

УДК 577.21

ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ И РЕФОЛДИНГ БЕЛКОВ В БАКТЕРИЯХ ОПРЕДЕЛЯЮТСЯ АКТИВНОСТЬЮ ДВУХ РАЗЛИЧНЫХ ГРУПП АТР-ЗАВИСИМЫХ ШАПЕРОНОВ

© 2020 г. Г. Б. Завильгельский^{а, *}, Е. Ю. Гнучих^а, О. Е. Мелькина^а^аГосударственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов
Национального исследовательского центра “Курчатовский институт”, Москва, 117545 Россия

*e-mail: zavljel@genetika.ru

Поступила в редакцию 07.10.2019 г.

После доработки 07.10.2019 г.

Принята к публикации 23.10.2019 г.

Термостабильность белков-ферментов определяют, измеряя их активность при инкубировании при постоянной сравнительно высокой температуре. Рефолдинг термоинактивированных ферментов проводят в присутствии шаперонов, как правило, при пониженной температуре, оптимальной для проявления ферментативной активности. Нами проведен сравнительный анализ термостабильности бактериальных люцифераз, измеряемой *in vitro* (бесклеточные экстракты) и *in vivo* (непосредственно в бактериальной клетке). В качестве модели использованы термочувствительные люциферазы *Aliivibrio fischeri*, *Photorhabdus luminescens* и *Photobacterium leiognathi*. Показано, что термостабильность этих люцифераз в бактериях *Escherichia coli* MG1655 *dnaK*⁺ и РК202 Δ *dnaKJ14* значительно выше, чем в бесклеточных экстрактах. Однако, если кинетику термоинактивации люцифераз *in vivo* измерять в присутствии в среде разобшителя окислительного фосфорилирования протонофора карбонилцианид-3-хлорфенилгидразона (СССР) или летучего гидрофобного вещества (–)-лимонена (C₁₀H₁₆), то термостабильность ферментов резко снижается вплоть до уровня, характерного для бесклеточных препаратов. Показано также, что СССР и (–)-лимонен практически полностью ингибируют *DnaKJE*-зависимый рефолдинг термоинактивированных люцифераз. В процессе повышения термостабильности люцифераз в *E. coli* помимо *DnaKJE*-шаперона участвуют АТР-зависимые шапероны *ClpA* и *ClpB*, активность которых также ингибируется в присутствии СССР и (–)-лимонена. Предполагается, что АТР-зависимые шапероны *DnaKJE* и *GroEL/ES* (группа 1) способны, затрачивая энергию гидролиза АТР → АМР, проводить рефолдинг белков как после снижения температуры (стандартные условия рефолдинга), так и при высокой температуре, при которой происходит термоинактивация белков (условие термодинамического неравновесия). АТР-зависимые шапероны *ClpA*, *ClpB* (группа 2) не способны самостоятельно осуществлять рефолдинг в стандартных условиях, т.е. при снижении температуры, но способны за счет гидролиза АТР поддерживать неравновесную стабилизацию белков в нативной форме при высокой температуре.

Ключевые слова: АТР-зависимый шаперон, рефолдинг, термостабильность, бактериальные люциферазы**DOI:** 10.31857/S0026898420020196

Термостабильность белков-ферментов определяют *in vitro*, измеряя их активность при инкубировании при постоянной температуре [1–6]. Рефолдинг термоинактивированных белков проводят как *in vitro*, так и *in vivo* в присутствии шаперонов, как правило, при температуре, оптимальной для проявления ферментативной активности [7–11]. Для получения неактивного препарата фермента, используемого для последующего рефолдинга, применяют предварительную термообработку при повышенной температуре в течение определенного интервала времени. Так рефолдинг малатдегидрогеназы (MDH), осуществляемый АТР-зависимым шаперонином

GroEL/ES, проводили *in vitro* при повышенной температуре (37°C) [12]. При этом термоинактивация и рефолдинг фермента происходят одновременно, что характерно для термодинамически неравновесных систем. В связи с присутствием в клетке большого количества высоколабильных макромолекул (РНК, ферменты), для поддержания нативных структур которых *in vivo* при стрессовых условиях термодинамического неравновесия (повышенная температура, осмотический шок и др.) затрачивается значительное количество энергии (АТР → АМР), клетке необходимы различные группы АТР-зависимых шаперонов. Представляет интерес специфичность данных

