



УДК 577.112.016

## БИОСИНТЕЗ И КОНФОРМАЦИОННОЕ СОСТОЯНИЕ В РАСТВОРЕ 17кДа- И 27кДа-N-КОНЦЕВЫХ ФРАГМЕНТОВ ФАКТОРА ЭЛОНГАЦИИ EF-2

© 1996 г. А. Н. Плотников, К. С. Василенко\*, М. Д. Киркитадзе\*, Н. В. Котова\*,  
Л. П. Мотуз, К. В. Коротков, Г. В. Семисотнов\*, Ю. Б. Алахов<sup>#</sup>

Филиал Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
142292, Пущино Московской обл.;

\* Институт белка РАН, Пущино Московской обл.

Поступила в редакцию 06.12.95 г.

N-Концевые фрагменты фактора элонгации EF-2 из печени крысы, содержащие 162 (17 кДа) и 244 (27 кДа) из 857 (95 кДа) аминокислотных остатков всего белка, были синтезированы как в клетках *E. coli*, так и в бесклеточной системе трансляции из зародышей пшеницы с целью исследования их конформационного состояния. В процессе синтеза оба фрагмента формировали тела включения (неспецифические агрегаты молекул). Конформационное состояние фрагментов в растворе было исследовано при нейтральных pH методами КД, флуоресцентной спектроскопии, сканирующей микрокалориметрии, вискозиметрии, гель-проникающей хроматографии и ограниченного протеолиза, а также взаимодействием с моноспецифическими антителами, полученными к целому белку, и с молекулярным шапероном GroEL/ES. Было показано, что в неденатурирующих условиях оба фрагмента существуют в растворе в виде ассоциативных форм с широким молекулярно-массовым распределением, содержат значительное количество элементов внутримолекулярной вторичной структуры и являются глобулярными, но без жесткой третичной структуры, т.е. их полипептидные цепи имеют конформационное состояние, подобное так называемой расплавленной глобуле. Жесткая третичная структура не формируется во фрагментах даже после взаимодействия с молекулярным шапероном GroEL/ES, что указывает на критическую важность наличия более протяженной C-концевой части для сворачивания в жесткую структуру. В то же время оба фрагмента содержат подобные нативным конформационные детерминанты для взаимодействия с антителами, т.е., несмотря на отсутствие жесткой третичной структуры, трехмерная организация полипептидных цепей обоих фрагментов имеет элементы, сходные с организацией соответствующих участков цепи в составе целого белка.

*Ключевые слова:* сворачивание белков, фрагменты глобулярных белков, расплавленная глобула, тела включения, фактор элонгации EF-2, молекулярный шаперон GroEL/ES.

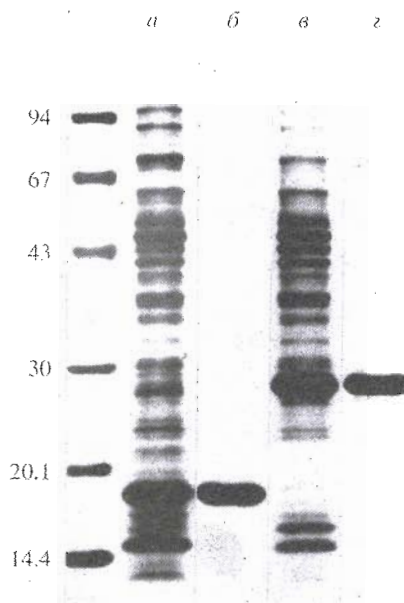
Механизм сворачивания растущей на рибосоме полипептидной цепи является ключевым для детального понимания формирования пространственной организации белковой молекулы *in vivo* [1–4]. Однако прямое исследование конформационного состояния, приобретаемого растущим на рибосоме полипептидом, затруднено рядом обстоятельств. В частности, присутствие самой рибосомы, молекулярная масса которой в сотни раз превышает молекулярную массу растущего полипептида, создает сильный белково-нуклеиновый фон при достижении полипептидом даже минимальных концентраций, необходимых для пря-

мых конформационных исследований физико-химическими методами. В числе характеристик, которые были использованы в последнее время для тестирования конформационного состояния синтезированных *in vivo* радиоактивно меченых белков, можно отметить взаимодействие с конформационно-специфическими антителами, чувствительность к протеиназам, способность к формированию дисульфидных связей и поведение при центрифугировании в градиенте плотности [5]. Однако применяемые для этих целей методы подразумевают исследование завершенной или растущей полипептидной цепи, уже сформированной домен или субдомен [6, 7], в то время как возможные промежуточные состояния молекулы, формирующиеся в процессе удлинения цепи, остаются вне поля зрения.

В этой связи представляется интересным подход, основанный на синтезе N-концевых фрагментов

Сокращения: IPTG – изопропил-β-D-галактопиранозид; PMSF – фенилметилсульфенилфторид; BSA – бычий сывороточный альбумин; TCA – трихлоруксусная кислота; PBS – калий-фосфатный буфер, pH 7.4; HEPES – N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота.

<sup>#</sup> Автор для переписки.



**Рис. 1.** Электрофоретический анализ в ПААГ в присутствии SDS N-концевых фрагментов EF-2, продуцированных в клетках *E. coli*: в составе клеточного лизата (а, в) и после выделения и очистки (17кДа- (б) и 27кДа- (г) фрагменты). Крайняя дорожка слева содержит маркеры (Pharmacia), молекулярная масса которых указана в килодальтонах.

белка различной длины и изучении их конформационного состояния после выделения и очистки. Такой подход давно обсуждается в литературе [1], однако реального воплощения пока не нашел. Конечно, отсутствие в системе рибосомы и других клеточных факторов делает указанный подход скорее модельным, чем отражающим реальную действительность, но он дает возможность исследования зависимости конформационного состояния полипептидной цепи от ее длины целым рядом прямых физико-химических методов.

Известно, что фактор элонгации EF-2 является мультифункциональным и мультидоменным белком, включенным в несколько процессов на стадии элонгации синтеза полипептидной цепи [8, 9]. Белок состоит из одной полипептидной цепи, содержащей 857 а. о. [10], и характеризуется высокой консервативностью [10–14]. N-Концевая часть EF-2 (160 а. о.) содержит участки гомологии с другими GTP-связывающими белками и участок, общий для всех факторов элонгации. Эти районы ответственны за связывание GTP и его гидролиз [10]. С-Концевая часть молекулы EF-2 имеет несколько протяженных участков, гомологичных соответствующим участкам в прокариотическом факторе элонгации EF-G и формирующих, по-видимому, часть участка взаимодействия комплекса EF-2 · GTP с рибосомой [10]. Некото-

рые данные подтверждают, что N- и С-концевые части EF-2 структурно взаимозависимы [15–18]. Было также показано [19], что в мягких условиях полипептидная цепь EF-2 высокоспецифично расщепляется эластазой на два фрагмента – N-концевой с  $M \sim 60$  кДа и С-концевой с  $M \sim 40$  кДа. N-Концевой фрагмент обладает высокостабильной конформацией, придающей устойчивость к действию эластазы и трипсина, и оба фрагмента, по-видимому, представляют собой отдельные структурно-функциональные домены.

