэтанол, 0.2 мМ PMSF. Для разрушения клеток добавляли лизоцим (1 мг/г клеток), после чего суспензию инкубировали во льду 10 мин. Разрушение клеток проводили ультразвуком пять раз при частоте 22 кГц в течение 45 с. Фрагменты разрушенных клеток удаляли центрифугированием в течение 30 мин при 14 тыс. об/мин. и далее при 35 тыс. об/мин. Для разделения фракций GroEL и GroES осветленный раствор наносили на колонку (1.6 × 20 см) DEAE-Toyopearl ("Toyo Soda", Япония), уравновешенную буфером 20 мМ Tris-HCl pH 8.0. При элюции в линейном градиенте NaCl (от 0.0 до 0.7 М) фракции GroES обнаруживались (по данным SDS-электрофореза) в первой трети, а GroEL – в середине градиента. Затем фракции GroEL диализовали против буфера, содержащего 20 мМ гистидина pH 6.0, и наносили на колонку MonoQ ("Pharmacia Biotech", Швеция), уравновешенную этим же буфером. Элюция GroEL наблюдалась в конце градиента NaCl (0 М – 0.6 М). Следующий этап очистки GroEL проходил на колонке MonoS ("Pharmacia Biotech", Швеция), уравновешенной буфером 20 мМ гистидин-HCl pH 5.3 в градиенте от 0 М до 0.6 М NaCl. Элюируемый в конце линейного градиента NaCl (0–0.6 М) преобладающий пик содержал GroEL с незначительной примесью других белков. Окончательная очистка (а также смена буфера) осуществлялась на колонке (1.6 × 50 см) Superose 6 ("Pharmacia Biotech", Швеция). Буфер содержал 20 мМ TrisHCl pH 8.0. Чистоту препарата определяли методами электрофореза в полиакриламидном геле и флуоресцентной спектроскопии (Clark, 1998). Нативность очищенного GroEL проверяли методом измерения АТФ-азной активности (Lanzetta, 1979). Концентрацию белков определяли спектрофотометрически по поглощению на 280 нм, используя коэффициенты экстинкции ($A_{1\text{см}}^{0.1\%}$), равные 1.48 для нативного пепсина, 0.25 для GroEL после стандартной очистки и 0.19 для GroEL после дополнительной очистки от триптофан-содержащей примеси.

Приготовление аффинного носителя. Аффинный носитель был создан на основе CNBr-активированной сефарозы 4B по известной методике (Axen, 1967). 20 мг пепсина в буфере А (0.1 М $NaHCO_3$, 0.5 М NaCl, pH 9) инкубировали с 6 мл BrCN-активированной сефарозы при непрерывном перемешивании 16 часов (при 4°C). Непрореагировавший пепсин отмывали буфером А и его количество определяли спектрофотометрически (~2 мг). Оставшиеся активные группы блокировали буфером Tris-HCl (0.1 М, pH 8) 16 часов при 4°C. Полученный аффинный носитель промывали

трижды (каждый цикл состоял из промывки ацетатным буфером (0.1 М, pH 4), содержащим NaCl (0.5 М), затем буфером Tris-HCl (0.1 М, pH 8), содержащим NaCl (0.5 М)). Приготовленный таким образом носитель хранили при 4°C.

