

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ШАПЕРОН GroEL/ES: ПРОЦЕССЫ ДЕНАТУРАЦИИ И РЕНАТУРАЦИИ

©2013 г. Н. А. РЯБОВА, В. В. МАРЧЕНКОВ,
С. Ю. МАРЧЕНКОВА, Н. В. КОТОВА,
Г. В. СЕМИСОТНОВ

Институт белка РАН, Московская область, Пущино,

I. Введение. II. GroEL/ES как молекулярный шаперон. III. Денатурация и стабильность GroEL и GroES. IV. Ренатурация GroEL и GroES. Роль лигандов и внешних условий. V. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Многолетние исследования процессов денатурации и ренатурации белков в основном подтверждают гипотезу Анфинсена о том, что вся необходимая и достаточная информация о пространственной структуре белка содержится в его аминокислотной последовательности [1, 2]. Вместе с тем, исследования процессов жизнедеятельности клеток в условиях различных клеточных стрессов выявили ряд белковых факторов, названных молекулярными шаперонами, которые вовлекаются либо в катализ процесса сворачивания белков, либо в регуляцию распределения вновь синтезированных белков между конкурирующими путями сворачивания и агрегации [3–5]. Таким образом, молекулярные шапероны создают оптимальные условия для протекания процесса сворачивания субстратных белков путем устранения «помех» или «нежелательных» межмолекулярных контактов [6, 7]. Кроме того, шапероны ассистируют сборку олигомерных комплексов, трансмембранный транспорт полипептидных цепей и их деградацию [2, 7, 8]. Важной функцией молекулярных шаперонов является также предотвращение летальной неспецифической ассоциации белков в стрессовых для клетки условиях [6].

Принятые сокращения: ANS – 8-анилино-1-нафталиンスульфоновая кислота, Hsp – heat shock protein, белок теплового шока.

Адрес для корреспонденции: Г.В. Семисотнов, nina@vega.protres.ru

Работа выполнена при поддержке грантами РФФИ (09-04-00768-а, 12-04-31966-мол_а) и ННМИ (55005607), программами «Молекулярная и клеточная биология» Президиума РАН и «Научные и педагогические кадры инновационной России» Минобрнауки РФ (гос. контракт № 2.02.740.11.0295)

Молекулярные шапероны обнаружены как в прокариотических, так и эукариотических организмах, и многие из шаперонов сами по себе являются сложными олигомерными белками, состоящими из большого количества субъединиц (с молекулярным весом от 10 до 100 кДа каждая), объединенных обычно в одно- или двухкольцевые структуры [9]. Поэтому один из интригующих вопросов состоит в понимании механизмов сворачивания самих шаперонов.

Целью настоящего обзора является анализ литературных и собственных данных авторов по исследованию процессов денатурации (разворачивания) и ренатурации (сворачивания) одного из наиболее интенсивно изучаемых шаперонов – белка теплового шока клеток *Escherichia coli* GroEL (Hsp 60), а также его партнера – ко-шаперона GroES (Hsp 10). GroEL представляет собой сложный олигомерный белковый комплекс, состоящий из 14-ти идентичных субъединиц (с молекулярным весом 60 кДа каждая), объединенных в две взаимодействующие торцами кольцевые структуры, содержащие по 7 субъединиц каждая [10]. Этот белок в процессе функционирования взаимодействует с другим олигомерным белком GroES, состоящим из 7-ми идентичных субъединиц (с молекулярным весом 10 кДа каждая), объединенных в куполообразную кольцевую структуру [11, 12].

Исследование процессов денатурации и ренатурации большого олигомерного белкового комплекса шаперона GroEL и его ко-шаперона GroES имеет отношение к выяснению двух основных аспектов в понимании механизма сворачивания белков. Одним является ответ на вопрос, каким образом сворачиваются белки, участвующие в сворачивании других белков? Второй аспект относится к получению новых знаний о процессе самоорганизации олигомерных белков, который до настоящего времени плохо изучен вследствие определенных трудностей в подборе условий для их эффективной самоорганизации *in vitro* [2].

II. GroEL/ES КАК МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ШАПЕРОН

Первый крупный олигомерный шаперон (GroEL) был обнаружен в клетках *E. coli* в начале 70-х годов как белок, необходимый для сборки фага λ [13, 14]. Было показано, что он способен нековалентно связываться с мономерной формой белка В фага λ , обеспечивая сборку головки фага. GroEL является одним из доминирующих белков клеток *E. coli*. Однако в условиях теплового шока доля этого белка в клетке резко возрастает [15]. В клетке GroEL может взаимодействовать как с вновь синтезируемыми белками, которые

не успели приобрести жесткую третичную структуру в процессе биосинтеза, так и с белками, которые по каким-либо причинам утратили свою жесткую структуру [16–20]. Нарушения экспрессии гена GroEL приводят к гибели клеток [21]. GroEL не обладает выраженной специфичностью по отношению к белковым мишеням. Исследования *in vitro* показали, что около 50% белков из экстракта клеток *E. coli*, будучи денатурированными, взаимодействуют с GroEL [22]. Также показано, что более 30% различных белков не способны свернуться в нативное состояние при отсутствии в клетке GroEL [18]. В экспериментах по ренатурации белков *in vitro* показано, что GroEL увеличивает выход нативного белка, ингибируя агрегацию несвернутых белковых молекул [23]. В ряде случаев для осуществления своей функции GroEL необходимо взаимодействовать с другим олигомерным белком теплового шока – GroES (Hsp10) [12, 24]. По данным электронной микроскопии [9] и рентгеноструктурного анализа [10, 25], GroEL состоит из 14 идентичных субъединиц по 57 кДа каждая. Субъединицы образуют два гептамерных кольца, лежащих друг на друге. Закристаллизованная структура GroEL представляет собой цилиндр высотой 145 Å и 135 Å в диаметре, с центральным каналом, диаметр которого составляет около 45 Å [10, 25] (рис. 1). В каждой субъединице GroEL (547 аминокислотных остатков) четко выражены три домена: апикальный, средний (промежуточный) и экваториальный (рис. 1). Апикальные домены (остатки 191–376) формируют торцы GroEL цилиндра и вовлечены в связывание белковых субстратов и ко-шаперона GroES [26–30]. По данным электронной микроскопии, ненативный субстратный белок связывается именно на торцах центрального канала [27, 28].

Экваториальный домен (остатки 6–133 и 409–523, всего 243) – самый большой домен субъединицы GroEL. Этот домен образован в основном α -спиральными участками и обеспечивает контакты между субъединицами в гептамерном кольце и контакты между гептамерными кольцами GroEL-частицы [10, 25].

