

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ШАПЕРОНА Skp ИЗ *Yersinia pseudotuberculosis* С МУЛЬТИДОМЕННЫМИ БЕЛКАМИ ПРИ РАЗНЫХ ЗНАЧЕНИЯХ pH СРЕДЫ

Сидорин Е.В., Хоменко В.А., Соловьева Т.Ф.

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН
просп. 100 лет Владивостоку, 159, г. Владивосток, 690022, РФ; e-mail: sev1972@mail.ru

Поступила в редакцию: 30.07.2018.

Аннотация. Белок Skp *Yersinia pseudotuberculosis* выполняет функции периплазматического шаперона в бактериях и обладает способностью связывать IgG человека и кролика. Данная работа посвящена изучению влияния этого шаперона на агрегацию IgG человека при разных значениях pH среды. Для решения этой задачи с помощью метода динамического рассеяния света была исследована кинетика агрегации rSkp, IgG и IgG в присутствии шаперона в кислом, нейтральном и щелочном растворах. Было показано, что в присутствии rSkp скорость процессов самоассоциации и агрегации IgG существенно снижается. Полученные результаты демонстрируют pH-зависимый характер шаперонной и иммуноглобулинсвязывающей активности rSkp. Наиболее устойчивые низкомолекулярные комплексы (R_n до 10 нм) между шапероном и IgG человека образуются при кислых значениях pH среды. В случае защелачивания реакционной среды шаперонная активность rSkp снижается, и агрегация IgG хотя и замедляется, но в меньшей степени, чем при кислом pH. Полученная информация может представлять интерес для разработчиков стабильных и качественных биофармацевтических препаратов на основе иммуноглобулинов.

Ключевые слова: шаперон Skp, *Yersinia pseudotuberculosis*, агрегация белков, белок-белковые взаимодействия, динамическое рассеяние света.

Белок Skp выполняет функции шаперона в грамотрицательных бактериях, участвуя в биогенезе целого ряда интегральных белков наружной мембраны. Он локализован в периплазматическом пространстве бактериальной клетки, связывает и защищает от агрегации мембранные белки, которые в развернутом виде пересекают цитоплазматическую мембрану и попадают в водную среду периплазмы [1-3]. Наряду со способностью взаимодействовать с белками наружной мембраны в качестве шаперона белки Skp обладают и другими свойствами, которые могут быть биологически и физиологически значимыми. Они проявляют липополисахарид- и ДНК-связывающую активность [4-7] и являются хемоаттрактантами для моноцитов и полиморфноядерных лейкоцитов [8].