групп шаперонов, например, их способность поддерживать термостабильность белков при высокой температуре, т.е. в условиях термодинамического неравновесия, или проводить рефолдинг белков при понижении температуры среды, т.е. в оптимальных условиях. Термостабильность ферментов можно определять не только *in vitro* с использованием очищенных препаратов, но и *in vivo*, непосредственно в бактериальной клетке. Однако в этом случае необходимо использовать метод, с помощью которого можно разделить процессы истинной термоинактивации фермента и осуществляемого одновременно рефолдинга клеточными АТР-зависимыми шаперонами. С этой целью использовали: 1) разобщитель окислительного фосфорилирования – протонофор карбонилцианид-3-хлорфенилгидразон (СССР), позволяющий снижать внутриклеточную концентрацию АТР до минимального уровня; и 2) низкомолекулярное гидрофобное вещество (–)-лимонен (C₁₀H₁₆). Так как для процесса рефолдинга белкам-шаперонам требуется гидролиз значительного количества АТР, то можно ожидать, что при добавлении СССР к суспензии бактерий будет происходить снижение АТР-зависимого рефолдинга. Использование гидрофобного (–)-лимона в качестве ингибитора шаперонзависимого рефолдинга основано на ранее опубликованных нами данных об эффективном ингибировании DnaKJE-зависимого рефолдинга *in vivo* при добавлении к суспензии бактерий гидрофобных низкомолекулярных кетонов (2-гептанона и др.) [13]. В качестве белков-субстратов использовали бактериальные люциферазы *Aliivibrio fischeri*, *Photobacterium leiognathi* и *Photobacterium luminescens*, которые характеризуются пониженной термостабильностью, что позволяет измерять термоинактивацию и шаперонзависимый рефолдинг ферментов непосредственно в бактериальной клетке.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

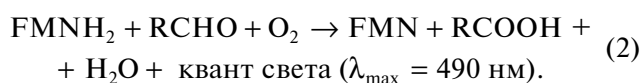
Бактериальные штаммы и плазмиды. *Escherichia coli* K12 MG1655 и мутант PK202 Δ *dnaK14* Δ *dnaJ14* *dksA::kan* получены от E. Craig (США) [14]. *E. coli* K12 SG20250 Δ *lacU169* *araD* *flbB* *relA* *clpA+* *clpB+* и его инсерционные мутанты SG22099 *clpA::kan* *clpB+* и SG22100 *clpA+* *clpB::kan* получены от S. Gottesman (США) [15]. Гибридная плаزمида рF2 с генами *luxAB* *A. fischeri*, расположенными под *lac*-промотором в векторе рUC18, сконструирована реклонированием фрагмента XhoI/SalI из плазмиды рF1, содержащей полный *lux*-оперон *A. fischeri* [16]. Гибридная плазмида рXen4 с генами *luxAB* *P. luminescens* Zm1, расположенными под *lac*-промотором в векторе рUC18, сконструирована реклонированием фрагмента XhoI/PstI из плазмиды рXen7, содержащей полный *lux*-оперон (*luxCDABEG*) *P. luminescens* Zm1

[17]. Гибридная плазмида рLeo1 содержит в векторе рUC18 гены *luxCDABE* *Ph. leiognathi* под *lac*-промотором [18].

Среды, реактивы. Клетки растили в бульоне Луриа–Бертани (LB) и на агаризованной среде LB, содержащей ампициллин (100 мкг/мл), при 30°C. FMN и *n*-деканаль и протонофор СССР получены от “Sigma-Aldrich” США. (–)-Лимонен (C₁₀H₁₆) (>96%) и дитионит натрия получены от “Fisher Scientific”, Германия.

Выделение и очистка бактериальных люцифераз. Бактериальные клетки, содержащие гибридные плазмиды с генами *luxAB*, растили в L-бульоне с ампициллином (100 мкг/мл) при 28°C на качалке до *OD* = 2.5–3.0. После центрифугирования клетки ресуспендировали в 1/10 объема раствора, содержащего 50 мМ фосфатный буфер рН 7.0 и 20 мМ β-меркаптоэтанол. Белковый экстракт получали путем обработки суспензии ультразвуком (44 кГц) при охлаждении во льду порциями по 30 мл (6 раз по 20 с). Для удаления фрагментов клеток озвученную суспензию центрифугировали в течение 30 мин при 30000 g. Последующую очистку белка проводили на колонке с сефадексом G-25, элюируя 0.1 М калий-фосфатным буфером, рН 7.0. Фракции, содержащие люциферазу, определяли по биOLUMИнесценции. Содержание белка в пробе после очистки на колонке с сефадексом-G-25 составляло 100 мкг/мл.

Для измерения активности люциферазы *Ph. leiognathi* *in vitro* использовали двухкомпонентную ферментную систему (R + L): NADH:FMN-оксидоредуктаза + люцифераза [19]. Эта система включает две реакции:



В первой реакции образуется восстановленный FMN (FMNH₂), который, в свою очередь, обеспечивает постоянный уровень биOLUMИнесценции. Лиофилизированные высокоочищенные ферменты двухкомпонентной системы (R + L) получены из лаборатории бактериальной биOLUMИнесценции (Институт биофизики СО РАН, Красноярск). Каждая проба содержит 0.5 мг/мл люциферазы и 0.15 ед. NADH:FMN-оксидоредуктазы из *Ph. leiognathi*.

Измерение интенсивности биOLUMИнесценции. Бактериальная люцифераза катализирует окисление длинноцепочечного альдегида (RCHO) атмосферным кислородом (O₂) в присутствии FMNH₂ (см. уравнение 2).

In vivo активность люциферазы измеряли с использованием люцинометра LMAO1 (“Beckman”, США) при 20°C. Суспензию синтезирующей лю-

циферазу бактериальной культуры (200 мкл) *E. coli* (pF2) или *E. coli* (pXen4) смешивали с 0.001% *n*-деканала (3 мкл) в этаноле и через 30 с–1 мин измеряли интенсивность биолюминесценции. Для бактерий *E. coli* (pLeo1) *n*-деканаль не требуется, так как гены *luxCDE* обеспечивают клетки тетрадеканалем – субстратом люциферазы.

