

УДК: 577.112+577.22

## ВЛИЯНИЕ ДВУХВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО ШАПЕРОНА GroEL С НЕНАТИВНЫМИ БЕЛКОВЫМИ МИШЕНЯМИ

Н.Ю.Марченко

*Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)*

Предотвращение неспецифической агрегации ненативных белков путем обратимого взаимодействия с ними – одна из основных функций молекулярного шаперона GroEL (олигомерного белка теплового шока клеток *Escherichia coli*). В настоящей работе методом аффинной хроматографии исследовано взаимодействие GroEL с белковыми мишенями различного общего заряда, обладающими различной степенью экспонированности гидрофобных кластеров и не имеющими жесткой пространственной структуры. Показано, что существует группа ненативных белков, на связывание которых с молекулярным шапероном GroEL существенное влияние оказывают ионы  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$ . Ненативные белки, связывание которых с GroEL при нейтральных pH (~7,5) и умеренных ионных силах раствора (до 150 мМ) требует присутствия ионов  $Mg^{2+}$  или  $Ca^{2+}$ , имеют при этом pH общий отрицательный заряд. На связывание белков, имеющих общий положительный заряд, ионы  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  не влияют.

Ключевые слова: белок-белковые взаимодействия, шапероны, GroEL, аффинная хроматография.

### Введение

Шаперонная система клеток *Escherichia coli*, состоящая из двух олигомерных белков (GroEL и GroES), обеспечивает правильное сворачивание и специфическую олигомеризацию других белков как *in vivo*, так и *in vitro* (Fenton, Horwich, 1997). Одна из основных функций этой системы заключается в связывании различных полипептидных цепей, лишенных жесткой третичной структуры, что предотвращает их неспецифическую агрегацию (Hartl, Hayer-Hartl, 2002; Viitanen et al., 1992). Считается, что основными взаимодействиями, стабилизирующими комплекс GroEL с ненативными белковыми мишенями, являются гидрофобные взаимодействия (Fenton et al., 1994; Lin et al., 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 et al., 2000; Viitanen et al., 1990). Белки-мишени, с которыми связывается GroEL, сильно различаются по многим параметрам, например, размеру, степени экспонированности гидрофобных кластеров, заряду, компактности и т. д., хотя большинство авторов сходятся на том, что белковыми субстратами шаперонов являются компактные интермедиаты сворачивания, проявляющие свойства «расплавленной глобулы» (Fenton, Horwich, 1997). Кроме ненативных полипептидных цепей, GroEL связывает адениловые нуклеотиды (АТФ, АДФ), а также другой олигомерный белок – кошаперон GroES (Fenton, Horwich, 1997). GroEL обладает слабой АТФазной активностью, и в процессе его функционирования, помимо адениловых нуклеотидов, участвуют ионы  $K^+$  и  $Mg^{2+}$  (Goloubinoff et al., 1989; Viitanen et al., 1990). Несмотря на значительное количество исследований механизма функционирования GroEL, данных о влиянии лигандов GroEL и внешних условий на взаимодействие шаперона со своими белковыми мишенями немного, и они несистематичны (Goloubinoff et al., 1989; Katsumata et al., 1996; Pack et al., 2000). Отсутствие планомерных исследований такого рода не дает возможности обобщить результаты, полученные в различных условиях и на различных белковых мишенях, и прояснить роль гидрофобных и электростатических взаимодействий в формировании комплекса GroEL с белковыми мишенями, обладающими различными физико-химическими свойствами.

Основной задачей данной работы является исследование влияния двухвалентных катионов ( $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$ ) при физиологической ионной силе (150 мМ) на взаимодействие GroEL с белками различного общего заряда, не имеющими жесткой третичной структуры и не способными приобрести ее в присутствии GroEL. Исследование проводилось с помощью разработанной в Институте белка РАН (г. Пуцино, Московская обл., Россия) методики аффинной хроматографии GroEL на сефарозе с ковалентно пришитыми к ней белками-мишенями. Показано, что для образования прочного комплекса GroEL с отрицательно заряженными (при pH~7,5) белковыми мишенями необходимо присутствие двухвалентных катионов ( $Mg^{2+}$  или  $Ca^{2+}$ ). На связывание белков, имеющих при этом pH положительный заряд, ионы  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  не влияют.

