

ROLI I PROTEINËS GROE NË AKTIVIZIMIN E CITRAT SINTETAZËS

(THE ROLE OF GROE PROTEIN ON CITRATE SYNTHETASE ACTIVATION)

TREBICKA A.^{1*}, KRISTO K.², BABANI F.², KOJA O.²

¹Departamenti i Biologjisë, Fakulteti i Shkencave Natyrore, Universiteti i Tiranës, SHQIPERI

²Departamenti i Fizikës, Fakulteti i Shkencave Natyrore, Universiteti i Tiranës, SHQIPERI

E-mail: *atrebicka@yahoo.it*

PËRMBLEDHJE

Molekulat chaperone janë një grup i madh proteinash të kudondodhura në qelizë. Ato luajnë një rol të rëndësishëm në ruajtjen e integritetit qelizor në kushtet e stresit termik. Koncepti chaperone përdoret për proteinat, që lidhen me proteina të tjera dhe i mbrojnë ato nga krijimi i lidhjeve të padëshiruara, që mund të çojnë në konformacione të gabuara ose agregime. Është vërtetuar se këto proteina luajnë një rol të rëndësishëm edhe në transportin përmes membranave të lëndeve të reja të sintetizuara në qeliza. Proteinat më të studiuara të kësaj familje me origjinë nga *Escherichia coli* janë GroEL (14-mer me nënjesi identike prej 60 kDa) dhe GroES (7-mer me nënjesi 10 kDa secila). Për karakterizimin funksional të GroEL si një proteinë Chaperone që ndihmon në rinatyrimin e proteinave jonative në qelizë u përdor sistemi in vitro i CS (citrato sintetaza). U arrit në përfundimin se riaktivizimi maksimal i CS përftohet në vlerat e përqendrimit 0,15 μM dhe provat e mëtejshme për ndikimin e GroE u bënë në këte vlerë të përqendrimit të enzimës në test. Ndikimi i GroE në sasinë e riaktivizimit të enzimës së denaturuar shihet qartë në rastin e CS. Prania e GroE pothuaj e trefishon sasinë e enzimës së rinaturuar. Viskoziteti i mjedisit luan

rol vendimtar në sasinë e enzimës së rinaturuar në mungesë të chaaperonit. Rinatyrimin spontan, në prani vetëm të glicerinës në testin e aktivitetit, është dyfishuar. Maksimumi i aktivitetit (65%) arrihet në prani të sistemit të plotë GroE dhe të glicerinës me përqendrim 20% .

Fjalët kyçe: Proteina chaperone, GroEL, GroES, CS (citrato sintetaza), rinatyrim.

ABSTRACT

Molecular chaperones are a group of proteins that have shown to be implicated in the post-translation folding and transport of newly synthesized proteins within the cell. Chaperonins play an important role in maintaining protein integrity under physiological as well under heat shock conditions. Forming tight complexes with folding intermediates they prevent aggregation and assist the folding of polypeptides. One of the members of this family is the *Escherichia coli* proteins GroEL (14-mer of 60 kDa subunits, also termed cpn60) and GroES (7-mer of 10 kDa subunits, also termed cpn10). For further characterization of the activity and the work-mechanism of these proteins it is interesting to investigate the interaction of the GroE-proteins with a variety of non-native polypeptide chains in detail with CS

(citrate synthetase). Maximum yields of renaturation were obtained at a concentration of 0,15 μ M CS. In refolding experiments in presence of the complete GroE system the yield of correctly folded protein is increased up to 60% compared to the 20% of the spontaneous reactivation. The results demonstrate that folding condition become more permissive in presence of 20% glycerol.

HYRJE

Palosja e saktë e proteinave ndodh vetvetiu nëpërmjet informacionit të radhitjes primare të aminoacideve. Koncepti i vetorganizimit u paraqit për herë të parë nga Anfinsen [1] që eksperimentoi me ribonukleazën e denaturuar duke e kthyer atë në gjendje native "in vitro" nëpërmjet hollimit me një tretësirë tampone të përshtatshme. Për arritjen e konformacionit nativ proteina ka nevojë për energji dhe informacion hapësinor [12]. Struktura hapësinore përfundimtare e proteinës është e qëndrueshme sepse është gjendja me energjinë minimale [2, 13]. Një sërë proteinash mund të luajnë një rol ndihmës në ripalosjen e proteinave. Një kategori e rëndësishme e tyre është grupi "chaperone".