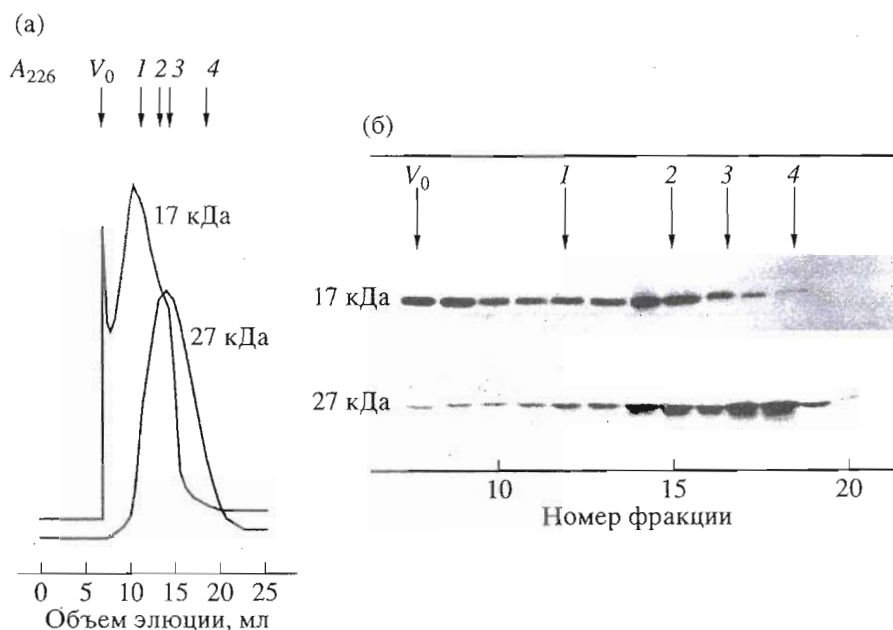
В данной работе были сконструированы и экспрессированы в клетках *E. coli* и в бесклеточной системе трансляции два типа плазмид, кодирующие N-концевые фрагменты фактора элонгации EF-2 длиной в 162 и 244 а. о. (см. “Экспер. часть”). Основная цель настоящей работы – исследование конформационного состояния двух различающихся по длине N-концевых фрагментов EF-2 после их синтеза как в клетках *E. coli*, так и в бесклеточной системе трансляции и выяснение вопроса, могут ли эти фрагменты приобрести жесткую третичную структуру в отсутствие большого С-концевого фрагмента белка.

Оба N-концевых полипептида эффективно синтезировались в клетках *E. coli*, однако формировали так называемые тела включения. Образование тел включения, которые представляют собой трудно растворимые в неденатурирующих условиях агрегаты белковых молекул, не обладающие биологической активностью, часто наблюдается при экспрессии чужеродных генов как в бактериальных клетках, так и в других живых экспрессирующих системах [20–22]. Природа и механизм формирования тел включения в клетке до сих пор не выяснены. Вместе с тем это явление сильно затрудняет процесс получения активного белка, обычно включающий денатурацию и ренатурацию вновь синтезируемых полипептидов [21].

#### Очистка фрагментов из тел включения

Уровень синтеза обоих фрагментов составлял около 30% от массы общего белка (см. рис. 1). Молекулярная масса синтезированных фрагментов, по данным SDS-электрофореза в ПААГ (17 и 27 кДа), соответствовала ожидаемой величине, выведенной из структуры соответствующих кДНК.

Выделить фрагменты в чистом виде после их синтеза в *E. coli* было достаточно сложно. В первоначальном варианте выделения перевод тел включения в раствор осуществлялся интенсивным перемешиванием при pH 10.5 и низкой ионной силе раствора. Далее pH раствора доводили до нейтральных значений (7–8) добавлением соответствующих количеств HCl. При хроматографии на колонке с сефадексом G-75, уравновешенным 5 мМ трис-HCl (pH 8.0), оба фрагмента выходили



**Рис. 2.** Анализ N-концевых фрагментов EF-2 после выделения из клеток *E. coli* и ренатурации (а) и после их синтеза в бесклеточной системе трансляции (б). Стандарты молекулярных масс (в скобках приведены *M*, кДа):  $V_0$  – голубой декстран (2000), 1 – GroEL (800), 2 – каталаза (236), 3 – BSA (67), 4 – карбоангидраза В (30).

с колонки в широком диапазоне молекулярных масс, что указывало на их существование в виде растворимых ассоциированных форм и осложняло окончательную очистку в неденатурирующих условиях. Чистота фрагментов на этой стадии достигала ~80% по данным SDS-электрофореза (не показано), что явно не удовлетворяло требованиям дальнейших структурных исследований. Пересаживание при pH 5.0 или при повышенной ионной силе (более чем 0.05 M NaCl или сульфатом аммония), а также ионообменная хроматография на различных носителях не приводили к полной очистке фрагментов от примесей.

Поэтому в окончательный способ очистки фрагментов входила солубилизация тел включения 2% SDS с последующей колоночной хроматографией на Ultrigel AcA-44 в присутствии 0.1% SDS (см. "Экспер. часть"). Чистота полученных таким образом фрагментов составляла ~98% (рис. 1). От SDS далее освобождались интенсивным диализом при pH 7.8 и низкой ионной силе ( $\leq 0.05$ ). Очищенные и ренатурированные таким образом фрагменты также существовали в растворе в виде ассоциированных форм. Профиль элюции обоих фрагментов при их хроматографии на Superose 6 указывает на широкое молекулярно-массовое распределение (рис. 2а), слабо изменяющееся при уменьшении концентрации белка на 2 порядка (не показано).

При синтезе фрагментов в бесклеточной системе трансляции из зародышей пшеницы, несмотря на крайне низкую концентрацию фрагментов в реакционной смеси, также происходит образо-

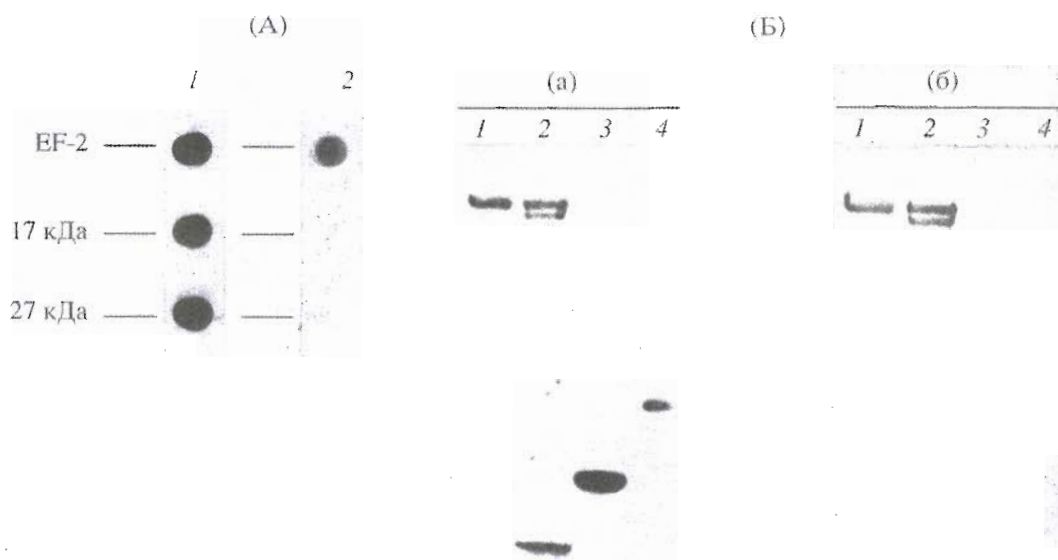
вание ассоциированных форм. При гель-фильтрации на Superose 6 оба вновь синтезированных фрагмента элюируются практически во всем диапазоне молекулярных масс (рис. 2б).

Таким образом, в неденатурирующих условиях оба фрагмента имеют повышенную склонность к образованию неспецифических ассоциатов с достаточно сильными межмолекулярными взаимодействиями, слабо зависящими от концентрации полипептидов. Обычно подобная ассоциация наблюдается для промежуточных конформационных состояний глобулярных белков, в которых отсутствует жесткая третичная структура (конформационное состояние типа расплавленной глобулы [21, 23, 24]). Это конформационное состояние характеризуется высоким содержанием вторичной структуры, высокой степенью компактности (близкой к таковой для глобулярных белков) и отсутствием жесткой третичной структуры (отсутствие кооперативности денатурационных переходов и высокая доступность ограниченному протеолизу), что и определяет повышенную склонность белка в состоянии расплавленной глобулы к неспецифической межмолекулярной ассоциации.