In vitro активность люцифераз *A. fischeri* и *P. luminescens* (бесклеточные экстракты) определяли на люминометре модели 1251 (Финляндия) при 20°C. Реакционная среда содержала 0.1 М калий-фосфатный буфер, pH 7.0, 20 мМ β-меркаптоэтанол, 20 мкМ FMN и 6.8 мкМ *n*-деканаль. Реакцию запускали добавлением 20 мкл 0.1%-ного раствора дитионита натрия, восстанавливающего FMN до FMNH₂, в кювету с реакционной смесью, расположенную непосредственно перед фотоумножителем люминометра [20]. Конечный объем реакционной смеси составлял 1 мл. Поскольку FMNH₂ окисляется быстро по сравнению со временем жизни промежуточных интермедиатов люминесцентной реакции, фермент осуществляет лишь один оборот, причем интенсивность свечения достигает максимума в течение первых нескольких секунд.

In vitro активность люциферазы *Ph. leiognathi*, содержащейся в двухкомпонентной системе (R + L), определяли на люминометре LMAO1 (“Beckman”) при 20°C. Реакционная смесь содержала 5 мкл раствора двухкомпонентной ферментной системы, 200 мкл 0.05 М калий-фосфатного буфера (pH 6.8), 200 мкл 0.4 мМ NADH, 50 мкл 0.5 мМ FMN и 5 мкл 0.001%-ного *n*-деканала. Все компоненты последовательно вносили в кювету и быстро перемешивали. Кювету ставили в люминометр перед фотоумножителем и измеряли максимальную интенсивность биолюминесценции (в относительных единицах, ОЕ).

Термоинактивация и рефолдинг люцифераз. Термоинактивацию люцифераз *in vivo* и *in vitro* проводили в водяной бане при фиксированной температуре. В опытах *in vivo* к суспензии клеток добавляли хлорамфеникол (167 мкг/мл) для ингибирования синтеза белка. Для снижения концентрации АТР в бактериях использовали разбавитель окислительного фосфорилирования СССР. Концентрацию АТР в бактериальных клетках определяли с использованием люциферазы светлячка [21].

Рефолдинг люцифераз проводили *in vivo* (бактерии *E. coli*) или при комнатной температуре, или при температуре, оптимальной для данной люциферазы: 22°C для люцифераз *A. fischeri* и *Ph. leiognathi* и 35°C – для люциферазы *P. luminescens* [1, 9]. Через определенные интервалы времени отбирали аликвоты (200 мкл) и измеряли интенсивность люминесценции.

При определении активности (–)-лимонена в качестве ингибитора рефолдинга эту субстанцию вносили в пластмассовые пробирки объемом 1 мл, содержащие бактериальные клетки (титр 2–3 × 10⁸/мл) в среде LB. Пробирки заклеивали парафильмом (“ParafilmM” США).

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

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Рефолдинг термоинактивированных люцифераз

Измерение кинетики и уровня рефолдинга термоинактивированных люцифераз проводили *in vivo* в клетках *E. coli* K12 MG1655 и его делеционного мутанта PK202 Δ*dnaKJ14*, содержащих плазмиду с генами *luxAB A. fischeri* или *P. luminescens* (плазмиды pF2 или pXen4), а также плазмиду pLeo1 с генами *luxCDAB Ph. leiognathi*. Бактерии росли при 28°C до середины экспоненциальной фазы. После проведения “теплого шока” (30 мин при 42°C) к суспензии клеток для ингибирования последующего синтеза белка добавляли хлорамфеникол (167 мкг/мл), культуру переносили в водяную баню для инактивации люциферазы. Температуру и время инкубации для каждой люциферазы выбирали таким образом, чтобы окончательный уровень ферментативной активности составлял 10⁻³–10⁻⁴ от исходного. Рефолдинг инактивированных люцифераз проводили при 22°C (люциферазы *A. fischeri* и *Ph. leiognathi*) или при 35°C (люцифераза *P. luminescens*), оптимальных для этих ферментов. На рис. 1а–в приведены зависимости уровня ренатурации люцифераз (в процентах от исходного уровня) от времени инкубации. Как видим, рефолдинг белков полностью отсутствует в клетках штамма PK202 Δ*dnaKJ14* (кривые 2). В клетках MG1655 *dnaK*⁺ происходит рефолдинг всех люцифераз, однако термолабильные люциферазы *A. fischeri* и *Ph. leiognathi* ренатурируют значительно полнее (до 80% от исходного уровня у *A. fischeri* и до 40% – у *Ph. leiognathi*) по сравнению с термостабильной люциферазой *P. luminescens* (около 10% от исходного уровня). Отметим, что несколько сниженный уровень рефолдинга (40%) люциферазы *Ph. leiognathi* вызван присутствием в среде синтезируемого одновременно с люциферазой субстрата реакции – длинноцепочечного альдегида тетрадеканала, ингибирующего активность шаперона DnaKJE.

