

12. Любин Н.А., Конова Л.Б. *Методические рекомендации к определению и выведению гемограммы у животных*. Ульяновск, 2005, 112 с. [Lubin N.A., Konova L.B. *Guidelines for the identification and isolation of hemogram in animals*. Ulianovsk, 2005, 112 p. (In Russ.)]

13. Watmough D.J., Dendy P.P., Eastwood L.M., Gregory D.W., Gordon C.A., Whestly D.N. The biophysical effects of therapeutic ultrasound on HeLa cells. *Ultrasound in Med. & Biol.*, 1977, vol. 3, pp. 205-219.

14. Пашовкина М.С., Акоев И.Г., Пашовкин Т.Н. Изменение активности некоторых ферментов животных и человека при воздействии модулированных микроволн и феномены выявления нелинейных эффектов. *Биологические эффекты слабых электромагнитных излучений*. Пушино, 2002, с. 26-37. [Pashovkina M.S., Akoev I.G., Pashovkin T.N. Changes in the activity of some enzymes in animals and humans under modulated microwave exposure and phenomena of non-linear effects' revealing. *The biological effects of weak electromagnetic radiation*. Pushchino, 2002, pp. 26-37 (In Russ.)]

15. Пашовкина М.С., Акоев И.Г. Изменение активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови морских свинок *in vivo* при действии амплитудно-модулированного сверхвысокочастотного электромагнитного поля (2375 МГц). *Биофизика*, 2000, т. 45, № 1, с. 130-136. [Pashovkina M.S., Akoev I.G. Changes in the activity of alkaline phosphatase in guinea pig blood serum *in vivo* by the action of an amplitude modulated microwave EMF (2375 MHz). *Biophysics*, 2000, vol. 45, no. 1, pp. 130-136. (In Russ.)]

ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ СОСТОЯНИЯ В СВОРАЧИВАНИИ ПОРООБРАЗУЮЩЕГО БЕЛКА OmpF *Yersinia pseudotuberculosis* И ИХ СТРУКТУРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Сидорин Е.В., Хоменко В.А., Ким Н.Ю., Новикова О.Д., 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

Аннотация. Порин OmpF *Yersinia pseudotuberculosis* является трансмембранным белком, который имеет антипараллельную β -структуру, упакованную в виде β -цилиндра. В этой работе были изучены конформационные превращения порина при его переходе из полностью развернутого в подобное нативному состоянию в водных средах. За сворачиванием белка следили с помощью светорассеяния, высокоэффективной гель-проникающей хроматографии и оптической спектроскопии. Анализ результатов гель-проникающей хроматографии показал, что сразу после удаления основной части денатуранта образуются частично свернутые формы порина, с преобладанием интермедиатов сворачивания одного типа. Эти интермедиаты более компактны, чем полностью развернутый белок, и агрегируют с образованием растворимых мультимеров. Добавление шаперона Skp в раствор развернутого порина препятствует агрегации интермедиатов. По данным КД- и флуоресцентной спектроскопии интермедиаты сворачивания OmpF имеют выраженную вторичную структуру и достаточно компактную, но не жестко упакованную третичную структуру. По структуре они подобны расплавленной глобуле. Было оценено влияние макромолекулярного уплотнения на сворачивание порина. Полученные результаты вносят вклад в понимание механизмов сворачивания и агрегации мембранных белков *in vivo* и способствуют разработке методов эффективной экспрессии рекомбинантных мембранных белков в виде «неклассических» телец включения.

Ключевые слова: рекомбинантный порин OmpF, *Yersinia pseudotuberculosis*, структура денатурированных белков, агрегация белков, сворачивание белков.