Средний (промежуточный) домен субъединицы GroEL самый маленький (остатки 134–190 и 377–408, всего 89). Он образует подобие шарнирного соединения между апикальным и экваториальным доменами [10]. Анализ лиганд-индуцируемых конформационных изменений GroEL методом электронной микроскопии [9, 28, 31] и сравнение кристаллических структур GroEL и комплекса GroEL–GroES [10–12] (рис. 1) подтверждают, что основные лиганд-индуцируемые изменения структуры GroEL происходят благодаря

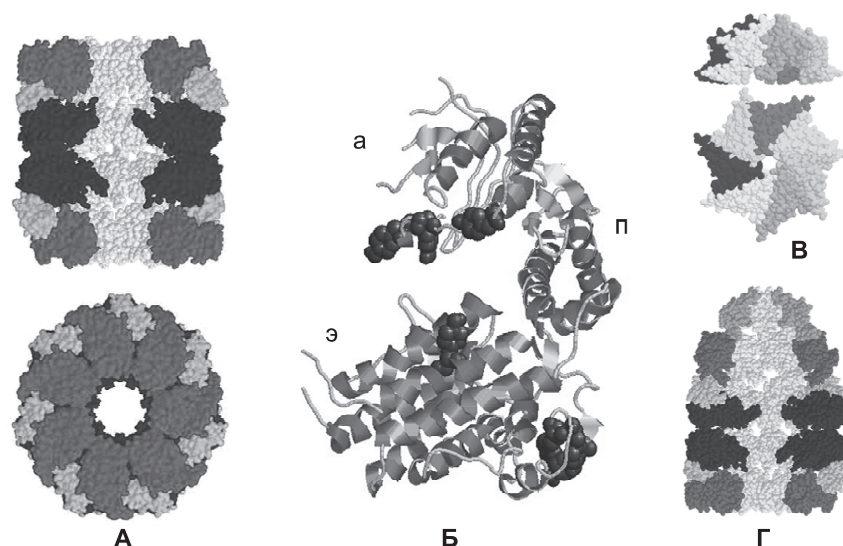


Рисунок 1. Пространственные структуры компонентов шаперонной системы клеток *E. coli* GroEL/ES.

А – 14-ти субъединичный двухкольцевой шаперон GroEL (вид сбоку – верх и с торца – низ). Для отображения внутренней полости на виде сбоку удалены по 3 субъединицы каждого кольца.

Б – структура субъединицы GroEL (а – апикальный, п – промежуточный и э – экваториальный домены).

В – 7-и субъединичный ко-шаперон GroES (вид сбоку – вверху, вид сверху – внизу).

Г – асимметричный комплекс шаперона GroEL и ко-шаперона GroES.

Для отображения внутренней полости комплекса удалены по 3 субъединицы из каждого кольца GroEL и GroES. Различными оттенками выделены домены субъединиц GroEL и субъединицы GroES.

Рисунок подготовлен с помощью программы Ras Win (based on Ras Mol 2.6 by Roger Sayle, Biomolecular Structures Group, Glaxo Wellcome Research & Development, Stevenage, Hertfordshire, UK) из файлов IDER [86] и IAON [12], находящихся в банке белковых структур PDB.

подвижности среднего домена. Мутации в среднем домене могут частично или полностью подавить функции GroEL [30].

Ко-шаперон GroES состоит из 7 идентичных субъединиц (с молекулярной массой 10 кДа каждая) и представляет собой купол с высотой приблизительно 30 Å и диаметром 70–80 Å, с отверстием около 10 Å. Внутренняя полость имеет высоту 20 Å и диаметр 30 Å.

Структура GroES имеет такую же симметрию, что и GroEL [11] (рис. 1).

Системы, подобные шаперонной системе GroEL/ES клеток *E. coli*, состоящие из двух компонентов – белков теплового шока hsp60 и hsp10, были обнаружены в хлоропластах и митохондриях эукариотических клеток [16, 32]. Эти белки обладают очень высокой гомологией с аналогичными белками клеток *E. coli* (GroEL и GroES) [16], что дало основание предполагать наличие сходства их пространственных структур.

Белковым субстратом молекулярного шаперона GroEL является в той или иной степени развернутая, ненативная полипептидная цепь. Шапероны способны связывать как небольшие (~2 кДа) неструктурированные полипептиды [33, 34], так и крупные (до 100 кДа) белки, находящиеся в денатурированном состоянии [35–38]. Белки могут находиться в ненативном состоянии как сразу после завершения их синтеза на рибосоме, так и вследствие воздействия повышенной температуры или других денатурирующих факторов на зрелые белки. GroEL хорошо взаимодействует с различными полипептидами как прокариотических, так и эукариотических организмов [17, 22, 24, 32, 35]. Комплекс с субстратными белками стабилизируется в основном гидрофобными взаимодействиями [30, 38–40]. Дополнительный вклад вносят также электростатические взаимодействия (сродство GroEL к своим белковым субстратам меняется в зависимости от ионных условий среды) [41–44].

Функционирование GroEL как шаперона обеспечивается его взаимодействием с рядом лигандов: ионами K^+ и Mg^{2+} , адениновыми нуклеотидами (ADP и ATP) и менее крупным, по сравнению с GroEL, ко-шапероном GroES [18, 20, 24, 45, 46]. Свободный GroEL обладает слабой АТФ-азной активностью (скорость гидролиза составляет 0.1 с^{-1} на одну субъединицу) при наличии ионов K^+ в растворе [45]. Прочное кооперативное связывание Mg-ATP ($K_{\text{дисс}} = 10\text{ мкМ}$) приводит к конформационным изменениям GroEL-частицы [31, 47].

Низкомолекулярные лиганды (адениновые нуклеотиды), взаимодействуя с GroEL в присутствии ионов Mg^{2+} , способны понижать константу связывания с ним белковых мишеней. В присутствии Mg-ATP GroEL и GroES быстро образуют комплекс $\text{GroEL}_{14}/\text{ATP}_7/\text{GroES}_7$. Последующий гидролиз ATP приводит к образованию очень стабильного комплекса $\text{GroEL}_{14}/\text{ADP}_7/\text{GroES}_7$ с константой диссоциации ~0.3 нМ [48, 49]. GroEL-частица имеет высокое сродство к одному гептамерному олигомеру GroES и низкое – ко второму олигомеру GroES, так что сначала было показано

наличие асимметричного комплекса одной GroEL-частицы с одним олигомером GroES [9, 12, 49, 50] (см. рис. 1). Однако GroEL-частица может образовывать комплекс и с двумя олигомерами GroES, причем доля симметричного комплекса прямо зависит от соотношения ATP/ADP и от концентрации ионов K^+ в растворе [51].

III. ДЕНАТУРАЦИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ GROEL И GROES

Информация о стабильности структуры олигомерных белков обеспечивает ключ к оценке их способности к эффективной самоорганизации *in vitro*. Олигомерные компоненты шаперонной системы клеток *E. coli* – тетрадекамерный GroEL и гептамерный GroES обладают сходной стабильностью по отношению к действию температуры и денатурантов, однако процессы денатурации и ренатурации GroEL в существенной степени зависят от присутствия лигандов, в то время как для GroES такая зависимость не выражена.

Процессы денатурации и ренатурации GroEL начали изучаться 20 лет назад и были в существенной степени инициированы публикацией статьи Н.М. Лисина и др. в журнале Nature в 1990 г. [52]. Авторы показали, что сложная тетрадекамерная частица GroEL (рис. 1) может быть реконструирована *in vitro* из развернутого мочевиной мономерного состояния в присутствии Mg-ATP. При этом, эффективность сборки GroEL частицы увеличивалась как при увеличении концентрации мономерной формы, так и при добавлении нативного GroEL (самошаперонирование) или ко-шаперона GroES.