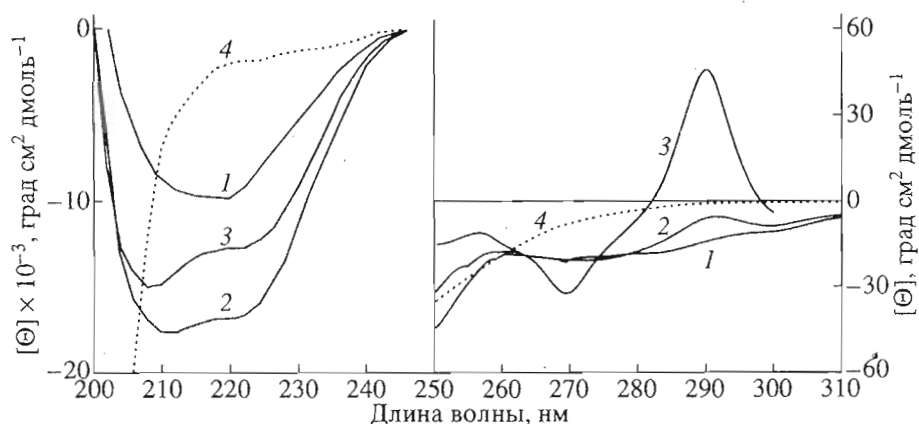
#### Взаимодействие с антителами

На рис. 3 представлены данные по иммунодо- тингу и иммуноблоттингу как обоих фрагментов, так и целого фактора элонгации EF-2. Видно, что целый белок взаимодействует с поликло- нальными антителами как в нативных, так и в





**Рис. 3.** Иммунохимическое изучение N-концевых фрагментов EF-2. (А) – дот-блот EF-2 и его N-концевых фрагментов. Белки приготовлены в буфере 20 мМ трис-НСl, рН 7.8 (1) и в 2% SDS после кипячения в течение 2 мин (2); (Б) – иммуноблоттинг EF-2 (1); смеси, полученной после ограниченного протеолиза EF-2 трипсином (2); N-концевых фрагментов 17кДа (3) и 27кДа (4). Белки, разделенные SDS-электрофорезом в ПААГ, были перенесены на нитроцеллюлозную мембрану и либо окрашены раствором амидо-черного 10В (а), либо иммуноокрашены анти-EF-2-IgG (б).



**Рис. 4.** Круговой дихроизм EF-2 (3), 17кДа- (1), 27кДа-фрагментов (2) в буфере 20 мМ трис-НСl (рН 7.8); 4 – спектры 17кДа-, 27кДа-фрагментов и EF-2 в 6 М гуанидингидрохлориде.

денатурирующих условиях нанесения на нитроцеллюлозную мембрану (см. “Экспер. часть”), что указывает на присутствие в целом белке значительного количества неконформационных эпитопов. Вместе с тем N-концевые фрагменты взаимодействуют с антителами только в неденатурирующих условиях. Полученный результат свидетельствует о том, что, по-видимому, неконформационные эпитопы присутствуют в основном в С-концевой части фактора элонгации EF-2, а в его N-концевой части (по крайней мере в пределах 240 N-концевых аминокислотных остатков) сосредоточены в основном конформационные эпитопы. Причем взаимодействие фрагментов с антителами было одинаковым как до

денатурации фрагментов SDS, так и после ренатурации, что позволяет сделать заключение о наличии определенной нативноподобной пространственной организации этих фрагментов в обоих случаях в неденатурирующих условиях. Взаимодействие обоих фрагментов с антителами в неденатурирующих условиях подтверждено также их сорбцией на иммобилизованных анти-EF-2-антителах (не показано).

#### Содержание вторичной структуры

На рис. 4 представлены спектры КД для обоих фрагментов и целого EF-2 как в неденатурирующих условиях, так и в присутствии 6 М гуанидингидро-

Структурные характеристики EF-2 и его N-концевых фрагментов

Структурные характеристики	EF-2	17 кДа	27 кДа
Содержание элементов вторичной структуры (%)*:			
α-спираль	41 (41)	24 (31)	50 (44)
β-структура	36 (21)	51 (26)	23 (20)
неупорядоченная структура	23 (38)	25 (43)	27 (36)
Глобулярность:			
Характеристическая вязкость [η] (см <sup>3</sup> /г):			
неденатурирующие условия**	3 ± 1	4 ± 1	4 ± 1
денатурирующие условия***	–	16 ± 2	24 ± 2
Положение спектра триптофановой флуоресценции (нм):			
неденатурирующие условия	338	–	333
денатурирующие условия	350	–	350

\* Значения содержания вторичной структуры, указанные в скобках, получены расчетом из аминокислотной последовательности по методу Соловьева и Саламова [26].

\*\* 20 мМ трис-НСl, рН 7.8.

\*\*\* 6 М гуанидингидрохлорид.

хлорида. Спектры КД в дальней УФ-области указывают на присутствие выраженной вторичной структуры в обоих фрагментах в неденатурирующих условиях.

В таблице приведены данные по разложению экспериментальных спектров в дальней УФ-области на α-спиральные, β-структурные и неупорядоченные составляющие с использованием метода Провинчера [25], а также предсказание этих составляющих из аминокислотной последовательности с использованием метода Соловьева и Саламова, основанного на статистике для нативных белков [26]. Обращает на себя внимание то, что как в случае целого белка, так и в случае 27кДа-фрагмента данные по разложению экспериментального спектра хорошо совпадают со значениями, предсказанными по первичной структуре. Этот результат свидетельствует о том, что вторичные структуры фрагмента в изолированном состоянии и в составе целого белка близки. Вместе с тем для фрагмента, содержащего 162 N-концевых аминокислотных остатка, α-спиральная составляющая вторичной структуры, определенная из экспериментального спектра, близка к предсказанной по первичной структуре, а β-структурная составляющая превышает предсказанную приблизительно в 2 раза. Отмеченный факт может быть связан с влиянием межмолекулярной ассоциации на спектр КД белковых молекул в пептидной области [27]. Возможно, что меньший фрагмент образует существенно менее лабильные ассоциативные формы, чем больший. В пользу этого

объяснения свидетельствует и гораздо большее содержание высокомолекулярных фракций в профиле элюции меньшего фрагмента (рис. 2).

*Глобулярность*

Поскольку оба фрагмента при неденатурирующих условиях существуют в растворе в виде ассоциатов с широким молекулярно-массовым распределением, оценка степени их компактности методами хроматографии или седиментации оказывается невозможной. В этом случае единственным прямым методом оценки компактности полипептидной цепи остается измерение величины характеристической вязкости, которая слабо зависит от степени ассоциации глобулярных конформаций, но существенно различается для глобулярных и неглобулярных конформаций [28]. В таблице приведены значения характеристических вязкостей для обоих фрагментов в неденатурирующих условиях и в присутствии 6 М гуанидингидрохлорида. Видно, что в неденатурирующих условиях величина характеристической вязкости обоих фрагментов составляет 4 ± 1 см<sup>3</sup>/г, тогда как в присутствии 6 М гуанидингидрохлорида (клубкообразная конформация) – 16 ± 3 и 24 ± 2 см<sup>3</sup>/г для 17кДа- и 27кДа-фрагментов соответственно. Таким образом, данные по характеристической вязкости фрагментов прямо указывают на их глобулярную организацию в составе ассоциатов.

Такой же вывод можно сделать и из косвенных данных по положению спектра триптофановой

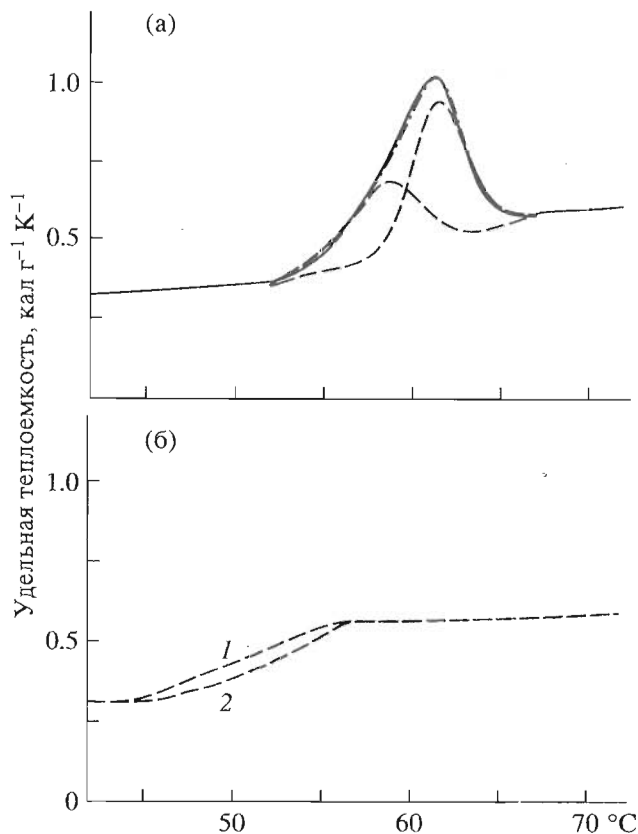


Рис. 5. Калориметрические кривые плавления EF-2 (а, сплошная линия) и его N-концевых фрагментов: 17кДа (б, 1) и 27кДа (б, 2). Штриховой линией (а) показано разложение на кооперативные составляющие (см. комментарий в тексте).