INTERMEDIATES STATES IN *Yersinia pseudotuberculosis* PORIN FOLDING AND THEIR STRUCTURAL CHARACTERISTICS

Sidorin E.V., Khomenko V.A., Kim N.Yu., Novikova O.D., Solov'eva T.F.
G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-Eastern Branch of the RAS
100 Let Vladivostoku av., 159, Vladivostok, 690022, Russia
e-mail: sev1972@mail.ru

Abstract. *Yersinia pseudotuberculosis* porin OmpF is a transmembrane protein that has an antiparallel β -structure, packed as a β -barrel. In this study conformational transformations of the porin were studied during its transition from a fully unfolded to a native-like state in aqueous media. The porin folding was monitored by light scattering, size-exclusion chromatography (SEC), and optical spectroscopy. SEC analysis showed, that immediately after removal of the main part of the denaturant the partially folded forms of the porin, with a predominance of one type folding intermediates are formed. These intermediates are more compact than the completely unfolded protein and they aggregate to form the soluble multimers. The chaperone Skp addition to unfolded porin solution prevents the aggregation of folding intermediates. According to circular dichroism and fluorescence spectra, OmpF porin folding intermediates have a substantial secondary structure and sufficiently compact, but not tightly packed tertiary structure. These folding intermediates structurally resemble a molten globule. It was estimated macromolecular crowding effect on folding of the porin. These results contribute to the understanding of the mechanisms of the membrane proteins folding and aggregation *in vivo* and promote the development of methods for the efficient expression of the recombinant proteins in the form of "non-classical" inclusion bodies.

Key words: recombinant porin OmpF, *Yersinia pseudotuberculosis*, structure of denaturated proteins, aggregation of proteins, protein folding.

Формирование телец включения (специфических белковых преципитатов) является главной проблемой получения рекомбинантных белков. Изоляция белков из телец включения (ТВ) представляет лимитирующий фактор в продукции белка, таким образом, они рассматриваются как непригодные для биотехнологии. Однако недавно удалось получить новый подтип ТВ, который содержит корректно свернутый белок в биологически активной форме [1]. Процесс выделения рекомбинантного белка становится быстрым и экономически выгодным и может быть использован для создания безопасного для окружающей среды биотехнологического производства, а сами ТВ являются новыми функционально активными наноматериалами. Глубокое знание механизмов сворачивания и агрегации белков различных структурных семейств в процессе экспрессии позволит получать «неклассические» ТВ с желаемыми характеристиками. Целью данной работы является изучение конформационных превращений полностью развернутого белка в водных средах и влияния на этот процесс факторов, действующих при формировании ТВ в клетке.

Исследования по сворачиванию белков, в основном, проводились на небольших глобулярных водорастворимых белках. В данной работе в качестве исследуемого белка был взят порин OmpF *Yersinia pseudotuberculosis*, трансмембранный белок, который имеет антипараллельную β -структуру, упакованную в виде β -цилиндра, и обладает свойством образовывать в мембране водонаполненные поры. Исходное полностью развернутое состояние рекомбинантного порина OmpF (rOmpF) было получено растворением в 8 М мочеvine ТВ, в виде которых белок был экспрессирован в *Escherichia coli*. Денатурированный порин, растворенный в 8 М мочеvine, был очищен до гомогенности с помощью ионообменной и гель-проникающей хроматографии. В опытах по ренатурации порина денатурант из раствора развернутого белка удаляли с помощью гель-фильтрации (при элюции водой или буфером, pH 8, содержащем 0.8 М мочеvinу) или разбавляли его в 10 раз 0.1М натрий-ацетатным, pH 5, или 0.1М натрий-фосфатным, pH 8, буфером. Переход белка из полностью развернутого состояния (существующего в 8М мочеvine) в подобное нативному (в буфере с 0,8 М мочеvinой или в воде) определяли с помощью светорассеяния, высокоэффективной гель-проникающей хроматографии на колонке Superdex 200 HR («Amersham Biociences», Швеция) и оптической спектроскопии.