Аффинная хроматография. В работе были использованы хроматографические колонки 5 × 25 мм и 20 × 60 мм. Эксперименты проводились при комнатной температуре в стандартном 20 mM Tris-HCl буфере, pH 7.5, включающем различные концентрации солей (KCl, NaCl, NH₄Cl в концентрациях от 0 до 1 М; MgCl₂, CaCl₂ в концентрациях от 0 до 20 mM). Скорость потока сохраняли постоянной и равной 10 мл/час с использованием перистальтического насоса (Minipuls 3, Gilson, Франция). При подборе условий связывания GroEL с аффинным носителем и при очистке от триптофан-содержащей примеси раствор GroEL наносили на аффинную колонку 5 × 25 мм в концентрации ~2 мг/мл в объеме 150 мкл. При одностадийной очистке GroEL из клеточного лизата (клетки *E. coli*, трансформированные мультিকопийной плазмидой, несущей полный groE оперон) на аффинную колонку 20 × 60 мм наносили отцентрифугированный (30 мин при 14 тыс. об/мин., затем 30 мин при 30 тыс. об/мин) лизат в количестве 2 мл. Аффинно связанный GroEL элюировали буфером Tris-HCl (20 mM, pH 7.5), затем колонку промывали раствором мочевины (6.5 М, pH 7.5). Элюцию регистрировали по интенсивности поглощения (Uvicord S 2138, LKB, Швеция), а также по данным АТФ-азной активности GroEL, SDS-электрофореза и флуоресценции. Количество GroEL, присоединенного к ненативному носителю, оценивали, исходя из площадей под пиками элюции. Процент комплекса GroEL – ненативная мишень вычисляли следующим образом:

$$\% \text{ комплекса GroEL с белковой мишенью} = \frac{\text{количество GroEL, связавшегося с аффинным носителем}}{\text{количество GroEL, нанесенного на колонку}} \times 100\%$$

Результаты и обсуждение

Подбор условий связывания GroEL с аффинным носителем. Проведенные ранее исследования связывания GroEL с ненативным пепсином (pH 7.5) в растворе показали, что на прочность комплекса оказывают влияние двухвалентные катионы (ионы Mg²⁺ и Ca²⁺), а также ионная сила раствора (Aoki, 1997; Pask, 1999). При низких ионных силах (20-40 mM) присутствие высоких концентраций двухвалентных катионов (~10 mM) является необходимым условием образования прочного комплекса (Марченко, 2005). Вместе с тем, повышение ионной силы раствора стабилизирует комплекс GroEL с ненативным пепсином даже в отсутствие двухвалентных катионов (Aoki, 1997; Pask, 1999). К факторам, дестабилизирующим комплекс GroEL с ненативным пепсином, относится также присутствие адениловых нуклеотидов (АДФ или АТФ) и особенно ко-шаперона GroES (Aoki, 1997; Марченко, 2005). Таким образом, комплекс GroEL с ненативным пепсином обеспечивается неким балансом гидрофобных и электростатических взаимодействий, который поддерживается условиями внешней среды.

Для проверки влияния условий внешней среды на сродство GroEL к аффинному носителю на основе денатурированного пепсина был использован шаперон, выделенный стандартным методом (Lissin, 1990) и очищенный от триптофан-содержащей примеси с помощью хроматографии на гидрофобном носителе (Murai, 1996). Очищенный таким образом GroEL прочно взаимодействует с аффинным носителем в присутствии ионов Mg²⁺ или Ca²⁺ (см. табл. 1). Оценка ёмкости аффинного носителя показала, что в этих условиях по крайней мере 3 мг очищенного GroEL может прочно связываться с 1 мл аффинного носителя. Элюция GroEL с аффинного носителя легко осуществляется буфером низкой ионной силы (20 mM Tris-HCl, pH 7.5), не содержащим двухвалентных катионов, в котором GroEL полностью теряет сродство к аффинному носителю (табл. 1). При этом шаперон элюирует в сравнительно небольшом объеме, оставаясь полностью нативным (рис. 1). Данные, приведенные в таблице 1, показывают, что в отсутствие двухвалентных катионов (ионов Mg²⁺ или Ca²⁺) GroEL прочно связывается с ненативным пепсином только при достаточно высокой ионной силе раствора (~600 mM). Можно предположить, что при низкой ионной силе электростатическое отталкивание между отрицательно заряженными при pH 7.5 молекулами GroEL (-19 на субъединицу) и пепсина (-32) превышает их притяжение за счёт гидрофобных взаимодействий. Увеличение же ионной силы раствора или сольватация двухвалентных катионов молекулами GroEL резко уменьшают их электростатическое отталкивание от молекул денатурированного пепсина, что и обеспечивает их прочный комплекс за счёт гидрофобных взаимодействий.