флуоресценции 27кДа-фрагмента (таблица), имеющего единственный остаток триптофана в 221-м положении [11]. Видно, что в неденатурирующих условиях этот фрагмент имеет существенно более коротковолновое положение спектра триптофановой флуоресценции ( $\lambda_{\max}$  333 нм) по сравнению со спектром в присутствии 6 М гуанидингидрохлорида ( $\lambda_{\max}$  350 нм). Это свидетельствует о значительной экранировке триптофанового остатка фрагмента от растворителя в неденатурирующих условиях.

#### Жесткость третичной структуры

Существование жесткой третичной структуры в глобулярных белках часто связывают с наличием выраженного спектра КД в области поглощения ароматических групп [23]. Из рис. 4 видно, что спектры КД обоих фрагментов, хотя и отличаются от спектров развернутого белка, не обладают высокой интенсивностью. Кроме того, они сильно отличаются от спектра EF-2. Все это не позволяет сделать определенного вывода о степени жесткости третичной структуры обоих фраг-

ментов. Вместе с тем известно, что наличие жесткой третичной структуры в глобулярных белках всегда проявляется в высокой кооперативности перехода белковой молекулы в денатурированное состояние при повышении температуры или увеличении концентрации различных денатурантов [23, 24, 29, 30].

Из калориметрической кривой плавления фактора элонгации EF-2 (рис. 5а) видно, что температурная денатурация целого белка характеризуется высококооперативным теплопоглощением с отношением эффективной и калориметрической энтальпий, близким к единице. Вместе с тем плавление EF-2 можно представить как плавление двух кооперативных термодинамических блоков (доменов) с температурами полупереходов 58 и 61°C и соответствующими калориметрическими энтальпиями 640 и 880 кДж моль<sup>-1</sup>. Таким образом, молекула EF-2 содержит по крайней мере два кооперативных термодинамических домена, которые достаточно сильно взаимодействуют друг с другом, формируя единую кооперативную пространственную структуру белка, удельная теплота плавления которой характерна для обычных глобулярных белков.

Калориметрические кривые плавления N-концевых фрагментов EF-2 (рис. 5б) отражают некооперативное увеличение теплоемкости при 47–55°C и сильно отличаются от кривых калориметрического плавления глобулярных белков с жесткой третичной структурой, которые характеризуются наличием максимума на кривой зависимости теплоемкости от температуры [30] (см. также рис. 5а). Некооперативное увеличение теплопоглощения при калориметрическом плавлении обоих фрагментов в области 47–55°C (рис. 5б) может быть объяснено некооперативным изменением либо межмолекулярных взаимодействий в ассоциатах неизвестной природы, либо внутримолекулярных взаимодействий, в результате которых происходит дополнительное экспонирование гидрофобных областей молекулы белка на растворитель.

Некооперативный характер плавления с повышением температуры наблюдается для обоих фрагментов и при регистрации эллиптичности на 220 нм, характеризующей наличие вторичной структуры (рис. 6). При этом уменьшение эллиптичности при нагревании до 95°C составляет 20–30%, что свидетельствует о высокой стабильности элементов вторичной структуры обоих фрагментов к действию температуры. Вместе с тем плавление глобулы EF-2 приводит к кооперативному уменьшению содержания вторичной структуры в области температурного денатурационного перехода (рис. 6).

Кривая разворачивания целого EF-2 и его 27кДа-фрагмента мочевиной при регистрации

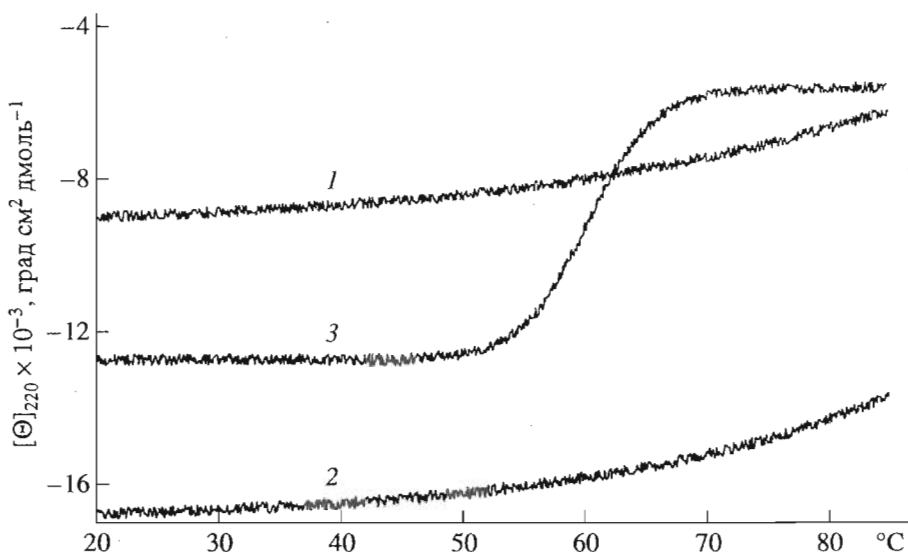


Рис. 6. Изменение эллиптичности EF-2 (3) и его N-концевых фрагментов 17кДа (1) и 27кДа (2) от температуры.

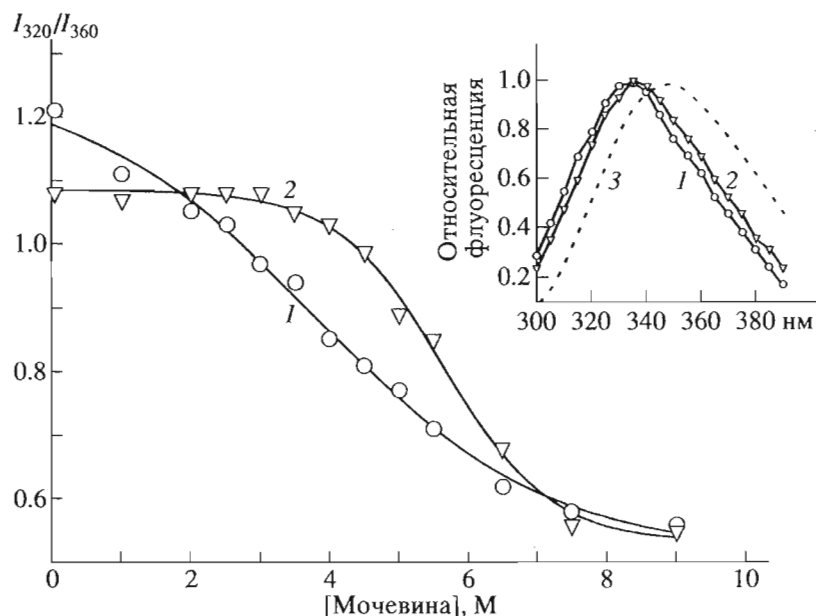


Рис. 7. Зависимость положения спектров флуоресценции ( $I_{320}/I_{360}$ ) от концентрации мочевины для 27кДа-фрагмента (1) и EF-2 (2). Вставка показывает спектры флуоресценции Трп-остатков 27кДа-фрагмента (1) и EF-2 (2) в неденатурирующих условиях (20 мМ трис-НСl, рН 7.8) и спектр 27кДа-фрагмента в присутствии 9 М мочевины (3).