Как можно было судить по изменению оптической плотности раствора белка при 340 нм (см. рис. 1), в опытах с разбавлением исходного раствора порина буфером, pH 5, белок быстро агрегировал в течение первых 20 мин с последующим медленным ростом агрегационного индекса (АИ) белка [2]. Этот эффект, скорее всего, связан с тем, что величина pH буфера близка к изоэлектрической точке порина ($pI = 4.94$). В то же время при использовании буфера, pH 8, АИ белка соответствовал слабо агрегированным растворам и лишь незначительно увеличивался в течение 2 часов, оставаясь примерно на этом уровне при выдерживании раствора в течение суток.

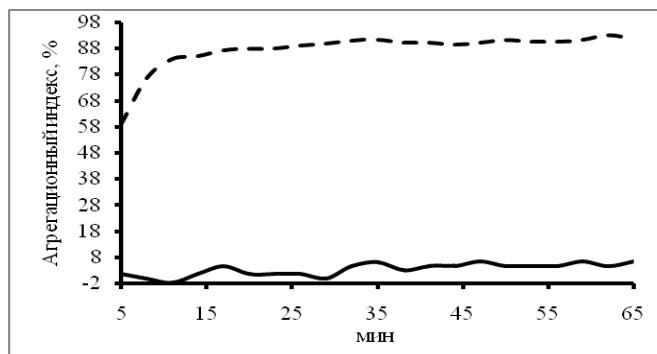


Рисунок 1 – Агрегационный индекс денатурированного rOmpF в 0.1М натрий-ацетатном буфере, pH 5 (прерывистая линия), и натрий-фосфатном буфере, pH 8 (сплошная линия)

Была проведена гель-проникающая хроматография развернутого порина (нанесен в 8 М мочеvine) с использованием для элюции буфера, pH8, с 0.8 М мочеvinой. Как видно из рисунка 2, на кривой элюции обнаруживается 2 основных пика: первый – с объемом элюции (11 мл), близким к таковому развернутого порина (белок в 8 М мочеvine) и второй – с большим объемом элюции (14 мл). При гель-фильтрации раствора денатурированного порина в буфере, pH 8, с 0.8М мочеvinой (выдержанного в течение 5 минут после разбавления исходного раствора белка) наряду с пиком с объемом элюции 14 мл, совпадающим с пиком, представленным на описанной выше кривой, появляется второй в области высокомолекулярных белков (объем элюции 8.5 мл) (см. рис. 2). При увеличении времени выдержки (1 час после разбавления) белка в буфере на его выходной кривой наблюдается существенное уменьшение пика с большим объемом элюции и увеличение второго (см. рис. 2). По данным динамического светорассеяния средний гидродинамический радиус частиц белка в этом растворе равен 25 нм. На основе анализа результатов гель-проникающей хроматографии можно предположить, что сразу после удаления основной части денатуранта начинают образовываться частично свернутые белки, видимо, с преобладанием одного интермедиата сворачивания (объем элюции 14 мл), которые агрегируют с образованием растворимых мультимеров (объем элюции 8.5 мл). В пользу этого предположения свидетельствуют известные факты, согласно которым склонность к самоассоциации является одной из самых характерных свойств частично-свернутых белковых молекул [3]. Данный процесс, как было установлено,

может играть существенную роль в структурировании ненативных молекул белка. При этом не только имеет место существенное увеличение устойчивости данных конформаций к внешним воздействиям, но и наблюдается возникновение внутри белковой молекулы дополнительных структурных элементов и даже формирование новых внутримолекулярных уровней структуры.

Образование интермедиатов сворачивания поринов в условиях представленных выше экспериментов также подтверждается данными оптической спектроскопии. Развернутый порин, переведенный в воду, имеет спектр кругового дихроизма в дальней УФ области, который характеризуется интенсивной отрицательной полосой при 200 нм, характерной для белков с развернутой структурой, и плечом в области 210-230 нм (см. рис. 3). Такие спектры обычно имеют белки, находящиеся в конформации промежуточной по своим свойствам между состояниями расплавленной глобулы и неупорядоченного клубка, получившей название состояния-предшественника расплавленной глобулы [4]. Спектры КД в дальней УФ области порина в буфере, рН 8, с 0.8 М мочевиной, полученные через 5 мин, 0.5; 1; 1.5; 2; 2.5; 24 часов после десятикратного разбавления раствора денатурированного порина, имеют большое сходство по форме (минимумы при 206 и 215-217 нм) и достаточно высокую отрицательную эллиптичность, которая незначительно увеличивается со временем (см. рис. 3). При этом спектры белковых растворов, инкубированных от 1 до 2.5 часа, практически совпадают по интенсивности и форме (данные не приведены). Спектральные данные свидетельствуют о наличии у исследованного белка хорошо выраженной вторичной структуры.