Отсутствие взаимодействия GroEL с ненативным пепсином при низкой ионной силе раствора в отсутствие двухвалентных катионов и наоборот, их прочное взаимодействие при высоких ионных

силах (табл. 1), даєть можливість достатньо просто очищати шаперон від триптофан-содержащих примесей и выделять его непосредственно из осветлённого центрифугированием клеточного лизата.

Таблиця 1.
Влияние ионной силы и концентрации двухвалентных катионов на взаимодействие GroEL с аффинным носителем на основе денатурированного пепсина

Концентрации солей в буфере нанесения		Ионная сила (мМ)	GroEL, связанный с аффинным носителем (%)
KCl, NaCl или NH ₄ Cl (мМ)	MgCl ₂ или CaCl ₂ (мМ)		
0	0	20	0
	20	80	100
20	0	40	0
	10	70	100
100	0	120	5
	10	150	100
600	0	620	100
	10	650	100

Очистка GroEL, выделенного стандартным способом, от триптофан-содержащей примеси. Как отмечалось выше, GroEL, выделенный из клеточного лизата стандартными методами ионообменной и гель-хроматографий, часто содержит прочно связанные с ним триптофан-содержащие примеси (Haueg-Hartl, 1993), освобождение от которых требует дополнительных усилий и значительно снижает выход белка (Clark, 1998; Murai, 1996; Todd, 1998).

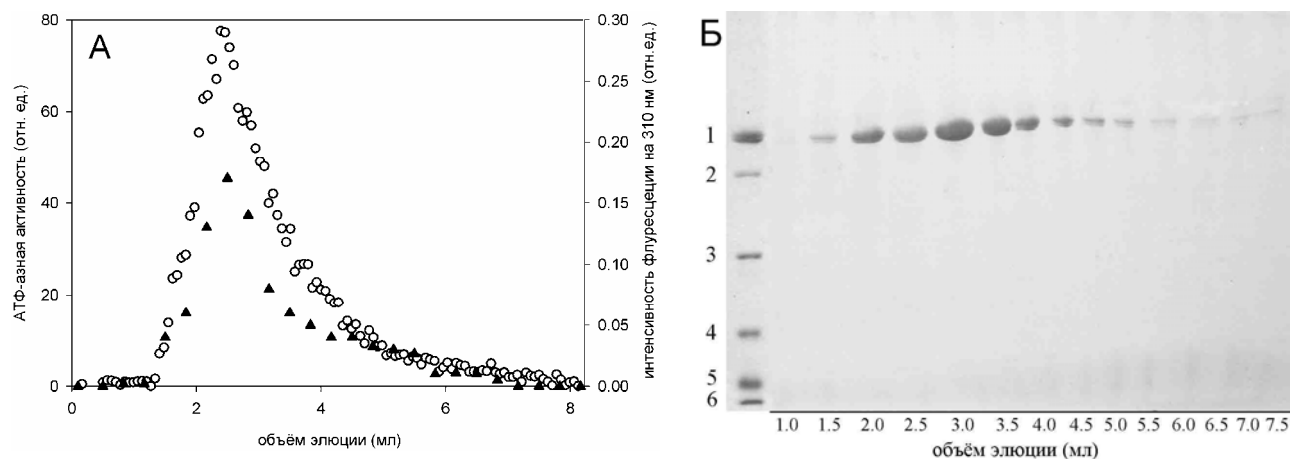


Рис. 1. Профили элюции GroEL с аффинного носителя, зарегистрированные:
А – по АТФ-азной активности (○) и тирозиновой флуоресценции (▲) на длине волны 310 нм (длина волны возбуждения – 270 нм);
Б – SDS-электрофорезом (стандарты молекулярных масс: 1 – 60 кДа, 2 – 45 кДа, 3 – 29 кДа, 4 – 23 кДа, 5 – 12.5 кДа, 6 – 6.5 кДа)