Если в клеточную суспензию за несколько минут до начала измерения уровня рефолдинга термоинактивированных люцифераз добавить СССР (50 мкМ), то рефолдинг практически полностью отсутствует (кривые 3). Отметим, что уже через несколько минут после добавления СССР концен-

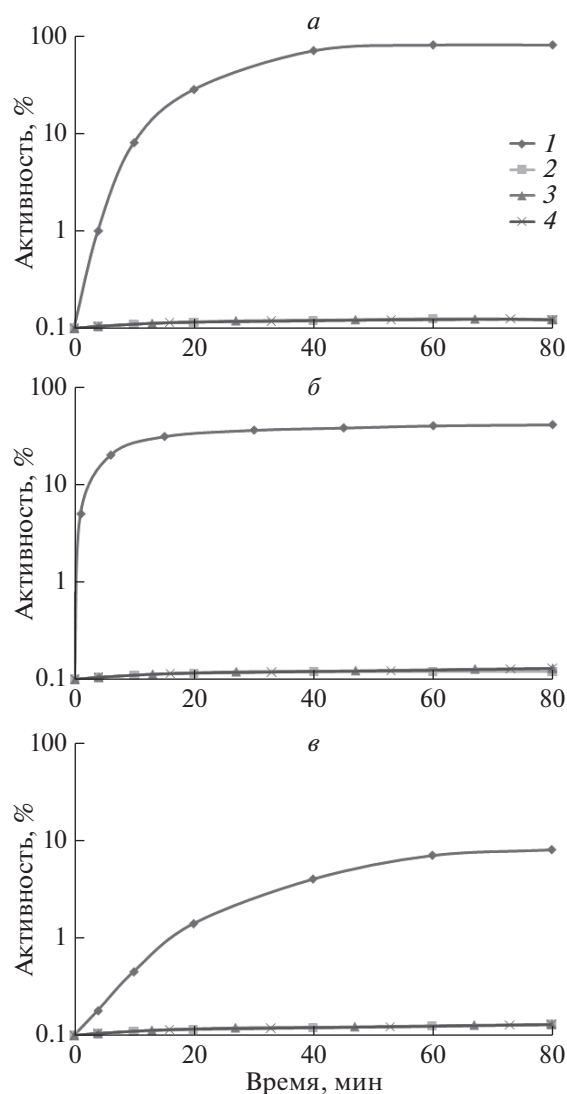


Рис. 1. ДнаКЈЕ-зависимый рефолдинг бактериальных люцифераз *A. fischeri* (а), *Ph. leiognathi* (б) и *P. luminescens* (в). Влияние СССР и (–)-лимонена. 1 – *E. coli* MG1655 *dnaK*⁺, 2 – *E. coli* RK202 Δ *dnaKJ14*, 3 – *E. coli* MG1655 + СССР (50 мкМ), 4 – *E. coli* MG1655 + (–)-лимонен (7 мкМ). По оси ординат указана активность люциферазы (в процентах от исходного уровня); по оси абсцисс – время (мин) выдерживания образца при температуре, оптимальной для данной люциферазы (22°C – *A. fischeri* и *Ph. leiognathi*, 35°C – *P. luminescens*). Здесь и на рис. 2–4 представлены средние данные, полученные не менее чем из трех повторов.

трация АТР в клетках снижается практически до фонового уровня как при комнатной, так и при повышенной температуре, причем при комнатной температуре исходная интенсивность биOLUMИнесценции не снижается на протяжении всего опыта (данные не приведены). Следовательно, низкий уровень АТР в клетке критичен для рефолдинга белка, проводимого ДнаКЈЕ-шапероном, но не для самой биOLUMИнесцентной реакции.

ДнаКЈЕ-зависимый рефолдинг практически полностью отсутствует, если к суспензии бактерий *E. coli* MG1655 добавлен (–)-лимонен (7 мкМ) (рис. 1, кривые 4).

Определение термостабильности люцифераз

На рис. 2 приведены кинетические кривые термоинактивации люциферазы *P. luminescens* при 44°C: *in vivo* (в штаммах MG1655 *dnaK*⁺ и RK202 Δ *dnaKJ14*) и *in vitro* (бесклеточный экстракт) в стандартных условиях и при добавлении СССР или (–)-лимонена в среду с бактериальными клетками на ранней стадии термоинактивации. Как видим, скорость термоинактивации люциферазы в мутантном штамме RK202 Δ *dnaKJ14* примерно в 2 раза выше, чем в штамме MG1655 *dnaK*⁺. Следовательно, шаперон ДнаК, ответственный за рефолдинг белков при низкой температуре, принимает непосредственное участие также в процессе стабилизации структуры фермента при высокой температуре. В свою очередь, термостабильность люциферазы *in vivo* в штамме RK202, согласно кинетике кривых термоинактивации, примерно в 5–6 раз выше термостабильности в “бесклеточном экстракте” *in vitro*. Если же СССР или (–)-лимонен добавлялся к суспензии клеток на ранней стадии термоинактивации, то скорости термоинактивации люциферазы, измеряемые *in vivo*, практически совпадали со скоростью термоинактивации, измеряемой *in vitro*. Следовательно, клетки мутантного штамма RK202 содержат АТР-зависимый шаперон (или несколько подобных шаперонов), который в отличие от ДнаКЈЕ не способен проводить стандартный, т.е. при пониженной температуре, рефолдинг термоинактивированных белков, но способен, затрачивая энергию гидролиза АТР, поддерживать нативную структуру белка при высокой температуре, т.е. в условиях термодинамического неравновесия.