положения спектра триптофановой флуоресценции (рис. 7) свидетельствует о том, что разворачивание 27кДа-фрагмента мочевиной происходит также некооперативно (постепенно), что совсем не характерно для глобулярных белков с жесткой третичной структурой (ср. разворачивание целого EF-2 мочевиной, рис. 7).

Таким образом, отсутствие высокой кооперативности денатурационных переходов при денатурации N-концевых фрагментов EF-2 температурой или мочевиной свидетельствует об отсут-

ствии жесткости их пространственной структуры. Этот вывод подтверждается слабой устойчивостью обоих фрагментов к ограниченному протеолиту эластазой (рис. 8) и трипсином (не показано).

Принимая во внимание, что оба фрагмента имеют выраженную внутримолекулярную вторичную структуру, содержание которой очень близко к ожидаемому исходя из первичной структуры для нативных конформаций, а также высокую степень компактности (глобулярность), конформационное состояние обоих фрагментов



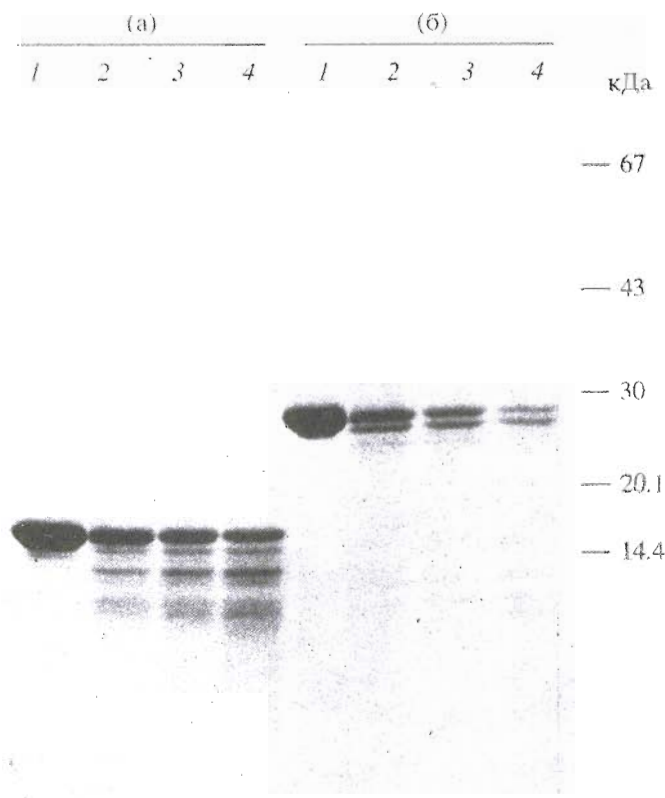


Рис. 8. Ограниченный протеолиз 17кДа- (а) и 27кДа- (б) фрагментов. Электрофорез продуктов ограниченного протеолиза эластазой 17кДа- (а) и 27кДа- (б) фрагментов, проводимого в течение 0 (1), 15 (2), 30 (3) и 60 мин (4). Окрашивание кумасси G-250. Крайняя дорожка справа содержит маркеры (Pharmacia).

в составе растворимых ассоциатов можно с уверенностью охарактеризовать как состояние расплавленной глобулы [23, 24].

#### Взаимодействие с молекулярным шапероном GroEL/ES

Известно, что процесс денатурации даже зрелых белков часто необратим [21]. Одной из основных причин этой необратимости является то обстоятельство, что в процессе ренатурации (сворачивания) молекула белка приобретает промежуточные конформационные состояния с повышенной гидрофобностью (например, состояние расплавленной глобулы [29]), в которых она чрезвычайно склонна к межмолекулярной ассоциации, что в свою очередь препятствует приобретению белком жесткой нативной структуры [21]. Широко известны клеточные факторы, так называемые молекулярные шапероны (принадлежащие к группе белков теплового шока), которые прочно связывают белки в ненативных конформационных состояниях, предотвращая тем самым их неспецифическую ассоциацию и способствуя в

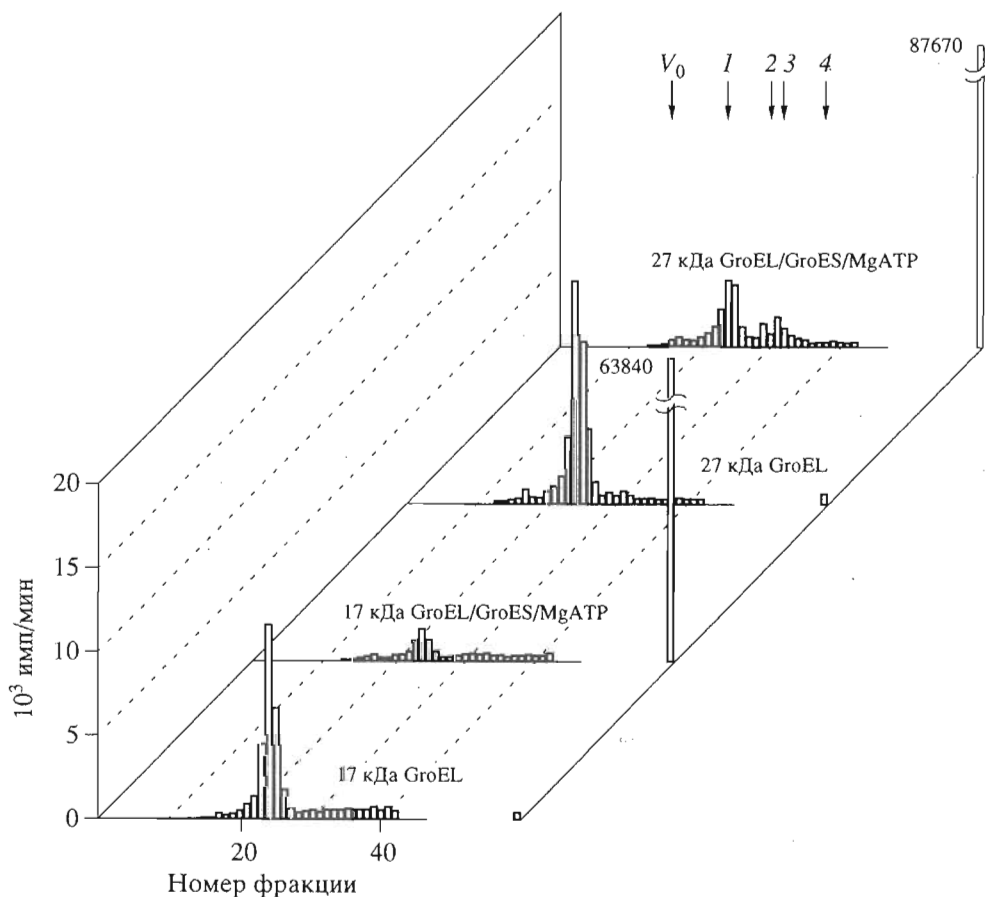
приобретении белками жесткой нативной конформации [31, 32]. Один из наиболее ярких представителей молекулярных шаперонов – GroEL из *E. coli*. Этот белок участвует в процессе сворачивания и трансмембранного транспорта многих белков как *in vivo*, так и *in vitro* [3, 31, 32], при этом необходимо присутствие ионов Mg, ATP и еще одного белкового фактора – GroES.

Чтобы выяснить, могут ли исследованные нами фрагменты в принципе приобрести жесткую структуру в отсутствие ассоциации, мы осуществили их ренатурацию из клубкообразного состояния (из 6 М гуанидингидрохлорида) в присутствии молекулярного шаперона GroEL/ES. Для этого мы использовали фрагменты, в которые была введена радиоактивная метка (см. “Экспер. часть”). Радиоактивно меченые фрагменты по своим физико-химическим свойствам ничем не отличались от немеченых, т.е. в неденатурирующих условиях находились в конформационном состоянии типа расплавленной глобулы и образовывали растворимые ассоциативные формы при низкой ионной силе (не показано).