Реконструкция начиналась с формирования свернутой мономерной формы GroEL_m, которая сворачивалась при удалении мочевины из раствора белка гель-фильтрацией. Полученная таким образом мономерная форма GroEL не способна специфически олигомеризоваться в отсутствие Mg-ATP, обладала большим содержанием вторичной структуры и компактностью, но была менее стабильной, чем в составе полного тетрадекамера GroEL₁₄ по отношению к действию температуры и мочевины [см. также 53, 54]. Свернутая мономерная форма (GroEL_m) характеризуется также существенно большим содержанием экспонированных на растворитель гидрофобных кластеров по сравнению с субъединицей в составе олигомера (GroEL_p) [54, 55]. Полученные нами данные подтвердили большинство из опубликованных ранее результатов. Во-первых, исследования денатурации полноразмерного GroEL и его ренатурации из развернутого мочевиной состояния в отсутствие Mg-ATP с

использованием электрофореза в поперечном градиенте мочевины [56, 57] показали, что изменение гидродинамического объема при разворачивании полноразмерного GroEL происходит в две стадии: сначала происходит его уменьшение в районе 2 М мочевины, а затем – заметное увеличение. Первая стадия связана, по-видимому, с диссоциацией олигомерной GroEL частицы на мономеры, которые в условиях диссоциации являются частично развернутыми [58]. Это согласуется с полученными ранее данными, указывающими на то, что именно в этом интервале концентраций денатуранта происходит резкое уменьшение интенсивностей рассеяния света [54, 58] и рентгеновских лучей [59], а также уменьшение амплитуды кругового дихроизма в области поглощения пептидных связей [54, 58]. Вторая стадия связана с дальнейшим разворачиванием мономеров GroEL и увеличением их гидродинамического объема. Гидродинамический объем развернутой мономерной формы (электрофоретическая подвижность) близок к гидродинамическому объему (электрофоретической подвижности) полной нативной GroEL частицы. Однако исследование разворачивания GroEL методом малоуглового диффузного рассеяния рентгеновских лучей указывает на то, что радиус инерции развернутого мономерного состояния на 15 Å (~20%) больше радиуса инерции нативного олигомера (~70 Å) [59, 60]. Уменьшение гидродинамического объема в процессе ренатурации GroEL из развернутого мочевиной состояния в отсутствие Mg-ATP происходит также в две стадии. Однако эти стадии отражают изменение гидродинамического объема при сворачивании мономера GroEL. Продукт ренатурации GroEL в районе 0.5 М мочевины обладает существенно большей электрофоретической подвижностью, чем полная GroEL частица в тех же условиях. Наличие двух стадий в процессе ренатурации мономерной формы GroEL связано, по-видимому, с последовательным сворачиванием доменов GroEL субъединицы. Надо отметить, что изменение электрофоретической подвижности при денатурации (разворачивании мочевиной) свернутой мономерной формы GroEL происходит точно так же, как и в случае ренатурации. Двухстадийный характер разворачивания мономерной формы (субъединицы) GroEL проявляется также и в изменении таких параметров как амплитуда спектра кругового дихроизма при 220 нм, интенсивность флуоресценции тирозиновых остатков и гидрофобного зонда ANS (данные не представлены). Поскольку в условиях диссоциации олигомерного GroEL (~2 М мочевины) мономерная форма в значительной степени развернута, можно предположить, что

в этих условиях развернут экваториальный домен, ответственный за межсубъединичные контакты, а апикальный домен сохраняет часть внутримолекулярных взаимодействий. Это предположение согласуется с данными, полученными авторами работы [58], указывающими на то, что апикальный домен субъединицы GroEL сохраняет остаточную структуру в районе 3 М мочевины.

Свернутая мономерная форма GroEL дестабилизируется и частично разворачивается при понижении температуры ниже 10°C [52–54, 61], что делает ее некомпетентной к специфической олигомеризации при низких температурах даже в присутствии ионов магния и адениновых нуклеотидов [53, 61].

Влияние лигандов и внешних факторов на стабильность олигомерной структуры GroEL-частицы стало предметом исследований ряда авторов. Так было обнаружено, что дестабилизация олигомерной структуры GroEL может быть достигнута небольшими концентрациями гуанидингидрохлорида (<0.5 М) [62, 63], присутствием Mg-ATP или Mg-ADP [55, 64], солей NaCl, KCl и трехвалентного катиона спермидина [63], а также высоким гидростатическим давлением [65–67] или пониженной температурой [61]. Небольшие концентрации денатурантов приводят также к дестабилизации комплексов GroEL с субстратными белками [68] и GroES [69]. Вместе с тем, ионы Mg^{2+} сами по себе, взаимодействие с субстратными белками и ко-шапероном GroES в значительной степени стабилизируют четвертичную структуру GroEL [61, 64, 65, 67, 68, 70, 71]. Таким образом, четвертичная структура GroEL характеризуется повышенной лабильностью, а ее стабильность регулируется как различными внешними факторами, так и лигандами. Такое свойство GroEL, возможно, обеспечивает его взаимодействие с субстратными белками, различными по аминокислотному составу, структуре и размеру [22].

В противоположность GroEL денатурация мочевиной его гептамерного партнера – ко-шаперона GroES является полностью обратимым процессом, который не зависит от присутствия каких-либо внешних факторов. Изменение гидродинамического объема при разворачивании мочевиной полноразмерного GroES₇ происходит так же, как и в случае GroEL₁₄ в две хорошо различимые стадии. В районе 2.5 М мочевины происходит распад олигомерной структуры с соответствующим уменьшением гидродинамического объема, а затем окончательное разворачивание мономеров с увеличением гидродинамического объема. Последовательность сворачивания (ренатурации) обратная – сначала мономеры достигают определенного (может быть, частично свернутого) конформационного состояния, компетентного

к специфической олигомеризации. Затем эти мономерные состояния олигомеризуются с формированием нативного гептамера GroES₇.

Этот результат полностью согласуется с литературными данными по исследованию денатурации и ренатурации ко-шаперона GroES (Hsp 10), указывающими на высокую обратимость этого процесса. Так, при исследовании стабильности GroES методами дифференциальной сканирующей калориметрии и кругового дихроизма при различном составе растворителя [72] было показано, что индуцируемое температурой разворачивание/сворачивание этого белка является спонтанным обратимым процессом, описываемым высоко кооперативным переходом между свернутыми гептамерами и развернутыми мономерами. В процессе денатурации свернутое мономерное состояние является энергетически невыгодным и поэтому не накапливается в заметных количествах. Стабилизация структуры мономерного GroES происходит главным образом благодаря межсубъединичным взаимодействиям [72]. Эти взаимодействия делают олигомеризацию как энтальпийно, так и энтропийно выгодной. Несмотря на высокую плотность заряженных остатков, стабильность GroES практически не зависит от концентрации солей при pH 7. Однако миллимолярные концентрации ионов Mg²⁺ заметно стабилизируют структуру GroES, по-видимому, вследствие их специфического связывания (приблизительно три Mg²⁺ связывающих центра на гептамер) [72]. Таким образом, GroES (Hsp 10) является хорошим примером роли четвертичной структуры в стабилизации малых по размеру белков. Каждая субъединица в составе гептамерных GroES и его аналогов содержит очень подвижную петлю (остатки с 16-го по 33), расположенную на нижнем торце молекулы (рис. 1) и приобретающую стабильную конформацию β-шпильки только при взаимодействии с GroEL [11, 12, 73, 74]. Было замечено также, что стабильность (температура денатурации) GroES увеличивается с увеличением концентрации белка [72]. Этот результат указывает на то, что разворачивание GroES повышением температуры сопровождается диссоциацией его олигомерной структуры. Показано, что олигомерная структура GroES обладает сильной тенденцией диссоциировать при понижении концентрации белка ниже микромолярной [75]. Высокая кооперативность и обратимость денатурации GroES были также показаны в случае разворачивания белка гуанидингидрохлоридом [76, 77] или мочевиной [77, 78]. Возможность существования свернутой мономерной формы GroES в неденатурирующих условиях была показана с помощью механического разворачивания ковалентно соединенных субъединиц GroES на атомно-силовом микроскопе [79].