### Объекты и методы исследования

**Реактивы и белки.** В работе использованы: цитохром с сердца лошади («Sigma», США), из которого был получен апоцитохром в соответствии с методикой, описанной Фишером (Fisher et al., 1973); рибонуклеаза А поджелудочной железы быка («Sigma», США); альфа-лактальбумин молока человека («Sigma», США); лизоцим яичного белка («Реахим», Россия); казеин молока коровы («Sigma», США); пепсин слизистой оболочки желудка свиньи («Sigma», США); CNBr-активированная сефароза 4В («Pharmacia Biotech», Швеция); хлористые калий, кальций и магний («Реахим», Россия); мочевины («Реахим», Россия); трис(гидроксиметил)аминометан (Tris) («Serva», Германия); дитиотрейтол (ДТТ) («Serva», Германия); 8-анилинонафтален-1-сульфонат аммониевая соль (АНС) («Serva», Германия). GroEL выделялся по известной методике (Lissin et al., 1990) после экспрессии в клетках *E. coli* (штамм HB101) мультикопийной плазмиды pGroE4 (полный groE оперон *E. coli*, клонированный в EcoR1 сайте вектора pACYC184) (Lissin et al., 1990). Чистоту препарата определяли методами электрофореза в полиакриламидном геле (Laemmli, 1970) и флуоресцентной спектроскопии (Clark et al., 1998). Концентрацию белков определяли спектрофотометрически по поглощению на 280 нм, используя коэффициенты экстинкции ( $A_{1\text{см}}^{0.1\%}$ ), равные 0,9 для апоцитохрома с, 0,6 для рибонуклеазы А, 1,6 для альфа-лактальбумина, 2,7 для лизоцима, 1,0 для казеина, 1,4 для пепсина и 0,2 для GroEL. Заряд белков рассчитывали по их аминокислотной последовательности при pH 7,5 (отрицательно заряжены аспарагиновая и глутаминовая кислоты, положительно заряжены аргинин и лизин).

**Изготовление аффинного носителя.** Аффинные носители были созданы на основе CNBr-активированной сефарозы 4В по известной методике (Axen et al., 1967). 20 мг белка-мишени в буфере А (0,1 М NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 М NaCl, pH 9) инкубировали 16 часов с 6 мл BrCN-активированной сефарозы при непрерывном перемешивании (при 4°C). Непрореагировавший белок отмывали буфером А и количество непрореагировавшего белка-мишени определяли спектрофотометрически (всегда ~10%). Оставшиеся активные группы блокировали инкубацией с буфером Tris-HCl (0,1 М, pH 8) в течение 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), а затем буфером Tris-HCl (0,1 М, pH 8), содержащим NaCl (0,5 М)). Приготовленные таким образом носители хранили при 4°C.

**Аффинная хроматография.** В работе были использованы хроматографические колонки 5 × 25 мм. Эксперименты проводились при комнатной температуре в стандартном 20 мМ Tris-HCl буфере, pH 7,5, содержащем 100 мМ KCl, 20 мМ ДТТ (ДТТ добавляли только при работе с дисульфидсодержащими рибонуклеазой А, альфа-лактальбумином и лизоцимом), а также, где указано, 10 мМ MgCl<sub>2</sub> или CaCl<sub>2</sub>. Скорость потока сохраняли постоянной и равной 10 мл/час с использованием перистальтического насоса (Minipuls 3, «Gilson», Франция). GroEL наносили на аффинную колонку в концентрации ~2 мг/мл в объеме 150 мкл. Аффинно связанный GroEL элюировали буфером Tris-HCl (20 мМ, pH 7,5), содержащим 20 мМ Mg<sup>2+</sup>-АТФ; затем колонку промывали раствором мочевины (6,5 М, pH 7,5). Элюцию GroEL регистрировали по интенсивности поглощения на длине волны 280 нм (Uvicord S 2138, «LKB», Швеция), а также по данным АТФазной активности (Lanzetta et al., 1979), электрофореза и флуоресценции. Количество GroEL, связавшегося с аффинным носителем, оценивали, исходя из площадей под пиками элюции.

**Связывание АНС.** В образцы белков-мишеней (0,14 мМ) в буфере Tris-HCl (20 мМ, pH 7,5), содержащем 100 мМ KCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, а также 20 мМ ДТТ (ДТТ использовали только при работе с рибонуклеазой А, альфа-лактальбумином и лизоцимом), добавляли АНС (конечные концентрации белков и АНС составили 0,0014 и 0,028 мМ, соответственно). Спектры флуоресценции АНС в отсутствие и в присутствии ненативных белков-мишеней (апоцитохрома с, рибонуклеазы А, альфа-лактальбумина, лизоцима, казеина, пепсина) измеряли на спектрофлуориметре RF-5301PC («Shimadzu», Япония) при 20°C. Длина волны возбуждения составляла 340 нм, а регистрация спектров флуоресценции осуществлялась в интервале 345–600 нм. Оценка сродства АНС к белковой мишени производилась по разнице интенсивности флуоресценции АНС в отсутствие и в присутствии белков на длине волны 480 нм.