Ранее нами было показано, что Skp *Yersinia pseudotuberculosis* обладает свойством неиммунным способом (минуя антигенсвязывающие участки IgG (антител)) связывать IgG человека и кролика, как в виде мономера (Skp) [9], так и в форме гомотримера (Skp₃) [10]. В представленной работе нами было продолжено изучение шаперона Skp *Y. pseudotuberculosis* в качестве иммуноглобулинсвязывающего белка. Целью работы являлось определение качественных и количественных характеристик иммуноглобулинсвязывающей активности Skp в реакции связывания IgG человека при разных значениях pH среды. Белок Skp *Y. pseudotuberculosis* экспрессировали в *E. coli*, рекомбинантный белок (rSkp) выделяли из клеток и очищали, как описано нами ранее [10]. В качестве белкового субстрата для связывания с шапероном rSkp использовали коммерческий образец поликлональных IgG человека (ICN Pharmaceuticals, США). Как ранее было установлено, rSkp *Y. pseudotuberculosis* может длительное время храниться в буфере с низкими значениями pH, сохраняя иммуноглобулинсвязывающую активность, но достаточно быстро (в течение недели) агрегирует и выпадает в осадок при основных и нейтральных значениях pH. Методом динамического рассеяния света (ДРС) было изучено поведение rSkp в водных растворах при различных значениях pH. Для количественного и качественного описания процессов, связанных с изменением размеров частиц, которые образуются при самоассоциации и агрегации rSkp, были использованы два метода анализа полученных корреляционных функций: анализ распределения (определяет распределение фактического размера и процент для каждого из пиков распределения) и анализ кумулянтов (определяет средний гидродинамический размер частиц и индекс полидисперсности). Расчет среднего гидродинамического радиуса частиц всего образца (Z -average) и гидродинамических радиусов (R_n) частиц при анализе их объемного распределения проводили с помощью программного обеспечения к прибору (ZetaSizer Nano ZS "Malvern", Великобритания). Полученные результаты представлены в таблице 1 и на рисунке 1. По данным метода ДРС rSkp в 0,05М натрий ацетатном буфере, pH 5,0, имел в течение 6 дней мономодальное распределение с преимущественным содержанием частиц с R_n и Z -average равными 3,6 нм и 6,4 нм соответственно. Подобное распределение частиц также наблюдалось в течение первых четырех часов при переводе шаперона в растворы с нейтральным и щелочным значениями pH, но при этом величина Z -average образцов резко возрастала (61 и 154 нм при pH 6,7 и 7,9 соответственно). Дальнейшая инкубация растворов, в течение 24 часов, приводила к еще большему увеличению Z -average (341 и 382 нм при pH 6,7 и 7,9 соответственно) и появлению различий в распределении частиц: в растворе с pH 6,7 преимущественно сохранялись мелкие частицы (3,6 нм), в то время как в буфере с pH 7,9 частиц с R_n меньше 200 нм не наблюдалось. Таким образом, можно сделать вывод, что при изменении значений pH среды от кислых к щелочным наблюдается агрегация rSkp *Y. pseudotuberculosis*, и ее скорость увеличивается с увеличением pH в направлении к изоэлектрической точке белка ($pI = 9,33$).

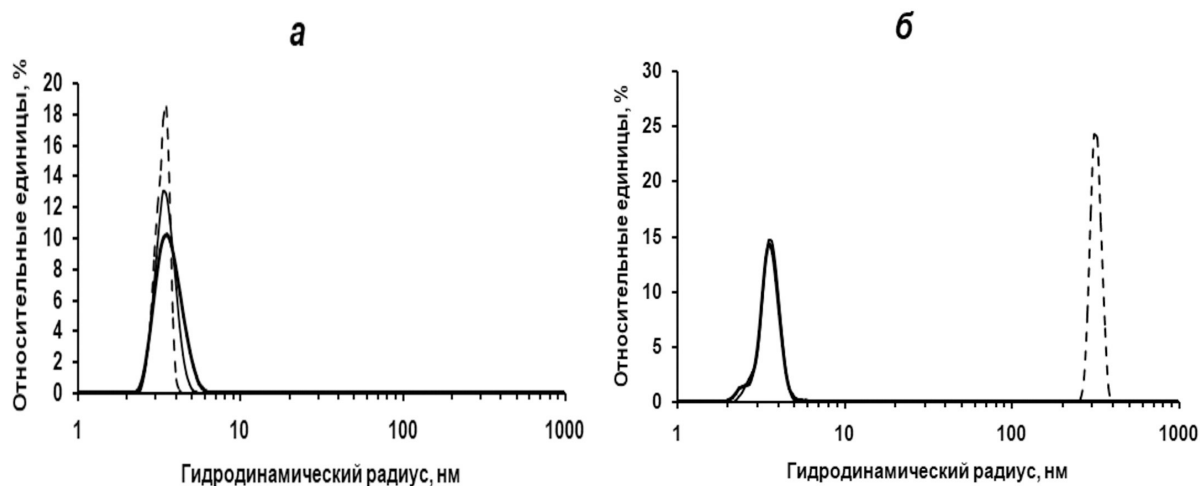


Рисунок 1. Объемное распределение по размеру частиц rSkp *Y. pseudotuberculosis*: (а) в буфере pH 5,0, время инкубации в течение 6 дней (сплошная широкая линия), в буфере pH 6,7, время инкубации 4 (сплошная тонкая линия) и 24 (прерывистая линия) часа и (б) в буфере pH 7,9, время инкубации 60 мин (сплошная широкая линия), 4 (сплошная тонкая линия) и 24 (прерывистая линия) часа

Мы также изучили поведение поликлональных IgG человека в водных растворах с кислым, нейтральным и основным pH. На рисунке 2а и в таблице 2 приведены диаграмма относительного объемного распределения по размеру (R_H) и Z-Average частиц IgG человека во времени и при трех значениях pH (5,1, 6,7 и 7,9) соответственно.