На рис. 3 приведены кинетические кривые термоинактивации термочувствительной люциферазы *Ph. leiognathi* при 35°C: *in vivo* (в штамме RK202 Δ *dnaKJ14*) и *in vitro* (двухкомпонентная система, R + L) в стандартных условиях и при добавлении СССР или (–)-лимонена в среду с бактериальными клетками на ранней стадии термоинактивации. Как и в варианте с термостабильной люциферазой *P. luminescens*, наблюдается повышенная термостабильность фермента *in vivo*. При добавлении в среду СССР (50 мкМ) или (–)-лимонена (7 мкМ) термостабильность снижается практически до уровня, характерного для очищенного препарата белка.

На рис. 4 представлены кривые термоинактивации люциферазы *P. luminescens* при 44°C *in vivo* в штаммах *E. coli* 20250 *clpA*⁺*clpB*⁺, 22100 *clpA*⁺*clpB*[–], 22099 *clpA*[–]*clpB*⁺ (бактерии содержат плазмиду

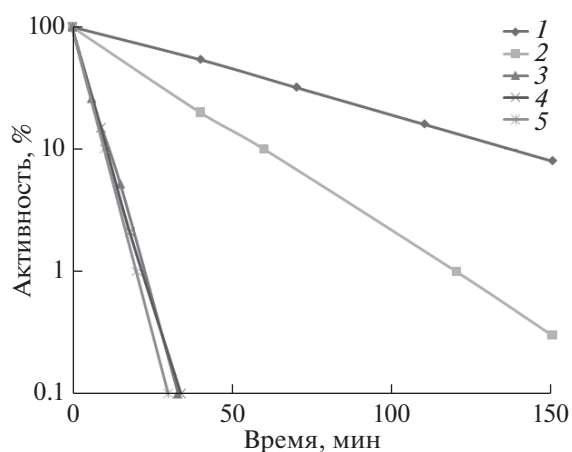


Рис. 2. Кинетика термоинактивации люциферазы *P. luminescens in vitro* и *in vivo* в *E. coli* MG1655 *dnaK*⁺ и PK202 Δ *dnaKJ14* при 44°C. Влияние СССР и (–)-лимонена. По оси ординат указана активность люциферазы (в процентах от исходного уровня), по оси абсцисс – время термоинактивации, мин. 1 – *E. coli* MG1655 *dnaK*⁺; 2 – *E. coli* PK202 Δ *dnaKJ14*; 3 – *E. coli* PK202 + СССР (50 мкМ); 4 – *E. coli* PK202 + (–)-лимонен (7 мкМ); 5 – “бесклеточный экстракт” (*in vitro*).

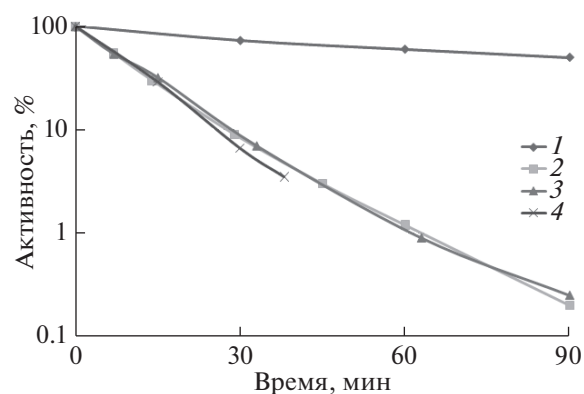


Рис. 3. Кинетика термоинактивации люциферазы *P. leiognathi in vitro* и *in vivo* в *E. coli* PK202 Δ *dnaKJ14* при 35°C. Влияние СССР и (–)-лимонена. По оси ординат указана активность люциферазы (в процентах от исходного уровня), по оси абсцисс – время термоинактивации, мин. 1 – *E. coli* PK202 Δ *dnaKJ14*; 2 – *E. coli* PK202 + СССР (50 мкМ); 3 – *E. coli* PK202 + (–)-лимонен (7 мкМ); 4 – “двухкомпонентная система”, R + L (*in vitro*).

pXen4). В клетках штамма 22099 *clpA*⁻*clpB*⁺ наблюдается значительное снижение термостабильности люциферазы, что фиксируется как увеличение наклона на начальной стадии кинетической кривой. Если бактерии содержат шаперон ClpB (штаммы 20250 *clpA*⁺*clpB*⁺, 2099 *clpA*⁻*clpB*⁺), то в кинетических кривых термоинактивации люциферазы наблюдается “терморезистентная фракция”, которой нет в мутантном штамме 22100 *clpA*⁺*clpB*⁻. Для проверки участия шаперона ClpB в поддержании высокой термостабильности люциферазы в суспензию клеток штамма 22099 *clpA*⁻*clpB*⁺ (pXen4) в начальной стадии формирования “терморезистентной фракции” кинетической кривой термоинактивации вносили СССР (50 мкМ) или (–)-лимонен (7 мкМ). В результате происходило быстрое снижение уровня термостабильности люциферазы – активность фермента уменьшилась на несколько порядков за 7–8 мин (момент добавления в суспензию клеток СССР и (–)-лимонена указан стрелкой).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Установлено, что при повышенной температуре АТФ-зависимые шапероны GroEL/ES и DnaKJE за счет энергии гидролиза АТФ → АМР участвуют в процессе неравновесной стабилизации нативной структуры белков [12]. Как показано ранее, эти шапероны с высокой эффективностью проводят также рефолдинг термоинактивированных белков в стандартных условиях, т.е. при пониженных температурах. Согласно предложенной модели