### Результаты и обсуждение

Для исследования взаимодействия GroEL с ненативными белками были выбраны белки-мишени, которые: во-первых, в нативных для GroEL условиях не обладают жесткой третичной структурой и не могут её приобрести ни самостоятельно, ни в присутствии GroEL; во-вторых, имеют различную молекулярную массу и заряд (см. табл. 1). Это небольшие глобулярные белки, стабилизированные дисульфидными связями (рибонуклеаза А, альфа-лактальбумин, лизоцим), которые в присутствии восстановителя (20 мМ ДТТ) теряют нативную конформацию (в то время как присутствие ДТТ не влияет ни на структуру GroEL, ни на его способность к связыванию ненативных

белков). Кроме того, были выбраны апоцитохром с (не имеет жесткой пространственной структуры в отсутствие гема), пепсин (ненативен при pH 7,5) и казеин (в нативном состоянии не имеет жесткой третичной структуры). Существенным свойством белков, не имеющих жесткой пространственной структуры, является их склонность к агрегации, в связи с чем исследование взаимодействия таких белков с GroEL в растворе затруднено. В данной работе мы использовали для исследования связывания GroEL с белками-мишенями метод аффинной хроматографии на сефарозе с ковалентно присоединёнными к ней белками-мишенями, что позволяет избежать их необратимой агрегации и, таким образом, исследовать широкий спектр белковых мишеней.

Таблица 1.

## Белковые мишени для взаимодействия с GroEL и их характеристика

Белок	M <sup>1</sup> , кДа	Заряд <sup>2</sup>	Условия, при которых отсутствует жёсткая третичная структура	«Гидрофобность» <sup>3</sup> , отн. ед.
апоцитохром с	11,7	+9	pH 7,5, 100 мМ KCl	0,20
рибонуклеаза А	13,7	+4	pH 7,5, 100 мМ KCl, 20 мМ ДТТ	0,01
лизоцим	14,3	+8	pH 7,5, 100 мМ KCl, 20 мМ ДТТ	1,00
альфа-лактальбумин	14,1	-7	pH 7,5, 100 мМ KCl, 20 мМ ДТТ	1,20
казеин	22,5	-12	pH 7,5, 100 мМ KCl	0,24
пепсин	34,6	-32	pH 7,5, 100 мМ KCl	0,01

<sup>1</sup> M – молекулярная масса.

<sup>2</sup> Заряд – расчетный заряд при pH 7,5; см. Объекты и методы исследования.

<sup>3</sup> «Гидрофобность» – степень экспонированности гидрофобных кластеров, определяемая по сродству к гидрофобному зонду АНС (разница в интенсивности флуоресценции АНС в отсутствие и в присутствии белка); см. Объекты и методы исследования.

В табл. 2 представлены результаты исследования влияния двухвалентных катионов на взаимодействие GroEL с различными белковыми мишенями.

Таблица 2.

## Влияние двухвалентных катионов на взаимодействие GroEL с ненативными белковыми мишенями

Белок	Наличие прочного комплекса GroEL с ненативным белком <sup>1</sup>		
	+ Mg <sup>2+</sup> – Ca <sup>2+</sup>	– Mg <sup>2+</sup> + Ca <sup>2+</sup>	– Mg <sup>2+</sup> – Ca <sup>2+</sup>
апоцитохром с	+	+	+
рибонуклеаза А	+	+	+
лизоцим	+	+	+
альфа-лактальбумин	+	+	–
казеин	+	+	–
пепсин	+	+	–

<sup>1</sup> Прочный комплекс GroEL с ненативным белком считается образовавшимся (+), если более 90% наносимого на аффинную смолу шаперона связывается с хроматографическим носителем; отсутствие прочного комплекса (–) наблюдается, если с хроматографическим носителем связывается менее 10% наносимого на аффинную смолу шаперона; см. Объекты и методы исследования.