Обратимость денатурации GroES в существенной степени зависит от времени инкубации белка в денатурированном состоянии [72], что может быть связано с его агрегацией в этом состоянии [77, 80]. Важным структурным элементом субъединиц GroES, обеспечивающим формирование их гептамерной четвертичной структуры, является 7 С-концевых аминокислотных остатков. Протеолитическое (карбоксипептидазой Y) отщепление этих остатков приводит к отсутствию специфической олигомеризации субъединиц GroES [81]. Важность этих остатков в формировании компетентной к олигомеризации субъединицы GroES была подтверждена нами и в случае ограниченного трипсинолиза. Таким образом, на основании литературных и собственных данных мы можем констатировать, что процесс денатурации (разворачивания) гептамерной молекулы GroES является высоко кооперативным процессом, в котором диссоциация олигомерной структуры сопровождается разворачиванием мономерной формы, что приводит к отсутствию заметного накопления промежуточных состояний в области денатурационного перехода, который хорошо описывается моделью двух состояний (нативного гептамерного и развернутого мономерного). В эту модель, однако, не вписываются данные по денатурации эукариотического Hsp10 [77], согласно которым разворачивание этого белка мочевиной не сопровождается диссоциацией гептамера, а денатурация гуанидингидрохлоридом приводит к диссоциации гептамера. Вместе с тем, ряд литературных данных [78] и наши данные указывают на то, что диссоциация гептамерной структуры прокариотического GroES при его разворачивании мочевиной происходит так же, как и при денатурации белка гуанидингидрохлоридом [76, 77] или повышением температуры [72].

IV. РЕНАТУРАЦИЯ GROEL И GROES. РОЛЬ ЛИГАНДОВ И ВНЕШНИХ УСЛОВИЙ

Ренатурация мономерной формы (субъединицы) GroEL при умеренных концентрациях белка происходит с высокой эффективностью и не требует никаких дополнительных факторов [52–55]. Вместе с тем, в одной из работ отмечалось, что при повышенных концентрациях белка простое разбавление раствора GroEL в присутствии более чем 3 М мочевины нативным буфером до условий существования свернутой мономерной формы (0.7 М мочевины) сопровождается значительной агрегацией [59]. Поэтому получение свернутой мономерной формы GroEL_m предпочтительно производить по методике, предложенной в работе [52], с использованием гель-фильтрации

для освобождения от высоких концентраций мочевины. Нами было подтверждено, что такая методика (с последующим концентрированием) позволяет получать свернутую мономерную форму GroEL с высоким выходом и с минимальной агрегацией [54]. Кроме того, такой подход позволяет сразу отделять агрегаты от мономерного белка. Надо отметить, что сворачивание мономерной формы GroEL происходит достаточно быстро (в секундном временном интервале), несмотря на ее большой молекулярный вес (~60 кДа) и доменную организацию (неопубликованные данные авторов). Кинетика восстановления тирозиновой флуоресценции хорошо описывается одноэкспоненциальным процессом с константой скорости $\sim 0.23 \text{ с}^{-1}$ ($t_{1/2} \sim 3 \text{ с}$). Вторичная структура мономерной формы в процессе ее ренатурации также восстанавливается быстро (в секундном временном интервале), но этот процесс происходит в три хорошо разделенные по времени стадии. Основная часть вторичной структуры белка (~60%) формируется за мертвое время кинетических экспериментов ($< 10^{-2} \text{ с}$). Остальная часть вторичной структуры формируется в измеримом интервале времен за две кинетические стадии: 1) ~30% за характерное время $t_{1/2} \sim 0.7 \text{ с}$, 2) ~10% за характерное время $t_{1/2} \sim 7 \text{ с}$. Сложный характер формирования вторичной структуры мономерной формы GroEL типичен для сворачивания глобулярных белков и связан с быстрым формированием промежуточного состояния типа «расплавленная глобула» и различной стабильностью элементов вторичной структуры [82]. Возможно, что определенную роль в этом процессе играет доменная организация субъединицы GroEL. В условиях инициации процесса специфической олигомеризации мономерной формы GroEL (в присутствии ионов Mg^{2+} и глицерина или Mg-ATP [52, 54, 59, 61]) времена кинетических стадий практически не изменяются, но заметно (в ~2 раза) увеличивается амплитуда самой медленной третьей стадии. Это свидетельствует о том, что в условиях олигомеризации стабилизируются дополнительные элементы вторичной структуры субъединиц, которые, возможно, являются ответственными за межсубъединичные взаимодействия.

Инициация процесса олигомеризации свернутой мономерной формы (субъединиц) GroEL и увеличение его эффективности достигается добавлением нескольких факторов. Так в первой работе по сборке GroEL частицы из свернутого мономерного состояния [52] было отмечено, что специфическая олигомеризация белка происходит в присутствии Mg-ATP, а ее эффективность возрастает при добавлении GroES. В этой же работе было замечено, что в присутствии Mg-ADP специфической олигомеризации не происходит, а добавление

нативного GroEL в дополнение к Mg-АТФ приводит к увеличению эффективности сборки GroEL частицы из мономерного состояния (самошаперонированию). Присутствие Mg-адениновых нуклеотидов необходимо не только для сборки GroEL, но и подобных ему шаперонов из разных организмов [61]. Последующие исследования сборки GroEL частицы из денатурированного состояния привели к неоднозначным результатам. Так в работе [83] было отмечено, что тетрадекамерная частица GroEL может быть собрана *in vitro* из мономеров и в отсутствие Mg-АТФ. Авторы работ [55, 59, 84] показали, что в присутствии сульфата аммония сборка GroEL частицы может быть инициирована и Mg-ADP [59, 84], а при высоких концентрациях сульфата аммония (~1 М) и без адениновых нуклеотидов [55]. Присутствие нативного GroEL не обязательно для сборки субъединиц (т.е. явление «самошаперонирования» не является необходимым для инициации сборки GroEL частицы из мономерного состояния) [59, 84]. Более того, адениновые нуклеотиды вовсе не обязательны, если сборка GroEL происходит в присутствии 20%-ного глицерина и ионов Mg^{2+} [61].