На рис. 9 представлены профили элюции на Superose 6 обоих фрагментов после их ренатурации из 6 М гуанидингидрохлорида в присутствии GroEL и его кофакторов. Поскольку растворы, при которых GroEL функционально активен, обычно содержат 100 мМ KCl, т.е. имеют повышенную ионную силу, фрагменты выпадали со временем в осадок (величина осадка схематично указана справа от профилей элюции – см. рис. 9). Видно, что ренатурация фрагментов в присутствии GroEL, но в отсутствие его кофакторов сопровождается образованием прочного комплекса с GroEL, который предотвращает их неспецифическую межмолекулярную ассоциацию даже через 12 ч инкубирования.

Однако при добавлении факторов, ослабляющих взаимодействие GroEL с ненативным белком и промотирующих правильное сворачивание зрелых белков (таких, как Mg-ATP и особенно белковый фактор GroES), наблюдается зависимое от времени образование ассоциатов и выпадение фрагментов в осадок. Полученный результат свидетельствует о том, что молекулярный шаперон GroEL не может обеспечить приобретение обоими N-концевыми фрагментами жесткой структуры в условиях, при которых он обычно промотирует сворачивание зрелых белков в жесткую нативную структуру. Выпавшие в осадок после взаимодействия с GroEL фрагменты были растворены при щелочных pH и низкой ионной силе и исследованы при нейтральных pH с помощью ограниченного протеолиза эластазой. Доступность солубилизированных таким образом фрагментов ограниченному протеолизу оказалась такой же, как и у исходных растворенных фрагментов,





**Рис. 9.** Гель-фильтрация  $^3\text{H}$ -меченых, денатурированных в 6 М гуанидингидрохлориде N-концевых фрагментов EF-2 в присутствии молекулярного шаперона GroEL/ES на колонке Superose 6 HR 10/30. Условия см. в "Экспер. части". Стандарты молекулярных масс (в скобках приведены  $M$ , кДа):  $V_0$  – голубой декстран (2000), 1 – GroEL (800), 2 – каталаза (236), 3 – BSA (67), 4 – карбоангидраза В (30). Линия справа показывает преципитируемый материал (радиоактивность в имп/мин; центрифугирование при 10000g в течение 10 мин перед нанесением на колонку).

не имеющих жесткой третичной структуры (см. рис. 8). Таким образом, даже в присутствии молекулярного шаперона GroEL/ES исследованные нами фрагменты не могут приобрести жесткую третичную структуру, которая предохраняла бы их от действия протеиназы и от неспецифической ассоциации.

### Заключение

Анализ конформационного состояния N-концевых фрагментов фактора элонгации EF-2, содержащих 162 и 244 а. о., приводит к выводу, что оно по своим основным свойствам сходно с хорошо известным промежуточным состоянием зрелых глобулярных белков – расплавленной глобулой [23, 24, 29].

Во-первых, они содержат значительное количество элементов вторичных структур. Расчет вторичной структуры из экспериментальных спектров КД (рис. 4) и из аминокислотной последовательности дает близкие результаты, за исключе-

нием  $\beta$ -структуры в 17кДа-фрагменте, для которого расхождение может быть обусловлено вкладом межмолекулярной  $\beta$ -структуры (таблица).

Во-вторых, оба фрагмента глобулярны. Значения характеристической вязкости для обоих фрагментов в неденатурирующих условиях характерны для глобулярных белков. Разворачивание обоих фрагментов гуанидингидрохлоридом приводит к значительному увеличению характеристической вязкости (таблица) – факт, свидетельствующий о наличии развитого гидрофобного ядра, которое стабилизирует компактную конформацию фрагментов. Наконец, оба фрагмента не обладают жесткой кооперативной третичной структурой, что проявляется в отсутствии кооперативности как при тепловой денатурации, так и при денатурации мочевиной (рис. 6, 7). Вместе с тем описанное конформационное состояние обладает высокой вероятностью образования нативноподобных элементов пространственной структуры, на что указывает наличие конформационных эпипептидов для связывания специфических антител

(рис. 3). Высокая вероятность существования конформационных эпитопов в белковой молекуле, не обладающей жесткой третичной структурой, была показана ранее на примере  $\beta$ -субъединицы триптофансинтазы [33]. По-видимому, белковая цепь уже на ранних стадиях сворачивания может быть мишенью для связывания конформационных антител.

Кинетические данные по исследованию спонтанного сворачивания зрелых глобулярных белков позволяют предположить, что состояние расплавленной глобулы является общим кинетическим промежуточным состоянием на пути сворачивания глобулярных белков и формируется за 0.01–0.15 с [29]. Это время существенно меньше, чем время синтеза белковой цепи в клетке (0.1 с на один шаг [1]), и дает основание считать, что уже в процессе биосинтеза на рибосоме вероятность сворачивания синтезируемой полипептидной цепи в состояние расплавленной глобулы весьма высока. Поскольку расплавленная глобула эффективно взаимодействует с молекулярными шаперонами (в частности, с GroEL [34]), промотирующими правильное сворачивание и трансмембранный транспорт белковых молекул [31, 32], шапероны уже в процессе биосинтеза могут взаимодействовать с растущей полипептидной цепью, предопределяя тем самым ее дальнейшую судьбу [35].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы каталаза, протеиназа К, трипсин, эластаза, NTP, Tween-20 (Boehringer-Mannheim); лизат зародышей пшеницы (BBL, Латвия); спермидин (Calbiochem); дрожжевой экстракт, триптон (Difco); акриламид, бисакриламид, ацетат аммония, гуанидингидрохлорид, мочеви́на,  $\beta$ -меркаптоэтанол, Тритон X-100,  $MgCl_2$ , LiCl, К-ацетат, Mg-ацетат (Fluka); EDTA, 4-хлор-1-нафтол (Merck); HindIII, РНК-полимераза SP6 (Promega); амидо-черный 10B, метиленовый синий (Reanal); бромфеноловый синий, кумасси G-250, сахароза, PMSF, SDS (Serva); аминокислоты, ампициллин, голубой декстран, карбоангидраза В, креатинкиназа, креатинфосфат, мертиолат, РНКзин, трис, BSA, дитиотреит, NEMES, IPTG (Sigma).

**Выделение и очистка белков.** Выделение и очистку EF-2 из печени крыс проводили как описано ранее [19]. GroEL и GroES выделяли из клеток *E. coli*, штамм HB101, трансформированных мультикопийной плазмидой pGroE4 (полный groE-оперон *E. coli*, клонированный в EcoRI-сайте вектора pACYC184), по методу [36]. Плазмида pGroE4 была предоставлена А. Грагеровым.

**Электрофоретические методы.** Электрофорез белков в ПААГ в присутствии SDS проводили по методу [37], используя линейный градиент кон-

центрации ПААГ 10–25%\*. Гели после электрофореза фиксировали в 50% (v/v)\*\* метаноле, 5% (v/v) хлорной кислоте и окрашивали с использованием 0.02% раствора кумасси G-250 в 3.5% (v/v) хлорной кислоте (15–30 мин, 60°C) с последующей отмывкой в горячей воде. Электрофорез РНК в ПААГ в присутствии 7 М мочевины проводили как описано [38], используя 6% ПААГ. Гели после электрофореза окрашивали с использованием 0.1% раствора метиленового синего в 10% (v/v) уксусной кислоте (15–30 мин) с последующей отмывкой в дистиллированной воде.

**Структурные методы.** Определение молярных коэффициентов поглощения фрагментов проводили по методу [39] и по данным аминокислотного анализа. Величины коэффициентов, полученные двумя этими методами, оказались близкими, а их средние значения составили  $8.86 \times 10^3$  и  $2.17 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$  при 280 нм для 17кДа- и 27кДа-фрагментов соответственно.

Во всех экспериментах растворы белков были приготовлены в 20 мМ трис-НСl-буфере, pH 7.8, если не указано иначе, и доведены до требуемой концентрации погружаемым ультрафильтром CX-10 (Millipore).

Спектры КД были получены с помощью спектрополяриметра J-600 (Jasco, Япония), а кривые температурного плавления в дальней УФ-области – с помощью спектрополяриметра J-41 (Jasco, Япония).