Использование аффинной хроматографии на основе денатурированного пепсина позволяет достаточно просто освободиться от такой примеси. На рисунке 2 представлены данные SDS-электрофореза и флуоресцентной спектроскопии GroEL, выделенного стандартным методом, до и после аффинной хроматографии. Видно, что несмотря на то, что очищенный стандартным способом GroEL выглядит электрофоретически как хорошо очищенный (рис. 2 А, слот 1), спектр его флуоресценции содержит большой вклад триптофановой составляющей ($\lambda_{\text{макс}} \sim 350$ нм (рис. 2 Б, 1)).

Нанесение этого препарата GroEL на аффинный носитель в условиях высокой ионной силы (600 мМ) при отсутствии двухвалентных катионов приводит к тому, что GroEL связывается с носителем (рис. 2 А, слот 2), а триптофан-содержащая примесь выходит в проскоке (рис. 2 Б, 2). Элюированный с аффинного носителя GroEL (рис. 2 А, слот 3) практически не содержит триптофан-содержащей примеси и его спектр флуоресценции содержит только тирозиновую составляющую (рис. 2 Б, 3), как это и следует из его аминокислотной последовательности (Hemmingsen, 1988). По-видимому, при высокой ионной силе взаимодействие GroEL с триптофан-содержащей примесью сильно ослабляется и она не может удержаться на прочно связанном с аффинным носителем шапероне.

Аффинная очистка GroEL из клеточного лизата. Аффинная хроматография на основе ненативных белков представляется одним из перспективных подходов к разработке методов быстрой и высокоэффективной очистки GroEL и подобных ему шаперонов непосредственно из клеточного лизата (Evers, 1993). Это, в свою очередь, представляет интерес как для биотехнологических целей (например, для получения шаперонов из различных организмов с целью их использования для реактивации белков из «телец включения»), так и для экспресс-анализа содержания шаперонов в патогенных клетках, что может быть полезным для разработки новых диагностических систем.