Lidhja e chaperoneve me substratin ndalon reaksionet jospesifike duke rritur sasinë e proteinës native në qelizë të palosur korrektësisht. Ka shembuj proteinash, që mund të palosen vetëm kur janë të lidhura në matrica të patretshme. Bazuar në këto të dhëna u hodh hipoteza që të gjithë chaperonet funksionojnë në mënyrë të njëjtë [1].

Chaperonet nxisin arritjen në konfiguracionin nativ të proteinës, por nuk janë pjesë e strukturës së saj. Chaperonet nuk përmbajnë asnjë informacion hapësinor për palosjen, por vetëm shmangin bashkëveprimet e padëshiruara të pakthyeshme [12]. Proteina GroE është një nga molekulat chaperone më të studiuara. Mekanizmi i saktë i krijimit të kompleksit hapësinor proteinik nuk është akoma i qartë. Nga studimet e deritanishme mendohet se, proteinat chaperone luajnë rol në palosjen proteinike në qelizë si në fazën ko-translacionale dhe në atë post-translacionale.

Qëllimi ynë është vërtetimi i rolit të GroE në realizimin e palosjes së proteinave. Si "substrat"

për GroE përdorëm CS. Duke e denaturuar fillimisht, pamë shpejtësinë dhe sasinë e proteinës së rinaturuar në mënyrë të vetvetishme dhe me ndihmën e GroE. Meqë CS është enzimë, sasia e proteinës së ripërftuar mund të matet me një test aktiviteti.

MATERIALI DHE METODA

Përfitimi i GroEL dhe GroES u bë nga shtami *E.coli* JM109TZ136 sipas [15] duke ndjekur dhe modifikime të vonëshme [8]. Matriksi proteinik u kalua në kollonë kromatografike gelfiltruese (Sephacryl S300) për seleksionimin e parë dhe disa herë në një kollonë jonshkëmbyese (Q-Sepharose). Izolimi përfundimtar u bë me elektroforezë. (silver-stain SDS-gel) [10], [15]. Pas fluoreshencës spektroskopike (Merck Hitachi, 1000) kishte akoma papastërti. Për të larguar mbetjet e triptofanit, proteina u inkubua për 30 minuta në 42°C në tretësirë 10mM ATP, 10mM MgCl₂ dhe 10mM KCl. Për shkëputjen e vargjeve të ADN-së dhe ARN-së, tretësira trajtohet me ADN-azë dhe ARN-azë (0,2mg/ml) dhe me MgCl₂ 5mM, në inkubim 2 orë në temperaturën e dhomës.

Testi i aktivitetit për CS u bë sipas [17]. CS është një enzimë e matriksit mitokondrial që katalizon reaksionin e parë të ciklit të Krebsit. Oksalacetati, i sapodalë nga cikli, rigjenerohet nëpërmjet acetilimit, ku dhurues i grupin acetyl është acetylCoA.

Enzima eukariotike CS është një dimer. Masa molare e nënjesive është 43500 D. Në testin e aktivitetit me metodën e absorbimit, vërehet lidhja e grupit të lirë -SH me CoA mbas acetilimit të oksalacetatit. Lidhja bëhet e dukshme nëpërmjet një reaksioni me ngjyrë nga DTNB (ditio metil benzoat). Për eksperimentin u përdorën këta reagjentë.

Vëllimet	Substancat (μ l)	Përqendrimi (mM)	Përqendrimi në test (mM)
930	Tampon	50 Tris/HCl, pH 8	
10	Oksalacetat	10	0,1
30	AcetylCoA	5	0,15
10	DTNB	10	0,1
20	CS	E ndryshme	

Reaksioni fillon me shtimin e CS. Testi i aktivitetit u krye me anë të një fotometri në 412nm. U përdorën kyveta 1cm dhe temperatura e eksperimentit ishte 25°C. Aktiviteti specifik u llogarit sipas formulës:

$$A = \frac{\Delta E / \text{min} \cdot V}{\epsilon \cdot V_{\text{enz}} \cdot C}$$

$\Delta E / \text{min}$: madhësia e absorbimit në minutë

ϵ : 3.4 ($M^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

V_{enz} : vëllimi i enzimës (ml)

C : përqendrimi i enzimës (mg/ml)

Për enzimën aktive aktiviteti specifik ka vlerën 150 U/mg [17]

Denatyrimi i CS bëhet me anë të tretjes së enzimës native në tretësirë të përbërë: klorur guanidine 6,6M, TRIS/HCl 1mM, EDTA 2mM, DTE 20mM në pH 8. Pas inkubimit për një orë në temperaturën e dhomës denatyrimi konsiderohet i arritur.