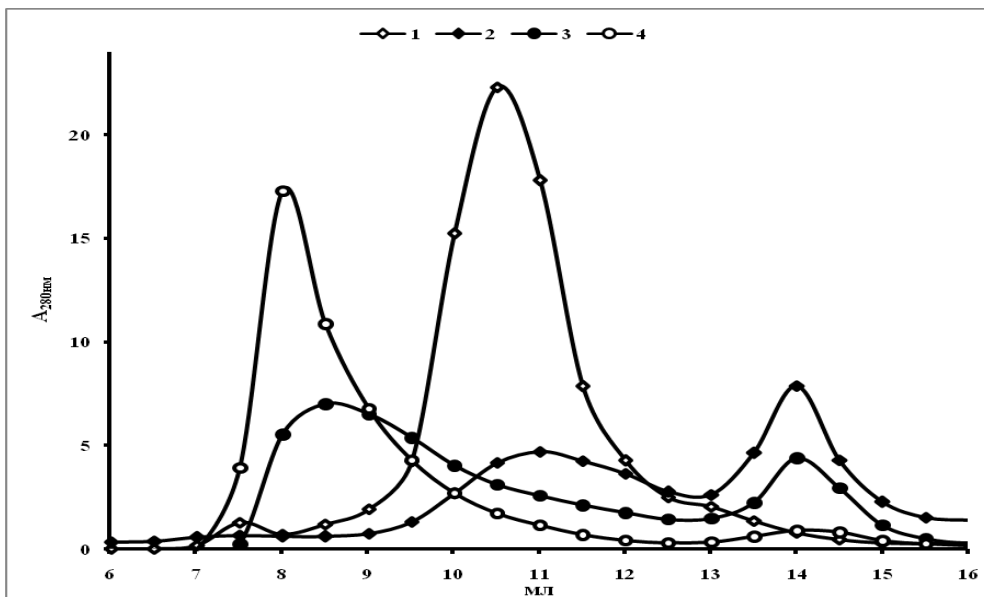


Рисунок 2 – Гель-проникающая хроматография денатурированного гOmpF. Профили элюции: 1 – гOmpF в 8М мочеvine, элюция буфером, рН 8, с 8 М мочевиной; 2 – гOmpF в 8 М мочеvine, элюция буфером, рН 8, с 0.8 М мочевиной; 3 – денатурированный гOmpF в 0.8 М мочеvine (выдержанный 5 мин), элюция буфером, рН 8, с 0.8 М мочевиной; 4 – денатурированный гOmpF в 0.8 М мочеvine (выдержанный 60 мин), элюция буфером, рН 8, с 0.8 М мочевиной

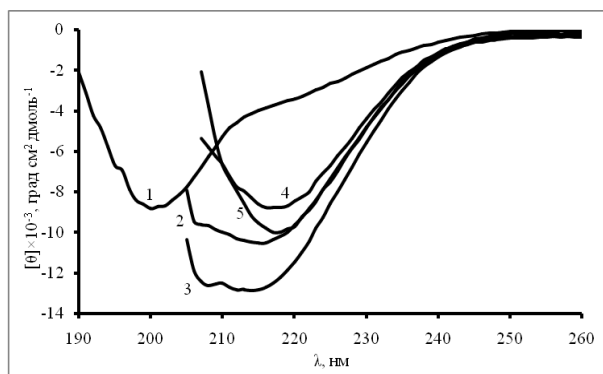


Рисунок 3 – Спектры КД денатурированного гOmpF. 1 – в воде; 2 – в буфере, рН 8, с 0.8 М мочевиной (30 мин); 3 – в буфере, рН 8, с 0.8 М мочевиной (24 часа); 4 – в буфере, рН 8, содержащем 35 % ПЭГ 20 кДа (30 мин); 5 – в буфере, рН 8, содержащем 35 % ПЭГ 20 кДа (24 часа)