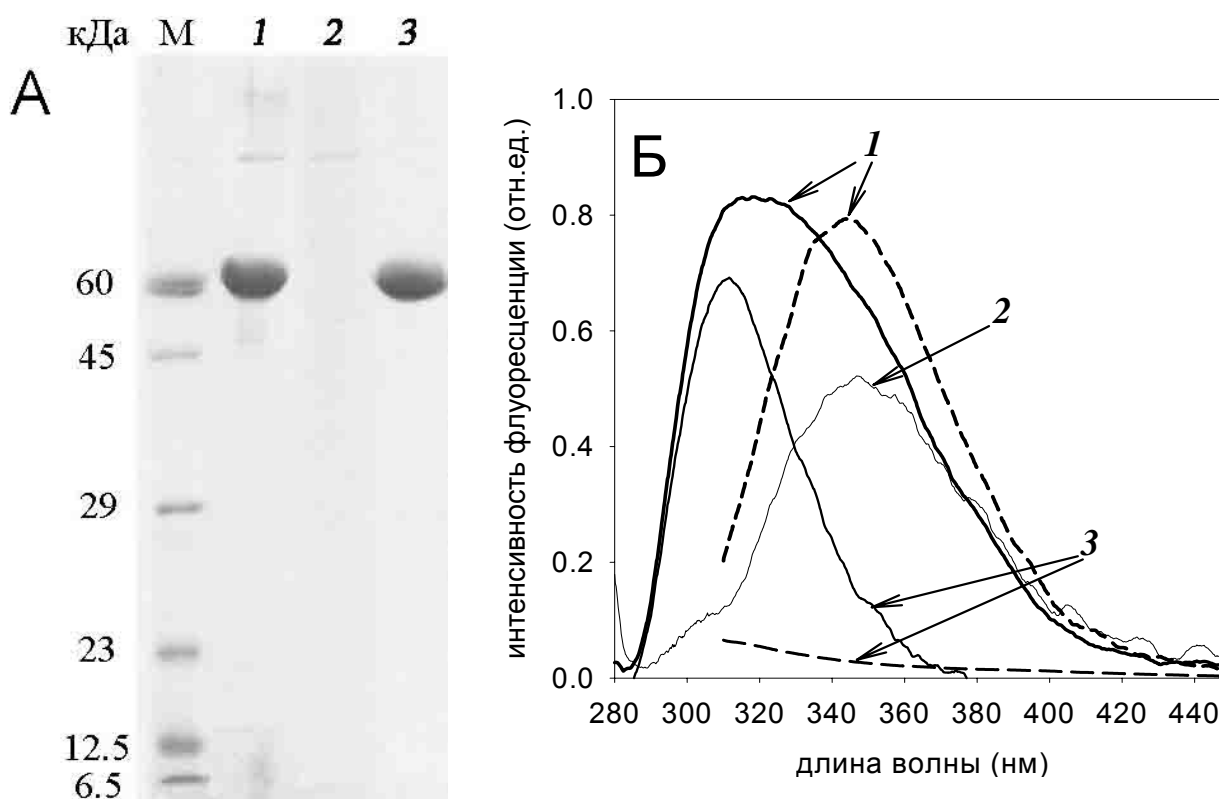


Рис. 2. SDS-электрофорез (А) и спектры флуоресценции (Б) образцов GroEL после стандартной очистки до нанесения на аффинную колонку (1); примесь, выходящая в проскоке при нанесении в 600 мМ ионной силе (2); GroEL, элюированный с аффинного носителя 20 мМ Tris-HCl буфером pH 7.5 (3). Спектры флуоресценции измерены при длине волны возбуждающего света 270 нм (сплошные линии) и 293 нм (штриховые линии)

На рисунке 3 представлены результаты аффинной хроматографии на основе денатурированного пепсина клеточного лизата, осветленного центрифугированием после экспрессии в клетках *E.coli* гена *groE* (см. Материалы и методы). Осветленный лизат (рис. 3 А, слот 1) в количестве 2 мл наносили на колонку с 20 мл аффинного носителя в 20 мМ Tris-HCl pH 7.5, 5 мМ ЭДТА, 600 мМ NaCl буфере. Связавшийся с аффинным носителем GroEL элюировали 20 мМ Tris-HCl буфером, pH 7.5 (рис. 3 А, слоты 2-6). Как видно из рисунка 3, очищенный таким образом GroEL не только электрофоретически чистый (рис. 3 А) и нативный (рис. 3 Б), но и не содержит триптофановой флуоресценции (рис. 3 Б, врезка).