[12], при высокой температуре, инактивирующей ферменты, процесс поддержания нативной формы белка с участием шаперонов за счет энергии гидролиза АТФ подчиняется законам неравновесной термодинамики. В этом случае формированию за счет тепловой энергии локально денатурированного участка в полипептидной цепи практически

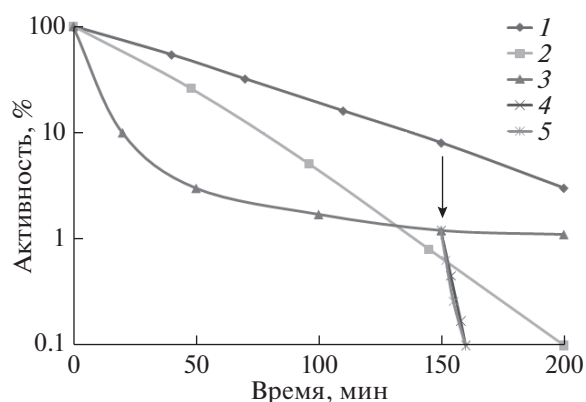


Рис. 4. Кинетика термоинактивации люциферазы *P. luminescens in vivo* в *E. coli* K12 SG20250 *clpA*⁺*clpB*⁺ и мутантных штаммах SG22099 *clpA*::*kan clpB*⁺ и SG22100 *clpA*⁺*clpB*::*kan* при 44°C. Влияние СССР и (–)-лимонена на ClpB-зависимую “терморезистентную фракцию”. По оси ординат указана активность люциферазы (в процентах от исходного уровня), по оси абсцисс – время термоинактивации, мин. 1 – *E. coli* SG20250 *clpA*⁺*clpB*⁺; 2 – *E. coli* SG22100 *clpA*⁺*clpB*::*kan*; 3 – *E. coli* SG22099 *clpA*::*kan clpB*⁺. Стрелкой указан момент добавления препарата: 4 – (–)-лимонен; 5 – СССР.

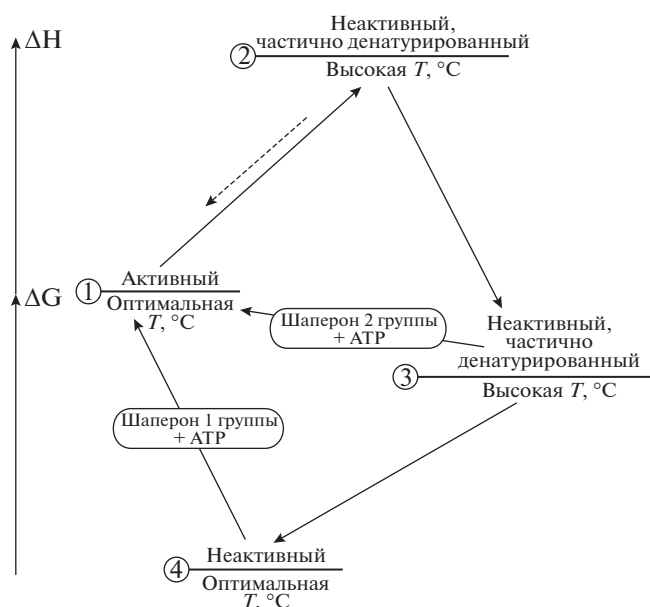


Рис. 5. Переходы между различными формами фермента. 1 – фермент в активной форме при 20–25°C, 2 и 3 – частично денатурированные неактивные формы фермента при высокой температуре, 4 – частично денатурированная неактивная форма фермента при 20–25°C. При комплексовании с АТР-зависимым шапероном фермент из неактивных частично денатурированных конформаций 3 (+ шапероны группы 2) и 4 (+ шапероны группы 1) может в результате гидролиза АТР → АМР переходить в активную форму 1. Реакции, осуществляемые шаперонами, изображены стрелками.

одновременно противостоит (АТР + шаперон)-зависимый процесс реверсии денатурированного участка в нативное состояние. При отсутствии АТР или шаперона при высокой температуре белок продолжает терять активность, а при понижении температуры переходит спонтанно в энергетически (свободная энергия) более низкую равновесную форму неактивного белка. Можно предположить, что более высокая термостабильность белков в бактериях по сравнению с бесклеточными препаратами не связана с активностью шаперонов, а определяется сугубо механическими условиями, например, адсорбцией на подложках типа мембран, так как закрепление фермента на носителе препятствует его разворачиванию и тем самым снижает уровень термоденатурации. Подобный способ повышения термостабильности используется в опытах *in vitro* при адсорбции ферментов на подложках специального состава (крахмальный и желатиновый гели, активированная агароза и др.) [19, 22]. Однако в этом случае повышенная термостабильность белков есть результат, определяемый согласно законам равновесной термодинамики, и не связана с необходимостью гидролиза АТР в качестве источника энергии для поддержания метастабильного нативного состояния.