Таким образом, из анализа литературных данных можно заключить, что сборка четвертичной структуры GroEL *in vitro* определяется как его лигандами, так и внешними условиями (температура и ионная сила). Чтобы выяснить внешние и структурные факторы, влияющие на сборку GroEL частицы из мономерной формы, мы провели более подробное исследование этого процесса. Из полученных нами данных можно заключить следующее: во-первых, как и отмечалось в литературных источниках [52–55, 59, 61, 84], в отсутствие лигандов или в присутствии каждого лиганда по отдельности и при умеренных значениях ионной силы раствора сборка олигомерной GroEL частицы не происходит. Во-вторых, инициация специфической олигомеризации мономерной формы осуществляется добавлением определенной комбинации лигандов GroEL, которая зависит от ионной силы раствора и состава ионов. Так, при низких значениях ионной силы (~20 mM Tris-HCl) заметная олигомеризация наблюдается только в присутствии Mg-АТФ или Mg-ADP и двукратного молярного избытка нативного GroES. При умеренной ионной силе (0.2 M NaCl) присутствие даже высоких концентраций Mg-ADP или Mg-АТФ (до 100 mM) также не приводит к олигомеризации субъединиц GroEL без GroES. Как отмечалось в предыдущих работах [55, 59, 84], наибольшим стимулирующим олигомеризацию GroEL эффектом обладает сульфат аммония. В присутствии 0.1M сульфата аммония

заметная олигомеризация наблюдается как в присутствии только Mg-ATP, так и только Mg-ADP. При этом Mg-ATP более эффективен для сборки GroEL частицы, чем Mg-ADP. Вместе с тем, дополнительное присутствие двукратного молярного избытка GroES ($\text{GroEL}_{14} : \text{GroES}_7 = 1 : 2$) существенно увеличивает эффективность олигомеризации и в этих случаях.

В-третьих, эффект отдельных лигандов может быть заменен определенными внешними условиями (составом растворителя). Так эффект ионов Mg^{2+} может заменить высокая (~2 М KCl или NaCl) ионная сила раствора. В присутствии 20%-ного глицерина сборка GroEL частицы происходит в отсутствие адениновых нуклеотидов при наличии в растворе только ионов Mg^{2+} [61], а 1 М сульфат аммония инициирует сборку полноразмерного GroEL₁₄ и при отсутствии как ионов Mg^{2+} и адениновых нуклеотидов, так и GroES [55]. Все это наводит на мысль, что для инициации процесса олигомеризации GroEL частицы необходимо стабилизировать некий структурный элемент субъединицы (возможно элемент вторичной структуры), что и происходит при взаимодействии мономерной формы с ионами Mg^{2+} и адениновыми нуклеотидами, в присутствии 1 М сульфата аммония или при комбинации различных факторов.

Кинетику процесса олигомеризации GroEL легко зарегистрировать по увеличению интенсивности рассеяния света, поскольку большая олигомерная частица GroEL более эффективно рассеивает свет, чем существенно меньшая по молекулярной массе мономерная форма [54, 63, 66]. Нами были получены временные зависимости увеличения интенсивности рассеяния света (на длине волны 330 нм) в процессе олигомеризации GroEL частицы из свернутой мономерной формы, инициируемого соответствующими концентрациями необходимых факторов (данные не представлены). Оказалось, что как в случае инициации процесса олигомеризации ионами Mg^{2+} (1 мМ) и глицерином (20%), так и в присутствии сульфата аммония (50 мМ), ATP (0.05 мМ) и ионов магния Mg^{2+} (1 мМ) кинетика формирования полной частицы GroEL является двухфазной. Первая фаза на порядок быстрее второй (заключительной) фазы. Двухфазность процесса формирования (сборки) GroEL частицы может отражать накопление промежуточного олигомерного состояния, содержащего значительное количество субъединиц GroEL. Промежуточный олигомер можно наблюдать при олигомеризации GroEL в процессе электрофореза в неденатурирующих условиях в присутствии Mg-ATP (данные не представлены). При этом наблюдается повышенная размытость электрофоретических полос мономера и промежуточного олигомера,

что может свидетельствовать о достаточно быстром обмене между этими состояниями, в то время как электрофоретическая полоса, отвечающая положению полного олигомера GroEL₁₄, является более четкой, что связано, по-видимому, с его высокой стабильностью.

Природа и структура промежуточного олигомерного состояния на пути сборки GroEL частицы являются ключевыми моментами в понимании этого процесса. Однако, имеющихся данных недостаточно для характеристики промежуточного олигомера. Распад и формирование олигомерной структуры GroEL в равновесных процессах его денатурации и ренатурации происходят кооперативно, и заметного накопления промежуточных олигомерных структур не обнаружено [55, 83]. Однако существуют данные, свидетельствующие о том, что в присутствии субстратного белка промежуточное олигомерное состояние GroEL (предположительно гептамерное) может быть стабилизировано при промежуточных концентрациях мочевины [68]. Нами также были получены косвенные данные, указывающие на то, что таким промежуточным олигомером может быть гептамерное кольцо, способное взаимодействовать с полноразмерным GroES. Во-первых, линейные зависимости скоростей двух фаз в кинетике олигомеризации GroEL от концентрации мономерной формы, отражающие бимолекулярный характер этих фаз, имеют существенно различные наклоны. Увеличение скорости первой (наиболее быстрой) фазы почти в 7 раз превышает увеличение скорости второй (более медленной) фазы при увеличении концентрации мономерной формы от 0.2 до 1.2 мг/мл. Это свидетельствует о том, что молярные концентрации молекул, взаимодействующих на этих кинетических стадиях, сильно различаются и на первой стадии они существенно больше, чем на второй. Во-вторых, скорость первой фазы увеличивается с увеличением концентрации нативного ко-шаперона GroES, а скорость второй (более медленной) практически не зависит от концентрации GroES. В-третьих, при небольших концентрациях мономерной формы GroEL (менее 0.1 мг/мл) олигомеризация GroEL происходит только в присутствии GroES, а при больших концентрациях (~1 мг/мл) влияние GroES на кинетику олигомеризации GroEL существенно меньше (неопубликованные данные авторов). Все это позволяет предположить, что формирование полной олигомерной GroEL₁₄ частицы происходит через формирование промежуточного гептамерного кольца, которое является нестабильным и распадается до мономеров, пока не провзаимодействует с другим гептамерным кольцом с образованием тетрадекамерной структуры. Эта тетрадекамерная структура является стабильной как при низких концентрациях белка, так и при низких