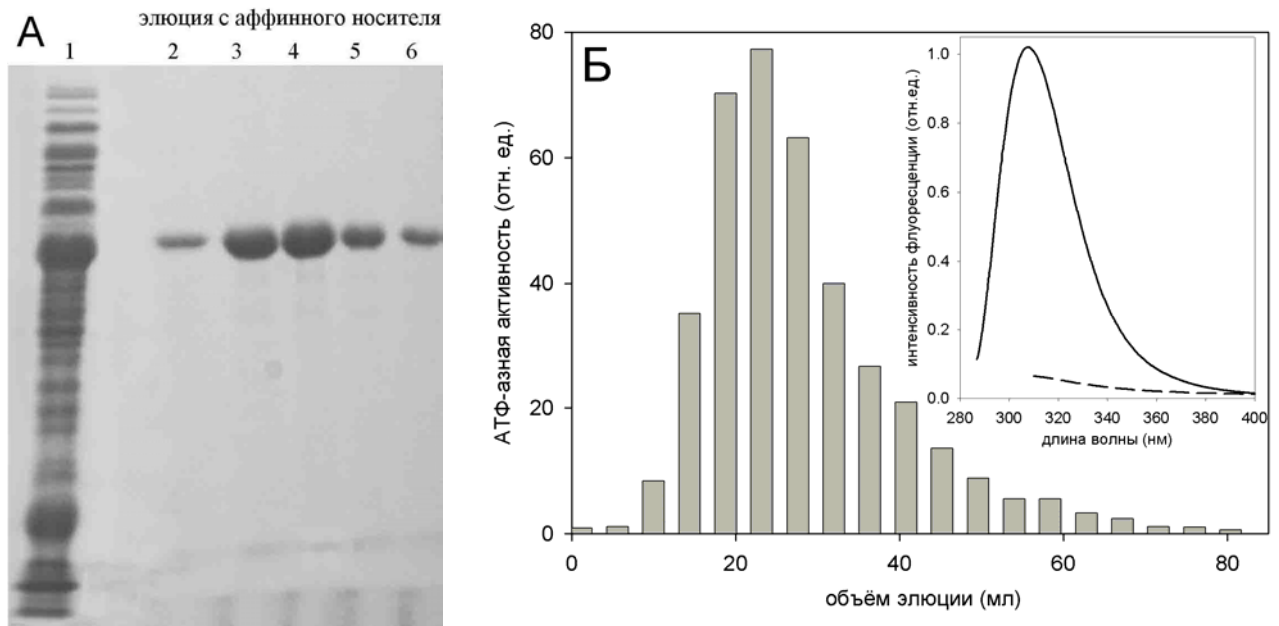


Рис. 3. Аффинная очистка GroEL из осветленного центрифугированием лизата клеток *E.coli* после экспрессии в них groE-оперона (см. Материалы и методы):

А – SDS-электрофорезы клеточного лизата до нанесения на аффинную колонку (1) и фракций элюции GroEL с аффинного носителя в области пика (2-6);

Б – профиль элюции GroEL с аффинного носителя, зарегистрированный по АТФ-азной активности. На врезке представлены спектры флуоресценции GroEL после аффинной очистки при длине волны возбуждения 270 нм (—) и 293 нм (---)

Выводы

Результаты работы указывают на высокую эффективность очистки GroEL на аффинном носителе с ковалентно иммобилизованным ненативным пепсином. Описанный нами подход позволяет очищать GroEL в одну стадию из клеточного лизата. Полученный шаперон обладает высокой степенью чистоты, не требует дальнейших этапов очистки, смены буфера и концентрирования, что, несомненно, повышает выход GroEL и позволяет избежать его потерь в ходе очистки. Прочное взаимодействие GroEL с аффинным носителем в описанных нами условиях и минимальные потери шаперона на стадии очистки предоставляют возможность экспресс-анализа содержания GroEL и GroEL-подобных шаперонов в клетках, тканях и органах различных организмов, в том числе подвергнувшихся воздействию различных стрессов.

Работа поддержана грантами Московской области и РФФИ (№ 04-04-47293-Р и № 03-04-49123), грантом ННМИ № 55000305, программой МКБ РАН – № 10002-251/П//145-161/140503-089, грантом Президента РФ – № НШ-1968.2003.4.

