

УДК 577.152

©Коллектив авторов

СТИМУЛИРОВАНИЕ АГРЕГАЦИИ БЕЛКОВ НЕФУНКЦИОНИРУЮЩИМ ШАПЕРОНИНОМ GroEL

*И.Н. Налетова¹, Е.В. Шмальгаузен¹, И.Н. Шалова^{1,2}, А.П. Плетень¹,
К. Цирюльников³, Т. Эртль³, В.И. Муронец^{1,2}*

¹НИИ Физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского и ²факультет биоинженерии и биоинформатики, Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, 119992, г. Москва, Ленинские горы, Россия, факс: (+7495) 9393181; эл.-почта: vimuronets@belozersky.msu.ru

³Institut National de la Recherche Agronomique, BIA-FIPL, France

С целью выяснения роли шаперонов в развитии заболеваний амилоидной природы исследовали взаимодействие шаперонина GroEL с неправильно свернутыми белками, а также с рекомбинантными прионами. В присутствии прионов эффективность шаперонин-зависимого фолдинга предварительно денатурированной глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) снижается. Прионы также связываются с иммобилизованным на сефарозе шаперонином GroEL, однако это не препятствует взаимодействию последнего с другими денатурированными белками. Методом динамического лазерного светорассеяния были определены размеры индивидуальных белков (шаперонина GroEL, ГАФД и рекомбинантного приона), а также агрегатов, образующихся при их смешивании. Нефункционалирующий шаперонин (смесь эквимольных количеств GroEL и GroES в отсутствие Mg-АТФ) взаимодействует с прионом с образованием крупных агрегатов размером более 400 нм даже при температуре 25°C. Добавление к шаперонину Mg-АТФ приводит к значительному уменьшению агрегатов (до 70-80 нм). При блокировании одного из центров такого нефункционирующего шаперонина окисленной денатурированной ГАФД размеры агрегатов возрастают до 1200 нм, причем даже присутствие Mg-АТФ не препятствует этой агрегации. Полученные данные свидетельствуют о важной роли шаперонинов в формировании амилоидных структур и о стимуляции агрегации функционально неактивными формами шаперонинов. Предложенная модель может быть использована для анализа эффективности антиагрегантов в содержащей шаперонины системе.

Ключевые слова: шаперонин GroEL, прионы, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, агрегация, динамическое светорассеяние

ВВЕДЕНИЕ. В основе возникновения различных амилоидозов (прежде всего болезни Альцгеймера и прионовых заболеваний) и других "конформационных" патологий лежит агрегация белков с измененной конформацией. Очевидно, что различные молекулярные шапероны, предназначенные для правильного сворачивания белков и предотвращения их

агрегации, должны быть вовлечены в развитие такого рода "конформационных заболеваний". Действительно, существует ряд работ, в которых высказывается предположение, что именно нарушение функционирования системы шаперонов приводит к развитию ряда заболеваний амилоидной природы [1]. Однако, как ни странно, возможна и противоположная ситуация. Некоторыми авторами развиваются и доказываются экспериментально представления, согласно которым именно шапероны запускают образование амилоидных структур. Эта гипотеза впервые была высказана Prusiner и соавторами [2]. Они предположили, что конверсию нормального клеточного прионового белка PrP^c (мономерного, с преобладанием α -спиралей, протеазо-чувствительного и растворимого в присутствии детергентов) в его инфекционную форму PrP^{Sc} может опосредовать молекулярный шаперон. Было также показано, что стимуляция образования шаперонов в ответ на тепловой шок сопровождается накоплением прионового белка [3]. Мы полагаем, что противоречивая информация о роли шаперонов в формировании амилоидных структур может быть связана с тем, что при анализе их действия могут быть использованы шапероны в разном функциональном состоянии. Например, результаты экспериментов с полным комплексом шаперонина GroEL/GroES и с изолированным GroEL могут отличаться. Кроме того, недавно мы показали, что шаперонины, частично блокированные неправильно свернутыми белковыми молекулами, функционируют по иным механизмам [4,5]. Таким образом, можно предположить, что агрегация амилоидных белков может по-разному регулироваться шаперонами в зависимости от их функционального состояния.