ионных силах или в отсутствие лигандов. Можно предположить, что стабилизация гептамерного промежуточного олигомера в процессе сборки GroEL-частицы при небольших концентрациях субъединиц или низких ионных силах осуществляется в присутствии Mg-ATP взаимодействием с гептамерным ко-шапероном GroES. Такое предположение позволяет понять, почему ген GroES находится перед геном GroEL в GroE опероне клеток *E. coli*. Очевидно, полноразмерный GroES необходим для эффективной сборки GroEL при небольших концентрациях шаперона на начальном этапе биосинтеза. В этой связи, особое значение принимает тот факт, что сворачивание и сборка GroES осуществляется в отсутствие каких-либо дополнительных факторов [72, 76, 78]. Кроме того, скорость спонтанной самоорганизации GroES существенно выше, чем скорость лиганд-зависимой самоорганизации GroEL. Проведенные нами кинетические эксперименты по ренатурации GroES из развернутого мочевиной мономерного состояния для различных концентраций белка показали, что увеличение сродства сворачивающегося GroES к гидрофобному зонду АНС происходит достаточно быстро (с константой скорости $\sim 2 \text{ с}^{-1}$) и не зависит от концентрации белка. Можно предположить, что этот процесс является внутримолекулярным и отражает, по-видимому, сворачивание субъединиц GroES до компетентного к олигомеризации конформационного состояния. Это конформационное состояние субъединиц характеризуется высокой экспонированностью гидрофобных кластеров на растворитель и, по-видимому, не является жестко упакованным. Вместе с тем, константа скорости этого процесса хорошо согласуется с литературными данными о скорости сворачивания субъединиц GroES [85]. Второй процесс, проявляющийся в увеличении интенсивности рассеяния света, зависит от концентрации белка, заметно ускоряясь с увеличением концентрации, что свидетельствует о его бимолекулярной природе. Скорость этого процесса существенно выше скорости олигомеризации GroEL при тех же молярных концентрациях белка. Таким образом, скорость самоорганизации ко-шаперона GroES значительно выше скорости самоорганизации шаперона GroEL. Учитывая, что ген GroES экспрессируется раньше гена GroEL, можно предположить, что к моменту олигомеризации GroEL нативный полноразмерный GroES уже присутствует в клетке и может облегчать сборку шаперона при его небольших концентрациях.

На основании литературных и собственных данных о процессах денатурации и ренатурации молекулярного шаперона GroEL и его

ко-шаперона GroES мы предлагаем следующую схему самоорганизации комплекса GroEL/ES *in vitro* (рис. 2). Заметим, что основные положения этой схемы могут быть верны и для сборки этого комплекса *in vivo*. Согласно этой схеме развернутые мономерные формы GroEL и GroES (*in vitro*) или вновь синтезированные субъединицы этих белков (*in vivo*) достаточно быстро приобретают конформационное состояние, компетентное к олигомеризации. Вместе с тем, скорость этого процесса для GroES на порядок выше, чем для GroEL. Кроме того, субъединицы GroES могут специфически олигомеризоваться (как *in vitro*, так и *in vivo*) в отсутствие каких-либо специфических факторов и скорость этого процесса зависит только от концентрации субъединиц. В случае GroEL для инициации олигомеризации субъединиц необходимо присутствие ионов магния и адениновых нуклеотидов, а также умеренной ионной силы и полноразмерного GroES. Отметим, что все эти факторы в достаточных для олигомеризации GroEL концентрациях могут присутствовать и *in vivo*.

Субъединицы GroEL олигомеризуются в промежуточный кольцевой гептамер, который при небольших концентрациях белка и физиологических ионных силах является, по-видимому, нестабильным и быстро распадается до мономеров, пока не провзаимодействует с полноразмерным GroES. Стабильный комплекс промежуточного гептамера GroEL с гептамерным GroES формирует двухкольцевую структуру GroEL, которая является стабильной в отсутствие как Mg-адениновых нуклеотидов, так и GroES. Отдельные аспекты этой схемы (например, существование гептамерного GroEL и его комплекса с гептамерным GroES) требуют дальнейшего экспериментального подтверждения. Тем не менее, предложенная нами схема (модель) сборки молекулярного шаперона GroEL/ES не противоречит имеющимся экспериментальным данным и может быть принята для дальнейшей экспериментальной проверки.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании анализа литературных данных и собственных экспериментальных данных по равновесным и кинетическим процессам денатурации (разворачивания) и сворачивания (ренатурации) молекулярного шаперона GroEL и его ко-шаперона GroES можно заключить следующее. Во-первых, несмотря на сложную олигомерную структуру, эти белки способны приобретать нативную функционально активную конформацию из развернутого денатурантами состояния

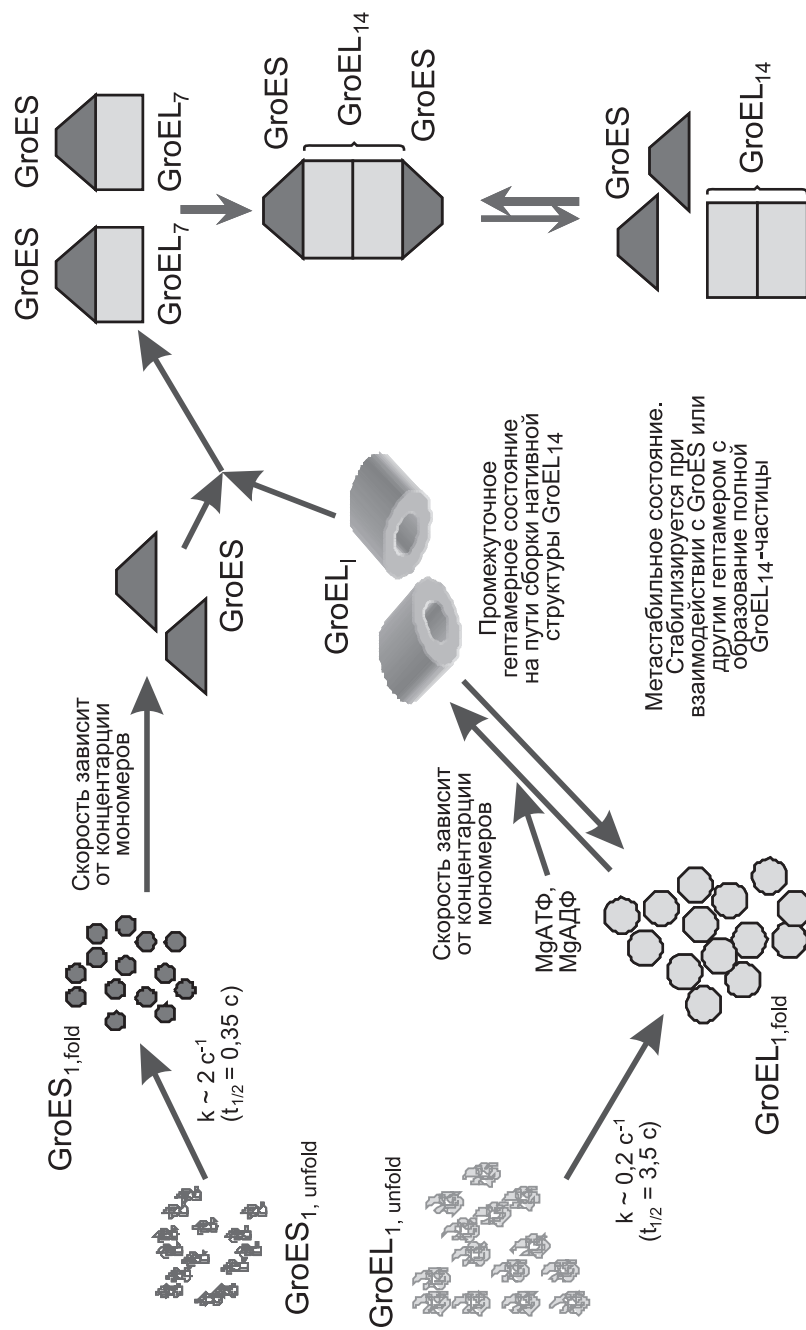


Рисунок 2. Схема сворачивания in vitro шаперона GroEL/ES.