Спектры суммарной флуоресценции денатурированного порина в этих же условиях не зависимо от времени выдержки его в растворе имели максимум при 334.7 нм и близкие значения интенсивности и заметно отличались от спектра развернутого белка, который имел 2 максимума при 307 нм (излучение остатков

тирозина) и при 348 нм (излучение остатков триптофана) (см. рис. 4). Спектры триптофановой флуоресценции по сравнению с таковым развернутого белка (максимум при 353 нм) были сдвинуты в сторону коротких длин волн (максимум при 338.7 нм) и имели одинаковую интенсивность, показывая, что окружение остатков триптофана в частично свернутых формах является более гидрофобным, чем в полностью развернутом состоянии. Таким образом, образовавшиеся интермедиаты сворачивания имеют достаточно компактную третичную структуру. Следует отметить, что растворы частично свернутых поринов, различающиеся между собой по содержанию мономерной и мультимерной форм (см. рис. 2, кривые 3 и 4), дают практически одинаковые спектры, что свидетельствует в пользу структурного подобия этих форм белков.

Одной из основных трудностей в экспериментах по сворачиванию и разворачиванию белков является идентификация и структурное описание их промежуточных состояний (интермедиатов сворачивания). Для определения формирования интермедиата, известного как «расплавленная глобула», используют гидрофобный флуоресцирующий зонд, 8-анилино-1-нафталеносульфоновую кислоту (8-АНС), которая имеет во много раз большее сродство к этому интермедиату, чем к нативному и полностью развернутому белку [5]. В случае денатурированного гOmpF в буфере, рН 8, содержащем 0.8 М мочевины, интенсивность флуоресценции АНС выше в 30 и 70 раз, чем для этого белка в воде и 8 М мочевины соответственно. Этот факт определяет присутствие доступных растворителю гидрофобных кластеров (т. е. отсутствие плотно упакованной третичной структуры) в интермедиатах, образованных гOmpF в буфере и отсутствие таковых в интермедиатах, формирующихся в воде и 8 М мочевины. Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что интермедиат сворачивания гOmpF в буфере с 0.8 М мочевиной более компактный (по данным гельфильтрации), чем полностью развернутый порин, с выраженной вторичной структурой, но без жесткой третичной, имеет структуру расплавленной глобулы.