Rinatyrimi bëhet nëpërmjet hollimit të tretësirave të denatyrura në raportet 1:100 me tretësirën tampon Tris/HCl 0,05M në pH 8. Për të studiuar ndikimin e Gro-E në rinatyrimin e enzimës janë përdorur kushte dhe gjendje të ndryshme, të paraqitura tek rezultateve. Për të minimizuar agregimin e enzimës dhe Gro-E pipetimet janë bërë duke përzierë tretësirën me shpejtësi.

Për analizimin e qëndrueshmërisë së Gro-EL ndaj agentëve denatyrues përdoret spektroskopia CD (dikroizmit rrethor), (Jasco DP500N Data Procesor). DC është dukuria e përthithjes në mënyrë specifike të dritës të polarizuar rrethore nga molekula optikisht aktive. Proteinat paraqesin dikroizëm rrethor sepse përmbajnë aminoacide, që janë optikisht aktivë. Karakteristikat e spektrave CD në zonën e largët (170-250 nm), përcaktohen nga konformacioni i vargjeve polipeptidike, kryesisht nga alfa helikat, që kanë një formë specifike në spektër [3].

REZULTATE DHE DISKUTIME

1. Përcaktimi i qëndrueshmërisë së proteinës ndaj agentëve denatyrues

Kjo është e rëndësishme, meqë synimi ynë është të vërtetojmë rolin e GroEL në rinatyrimin e proteinave të denatyrura. Ne duam të dimë

deri në cilat përqendrime të lëndës denatyruese mund të kemi siguri për vete GroEL.

Një sasi e denatyruesit mbetet ende në tretësirën përfundimtare me gjithë hollimin që i bëhet asaj. Për të studiuar ndikimin e denatyruesit u inkubua proteina në përqendrime në rritje të guanidinës.

Denatyrimi u vlerësua nga studimi i spektrave CD në 222 nm duke vërejtur zvogëlimin e sasisë së strukturave sekondare (alfa helikave), që janë masë e denatyrimit duke e krahasuar me strukturën native të konsideruar si vlerë 100%.

Nga spektret CD del se pika kritike mes gjendjes së denatyruar dhe native qëndron në vlerën e përqendrimit të klorurit të guanidinës 1,1M (Figura 1).

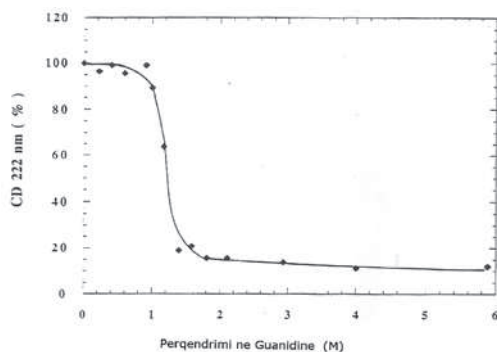


Figura 1. Rinatyrimin e CD i ndjekur me spektër DC

Meqë në testet e aktivitetit për citrat sintetazën, përqendrimi mbetet i lëndëve denatyruese për shkak të hollimit nuk do ta kalojë asnjëherë vlerën 0,6M, mund të themi se kjo e fundit nuk do të luajë rol në strukturën dhe rolin e GroE.

2. Ndikimi i GroE në aktivizimin e citrat sintetazës

Për këtë u përdor testi i aktivitetit në raportet e përshkruara në pjesën e metodikës. Përqendrimi i CS në testin përfundimtar ishte 0,15 μ M, ndërsa ai i GroEL dhe GroES 4,2 μ M. Absorbimi u mat në 412nm në 20°C.

Nga paraqitja grafike (Figura 2), shihet se aktivizimi spontan i enzimës me përqendrimin 0,15 μ M, në tretësirën rinatyruese 0,1M Tris/HCl, 10mM MgCl₂, 10mM KCl në pH 8, arrin deri në vlerën 20%. Aktivizimi në të njëjtin tampon me

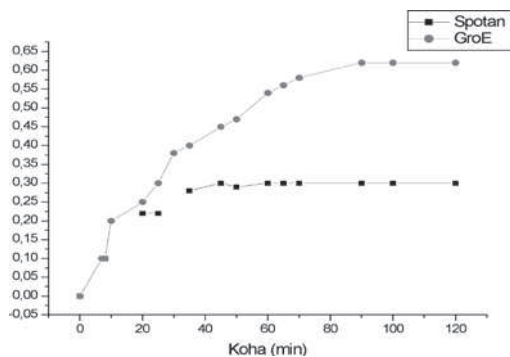


Figura 2. Aktiviteti i CS në mungesë dhe prani të GroE

praninë e GroEL dhe GroES në përqendrimin 4,2 μ M dhe 2mM ATP e rrit shkallën e riaktivizimit deri në 60%.