Целью представленной работы было выяснение роли шаперонинов, находящихся в различных функциональных состояниях, в формировании амилоидных структур. Нами были исследованы: взаимодействие рекомбинантных овечьих прионов с шаперонином GroEL, роль такого рода взаимодействий в формировании прионовых агрегатов, а также влияние обычных денатурированных белков на эти процессы.

МЕТОДИКА. В работе были использованы следующие реактивы: дитиотреитол и трис ("Fluka", Швейцария); АТФ, MgCl₂, NAD, глицеральдегид-3-фосфат, глицин, гуанидин гидрохлорид, 5,5'-дитиобис-2-нитробензойная кислота, додецилсульфат натрия, β -меркаптоэтанол, сефадекс G-100, DEAE-сефацел, сульфат аммония и ЭДТА ("Sigma", США); KН₂РO₄ ("Merck" Германия).

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу из скелетных мышц кролика выделяли по методу Scopes и Stoter [6] с последующей гель-фильтрацией на сефадексе G-100. Рекомбинантные овечьи прионы PrP-V136R154Q171 были получены и очищены как описано ранее [7]. Выделение шаперонина GroEL и ко-шаперонина GroES из клеток *E. coli* штамма W3110, трансформированных плазмидой pOF39, содержащей гены, кодирующие GroEL и GroES, проводили по методике Corrales и Fersht [8] с описанными нами ранее модификациями [5]. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически по поглощению при 280 нм, принимая коэффициент $A_{280}^{0,1\%}$ равным 1,0 для ГАФД и прионов, а для GroEL и GroES - 0,18 и 0,14, соответственно [9]. Молекулярная масса нативной (тетрамер) ГАФД составляет 144 кДа. Для денатурированного фермента молекулярную массу рассчитывали на мономер (36 кДа). Молекулярную массу GroEL₁₄ считали равной 840 кДа (субъединица 60 кДа), GroES₇ 70 кДа (субъединица 10 кДа), а рекомбинантного овечьего приона VRQ - 23 кДа.

Активность ГАФД определяли спектрофотометрически в стандартной системе по нарастанию оптической плотности при 340 нм в ходе ферментативной реакции окисления 3-фосфоглицеринового альдегида в присутствии NAD.

Иммобилизацию GroEL на сефарозе 4В проводили как описано ранее [10], используя для активации 30 мг BrCN/мл геля. Количество иммобилизованного шаперонина составляло 0,9 мг белка на мл уплотнённого центрифугированием геля.

Денатурацию ГАФД гуанидин гидрохлоридом проводили в 10 mM калий фосфатном буфере, pH 7,5, содержащем 30-100 мкМ ГАФД, 4 M гуанидин гидрохлорид, 1 mM ЭДТА и 2 mM β -меркаптоэтанол. Инкубацию проводили до полной инактивации фермента.

Для получения денатурированной и окисленной по всем цистеиновым остаткам ГАФД, фермент (30-100 мкМ) инкубировали в 10 mM калий фосфатном буфере, pH 7,5, содержащем 1 mM H_2O_2 , 4 M гуанидин гидрохлорид и 1 mM ЭДТА. Добавление 10-кратного молярного избытка H_2O_2 по отношению к мономеру ГАФД (2,5-кратного молярного избытка по отношению к содержанию сульфгидрильных групп) приводило к окислению всех сульфгидрильных групп фермента, что было доказано титрованием сульфгидрильных групп фермента 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислотой. SH-группы ГАФД не восстанавливались после удаления перекиси водорода даже в присутствии β -меркаптоэтанола.

Спонтанную и шаперонин-зависимую реактивацию ГАФД инициировали 100-кратным разведением денатурированного фермента до конечной концентрации 0,3-1 мкМ (в расчете на мономер) в буфере для рефолдинга (10 mM KH_2PO_4 , pH 7,5, 1 mM ЭДТА, 5 mM β -меркаптоэтанол, 1,5 mM NAD^+) в присутствии 0,3-1,0 мкМ GroEL₁₄, 0,6-2,0 мкМ GroES₇, 2 mM $MgCl_2$ и 2 mM ATP при 25°C. В процессе реактивации из реакционной среды отбирали аликвоты для определения ферментативной активности ГАФД и строили график зависимости активности фермента от времени реактивации.

Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) проводили по методу Laemmli [11] с использованием прибора для электрофореза "Mini-Protean 3" (BioRad). В случае иммобилизованного GroEL к порции геля добавляли равный объем 4-кратного буфера для образцов (0,125 M трис-HCl pH 6,8 4% ДСН 20% глицерин, 0,002% бромфеноловый синий, 10% β -меркаптоэтанол) и инкубировали в течение 3 мин при температуре 90°C на водяной бане. В данных условиях происходит частичное разрушение ковалентных связей с сефарозой, а также переход в раствор нековалентно связанных белков. Непосредственно перед нанесением проб на гель сефарозу осаждали центрифугированием.

Для определения среднего размера частиц, образующихся в процессе денатурации, использовали метод динамического лазерного светорассеяния. Индивидуальные белки или их смеси растворяли в 10 mM калий-фосфатном буфере, pH 7,5, содержащем 1 mM ЭДТА, и проводили измерение параметров динамического светорассеяния при температуре 25°C. Опыты были проведены на приборе "Zetasizer Nano-ZS" ("Malvern Instruments", Великобритания), используемом для измерения размеров частиц в диапазоне от 0,6 до 6000 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Ранее нами было показано, что добавление химически модифицированных или мутантных форм белков к шаперонину GroEL полностью его блокирует, что приводит к предотвращению шаперонин-зависимого сворачивания денатурированных белков [4, 5]. На основании этих экспериментов мы предположили, что изучение эффективности GroEL-зависимого фолдинга может быть использовано для детекции взаимодействия прионов с шаперонином. На рисунке 1 представлены результаты изучения влияния рекомбинантного овечьего приона VRQ на GroEL-зависимое сворачивание предварительно денатурированной ГАФД. Приведенные данные показывают, что в присутствии приона VRQ эффективность GroEL-зависимого фолдинга снижается (кривые 3 и 4), однако полного блокирования (как в случае денатурированной окисленной ГАФД - кривая 5) не происходит. Вероятно, прион VRQ если и взаимодействует с шаперонином, то это связывание носит обратимый характер и при функционировании в полной системе (GroEL, GroES и Mg-ATP), он не препятствует связыванию других развернутых белковых молекул.

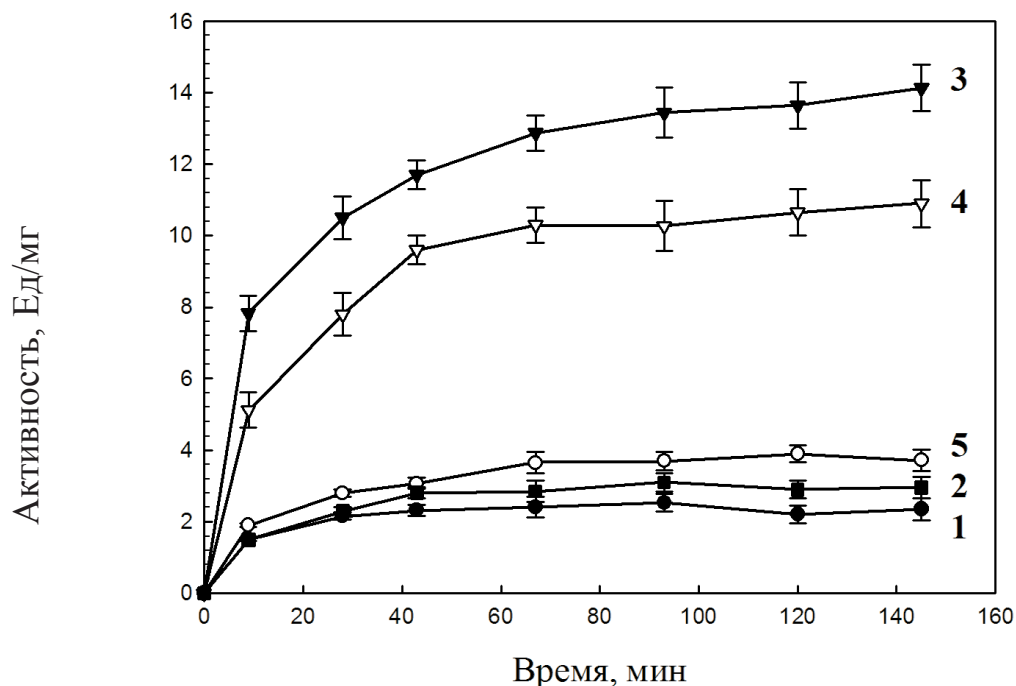


Рисунок 1.