in vitro. Во-вторых, разворачивание (денатурация) как GroEL, так и GroES начинается с диссоциации их олигомерной структуры до мономерного состояния, которое в условиях разрушения четвертичной структуры белков является в значительной степени развернутым. Сворачивание (ренатурация) этих олигомерных белков начинается со сворачивания субъединиц до конформационного состояния, компетентного к специфической олигомеризации. В случае GroES такое состояние формируется спонтанно без участия каких-либо дополнительных факторов. В случае GroEL для формирования конформационного состояния, компетентного к олигомеризации, необходимы его лиганды или определенные внешние условия (состав растворителя). Мы предполагаем, что компетентность субъединиц GroEL к олигомеризации обеспечивается, с одной стороны, стабилизацией некоего важного для межсубъединичных контактов элемента вторичной структуры, а с другой стороны, – подавлением электростатического отталкивания сильно отрицательно заряженной мономерной формы. Все это и осуществляется лигандами GroEL (ионы Mg^{2+} , адениновые нуклеотиды, GroES) или составом растворителя (сульфат аммония, глицерин и ионная сила). В-третьих, необходимо отметить определяющую роль ко-шаперона GroES в процессе сборки шаперона GroEL при его малых концентрациях или при низких или умеренных ионных силах раствора, что может быть важным для понимания механизма самоорганизации GroEL *in vivo*. Мы предполагаем, что это связано с низкой стабильностью (низкой вероятностью формирования) в этих условиях промежуточного гептамерного (однокольцевого) состояния, необходимого для сборки полной тетрадекамерной GroEL частицы. По-видимому, промежуточное гептамерное состояние GroEL взаимодействует с гептамерным GroES, стабилизируется, и вероятность образования полно-размерного стабильного тетрадекамера (двухкольцевого) GroEL резко повышается. Однако это предположение требует дальнейшей экспериментальной проверки. Проанализированные результаты указывают также на то, что лиганды GroEL активно участвуют не только в его функционировании как молекулярного шаперона, но и в его самоорганизации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Anfinsen, C.B. (1973) *Science*, **181**, 223–230.
2. Seckler, R. and Jaenicke, R. (1992) *FASEB J.*, **6**, 2545–2552.
3. Gething, M.J. and Sambrook, J. (1992) *Nature*, **355**, 33–45.
4. Freedman, R.B. (1992) Protein Folding in the Cell. In *Protein Folding*. / Edited by Creighton, T.E. New York: WH Freeman, 457–541.
5. Ellis, J. (1987) *Nature*, **328**, 378–379.
6. Lindquist, S., and Craig, E.A. (1988) *Annu. Rev. Genet.*, **22**, 631–677.
7. Gething, M.-J. (ed.) (1997) *Guidebook to Molecular Chaperones and Protein-Folding Catalysts* / Oxford: Oxford University Press, 584 p.
8. Ellis, J., Hemmingsen, S.M. (1989) *Trends Biochem. Sci.*, **14**, 339–342.
9. Saibil, H. and Wood, S. (1993) *Current Opinion in Structural Biology*, **3**, 207–213.
10. Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D.C., Joachimiak, A., Horwich, A.L., and Sigler, P.B. (1994) *Nature*, **371**, 578–586.
11. Hunt, J.F., Weaver, A.J., Landry, S.J., Gierasch, L., and Deisenhofer, J. (1996) *Nature*, **379**, 37–45.
12. Xu, Z., Horwich, A.L., and Sigler, P.B. (1997) *Nature*, **388**, 741–750.
13. Georgopoulos, C.P., Hendrix, R.W., Casjens, S.R., and Kaiser, A.D. (1973) *J. Mol. Biol.*, **76**, 45–60.
14. Sternberg, N. (1973) *J. Mol. Biol.*, **76**, 25–44.
15. Herendeen, S.L., VanBogelen, R.A., and Neidhardt, F.C. (1979) *J. Bacteriol.*, **139**, 185–194.
16. Hemmingsen, S.M., Woolford, C., van, d., V, Tilly, K., Dennis, D.T., Georgopoulos, C.P., Hendrix, R.W., and Ellis, R.J. (1988) *Nature*, **333**, 330–334.
17. Bochkareva, E.S., Lissin, N.M., and Girshovich, A.S. (1988) *Nature*, **336**, 254–257.
18. Horwich, A.L., Low, K.B., Fenton, W.A., Hirshfield, I.N., and Furtak, K. (1993) *Cell*, **74**, 909–917.
19. Ewalt, K.L., Hendrick, J.P., Houry, W.A., and Hartl, F.U. (1997) *Cell*, **90**, 491–500.
20. Hartl, F.U., and Martin, J. (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **5**, 92–102.
21. Fayet, O., Ziegelhoffer, T., and Georgopoulos, C. (1989) *J. Bacteriol.*, **171**, 1379–1385.
22. Viitanen, P.V., Gatenby, A.A., and Lorimer, G.H. (1992) *Protein Sci.*, **1**, 363–369.
23. Buchner, J., Schmidt, M., Fuchs, M., Jaenicke, R., Rudolph, R., Schmid, F.X., and Kiefhaber, T. (1991) *Biochemistry*, **30**, 1586–1591.
24. Goloubinoff, P., Christeller, J.T., Gatenby, A.A., and Lorimer, G.H. (1989) *Nature*, **342**, 884–889.
25. Braig, K., Adams, P.D., and Brunger, A.T. (1995) *Nat. Struct. Biol.*, **2**, 1083–1094.
26. Langer, T., Pfeifer, G., Martin, J., Baumeister, W., and Hartl, F.U. (1992) *EMBO J.*, **11**, 4757–4765.
27. Braig, K., Simon, M., Furuya, F., Hainfeld, J.F. and Horwich, A.L. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 3978–3982.
28. Chen, S., Roseman, A.M., Hunter, A.S., Wood, S.P., Burston, S.G., Ranson, N.A., Clarke, A.R., and Saibil, H.R. (1994) *Nature*, **371**, 261–264.
29. Ishii, N., Taguchi, H., Sasabe, H., and Yoshida, M. (1994) *J. Mol. Biol.*, **236**, 691–696.