Ndikimi i proteinës kujdestare në sasinë e riaktivizimit të enzimës së denaturuar është mjaft i qartë. Kjo është vlera më e larta nga pesë prova të bëra për këtë eksperiment.

3. Ndikimi i viskozitetit të mjedisit në riaktivizimin e CS

Eksperimenti u përsërit duke përdorur përqendrime të ndryshme të glicerinës nga 2% në 20% në tretësirën rinatyruese me përbërje 0,1M Tris/HCl, 10mM MgCl₂, 10mM KCl në pH 8. Viskoziteti i mjedisit është një faktor stabilizues për palosjen spontane [13, 15].

Rezultatet e paraqitura në grafik (Figura 3), tregojnë që kushtet bëhen më të përshtatshme në prani të glicerinës në tretësirën rinatyruese në nivele mbi 10%. Sasia e riaktivizimit rritet deri në 45%. I njëjti eksperiment u zhvilluar duke shtuar GroE për të vlerësuar efektin e njëkohshëm të faktorëve (Figura 4). Në praninë e sistemit të plotë chaperon dhe glicerinës 20% maksimumi i proteinës së rinaturuar është në nivelin 65%.

4. Ndikimi i përqendrimit të NaCl në rinatyrimin e citrat sintetazës.

Për të studiuar si lidhet substrati i denaturuar me GroE, u bënë disa matje në përqendrime të ndryshme të kripës NaCl, në prani dhe në mungesë të kompleksit GroE.

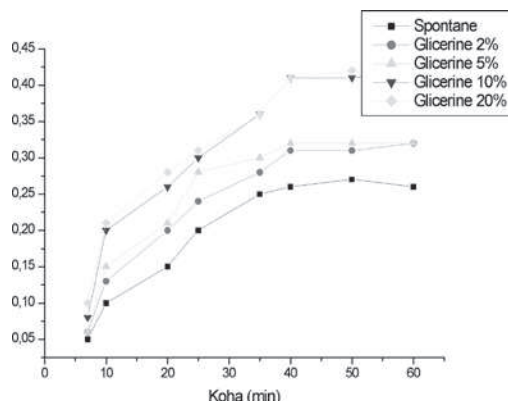


Figura 3. Aktiviteti i CS në përqendrime të ndryshme të glicerinës

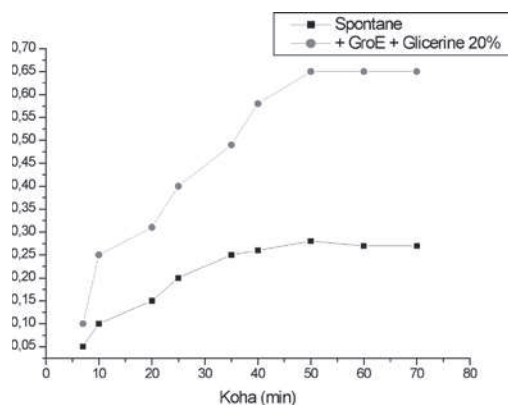


Figura 4. Aktiviteti i CS në glicerinës 20% dhe GroE

Nëse bashkëveprimi proteinik do të kishte një natyrë elektrostатike atëherë lidhja e citrat sintetazës jo native me GroE do të ndikohej nga ndryshimi i forcës jonike të mjedisit. Me rritjen e përqendrimit të kripës, sasia e citrat sintetazës së rinaturuar do të zvogëlohej sepse do të mbizotëronin forcat e bashkëveprimit me jonet e kripës, në krahasim me forcat e bashkëveprimit brenda dhe ndërmolekulare. Testet u bënë në përqendrime të rritje të NaCl nga 0 M deri në 1 M.

U pa ndikimi i përqendrimit të kripës si në rastin e rinatyrimin spontan edhe në rastin e rinatyrimin në prani të kompleksit GroE.

Rezultatet janë paraqitur në Tabelen 1.

Këto rezultate shprehin qartë se rritja e përqendrimit të NaCl nuk ka asnjë ndikim në sasinë

Përqendrimi i NaCl (M)	CS në (%) e rinatyrar spontanisht	CS në (%) e rinatyrar + GroE
0	19	52
0,05	22	55
0,1	17	58
0,5	27	59
1	22	52

Tabela 1. Ndikimi i përqendrimit të NaCl në rinatyrimin e citrat sintetazës.

e proteinës së ripërftuar, si në rastin e rinatyrimit spontan ashtu dhe në rastin e rinatyrimit në prani të GroE.