Шаперон-зависимая реактивация ГАФД, денатурированной в гуанидин гидрохлориде. ГАФД (100 мкМ) инкубировали в 4 М гуанидин гидрохлориде до полной инактивации, после чего разводили в 100 раз в буфере для реактивации (10 мМ KH_2PO_4 , pH 7,5, 1 мМ ЭДТА, 1,5 мМ NAD^+ , 5 мМ β -меркаптоэтанол), содержащем 2 мМ MgCl_2 и 2 мМ АТФ без добавок (1); в присутствии 2 мкМ VRQ (2); в присутствии 1 мкМ GroEL, 1 мкМ GroES (3); в присутствии 1 мкМ GroEL, 1 мкМ GroES, 2 мкМ VRQ (4); в присутствии 1 мкМ GroEL, 1 мкМ GroES, 1 мкМ окисленной денатурированной ГАФД (ГАФД_{ок}) (5). Прион VRQ растворяли до концентрации 43,4 мкМ в 10 мМ KH_2PO_4 , pH 7,5, содержащем 1,5 М гуанидин гидрохлорид, а затем добавляли в пробу с шаперонином.

Подтверждение этих предположений было получено с помощью "метода фиксированного партнера", при котором один из белков ковалентно иммобилизуется на нерастворимой матрице. Шаперонин GroEL иммобилизовали на активированной бромцианом сефарозе, а затем инкубировали в присутствии прионов и/или денатурированной ГАФД. После инкубации сефарозу интенсивно отмывали от неспецифически связывающихся белков и анализировали с помощью ДСН-электрофореза. Как видно из приведенной на рисунке 2 электрофореграммы рекомбинантный прион (2 дорожка) и денатурированная ГАФД (4 дорожка) эффективно связываются с GroEL. При этом в данных условиях ассоциации этих белков с контрольной сефарозой не происходит (данные не приведены). Денатурированная ГАФД способна также взаимодействовать с шапероном, в котором находится связанный прион (5 дорожка). Эти результаты указывают, что возможно одновременное взаимодействие двух белков (ГАФД и приона) с шаперонином GroEL.

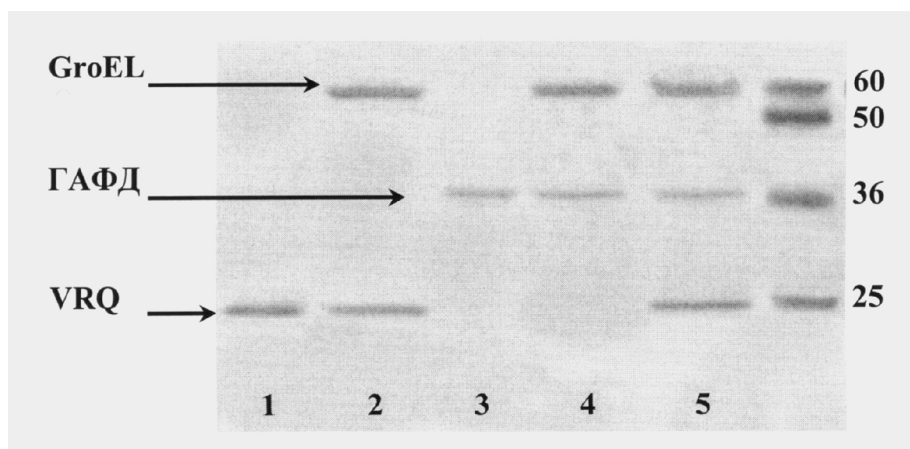


Рисунок 2.

Взаимодействие приона VRQ и денатурированной ГФД с шаперонином GroEL, иммобилизованным на сефарозе 4В.