Список литературы

- Марченко Н.Ю., Марченков В.В., Котова Н.В. та ін. Комплекс шаперону GroEL із флуоресцеїн-міченим денатурованим пепсином: стехіометрія і роль лігандів // Біофізичний вісник. - 2005. - в печати.
- Aoki K., Taguchi H., Shindo Y. et al. Calorimetric observation of a GroEL-protein binding reaction with little contribution of hydrophobic interaction // J.Biol.Chem. - 1997. - Vol.272. - P. 32158-32162.
- Axen R., Porath J., Ernback S. Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides // Nature. - 1967. - Vol.214. - P. 1302-1304.
- Blennow A., Surin B.P., Ehring H. et al. // Isolation and biochemical characterization of highly purified Escherichia coli molecular chaperone Cpn60 (GroEL) by affinity chromatography and urea-induced monomerization Biochim.Biophys.Acta. - 1995. - Vol.1252. - P. 69-78.
- Braig K., Otwinowski Z., Hegde R. et al. The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å // Nature. - 1994. - Vol.371. - P. 578-586.
- Clark A.C., Ramanathan R., Frieden C. Purification of GroEL with low fluorescence background // Methods Enzymol. - 1998. - Vol.290. - P. 100-118.

- Ellis R.J. Discovery of molecular chaperones // Cell Stress.Chaperones. - 1996. - Vol.1. - P. 155-160.
- Evers M.E., Huhse B., Titorenko V.I. et al. Affinity purification of molecular chaperones of the yeast *Hansenula polymorpha* using immobilized denatured alcohol oxidase // FEBS Lett. - 1993. - Vol.321. - P. 32-36.
- Fenton W.A., Horwich A.L. Chaperonin-mediated protein folding: fate of substrate polypeptide // Q.Rev.Biophys. - 2003. - Vol.36. - P. 229-256.
- Fenton W.A., Kashi Y., Furtak K. et al. Residues in chaperonin GroEL required for polypeptide binding and release // Nature. - 1994. - Vol.371. - P. 614-619.
- Goloubinoff P., Christeller J.T., Gatenby A.A. et al. Reconstitution of active dimeric ribulose biphosphate carboxylase from an unfolded state depends on two chaperonin proteins and Mg-ATP // Nature. - 1989. - Vol.342. - P. 884-889.
- Hayer-Hartl M.K., Hartl F.U. A comment on: "The aromatic amino acid content of the bacterial chaperone protein groEL (cpn60): evidence for the presence of a single tryptophan", by N.C. Price, S.M. Kelly, S. Wood and A. auf der Mauer (1991) FEBS Lett. 292, 9-12 // FEBS Lett. - 1993. - Vol.320. - P. 83-84.
- Hemmingsen S.M., Woolford C., van der Vies S.M. et al. Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly // Nature. - 1988. - Vol.333. - P. 330-334.
- Lanzetta P.A., Alvarez L.J., Reinach P.S. et al. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate // Anal.Biochem. - 1979. - Vol.100. - P. 95-97.
- Lin Z., Schwartz F.P., Eisenstein E. The hydrophobic nature of GroEL-substrate binding // J.Biol.Chem. - 1995. - Vol.270. - P. 1011-1014.
- Lissin N.M., Venyaminov S.Y., Girshovich A.S. (Mg-ATP)-dependent self-assembly of molecular chaperone GroEL // Nature. - 1990. - Vol.348. - P. 339-342.
- Motojima F., Makio T., Aoki K. et al. Hydrophilic residues at the apical domain of GroEL contribute to GroES binding but attenuate polypeptide binding // Biochem.Biophys.Res.Commun. - 2000. - Vol.267. - P. 842-849.
- Murai N., Makino Y., Yoshida M. GroEL locked in a closed conformation by an interdomain cross-link can bind ATP and polypeptide but cannot process further reaction steps // J.Biol.Chem. - 1996. - Vol.271. - P. 28229-28234.
- Nam S.H., Walsh M.K. Affinity purification and characterization of the *Escherichia coli* molecular chaperones // Protein Expr.Purif. - 2002. - Vol.24. - P. 282-291.
- Pack C.G., Aoki K., Taguchi H. et al. Effect of electrostatic interactions on the binding of charged substrate to GroEL studied by highly sensitive fluorescence correlation spectroscopy // Biochem. Biophys.Res.Commun. - 2000. - Vol.267. - P. 300-304.
- Pack C.G., Nishimura G., Tamura M. et al. Analysis of interaction between chaperonin GroEL and its substrate using fluorescence correlation spectroscopy // Cytometry. - 1999. - Vol.36. - P. 247-253.
- Price N.C., Kelly S.M., Wood S. et al. The aromatic amino acid content of the bacterial chaperone protein groEL (cpn60). Evidence for the presence of a single tryptophan // FEBS Lett. - 1991. - Vol.292. - P. 9-12.
- Todd M.J., Lorimer G.H. Criteria for assessing the purity and quality of GroEL // Methods Enzymol. - 1998. - Vol.290. - P. 135-141.
- Viitanen P.V., Gatenby A.A., Lorimer G.H. Purified chaperonin 60 (groEL) interacts with the nonnative states of a multitude of *Escherichia coli* proteins // Protein Sci. - 1992. - Vol.1. - P. 363-369.
- Viitanen P.V., Lubben T.H., Reed J. et al. Chaperonin-facilitated refolding of ribulosebiphosphate carboxylase and ATP hydrolysis by chaperonin 60 (groEL) are K⁺ dependent // Biochemistry. - 1990. - Vol.29. - P. 5665-5671.