Из данных, приведенных в табл. 1 и 2, видно, что при средней ионной силе (20 мМ Tris-HCl, 100 мМ KCl) в присутствии ионов  $Mg^{2+}$  или  $Ca^{2+}$  все ненативные белковые мишени взаимодействуют с GroEL. Однако в отсутствие двухвалентных катионов обнаруживается группа белков, взаимодействие которых с GroEL в значительной степени ослаблено. Влияние ионов  $Mg^{2+}$  или  $Ca^{2+}$  на сродство GroEL к белку-мишени не связано ни с размером белка, ни со степенью экспонированности его гидрофобных кластеров, но связано с общим зарядом молекулы белка-мишени. Присутствие двухвалентных катионов необходимо для прочного взаимодействия GroEL с отрицательно заряженными ненативными белками и не играет существенной роли при взаимодействии GroEL с положительно заряженными ненативными белковыми молекулами.

Следует отметить, что представленные результаты согласуются с литературными данными о влиянии двухвалентных катионов на сродство GroEL к денатурированным пепсину, альфа-лактальбумину и апоцитохрому с, полученными методом флуоресцентной корреляционной спектроскопии (Pack et al., 1999), а также с данными, полученными методом гель-фильтрации флуоресцентно-меченого пепсина (Марченко та ін., 2005) и измерениями анизотропии флуоресценции флуоресцентно-меченого пепсина, лизоцима и альфа-лактальбумина в растворе (не опубликовано). В то же время, использование выбранного нами метода (аффинной хроматографии на основе сефарозы с ковалентно присоединёнными к ней белками-мишенями) позволило расширить спектр белковых мишеней по сравнению с известными работами (Aoki et al., 1997; Pack et al., 1999), благодаря чему можно утверждать, что двухвалентные катионы необходимы для взаимодействия GroEL именно с отрицательно заряженными ненативными белковыми мишенями при физиологических ионных силах.

Полученный результат не является тривиальным, так как предполагается, что основным видом взаимодействий, стабилизирующих комплекс GroEL с ненативной белковой мишенью, являются гидрофобные взаимодействия. Немногочисленные работы, указывающие на важный вклад электростатических взаимодействий в стабилизацию такого комплекса, до сих пор мало принимаются во внимание. Обратим внимание также, что необходимость присутствия ионов магния для функционирования GroEL подчёркивалась и ранее. Указывалось, что магний стабилизирует структуру GroEL (Azem et al., 1994; Surin et al., 1997) и необходим для его функционирования как молекулярного шаперона (Diamant et al., 1995; Goloubinoff et al., 1989; Viitanen et al., 1992). Однако тщательные исследования роли ионов магния в шаперон-зависимом сворачивании белков не проводились. Результаты нашей работы указывают на то, что присутствие ионов  $Mg^{2+}$  абсолютно необходимо для обеспечения взаимодействия GroEL с отрицательно заряженными белками-мишенями, и что для осуществления этой функции GroEL ионы  $Mg^{2+}$  можно без ущерба заменять ионами  $Ca^{2+}$ .

Любопытно, что двухвалентные катионы увеличивают степень гидрофобности самого GroEL (Brazil et al., 1998), а добавление отрицательно заряженных АДФ или АТФ к комплексу GroEL как с отрицательно, так и с положительно заряженными белковыми мишенями в присутствии ионов  $Mg^{2+}$  сильно дестабилизирует комплекс в зависимости от концентрации нуклеотидов (Fenton, Horwich, 1997; Марченко та ін., 2005). Создается впечатление, что сродство GroEL к ненативным белкам определяется достаточно тонким балансом гидрофобных (притяжение) и электростатических (притяжение и отталкивание) взаимодействий. Оценка вклада гидрофобных и электростатических взаимодействий в стабилизацию комплексов GroEL с различными белковыми мишенями при различных внешних условиях является предметом дальнейших исследований.

Резюмируя вышеизложенное, можно сделать следующие выводы: при средних (физиологических) ионных силах (~150 мМ) присутствие двухвалентных катионов (магния или кальция) необходимо для взаимодействия отрицательно заряженных ненативных белковых мишеней с шапероном GroEL, в то время как присутствие двухвалентных катионов не оказывает значительного влияния на взаимодействие молекулярного шаперона GroEL с положительно заряженными (при pH 7,5) ненативными белковыми мишенями. Влияние двухвалентных катионов на сродство GroEL к ненативным белкам не зависит ни от размера этих белков, ни от степени экспонированности их гидрофобных кластеров.

Выражаю свою благодарность Н.В.Котовой за помощь в выделении GroEL, И.А.Кашпарову за приготовление аффинных носителей и Г.В.Семисотнову за прочтение рукописи и полезные обсуждения.

Работа поддержана грантами РФФИ (04-04-97293-р и 06-04-48955-а), грантом ННМИ № 55005607, программой МКБ РАН.