В свете данных, представленных в настоящей работе, необходимо рассматривать наличие в бактериальных клетках двух групп АТР-зависимых шаперонов: 1) способных проводить рефолдинг как при понижении температуры после термоинактивации белка, так и при высокой температуре, при которой происходит инактивация белка; 2) не способных проводить стандартный рефолдинг (т.е. при пониженной температуре), но способных поддерживать неравновесную стабилизацию нативных форм белка при высокой температуре. К первой группе шаперонов относятся DnaKJE и GroEL/ES, ко второй группе, по-видимому, относятся ClpB и, возможно, ClpA, а также пока неизвестные шапероны, проявляющие активность в мутантном штамме PK202 $\Delta dnaKJ14$. Согласно “transient model” [5] термоинактивация фермента (1 – активная форма) при повышении температуры проходит через две промежуточные обратимые стадии 2 и 3 (неактивные формы), причем на энергетической шкале неактивная форма 3 располагается ниже как формы 2, и переход из активной формы 1 в неактивную форму 3 происходит через промежуточную форму 2. При понижении температуры среды фермент переходит в неактивную форму 4, которая на энергетической шкале располагается ниже как формы 3, так и активной формы 1 (рис. 5). Можно предположить, что если АТР-зависимые шапероны группы 1 с высокой эффективностью осуществляют рефолдинг неактивного белка в форме 4 (переход 4 → 1, условие термодинамического равновесия), то АТР-зависимые шапероны группы 2 способны ренатурировать лишь неактивный белок в энергетически более высокой форме 3 (переход 3 → 1, условие термодинамического неравновесия). Согласно нашим предварительным данным, в грамположительных бактериях *Bacillus subtilis* шапероны группы 2 обладают повышенной способностью поддерживать белки в активном состоянии при условии термодинамического неравновесия, что проявляется в значительном повышении термостабильности (примерно на 4–5°C) люциферазы по сравнению с их термостабильностью в грамотрицательных бактериях *E. coli*.

Авторы выражают благодарность S. Gottesman (США) за предоставленные штаммы-мутанты *clpAB*, и E. Craig (США) за штамм PK202, а также А.В. Богачеву (МГУ им. М.В. Ломоносова) за помощь в измерении содержания АТР в бактериях и Р.С. Шакулову (ГосНИИгенетика, Москва) за обсуждение результатов.

Работа поддержана Государственным заданием № 595-00003-19ПР.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тюлькова Н.А., Сандалова Т.П. (1996) Сравнительное исследование влияния температуры на бактериальные люциферазы. *Биохимия*. **61**, 275–287.
2. Valkova N., Szittner R., Meighen E. (1999) Control of luminescence decay and flavin binding by the LuxA carboxyl-terminal regions in chimeric bacterial luciferases. *Biochemistry*. **38**, 13820–13829.
3. Завильгельский Г.Б., Котова В.Ю., Мажуль М.М., Манухов И.В. (2004) Влияние белков семейства Clp на DnaK-зависимый рефолдинг бактериальных люцифераз. *Молекуляр. биология*. **38**, 507–514.
4. Daniel R.M., Peterson M.E., Danson M.J., Price N.C., Kelly S.M., Monk C.R., Weinberg C.S., Oudshoorn M.L., Lee C.K. (2010) The molecular basis of the effect of temperature on enzyme activity. *Biochem. J.* **425**, 353–360.
5. Chen N.G., Gregory K., Sun Y., Golovlev V. (2011) Transient model of thermal deactivation of enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*. **1814**, 1318–1324.
6. Koksharov M.N., Ugarova N.N. (2011) Thermostabilization of firefly luciferase by *in vivo* directed evolution. *Protein Engin. Design Selection*. **24**, 835–844.
7. Tomoyasu T., Ogura T., Tatsuta T., Bukau B. (1998) Levels of DnaK and DnaJ provide tight control of heat shock gene expression and protein repair in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **30**, 567–581.
8. Goloubinoff P., Mogk A., Ben-Zvi A.P., Tomoyasu T., Bukau B. (1999) Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bi-chaperone network. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**, 13732–13737.
9. Manukhov I.V., Eroshnikov G.E., Vyssokikh M.Yu., Zavilgelsky G.B. (1999) Folding and refolding of thermolabile and thermostable luciferases: the role of DnaKJ heat-shock proteins. *FEBS Lett.* **448**, 265–268.
10. Zolkiewski M. (1999) ClpB cooperates with DnaK, DnaJ and GrpE in suppressing protein aggregation. A novel multi-chaperone system from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **274**, 28083–28086.
11. Mogk A., Tomoyasu T., Goloubinoff P., Rudiger S., Roder D., Langen H., Bukau B. (1999) Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. *EMBO J.* **18**, 38017–38026.
12. Goloubinoff P., Sassi A.S., Fauvet B., Barducci A., De Los Rios P. (2018) Chaperones convert the energy from ATP into the nonequilibrium stabilization of native proteins. *Nat. Chem. Biol.* **14**, 388–395.
13. Melkina O.E., Khmel I.A., Plyuta V.A., Koksharova O.A., Zavilgelsky G.B. (2017) Ketones 2-heptanone, 2-nonanone, and 2-undecanone inhibit DnaK-dependent refolding of heat-inactivated bacterial luciferases in *Escherichia coli* cells lacking small chaperon IbpB. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **101**, 5765–5771.
14. Kang P.-J., Craig E.A. (1990) Identification and characterization of a new *Escherichia coli* gene that is a dosage-dependent suppressor of a *dnaK* deletion mutation. *J. Bacteriol.* **172**, 2055–2064.
15. Gottesman S., Roche E., Zhou Y., Sauer R.T. (1998) The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system. *Genes Dev.* **12**, 1338–1347.
16. Чернова Т.А., Завильгельский Г.Б. (1991) Клонирование *lux*-регулона *Vibrio fischeri* в клетках *Escherichia coli*. *Биотехнология*. **3**, 37–40.
17. Завильгельский Г.Б., Зарубина А.П., Манухов И.В. (2002) Определение и сравнительный анализ нуклеотидной последовательности *lux* оперона *Photobacterium luminescens*, штамм Zm1. ERIC элементы как предполагаемые “горячие” точки рекомбинации. *Молекуляр. биология*. **36**, 786–795.
18. Завильгельский Г.Б., Котова В.Ю., Манухов И.В. (2003) Влияние белков – регуляторов RcsA и RcsB, на экспрессию *lux*-оперона *Vibrio fischeri* в клетках *Escherichia coli*. *Молекуляр. биология*. **37**, 704–711.
19. Есимбекова Е.Н., Торгашина И.Г., Кратасюк В.А. (2009) Сравнение иммобилизованной и растворимой биферментных систем НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза. *Биохимия*. **74**, 853–859.
20. Meighen E.A., Hastings J.W. (1971) Binding site determination from kinetic data. *J. Biol. Chem.* **246**, 7666–7674.
21. Lundin A., Thore A. (1975) Comparison of methods for extraction of bacterial adenine nucleotides determined by firefly assay. *Appl. Microbiol.* **30**, 713–721.
22. Лундовских И.А., Дементьева Е.И., Угарова Н.Н. (1998) Иммобилизованная рекомбинантная люцифераза светляков. Физико-химические свойства и применение. *Биохимия*. **63**, 820–826