PËRFUNDIME

1. Ndikimi i GroE në sasinë e riaktivizimit të enzimës së denatyrar shihet qartë në rastin e CS. Prania e GroE pothuaj e trefishon sasinë e enzimës së rinatyrar (Figura 1).

2. Viskoziteti i mjedisit luan rol të rëndësishëm në sasinë e enzimës së rinatyrar kur GroE nuk është e pranishme. Kjo është mëse e qartë në rastin kur rinatyrimi ndodh në mënyrë spontane në një mjedis me viskozitet në rritje. Në këtë rast (Figura 2) sasia e proteinës së riaktivizuar arrin më shumë se dyfish (20-45%). Në rastin kur kemi në mjedis edhe praninë e chaperonit, efekti i viskozitetit nuk është me aq thelbësor. Në këtë rast efekti chaperon "mbulon" rolin stabilizues të glicerinës për lidhjet e padëshiruara që shoqërohen me agregime. Kjo ka të bëjë me mekanizmin specifik të veprimit të chaperonit. Lidhja e zinxhirit proteinik të GroEL ndodh në mënyrë spontane, përkundrazi lëshimi i tij kërkon praninë e GroES dhe ATP. Për njohjen e saktë në nivel molekular të këtij bashkëveprimi punohet akoma. Deri tani dihet se procesi chaperon, kalon nëpër tre faza, kapja, palosja dhe lëshimi i proteinës. GroEL është një tetradekamer i organizuar në dy unaza shtatëshe mbi njëra tjetrën dhe GroES një heptamer në formë të një unaze.

Maksimumi i aktivitetit (65%) arrihet në praninë e glicerinës në nivelet mbi 10% dhe të sistemit të GroE (Figura 3).

3. Mosndikimi i përqendrimit të NaCl në sasinë e proteinës së rinatyrar jep të dhëna për

natyrën jo elektrostative të bashkëveprimit

Përfundimisht mund të themi se roli i kompleksit GroE si një proteinë chaperone, që ndihmon në rinatyrimin e proteinave jonative në qelizë u rivërtetua në sistemin in vitro të CS në kushtet specifike të përdorura nga ne.

BIBLIOGRAFIA

- Anfinsen C.B., Scheraga H.A., (1975), *Adv. Protein Chem.* **29**: 205-300.
- Buchner J., Schmidt M., Fuchs M., Jaenicke R., Rudolph R. (1991), *Biochemistry* **30**: 1586-1591.
- Cantor and Schimmel. *Biophysical Chemistry*. (1980), 150-178.
- Eaton C.M., Wright N., Hearse D., and Shattock M. (2002). GAPDH oxidation during cardiac ischemia and reperfusion. *J. Mol. Cell Cardiol.* **34**: 1549-1560.
- Ellis R.J., van der Vies S.M., (1991), *Ann. Rev. Biochem.* **60**: 321-347.
- Dobson C.M. (2004). Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **15**: 3-16.
- Georgopoulos C.P., Hendrix R.W., Casjens S.R., Kaiser A.D. (1973), *J. Mol. Biol.* **76**: 45-60.
- Grallert H., Rutkat K., Buchner J. Limits of Protein Folding inside GroE complexes. *J. Biol. Chem.*, (2000), **275** (27): 20424- 20430.
- Harl F.U., Neupert W., (1990), *Science* **247**:930-938
- Heukeshoven J., Dernik R. (1988), *Elektrophoresis* **9**: 28.
- Inobe T., Takahashi K., Maki K., Enoki S. Asymmetry of the GroEL-GroES complex under physiological conditions as Revealed by Small-angle X-Ray Scattering. *Biophys. J.* Feb 15, 2008; **94** (4): 1392-1402.
- Jaenicke R., Rudolph R. (1989), in: *Protein Structure: A practical Approach*, Hrsg: 191-223.
- Jaenicke R. (1991), *Biochemistry* **30**: 3147- 3161.
- Lanzetta P., Alvrez L.J., Reinach P.S., Candia O.A., (1979), *Analyt. Biochem.* **100**: 95-97.
- Schmidt. M. et al. *Symetric complex of GroE chaperonins as part of the functional cycle.* *Science* (1994) **265**: 656-9.
- Vittanen P.V. et al. (1990), *Biochemistry* **29**: 5665-5671.
- West & Price, (1988), N.C., *Biochem J.* **251**: 135-139.