При переводе образца в буферный раствор с меньшей ионной силой и значением pH 6,7 в течение первых 5 часов белок демонстрировал преимущественное содержание (98 %) частиц с $R_H = 5,6 \pm 0,5$ нм, что согласуется с размерами мономера IgG, приведенными в литературе [11-13]. Несмотря на то, что по данным объемного распределения размер частиц IgG оставался в течение 5 часов неизменным, величина Z-average белка возрастала с момента разбавления и к 30 мин и 5 часам составляла 110,3 и 174,8 нм соответственно. Подобное поведение белка говорит о его медленной самоассоциации и агрегации до крупных седиментирующих частиц. Величина Z-average IgG к 24 часам была 1099 нм, и частиц с R_H меньше 118 нм уже не наблюдалось. В буферных растворах с кислыми и щелочными значениями pH скорость процессов самоассоциации и агрегации поликлонального IgG человека была значительно выше (рис. 2а). При pH 7,9 в течение первых пяти часов можно было наблюдать частицы с R_H , соответствующим мономерам IgG: к 30 мин и 5 часам частицы с R_H менее 10 нм составляли 13,4 и 27,5 % соответственно. Однако основной объем в растворе IgG приходился на частицы с размером более 200 нм: к 30 минутам и 5 часам они составляли 61,1 и 48,7 % соответственно. К 24 часам частицы с R_H менее 200 нм в растворе не обнаруживались. Некоторое перераспределение между крупными и мелкими частицами в течение первых пяти часов может свидетельствовать об обратимом механизме самоассоциации IgG в этих условиях. Однако равновесная самоассоциация белков со временем переходит в односторонний процесс необратимой агрегации с ростом размеров образуемых частиц. В кислых растворах процесс необратимой агрегации наблюдался с первых 30 минут, в образце не фиксировались частицы менее 10 нм, а основной объем занимали частицы с R_H более 200 нм (76,1 %), содержание которых к 5 часам увеличивалось до 93,9 % (рис. 2). К 24 часам по данным объемного распределения частиц по R_H содержание частиц менее 10 нм выросло от 0 % при 5 часах наблюдения до 27,6 %. Наблюдаемый рост относительного вклада мелких частиц в общее объемное распределение, скорее всего, является кажущимся и может быть связан с седиментацией очень крупных частиц, не фиксируемых прибором.

С целью изучения возможных шаперонных свойства rSkp *Y. pseudotuberculosis* в отношении IgG, т.е. его способности предотвращать агрегацию IgG, образуя с ним растворимые (обратимые/равновесные) комплексы, в

Таблица 1. Средний гидродинамический радиус (Z-Average) rSkp *Y. pseudotuberculosis* в водных растворах при разных значениях pH и сроках инкубации

Величина pH; время инкубации	Z-Average, нм	Величина pH; время инкубации	Z-Average, нм
pH 5,1, 6 дн.	6,4	pH 7,9, 60 мин	155,3
pH 6,7, 4 ч	61,1	pH 7,9, 4ч	153,9
pH 6,7, 24 ч	341,2	pH 7,9, 24ч	382,6