Расчеты вторичной структуры на основании анализа спектров кругового дихроизма и аминокислотной последовательности выполнены с помощью методов, описанных в работах [25, 26].

Микрокалориметрические исследования осуществляли с помощью сканирующего микрокалориметра DACM-4 (Россия) с объемом ячейки 0.5 мл. Сканирование проводили со скоростью 1°C/мин при избыточном давлении 3.6 атм. Определение парциальной теплоемкости белка и анализ формы кривой плавления осуществляли как описано [40]. Парциальный объем белка полагали равным  $0.73 \text{ см}^3/\text{г}$ .

Флуоресцентные исследования проведены с использованием спектрофлуориметра Aminco 1000<sup>cm</sup> (USA).

Вискозиметрические измерения проведены с помощью вискозиметра типа Оствальда с временем истечения воды 240 с при 25°C. Значения характеристической вязкости белковых цепей  $[\eta]$  определяли из концентрационной зависимости специфической вязкости  $\eta_{sp}/c = f(c)$  при экстраполяции этой зависимости к нулевой концентрации [28].

\* Далее, где не указано особо, приведены весовые проценты (w/v).

\*\* v/v – по объему.

Создание генетических конструкций, кодирующих 17кДа- и 27кДа-N-концевые фрагменты EF-2, для экспрессии в клетках *E. coli* и бесклеточной системе трансляции. Фрагменты кДНК EF-2 [11] клонировали в вектор рКК223-3 (Pharmacia) под контроль *tac*-промотора и в вектор рSP65 под контроль SP6-промотора. Плазмиды рККЕF-1 и рSPEF-3 содержат кДНК EF-2 от +1 до +480 нуклеотида, а также два кодона для глицина и лейцина (соответствует 162 а. о.); плазмиды рККЕF-2 и рSPEF-2 – от +1 до +729, а также дополнительный кодон для лейцина (244 а. о.).

Плазмиды рККЕF-1 и рККЕF-2 использовали для экспрессии в клетках *E. coli*, плазмиды рSPEF-3 и рSPEF-2 – для получения мРНК N-концевых фрагментов EF-2 *in vitro*.

Экспрессия плазмид рККЕF-1 и рККЕF-2 в клетках *E. coli* и выделение 17кДа и 27кДа-N-концевых фрагментов EF-2. Клетки *E. coli* XL-1 Blue, трансформированные плазмидами рККЕF-1 и рККЕF-2, выращивали 12 ч при 37°C в среде LB (1% триптон, 0.5% дрожжевой экстракт, 0.5% NaCl с ампициллином (100 мкг/мл)). Культуры разводили в 1000 раз свежей средой LB, содержащей ампициллин, и растили при 37°C до величины оптического поглощения  $A_{595}$  0.5. Экспрессию индуцировали добавлением IPTG до 1 mM и растили при 37°C в течение последующих 6 ч. После выращивания клетки были осаждены центрифугированием, ресуспендированы в буфере А (50 mM трис-HCl, pH 7.8, 500 mM NaCl, 25 mM β-меркаптоэтанол, 2 mM EDTA) объемом 1/20 от первоначального объема культуры и разрушены ультразвуком (32 кГц, 15 импульсов по 60 с). Клеточный лизат был разбавлен до первоначального объема культуры буфером А, содержащим 1% (v/v) Тритон X-100 и 1 mM PMSF. Тела включения осаждали центрифугированием при 700g в течение 20 мин и трижды промывали буфером А, содержащим 0.5% (v/v) Тритон X-100, с озвучиванием ультразвуком и последующим центрифугированием. Промытые тела включения растворяли при 60°C в течение 10 мин в 50 mM трис-HCl-буфере (pH 7.8), содержащем 2% SDS, 50 mM β-меркаптоэтанол, 2 mM EDTA. Раствор осветляли центрифугированием при 22000g в течение 30 мин и наносили на колонку (2.6 × 100 см) с Ultrogel AcA-44, уравновешенную 50 mM трис-HCl-буфером (pH 7.8), содержащим 15 mM β-меркаптоэтанол, 0.1 mM EDTA, 0.1% SDS. Элюировали этим же буфером при скорости 15 мл/ч. Фракции, содержащие фрагменты (по SDS-электрофорезу в ПААГ), объединяли, разбавляли буфером для ренатурации (20 mM трис-HCl, pH 7.8, 250 mM сахароза, 5 mM β-меркаптоэтанол, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA) до концентрации 100–150 мкг/мл и диализовали против ренатурирующего буфера в течение 7 сут с

ежедневной сменой буфера (500–800 объемов). Удаление SDS контролировали методом [41]. Фрагменты идентифицировали методом Эдмана на секвенсоре модели 477 А (Applied Biosystem). Для анализа степени ассоциации N-концевые фрагменты (~20 мкг белка) наносили на колонку Superose 6 HR 10/30, уравновешенную буфером 50 mM трис-HCl (pH 7.8) и 10 mM KCl, элюировали со скоростью 0.25 мл/мин.

Синтез N-концевых фрагментов EF-2 в бесклеточной системе трансляции из зародышей пшеницы. Транскрипцию *in vitro* проводили по методу [42] с некоторыми изменениями. Плазмиды рSPEF-3 и рSPEF-2 (см. выше) линейаризовали с использованием рестриктазы *Hind*III. Транскрипционную смесь (100 мкл), содержащую 80 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 16 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM спермидин, 40 mM дитиотреит, 3 mM NTP, 100 ед. акт. РНКкиназы, 0.5 ед. акт. неорганической пирофосфатазы [43], 200 ед. акт. РНК-полимеразы SP6, 10 мкг плазмидной ДНК, выдерживали 4 ч при 37°C. мРНК осаждали добавлением 50 мкл 10 M LiCl с последующей инкубацией в течение ночи при –20°C, затем центрифугировали 15 мин при 10000g. Осадок промывали 70% этанолом, высушивали, растворяли в 200 мкл стерильной деионизированной воды и добавляли 1 мкл раствора протеиназы К (20 мг/мл). После 1-часовой инкубации при 50°C реакционную смесь дважды экстрагировали равным объемом смеси фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25 : 24 : 1) и мРНК осаждали добавлением 1/4 объема 10 M ацетата аммония и 2 объемов этанола. Небольшие образцы отбирали для анализа электрофорезом в ПААГ в присутствии 7 M мочевины.

Трансляционную смесь (50 мкл), содержащую 40 mM HEPES-KOH (pH 7.8), 80 mM K-ацетат (pH 7.6), 2 mM Mg-ацетат, 3.5 mM дитиотреит, 1 mM АТФ, 20 мкМ GTP, 260 мкМ спермидин, 20 mM креатинфосфат, 100 мкМ смесь аминокислот (без метионина), 2 мкг креатинкиназы, 35% (v/v) лизата зародышей пшеницы, 2 мкг мРНК и 20 мкКи [<sup>35</sup>S]метионина (“Изотоп”, Россия), выдерживали 1 ч при 22°C. Продукты трансляции анализировали SDS-электрофорезом в ПААГ с последующей автордиографией или гель-фильтрацией на Superose 6 HR 10/30 (Pharmacia) с последующими электрофорезом и автордиографией. Для анализа SDS-электрофорезом аликвоту трансляционной смеси (2 мкл) смешивали с 20 мкл буфера для образцов, содержащего 62.5 mM трис-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 5% (v/v) β-меркаптоэтанол, 10% (v/v) глицерин и 0.01% бромфеноловый синий, прогревали 2 мин при 100°C и наносили на ПААГ. Для анализа гель-фильтрацией аликвоту трансляционной смеси (48 мкл) доводили до 200 мкл 50 mM трис-HCl-буфером (pH 7.8), содержащим



окрашивали на общий белок в 0.3% растворе ами-до-черного 10В (как описано выше). Другую часть использовали для исследования взаимодействия с иммуноаффиноочищенными анти-ЕF-2-антителами. Все операции проводили как описано выше.