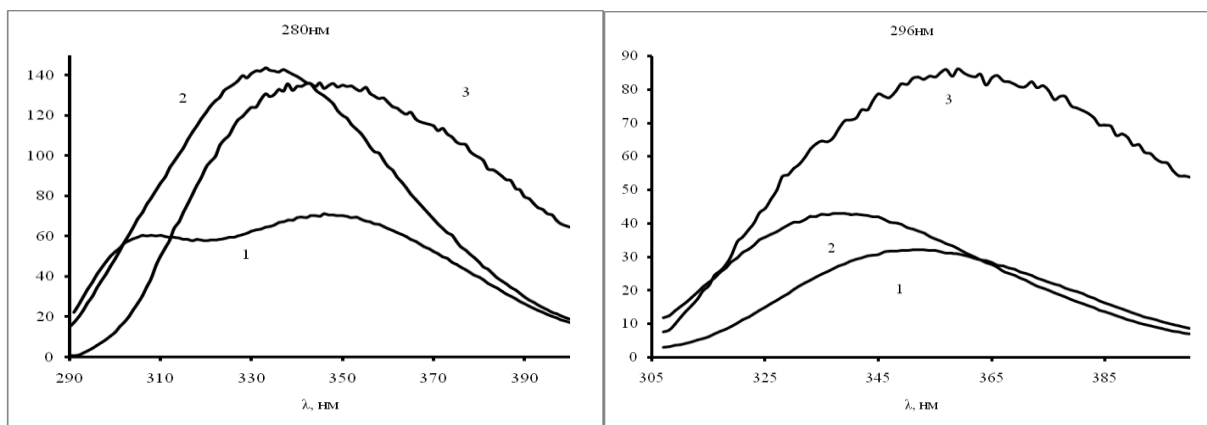


Рисунок 4 – Спектры собственной флуоресценции денатурированного гOmpF. Спектры суммарной (280 нм) и триптофановой (296 нм) флуоресценции: 1 – в буфере, рН 8, с 8 М мочевиной; 2 – в буфере, рН 8, с 0.8 М мочевиной; 3 – в буфере, рН 8, содержащем 35 % ПЭГ 20 кДа

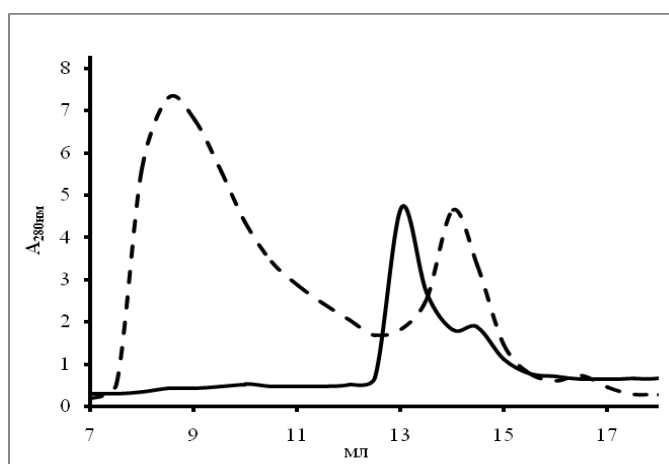


Рисунок 5 – Гель-проникающая хроматография денатурированного гOmpF в присутствии Skp. Профили элюции: денатурированный гOmpF в 0.8 М мочевины (прерывистая линия); денатурированный гOmpF в 0.8 М мочевины с Skp (сплошная линия). Элюция буфером, рН 8, с 0.8 М мочевиной

В клетке рекомбинантный белок находится под контролем шаперонов, которые могут влиять на процесс его агрегации. Мы проверили влияние шаперона Skp *Y. pseudotuberculosis*, специфичного для поринов, на агрегацию конформационных интермедиатов гOmpF. С этой целью раствор порина в 8 М мочевины был разбавлен в 10 раз буфером, рН 8, содержащем шаперон, и после 5 минутной выдержки был хроматографирован.

Как видно из рисунка 5, в присутствии шаперона интермедиат сворачивания порина не образует агрегатов (отсутствует пик мультимерных белков), видимо, в результате образования его комплексов с Skp. Средний гидродинамический радиус частиц в этом растворе равен 5 нм.