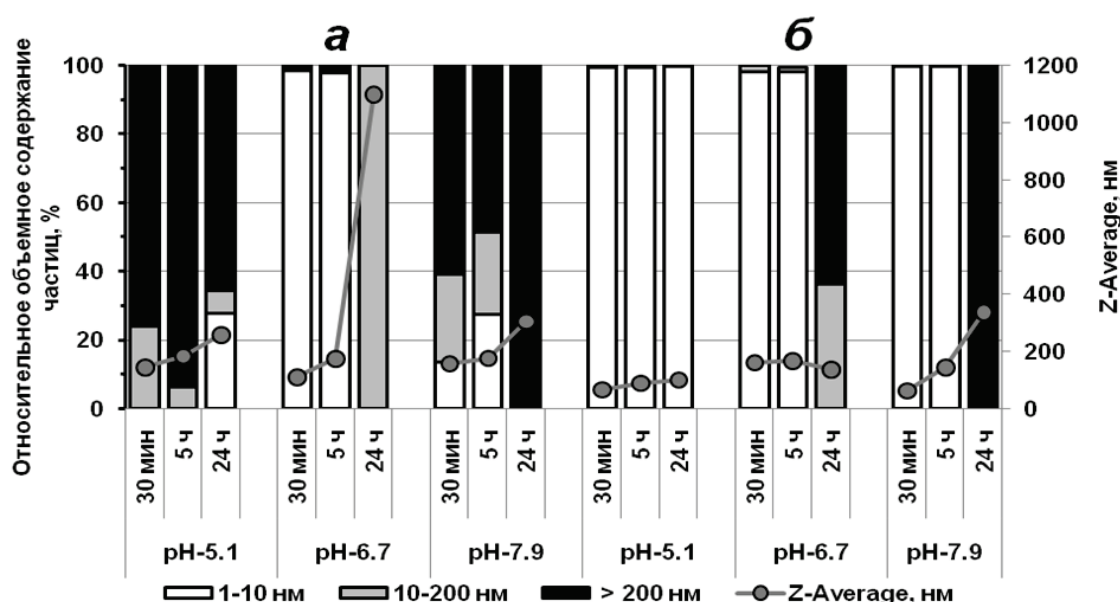


Рисунок 2. Относительное объемное содержание (%) частиц IgG человека в растворе в зависимости от pH и времени инкубации: (а) в отсутствии и (б) в присутствии rSkp *Y. pseudotuberculosis*

растворы IgG с разными значениями pH добавляли шаперон в молярном соотношения rSkp : IgG (2:1) (в расчётах использовали молекулярную массу тримера Skp). В присутствии rSkp скорость процессов самоассоциации и агрегации IgG человека существенно снижалась: рост относительного содержания частиц с R_n больше 10 нм (рис. 2б) и значений Z-average образцов замедлялся (Таблица 2). В проведенных экспериментах наблюдалось значительное влияния pH среды на проявление rSkp шаперонной активности. В случае кислого значения pH раствора (в условиях при которых rSkp наиболее стабилен) шаперон образовывал с IgG человека устойчивые (до 24 часов) низкомолекулярные комплексы с R_n до 10 нм (99,7 % соответственно). В растворах с нейтральным и щелочным значениями pH (6,7 и 7,9) шаперонная активность rSkp заметно снижалась. В этих условиях шаперон наиболее ярко проявлял свою активность в течение первых 5 часов: относительное объемное содержание частиц с R_n до 10 нм при pH 6,7 и 7,9 составляло 98,1 и 99,8 % соответственно. Дальнейшая инкубация растворов, в течение 24 часов, приводила к значительному увеличению доли крупных частиц, размер которых составлял 10-200 и более 200 нм (36,1 и 63,9 % соответственно) при pH 6,7 и 285 нм (100 %) при pH 7,9. Полученные данные говорят о том, что rSkp в качестве шаперона не способен полностью предотвратить самоассоциацию и агрегацию IgG, но может существенно замедлить эти процессы.

В последнее время появляется все больше литературных данных о том, что структурные нарушения, вызванные изменениями pH среды, увеличивают или уменьшают шаперонную активность белков [14-16]. Результаты, полученные в ходе выполнения работы, также демонстрируют pH-зависимый характер шаперонной и иммуноглобулинсвязывающей активности rSkp *Y. pseudotuberculosis*. Наиболее устойчивые низкомолекулярные комплексы (R_n до 10 нм) между шапероном и IgG человека образуются только при кислых значениях pH среды. В случае защелачивания реакционной среды его шаперонная активность снижается, и агрегация белков-субстратов хотя и замедляется, но в меньшей степени, чем это происходит при кислых pH. Полученная информация представляет практический интерес в связи с тем, что иммуноглобулины широко используются в медицине в качестве эффективных терапевтических препаратов для лечения ряда аутоиммунных заболеваний, рака и других патологий. Агрегаты IgG, которые появляются особенно после длительного хранения, увеличивают иммуногенность препаратов, а также изменяет их физические свойства, в первую очередь вязкость. Управление агрегацией является ключом к производству качественных и стабильных биофармацевтических препаратов.