30. Fenton, W.A., Kashi, Y., Furtak, K., and Horwich, A.L. (1994) *Nature*, **371**, 614–619.
31. Roseman, A.M., Chen, S., White, H., Braig, K., and Saibil, H.R. (1996) *Cell*, **87**, 241–251.
32. Cheng, M.Y., Hartl, F.U., Martin, J., Pollock, R.A., Kalousek, F., Neupert, W., Hallberg, E.M., Hallberg, R.L., and Horwich, A.L. (1989) *Nature*, **337**, 620–625.
33. Buckle, A.M., Zahn, R., and Fersht, A.R. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 3571–3575.
34. Chen, L. and Sigler, P.B. (1999) *Cell*, **99**, 757–768.
35. Houry, W.A., Frishman, D., Ecker-skorn, C., Lottspeich, F., and Hartl, F.U. (1999) *Nature*, **402**, 147–154.
36. Chaudhuri, T.K., Farr, G.W., Fenton, W.A., Rospert, S., and Horwich, A.L. (2001) *Cell*, **107**, 235–246.
37. Katsumata, K., Okazaki, A., Tsurupa, G.P., and Kuwajima, K. (1996) *J. Mol. Biol.*, **264**, 643–649.
38. Martin, J., Langer, T., Boteva, R., Schramel, A., Horwich, A.L., and Hartl, F.U. (1991) *Nature*, **352**, 36–42.
39. Lin, Z., Schwartz, F.P., and Eisenstein, E. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 1011–1014.
40. Hayer-Hartl, M.K., Ewbank, J.J., Creighton, T.E., and Hartl, F.U. (1994) *EMBO J.*, **13**, 3192–3202.
41. Perrett, S., Zahn, R., Stenberg, G., and Fersht, A.R. (1997) *J. Mol. Biol.*, **269**, 892–901.
42. Aoki, K., Taguchi, H., Shindo, Y., Yoshida, M., Ogasahara, K., Yutani, K., and Tanaka, N. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 32158–32162.
43. Katsumata, K., Okazaki, A., and Kuwajima, K. (1996) *J. Mol. Biol.*, **258**, 827–838.
44. Марченко Н.Ю., Марченков В.В., Кайшева А.Л., Кашипаров И.А., Котова Н.В., Калиман П.А., Семисотнов Г.В. (2006) *Биохимия*, **71**, 1668–1676.
45. Viitanen, P.V., Lubben, T.H., Reed, J., Goloubinoff, P., O'Keefe, D.P., and Lorimer, G.H. (1990) *Biochemistry*, **29**, 5665–5671.
46. Schmidt, M., Rutkat, K., Rachel, R., Pfeifer, G., Jaenicke, R., Viitanen, P., Lorimer, G., and Buchner, J. (1994) *Science*, **265**, 656–659.
47. Jackson, G.S., Staniforth, R.A., Halsall, D.J., Atkinson, T., Holbrook, J.J., Clarke, A.R., and Burston, S.G. (1993) *Biochemistry*, **32**, 2554–2563.
48. Burston, S.G., Ranson, N.A., and Clarke, A.R. (1995) *J. Mol. Biol.*, **249**, 138–152.
49. Bochkareva, E.S., Lissin, N.M., Flynn, G.C., Rothman, J.E., and Girshovich, A.S. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 6796–6800.
50. Todd, M.J., Viitanen, P.V., and Lorimer, G.H. (1994) *Science*, **265**, 659–666.
51. Llorca, O., Carrascosa, J.L., and Valpuesta, J.M. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 68–76.
52. Lissin, N.M., Venyaminov, S.Yu., Girshovich, A.S. (1990) *Nature*, **348**, 339–342.
53. Lissin, N.M., Hemmingsen, S.M. (1993) *FEBS Lett.*, **324**, 41–49.
54. Сурин А.К., Котова Н.В., Марченкова С.Ю., Марченков В.В., Семисотнов Г.В. (1999) *Биоорганическая химия*, **25**, 358–364.

55. Ybarra, J., Horowitz, P.M. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 22962–22967.
56. Creighton, T.E. (1979) *J. Mol. Biol.*, **129**, 235–264.
57. Goldenberg, D.P., Creighton, T.E. (1984) *Anal. Biochem.*, **138**, 1–18.
58. Gorovits, B.M., Seale, J.W., and Horowitz, P.M. (1995) *Biochemistry*, **34**, 13928–13933.
59. Arai, M., Inobe, T., Maki, K., Ikura, T., Kihara, H., Amemiya, Y., Kuwajima, K. (2003) *Protein Science*, **12**, 672–680.
60. Hiragi, Yu., Seki, Ya., Ichimura, K., Soda, K. (2002) *J. Appl. Cryst.*, **35**, 1–7.
61. Lissin, N.M. (1995) *FEBS Letters*, **361**, 55–60.
62. Mizobata, T., Kawata, Ya. (1994) *Bioch. Biophys. Acta*, **1209**, 83–88.
63. Horowitz, P.M., Hua, Su., Gibbons, D.L. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 1535–1542.
64. Gorovits, B.M., Horowitz, P.M. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 28551–28556.
65. Panda, M., Ybarra, J., Horowitz, P.M. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 5253–5259.
66. Panda, M., Ybarra, J., Horowitz, P.M. (2002) *Biochemistry*, **41**, 12843–12849.
67. Panda, M., Horowitz, P.M. (2002) *Biochemistry*, **41**, 1869–1876.
68. Mendoza, J.A., Demeler, B., Horowitz, P.M. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 2447–2451.
69. Todd, M.J., Lorimer, G.H. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 5388–5394.
70. Surin, A.K., Kotova, N.V., Kashparov, I.A., Marchenkov, V.V., Semisotnov, G.V. (1997) *FEBS Lett.*, **405**, 260–262.
71. Mendoza, J.A., Horowitz, P.M. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 25963–25965.
72. Boudker, O., Todd, M.J., Freire, E. (1997) *J. Mol. Biol.*, **272**, 770–779.
73. Landry, S.J., Zellstra-Ryalls, J., Fayet, O., Georgopoulos, C., Gierasch, L.M. (1993) *Nature*, **364**, 255–258.
74. Landry, S.J., Taher, A., Georgopoulos, C., Van Der Vies, S.M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 11622–11637.
75. Zondlo, J., Fisher, K.E., Lin, Zh., Ducote, K.R., Eisenstein, E. (1995) *Biochemistry*, **34**, 10334–10339.
76. Higurashi, T., Nosaka, K., Mizobata, T., Nagai, J., Kawata, Ya. (1999) *J. Mol. Biol.*, **291**, 703–713.
77. Guidry, J.J., Moczygamba, Ch.K., Steede, N.K., Landry, S.J. Wittung-Stafshede, P. (2000) *Protein Science*, **9**, 2109–2117.
78. Seale, J.W., Gorovitz, B.M., Ybarra, J., Horowitz, P.M. (1996) *Biochemistry*, **35**, 4079–4083.
79. Sakane, I., Hongo, K., Mizobata, T., Kawata, Ya. (2009) *Protein Science*, **18**, 252–257.
80. Iwasa, H., Meshitsuka, Sh., Hongo, K., Mizobata, T., Kawata, Ya. (2011) *J. Biol. Chem.*, **286**, 21796–21805.
81. Seale, J.W., Horowitz, P.M. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 30268–30270.
82. Kuwajima, K., Semisotnov, G.V., Finkelstein, A.V., Sugai, S., Ptitsyn, O.B. (1993) *FEBS Lett.*, **334**, 265–268.
83. Mendoza, J.A., Martinez, J.L., Horowitz, P.M. (1995) *Biochim. Biophys. Acta*, **1247**, 209–214.
84. Ybarra, J., Horowitz, P.M. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 2213–2215.

85. *Bascos, N., Guidry, J., Wittung-Stafshede, P.* (2004) *Protein Science*, **13**, 1317–1321.
86. *Boisvert D.C., Wang J., Otwinowski Z., Horwich A.L., Sigler P.B.* (1996) *Nat. Struct. Biol.*, **3**, 170–177.