Авторы выражают глубокую признательность А.В. Олейникову за создание генетических конструкций, И.А. Кашпарову за аминокислотный анализ, Н.Я. Кашпаровой и Т.А. Мурановой за N-концевой анализ фрагментов, а также С.А. Потехину за помощь в проведении калориметрических измерений.

Работа была выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 93-04-22061 и № 94-04-12050-а), ISF (грант № MUL000) и HFSP (грант № RG-331/93).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tsou C.L. // Biochemistry. 1988. V. 27. P. 1809–1812.
2. Fischer G., Schmid F.X. // Biochemistry. 1990. V. 29. P. 2205–2212.
3. Gething M.J., Sambrook J. // Nature. 1992. V. 355. P. 33–45.
4. Nilsson B., Anderson S. // Annu. Rev. Microbiol. 1991. V. 45. P. 607–635.
5. Gething M.J., McCommon K., Sambrook J. // Meth. Cell Biol. 1989. V. 32. P. 185–206.
6. Bergmann L.W., Kuehl W.M. // J. Biol. Chem. 1979. V. 254. P. 8869–8876.
7. Fedorov A.N., Friguet B., Djavadi-Ohanian L., Alakhov Yu.B., Goldberg M.E. // J. Mol. Biol. 1992. V. 228. P. 351–358.
8. Moldave K. // Ann. Rev. Biochem. 1985. V. 54. P. 1109–1149.
9. Nygard O., Nilson L. // Eur. J. Biochem. 1990. V. 191. P. 1–17.
10. Kohno K., Uchida T., Ohkubo H., Nakanishi S., Nakanishi T., Fukui T., Ohtsuka E., Ikehara M., Okada Y. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 4978–4982.
11. Oleinikov A.V., Jokhadze G.G., Alakhov Yu.B. // FEBS Lett. 1989. V. 248. P. 131–136.
12. Rapp G., Klaudiny J., Hagendorf G., Luck M.R., Scheit K.H. // Biol. Chem. Hoppe–Seyler. 1989. V. 370. P. 1071–1075.
13. Itoh T. // Eur. J. Biochem. 1989. V. 186. P. 213–219.
14. Perentesis J.P., Phan L.D., Gleason W.B., LaPorte D.C., Livingston D.M., Bodley J.W. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 1190–1197.
15. Nilson L., Nygard O. // Eur. J. Biochem. 1988. V. 171. P. 293–299.
16. Nilson L., Nygard O. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 10578–10582.
17. Lavergne J.-P., Marzouki A., Reboud A.-M., Reboud J.-P. // Biochem. Biophys. Acta. 1990. V. 1048. P. 231–237.
18. Marzouki A., Sontag B., Lavergne J.-P., Vidonne C., Reboud J.-P., Reboud A.-M. // Biochem. Biophys. Acta. 1990. V. 1048. P. 238–244.
19. Мотуз Л.П., Плотников А.Н., Коротков К.В., Алахов Ю.Б. // Биооргани. химия. 1994. Т. 20. С. 872–882.
20. Marston F.A.O. // Biochem. J. 1986. V. 240. P. 1–12.
21. Mitraki A., King J. // Biotechnology. 1989. V. 7. P. 690–697.
22. Schein C.H. // Biotechnology. 1989. V. 7. P. 1141–1147.
23. Ptitsyn O.B. // J. Prot. Chem. 1981. V. 6. P. 272–293.
24. Kuwajima K. // Protein Struct. Funct. Genet. 1989. V. 6. P. 87–103.
25. Provencher S.W., Glockner J. // Biochemistry. 1981. V. 20. P. 33–37.
26. Соловьев В.В., Саламов А.А. // Молекуляр. биология. 1991. Т. 25. С. 810–823.
27. Manning M.C. // J. Pharm. Biomed. Anal. 1989. V. 7. P. 1103–1119.
28. Цветков В.Н., Эскин В.Е., Френкель С.Я. Структура макромолекул в растворе. М.: Наука, 1964.
29. Ptitsyn O.B., Semisotnov G.V. // Conformations and Forces in Protein Folding / Eds B.T. Nall, K.A. Dill. Washington: AAAS Publ., 1991. P. 155–168.
30. Privalov P.L. // Adv. Protein Chem. 1979. V. 33. P. 167–241.
31. Ellis R.J. // Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 1993. V. 339. P. 257–261.
32. Hendrick J.P., Hartl F.-U. // Annu. Rev. Biochem. 1993. V. 62. P. 349–384.
33. Goldberg M.E., Semisotnov G.V., Friguet B., Kuwajima K., Ptitsyn O.B., Sugai S. // FEBS Lett. 1990. V. 263. P. 51–56.
34. Martin J., Langer T., Boteva R., Schramel A., Horwich A.L., Hart F.U. // Nature. 1991. V. 352. P. 36–42.
35. Bochkareva E.S., Lissin N.M., Girshovich A.S. // Nature. 1988. V. 336. P. 254–257.
36. Hayer-Hartl M.K., Ewbank J.J., Creighton T.E., Hartl F.U. // EMBO J. 1994. V. 13. P. 3192–3202.
37. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
38. Луттл Ф.Р.П., Джексон Йен Дж. // Новое в клонировании ДНК. Методы / Ред. Д.М. Гловер. М.: Мир, 1989. С. 12–40.
39. Hartree E.F. // Anal. Biochem. 1972. V. 48. P. 422–427.
40. Privalov P.L., Potekhin S.A. // Meth. Enzymol. 1986. V. 131. P. 4–51.
41. Waite J.H., Wang C.Y. // Anal. Biochem. 1976. V. 70. P. 279–280.
42. Gurevich V.V., Pokrovskaya I.P., Obukhova T.A., Zozulya S.A. // Anal. Biochem. 1991. V. 195. P. 207–213.
43. Cunningham P.R., Ofengand J. // BioTechniques. 1990. V. 9. P. 713–714.

44. Means G.E. // *Meth. Enzymol.* 1977. V. 47. P. 69–78.      46. Hawkes R., Niday E., Gordon J. // *Anal. Biochem.* 1982. V. 119. P. 142–147.
45. Shestakova E.A., Motuz L.P., Minin A.A., Gelfand V.I., Gavrilova L.P. // *Cell Biol. Int. Reports.* 1991. V. 215. P. 75–84.      47. Sheffield J.B., Graff D., Li H.P. // *Anal. Biochem.* 1987. V. 166. P. 49–54.

## Biosynthesis of the 17-kDa and 27-kDa N-Terminal Fragments of Elongation Factor EF-2 and Their Conformation in Solution

A. N. Plotnikov\*, K. S. Vasilenko\*\*, M. D. Kirkitadze\*\*, N. V. Kotova\*\*, L. P. Motuz\*, K. V. Korotkov\*, G. V. Semisotnov\*\*, and Yu. B. Alakhov\*

\* Branch of the Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142292 Russia

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

**Abstract**—N-Terminal fragments of the rat liver elongation factor EF-2 containing 162 (17 kDa) and 244 (27 kDa) amino acid residues of 857 (95 kDa) residues of the native protein were synthesized in *E. coli* cells and in a wheat germ cell-free translation system, and their conformations were studied. Both fragments were synthesized as inclusion bodies (nonspecific molecular aggregates). The conformations of the fragments in a solution were studied at neutral pH values by CD, fluorescence spectroscopy, scanning microcalorimetry, viscosimetry, gel-filtration, limited proteolysis, and interaction with monospecific anti-EF-2 antibodies and GroEL/ES molecular chaperon. Under nondenaturing conditions, both fragments existed in a solution as associates within a broad range of molecular masses, contained a considerable amount of elements of the intramolecular secondary structure, and represented globules without rigid tertiary structure (molten globules). A rigid tertiary structure was not formed even after the interaction of the fragments with the GroEL/ES molecular chaperone, thus indicating that the C-terminal fragment is essential for the formation of the rigid tertiary structure. Both fragments contained conformational antigenic determinants similar to those in the whole protein; i.e., despite the absence of the rigid tertiary structure, the fragments contained elements whose structure was similar to that of the corresponding regions in the whole protein.

*Key words:* protein folding, fragments of globular proteins, molten globule, inclusion bodies, EF-2 elongation factors, molecular chaperone GroEL/ES.