Таблица 2. Средний гидродинамический радиус (Z-Average) поликлональных IgG человека в отсутствии и в присутствии rSkp в водных растворах при различных значениях pH и разной продолжительности инкубации

Время инкубации	Z-Average, нм					
	IgG			IgG +rSkp		
	pH 5,1	pH 6,7	pH 7,9	pH 5,1	pH 6,7	pH 7,9
30 мин	144,0	110,3	156,9	66,4	162,1	63,6
5 ч	184,8	174,8	176,3	88,9	166,0	145,4
24 ч	258,9	1099,0	305,9	100,4	1185,0	337,8

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№16-008-00679).

Список литературы / References:

1. Harms N., Koningstein G., Dontje W., Muller M., Oudega B., Luirink J., de Cock H. The early interaction of the outer membrane protein Pho E with the periplasmic chaperone Skp occurs at cytoplasmic membrane. *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, pp. 18804-18811.
2. Schafer U., Beck K., Muller M. Skp, a molecular chaperone of gram-negative bacteria, is required for the formation of soluble periplasmic intermediates of outer membrane proteins. *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, pp. 24567-24574.
3. Соловьева Т.Ф., Новикова О.Д., Портнягина О.Ю. Биогенез β -баррельных интегральных белков наружной мембраны бактерий. *Биохимия*, 2012, т. 77, № 11, с. 1459-1477. [Solov'eva T.F., Novikova O.D., Portnyagina O.Yu. Biogenesis of β -Barrel Integral Proteins Bacterial Outer Membrane. *Biochemistry* (Moscow), 2012, vol. 77, no. 11, pp. 1459-1477. (In Russ.)]
4. Geyer R., Galanos C., Westphal O., Golecki J. A lipopolysaccharide-binding cell-surface protein from Salmonella minnesota. Isolation, partial characterization and occurrence in different Enterobacteriaceae. *Eur. J. Biochem.*, 1979, vol. 98, pp. 27-38.
5. Holck A., Lossius I., Aasland R., Kleppe K. Purification and characterization of the 17 K protein, a DNA-binding protein from Escherichia coli. *Biochim. Biophys. Acta*, 1987, vol. 914, pp. 49-54.
6. Holck A., Lossius I., Aasland R., Haarr L., Kleppe K. DNA- and RNA-binding proteins of chromatin from Escherichia coli. *Biochim. Biophys. Acta*, 1987, vol. 908, pp. 188-199.
7. Holck A., Kleppe K. Identity of the 17-kilodalton protein, a DNA-binding protein from Escherichia coli, and the firA gene product. *Gene*, 1988, vol. 67, pp. 117-124.
8. Shrestha A., Shi L., Tanase S., Tsukamoto M., Nishino N., Tokita K., Yamamoto T. Bacterial Chaperone Protein, Skp, Induces Leukocyte Chemotaxis via C5a Receptor. *Am. J. Pathol.*, 2004, vol. 164, pp. 763-772.
9. Сидорин Е.В., Зиганшин Р.Х., Набережных Г.А., Лихацкая Г.Н., Трифонов Е.В., Анастук С.Д., Черников О.В., Соловьева Т.Ф. Белок шаперон Skp из *Yersinia pseudotuberculosis* обладает способностью связывать иммуноглобулины G. *Биохимия*, 2009, т. 74, № 4, с. 501-514. [Sidorin E.V., Ziganshin R.Kh., Naberezhnyk G.A., Likhatskaya G.N., Trifonov E.V., Anastyuk S.D., Chernikov O.V., Solovyeva T.F. Chaperone protein Skp from *Yersinia pseudotuberculosis* is able to bind immunoglobulins G. *Biochemistry* (Moscow), 2009, vol. 74, no. 4, pp. 501-514. (In Russ.)]
10. Сидорин Е.В., Тищенко Н.М., Хоменко В.А., Исаева М.П., Дмитренко П.С., Ким Н.Ю., Лихацкая Г.Н., Соловьева Т.Ф. Молекулярное клонирование, выделение и характеристика шаперона Skp из *Yersinia pseudotuberculosis*. *Биохимия*, 2012, т. 77, № 11, с. 1571-1583. [Sidorin E.V., Tishchenko N.M., Khomenko V.A., Isayeva M.P., Dmitrenok P.S., Kim N.Yu., Likhatskaya G.N., Solovyeva T.F. Molecular cloning, isolation and characterization of chaperone Skp from *Yersinia pseudotuberculosis*. *Biochemistry* (Moscow), 2012, vol. 77, no. 11, pp. 1571-1583. (In Russ.)]
11. Hawea A., Kasperb J.C., Friessb W., Jiskoot W. Structural properties of monoclonal antibody aggregates induced by freeze-thawing and thermal stress. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2009, vol. 38, pp. 79-87.
12. Arosio P., Barolo G., Muller-Spath T., Wu H., Morbidelli M. Aggregation Stability of a Monoclonal Antibody During Downstream Processing. *Pharm. Res.*, 2011, vol.28, pp. 1884-1894.
13. Esfandiary R., Parupudi A., Casas-Finet J., Gadre D., Sathish H. Mechanism of Reversible Self-Association of a Monoclonal Antibody: Role of Electrostatic and Hydrophobic Interactions. *J. Pharm. Sci.*, 2015, vol. 104, pp. 577-586.
14. Poon S., Rybchyn M.S., Easterbrook-Smith S.B., Carver J.A., Pankhurst G.J., Wilson M.R. Mildly acidic pH activates the extracellular molecular chaperone clusterin, *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, no. 42, pp. 39532-39540.
15. Tapley T.L., Franzmann T.M., Chakraborty S., Jakob U., Bardwell J.C.A. Protein refolding by pH-triggered chaperone binding and release. *PNAS*, 2010, vol. 107, no. 3, pp. 1071-1076.
16. Bose D., Patra M., Chakrabarti A. Effect of pH on stability, conformation, and chaperone activity of erythroid & non-erythroid spectrin. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins and Proteomics*, 2017, vol. 1865, pp. 694-702.