ОДНОСТАДІЙНЕ ОЧИЩЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО ШАПЕРОНУ GroEL МЕТОДОМ АФІННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ НА ОСНОВІ ДЕНАТУРОВАНОГО ПЕПСИНУ

Н.Ю.Марченко, В.В.Марченков, А.Л.Кайшева, І.А.Кашпаров, Н.В.Котова, П.А.Каліман, Г.В.Семіотнов

GroEL (олігомерний білок теплового шоку клітин *Escherichia coli*) є представником групи молекулярних шаперонів, що здатні запобігати агрегації денатурованих конформаційних станів білкових молекул шляхом взаємодії з ними. У представленій роботі продемонстровано можливість швидкого і високоефективного очищення GroEL на хроматографічному носії (сефарозі) з ковалентно пришитим ненативним пепсином. Представлено умови, що дозволяють одержати високоочищений нативний GroEL (за даними SDS-електрофорезу в поліакриламідному гелі, флуоресцентної спектроскопії й АТФ-азної активності) із клітинного лізату в одну стадію очищення. Метод афінної хроматографії може бути використаний як для препаративного виділення GroEL і подібних йому шаперонів із різних типів клітин, так і для

експрес-аналізу змісту шаперонів у клітинах після впливу на них різноманітних стресів або патогенних факторів.

Ключові слова: білок - білкові взаємодії, шаперони, GroEL, афінна хроматографія.

SINGLE-STAGE PURIFICATION OF MOLECULAR CHAPERONE GroEL BY THE AFFINITY CHROMATOGRAPHY ON A BASIS OF DENATURED PEPSIN
N.Yu.Marchenko, V.V.Marchenkov, A.L.Kaysheva, I.A.Kashparov, N.V.Kotova, P.A.Kaliman, G.V.Semisotnov

GroEL (oligomeric heat-shock protein of *Escherichia coli* cells) is a representative of a group of molecular chaperones that are able to prevent aggregation of nonnative conformational states of proteins by an interaction with them. In the present work we demonstrate a possibility of fast and high-effective purification of GroEL using the chromatography carrier (sepharose) with nonnative pepsin covalently bound to it. The conditions that allow to produce high-purity native GroEL (on the data of SDS-electrophoresis in polyacrylamide gel, fluorescence spectroscopy and ATP-ase activity) from cell lysate in one step of purification are presented. The method of affinity chromatography can be used for preparative isolation of GroEL and GroEL-like chaperones from different types of cells as well as for express-analysis of a content of chaperones in cells after the action of different stress or pathogenic factors.

Key words: *protein-protein interaction, chaperones, GroEL, affinity chromatography.*

Представлено Ф.С. Леонтієвою
Рекомендовано до друку Є.Е.Перським