#### 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. – №665, вып.1(15). – С. 53–56.

- 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.
- Azem A., Diamant S., Goloubinoff P. Effect of divalent cations on the molecular structure of the GroEL oligomer // *Biochemistry.* – 1994. – Vol.33. – P. 6671–6675.
- Brazil B.T., Ybarra J., Horowitz P.M. Divalent cations can induce the exposure of GroEL hydrophobic surfaces and strengthen GroEL hydrophobic binding interactions. Novel effects of Zn<sup>2+</sup> GroEL interactions // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol.273. – P. 3257–3263.
- Clark A.C., Ramanathan R., Frieden C. Purification of GroEL with low fluorescence background // *Methods Enzymol.* – 1998. – Vol.290. – P. 100–118.
- Diamant S., Azem A., Weiss C. et al. Increased efficiency of GroE-assisted protein folding by manganese ions // *J. Biol. Chem.* – 1995. – Vol.270. – P. 28387–28391.
- Fenton W.A., Horwich A.L. GroEL-mediated protein folding // *Protein Sci.* – 1997. – Vol.6. – P. 743–760.
- 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.
- Fisher W.R., Taniuchi H., Anfinsen C.B. On the role of heme in the formation of the structure of cytochrome c // *J. Biol. Chem.* – 1973. – Vol.248. – P. 3188–3195.
- 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.
- Hartl F.U., Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein // *Science.* – 2002. – Vol.295. – P. 1852–1858.
- Katsumata K., Okazaki A., Tsurupa G.P. et al. Dominant forces in the recognition of a transient folding intermediate of alpha-lactalbumin by GroEL // *J. Mol. Biol.* – 1996. – Vol.264. – P. 643–649.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – Vol.227. – P. 680–685.
- 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.
- 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.
- Surin A.K., Kotova N.V., Kashparov I.A. et al. Ligands regulate GroEL thermostability // *FEBS Lett.* – 1997. – Vol.405. – P. 260–262.
- 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<sup>+</sup> dependent // *Biochemistry.* – 1990. – Vol.29. – P. 5665–5671.

### ВПЛИВ ДВОВАЛЕНТНИХ КАТІОНІВ НА ВЗАЄМОДІЮ МОЛЕКУЛЯРНОГО ШАПЕРОНА GroEL З НЕНАТИВНИМИ БІЛКОВИМИ МІШЕННЯМИ Н.Ю.Марченко

Запобігання неспецифічної агрегації ненативних білків шляхом оборотної взаємодії з ними є однією з основних функцій молекулярного шаперона GroEL (олігомерного білка теплового шоку клітин *Escherichia coli*). У представлений роботі за допомогою методу афінної хроматографії досліджено взаємодію GroEL з білковими мішенями різного загального заряду, що мають різний ступінь експонованості гідрофобних кластерів і не мають твердої просторової структури. Показано, що існує група ненативних білків, на зв'язування яких з молекулярним шапероном GroEL істотно впливають іони Mg<sup>2+</sup> та Ca<sup>2+</sup>. Ненативні білки, зв'язування яких з GroEL при нейтральних рН (~7,5) вимагає присутності іонів Mg<sup>2+</sup> або Ca<sup>2+</sup>, мають при цьому рН загальний

негативний заряд. На зв'язування білків, що мають загальний позитивний заряд, іони  $Mg^{2+}$  та  $Ca^{2+}$  не впливають.

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

**THE EFFECT OF DIVALENT CATIONS ON AN INTERACTION OF MOLECULAR CHAPERONE  
GroEL WITH NONNATIVE PROTEIN TARGETS**

**N.Yu.Marchenko**

One of the main functions of the molecular chaperone GroEL (oligomeric heat-shock protein of *Escherichia coli* cells) is preventing of nonspecific aggregation of nonnative proteins by reversible interaction with them. In the present work, the method of affinity chromatography is used for investigation of GroEL interaction with protein targets possessing different total charge, extent of hydrophobic clusters exposed on the solvent, and having no rigid spatial structure. It is shown that there is a group of nonnative proteins the binding of which to molecular chaperone GroEL is substantially affected by  $Mg^{2+}$  or  $Ca^{2+}$  ions. Those nonnative proteins which require the presence of  $Mg^{2+}$  or  $Ca^{2+}$  ions for binding with GroEL at neutral pH (~7,5), have a total negative charge at this pH.  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  ions do not affect the binding of proteins which have a total positive charge.

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

---

**Представлено О.П.Білозоровим  
Рекомендовано до друку В.А.Бондаренком**