В реальности сворачивание белков происходит внутри клетки, где окружение существенно отличается от разбавленного буферного раствора, который мы использовали в экспериментах. Внутриклеточное пространство насыщено макромолекулами (их концентрация 80-400 мг/мл), имеет ограниченное количество свободной воды и характеризуется почти полным отсутствием незанятого пространства [6]. Эта среда существенно влияет на все аспекты поведения белков в клетке, включая их сворачивание в нативную структуру. Для оценки влияния макромолекулярного уплотнения на сворачивание порина, мы изучили конформационное поведение развернутого порина в 35 % полиэтиленгликоле (ПЭГ) 20 кДа. За структурными превращениями белка наблюдали, снимая спектры КД и собственной флуоресценции через 0.5; 1.0; 2.5 и 24 часа после добавления раствора ПЭГ в 0.1 М натрий-фосфатным буфере, pH 8, к развернутому порину в 8 М мочеvine. Образовавшийся в этих условиях интермедиат rOmpF имеет спектр КД в дальнем УФ с хорошо выраженным минимумом при 217-218 нм, который практически не изменяется в интервале 0.5-2.5 часа (см. рис. 3). Через 24 часа после разбавления раствора развернутого порина его спектр становится более узким, а эллиптичность при 217 нм возрастает в абсолютном значении на 12 %. Форма этого спектра подобна таковой нативных поринов, растворенных в детергенте [7]. КД-спектр этого интермедиата сворачивания порина в ближнем УФ имеет сравнительно небольшую интенсивность и одну хорошо выраженную отрицательную полосу при 275 нм, что указывает на асимметричное окружение ароматических остатков в белке (данные не приведены). Спектры суммарной флуоресценции денатурированного порина имеют максимум при 345 нм, совпадающий с одним из таковых развернутого белка, а максимум спектра его триптофановой флуоресценции сдвинут в длинноволновую область в сравнение с таковым развернутого белка и расположен при 359 нм (см. рис. 4). Результаты флуоресцентной спектроскопии позволяют предполагать, что у этой формы порина отсутствует сколько-нибудь организованная третичная структура, и не согласуются с данными КД в ближнем УФ. В то же время оба спектра собственной флуоресценции денатурированного порина имеют интенсивность, заметно превышающую интенсивность спектра развернутого белка. Недавно было показано, что ПЭГ способен взаимодействовать с развернутыми формами белков и в частности с остатками триптофана [8]. Возможно, наблюдаемые спектральные характеристики интермедиата сворачивания порина в определенной степени являются результатом такого взаимодействия. Этот вопрос требует дальнейшего изучения.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 16-008-00679) и программы "Дальний Восток" (№ 15-1-5-004).

Список литературы / References:

1. Peternel Š., Komel R. Active protein aggregates produced in *Escherichia coli*. *Int. J. Mol. Sci.*, 2011, vol. 12, pp. 8275-8287.
2. Vincentelli R., Cnaan S., Campanacci V., Calencia C., Maurin D., Frassinetti F., Scappucini-Calvo L., Bourne Y., Cambillau C., Bignon C. High-throughput automated refolding screening of inclusion bodies. *Protein Science*, 2004, vol. 13, pp. 2782-2792.
3. Kuznetsova I.M., Biktashev A.G., Khaitlina S.Yu., Vassilenko K.S., Turoverov K.K., Uversky V.N. Effect of Self-Association on the Structural Organization of Partially Folded Proteins: Inactivated Actin. *Biophys. J.*, 1999, vol. 77, pp. 2788-2800.
4. Uversky V.N., Gillespie J.R., Millett I.S., Khodyakova A.V., Vasiliev A.M., Chernovskaya T.V., Vasilenko R.N., Kozlovskaya G.D., Dolgikh D.A., Fink A.L., Doniach S., Abramov V.M. Natively unfolded human Prothymosin R adopts partially folded collapsed conformation at acidic pH. *Biochemistry*, 1999, vol. 38, pp. 15009-15016.
5. Semisotnov G.V., Rodionova N.A., Razgulyaev O.I., Uversky V.N., Gripas' A.F., Gilmanshin R.I. Study of the "molten globule" intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe. *Biopolymers*, 1991, vol. 31, pp. 119-128.
6. Kuznetsova I.M., Turoverov K.K., Uversky V.N. What macromolecular crowding can do to a protein. *Int. J. Mol. Sci.*, 2014, vol. 15, pp. 23090-23140.
7. Rosenbuch J.P. Characterization of the major envelope protein from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 1974, vol. 249, pp. 8019-8029.
8. Wu J., Zhao C., Lin W., Hu R., Wang Q., Chen H., Li L., Chen S., Zheng J. Binding characteristics between polyethylene glycol (PEG) and proteins in aqueous solution. *J. Mater. Chem. B*, 2014, vol. 2, pp. 2983-2992.