INTERACTION OF CHAPERONE Skp FROM YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS WITH MULTIDOMAIN PROTEINS AT THE DIFFERENT pH VALUES OF MEDIUM.**Sidorin E.V., Khomenko, V.A., Solov'eva T.F.**

G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. 100 Let Vladivostoku, 159, Vladivostok, 690022, Russia; e-mail: sev1972@mail.ru

Abstract. Protein Skp *Yersinia pseudotuberculosis* serves as the periplasmic chaperone in bacteria and has the ability to bind human and rabbit IgG. This work is aimed at studying the effect of this chaperone on the aggregation of human IgG at various pH values of the medium. To solve this problem, the aggregation kinetics of rSkp, IgG, and IgG in the presence of a chaperone in acidic, near neutral, and basic solutions was studied using the dynamic light scattering method. It was shown that in the presence of rSkp, the rate of IgG self-association and aggregation decreases significantly. The obtained results demonstrate the pH-dependent character of the chaperone and immunoglobulin-binding activities of rSkp. The most stable low-molecular complexes (R_H up to 10 nm) between chaperone and human IgG are formed at acidic pH values of the medium. In the case of alkalization of the reaction medium, the chaperone activity of rSkp decreases, and the aggregation of IgG although slows, but to a lesser extent than at acidic pH. The information obtained may be of interest to developers of stable and high-quality biopharmaceuticals based on immunoglobulins.

Key words: chaperone Skp, *Yersinia pseudotuberculosis*, aggregation of proteins, protein-protein interactions, dynamic light scattering.