Прион VRQ растворяли до конечной концентрации 69,5 мкМ в 10 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,5, содержащем 1,5 М гуанидин гидрохлорид, а затем разводили в 10 мМ калий-фосфатным буфером, pH 7,5, до конечной концентрации 2 мкМ. ГФД (100 мкМ) денатурировали в 4 М гуанидин гидрохлориде, после чего разводили в 100 раз (до конечной концентрации 1 мкМ) в 10 мМ KH_2PO_4 , pH 7,5. Прион или денатурированную ГФД инкубировали с шаперонином GroEL, иммобилизованным на сефарозе 4В. Затем пробы отмывали фосфатным буфером. К пробе, содержащей связанный с GroEL прион, добавляли денатурированную ГФД и снова отмывали фосфатным буфером. Полученные образцы анализировали при помощи ДСН-электрофореза. Дорожка 1 - прион VRQ, 2 - иммобилизованный шаперонин после инкубации с прионом, 3 - денатурированная ГФД, 4 - иммобилизованный шаперонин после инкубации с денатурированной ГФД, 5 - иммобилизованный шаперонин, связанный с прионом после инкубации с денатурированной ГФД.

Особенности взаимодействия рекомбинантного приона с шаперонином GroEL были изучены также с помощью метода динамического лазерного светорассеяния, позволяющего определить как размеры индивидуальных молекул, так и их агрегатов. На рисунке 3 приведены данные о распределении числа частиц по размеру в препаратах рекомбинантных прионов ($4,36 \pm 0,3$ нм, кривая 1), тетрамера ГФД ($6,38 \pm 0,4$ нм, кривая 2) и GroEL ($12,32 \pm 0,4$ нм, кривая 3) при 25°C. Оказалось, что даже при комнатной температуре добавление рекомбинантных прионов к GroEL приводит к появлению достаточно крупных агрегатов (418 ± 35 нм, кривая 5). Важно отметить, что такие крупные агрегаты образуются только при использовании нефункционирующего шаперона - индивидуального GroEL или комплекса GroEL и GroES. Однако, после добавления прионов к функционирующему шаперону (GroEL, GroES и Mg-ATP) размеры образующихся структур не превышают 70-80 нм (кривая 4). Наиболее крупные агрегаты были обнаружены при совместной инкубации приона с шапероном, блокированным окисленной денатурированной ГФД (размер агрегатов более 1000 нм - 1200 ± 55 нм, кривая 6). Важно заметить, что такие крупные агрегаты образуются даже в присутствии GroES и Mg-ATP (кривые не приведены).



Рисунок 3.

Распределение числа частиц по размеру в препаратах приона VRQ, ГАФД, шаперонина GroEL и в смеси этих белков, определенное по измерению параметров динамического светорассеяния.

Прион VRQ, ГАФД, GroEL, а также смесь указанных белков, растворяли в 10 мМ фосфатном буфере, pH 7,5, и анализировали параметры светорассеяния при температуре 25°C. **1** - прион VRQ (концентрация 12 мкМ), **2** - нативный тетрамер ГАФД (3,4 мкМ), **3** - GroEL₁₄ (0,3 мкМ), **4** - прион в полной функционирующей системе шаперонина (11 мкМ VRQ, 0,3 мкМ GroEL, 0,3 мкМ GroES, 2 мМ MgCl₂ и 2 мМ ATP), **5** - прион в присутствии GroEL (11 мкМ VRQ и 0,3 мкМ GroEL), **6** - прион в присутствии шаперонина GroEL, заблокированного окисленной денатурированной ГАФД (11 мкМ VRQ, 0,3 мкМ GroEL и 0,6 мкМ ГАФД).

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют не только о возможности связывания молекул рекомбинантного овечьего приона с шаперонином GroEL, но и о возможности стимуляции агрегации прионов после их присоединения к шаперонину. Важно отметить, что крупные агрегаты не образуются при добавлении прионов к нормально функционирующему шаперонину, содержащему все компоненты, необходимые для правильного сворачивания белков (GroEL, GroES и Mg-ATP). Вероятно, в этом случае происходит обычный цикл ATP-зависимого связывания и десорбции приона, и агрегаты, если и образуются, то на короткие промежутки времени. В отсутствие Mg-ATP такого цикла не происходит, и, вероятно, с адсорбированным на шаперонине прионом начинают связываться другие молекулы этого белка. Особенно ярко проявляется эта тенденция в случае шаперонина, у которого один из активных центров необратимо заблокирован неправильно свернутой молекулой белка (окисленной денатурированной ГАФД). Последнее наблюдение представляется нам крайне важным. Ранее нами было показано, что необратимое блокирование шаперонина GroEL наблюдается в присутствии химически модифицированных и мутантных форм белков [4] и, что самое важное, окисленных денатурированных белков [5], которые могут присутствовать в клетке, особенно в условиях кислородного стресса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. На основании приведенных выше наблюдений можно прийти к заключению, что блокирование шаперонов неправильно свернутыми белками играет важную роль в агрегации амилоидных белков и, возможно, в развитии различных заболеваний амилоидной или прионовой природы. Можно также отметить, что предотвращение такого рода заболеваний может осуществляться не только за счет создания систем искусственных шаперонов, но и более простым способом - усилением антиоксидантной защиты организма. Основным выводом нашей работы является выявление способности нефункционирующих шаперонинов стимулировать образование белковых агрегатов, которая усиливается при блокировании шаперонинов неправильно свернутыми полипептидными цепями.