THERMOSTABILITY AND REFOLDING OF PROTEINS IN BACTERIA IS DETERMINED BY THE ACTIVITY OF TWO DIFFERENT ATP-DEPENDENT CHAPERONE GROUPS

G. B. Zavilgelsky^{1,*}, E. Yu. Gnuchikh¹, and O. E. Melkina¹

¹State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, 117545 Russia

*e-mail: zavilgel@genetika.ru

The thermal stability of protein enzymes is determined *in vitro* by measuring the enzymatic activity during incubation at constant temperature. Refolding of thermal inactivated enzymes is carried out both *in vitro* and *in vivo*, in the presence of chaperones, usually at temperature optimal for the particular enzyme for the manifestation of enzymatic activity. In the present work the thermal stability of bacterial luciferases *in vitro* (cell

free extract) and *in vivo* (in bacterial cell) have been determined. Bacterial luciferases of *Aliivibrio fischeri*, *Photobacterium leiognathi* and *Photorhabdus luminescens*, which are characterized by a reduced thermostability, as protein substrates have been used. The uncoupler of oxidative phosphorylation – protonophore carbonyl-cyanide-3-chlorophenylhydrazone (CCCP) that reduce the intracellular concentration of ATP to a minimum level, and the volatile hydrophobic substance (–)-Limonene have been used. It is shown that if the CCCP (50 μM) or the (–)-limonene (7 μM) are added to the *Escherichia coli* MG1655 cell suspension the DnaKJE-dependent refolding of thermal inactivated luciferases is almost completely absent. The rate of the *P. luminescens* luciferase thermal inactivation (at 44°C) in the mutant strain *E. coli* PK202 $\Delta\text{dnaKJ14}$ is about two times higher than in MG1655 dnaK^+ strain; in turn, the thermal stability of the *P. luminescens* luciferase *in vivo* in the strain PK202 $\Delta\text{dnaKJ14}$, is about six times higher than the thermal stability of “cell-free extract” luciferase *in vitro*. When CCCP or (–)-limonene is added at early stage of thermal inactivation, the rates of luciferase thermal inactivation measured *in vivo* and *in vitro* are practically the same. It is shown that the ATP-dependent chaperones ClpA and ClpB are essential for the increase of thermostability of luciferases in bacterial cells. Taking the data presented in this paper into account, it is necessary to consider the presence in bacterial cells of two groups of ATP-dependent chaperones: 1st group is able to conduct the refolding both at low temperature after protein thermal inactivation and at high temperature at which protein thermal inactivation occurs (DnaKJE and GroEL/ES); 2st group is unable to conduct the standard refolding (i.e. at low temperature), but capable of maintaining nonequilibrium stabilization of protein native forms at high temperature (ClpA, ClpB and possibly still unknown chaperones).

Keywords: ATP-dependent chaperone, thermostability, refolding, bacterial luciferase