Работа поддержана грантами ИНТАС (03-51-4813) и РФФИ (04-04-81038а-Бел, 05-04-48955-а и 06-04-48240-а).

ЛИТЕРАТУРА

1. Welch W.J., Gambetti P. (1998) *Nature*, **392**, 23-24.
2. Prusiner S.B., Scott M.R., DeArmond S.J., Cohen F.E. (1998) *Cell*, **93**, 337-348.
3. Shyu W.C., Harn H.J., Saeki K., Kubosaki A., Matsumoto Y., Onodera T., Chen C.J., Hsu Y.D., Chiang Y.H. (2002) *Mol. Neurobiol.*, **26**, 1-12.
4. Polyakova O.V., Roitel O., Asryants R.A., Polyakov A.A., Branlant G., Muronetz V.I. (2005) *Protein Science*, **14**, 921-928.
5. Naletova I.N., Muronetz V.I., Schmalhausen E.V. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, **1764**, 831-838.
6. Scopes R.K., Stoter A. (1982) *Methods Enzymol.*, **90**, 479-490.
7. Rezaei H., Marc D., Choiset Y., Takahashi M., Hui Bon Hoa G., Haertlé T., Grosclaude J., Debey P. (2000) *Eur. J. Biochem.*, **267**, 2833-2839.
8. Corrales F.J., Fersht A.R. (1996) *Fold. Des.*, **1**, 265-273.
9. Walters C., Errington N., Rowe A.J., Harding S.E. (2002) *Biochem. J.*, **364**, 849-855.
10. Cherednikova T.V., Muronetz V.I., Nagradova N.K. (1981) *Mol. Immunol.*, **18**, 1055-1064.
11. Laemmli K. (1970) *Nature*, **227**, 680-685.

Поступила 01. 08. 2006.

THE NON-FUNCTIONING CHAPERONIN GroEL STIMULATES PROTEIN AGGREGATION

I.N. Naletova¹, E.V. Schmalhausen¹, I.N. Shalova^{1,2}, A.P. Pleten¹, K. Tsirolnikov³, T. Haertlé³, V.I. Muronetz^{1,2}

¹Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology and ²School of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory, Moscow, 119992 Russia; fax: (+7495) 9393181; e-mail: vimuronets@belozersky.msu.ru,

³Institut National de la Recherche Agronomique, BIA-FIPL, France

To clarify the role of chaperones in the development of amyloid diseases, the interaction of the chaperonin GroEL with misfolded proteins and recombinant prions has been studied. The efficiency of the chaperonin-assisted folding of denatured glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was shown to decrease in the presence of prions. Prions are capable of binding to GroEL immobilized on Sepharose, but this does not prevent the interaction between GroEL and other denatured proteins. The sizes of individual proteins (GroEL, GAPDH, and the recombinant prion), as well as aggregates formed after their mixing, were determined by the dynamic light scattering method. It was shown that at 25°C the non-functioning chaperonin (equimolar mixture of GroEL and GroES in the absence of Mg-ATP) bound prion yielding large aggregates (greater than 400 nm). The addition of Mg-ATP decreased significantly the aggregate size to 70-80 nm. On the blocking of one of the chaperonin centers by oxidized denatured GAPDH, the aggregate size increased to 1200 nm, and the addition of Mg-ATP did not prevent the aggregation.

These data indicate the significant role of chaperonins in the formation of amyloid structures and demonstrate the acceleration of aggregation in the presence of functionally inactive chaperonins. The suggested model can be used for the analysis of the efficiency of antiaggregants in the system containing chaperonins.

Key words: chaperonin GroEL, prions, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, aggregation, dynamic light scattering.