

ИЗУЧЕНИЕ ШАПЕРОННОЙ АКТИВНОСТИ Skp ИЗ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* ПРИ РАЗНЫХ ЗНАЧЕНИЯХ pH СРЕДЫ

Киселева Д.А.^{1,2}, Сидорин Е.В.¹

¹ Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН
просп. 100 лет Владивостоку, 159, г. Владивосток, 690022, РФ; e-mail: sev1972@mail.ru

² Дальневосточный федеральный университет, Школа естественных наук
г. Владивосток, 690090, РФ; e-mail: kiseleva.diana99@mail.ru

Поступила в редакцию: 13.07.2021

Аннотация. Представленная работа посвящена изучению шаперонной активности рекомбинантно-го белка Skp (rSkp) *Yersinia pseudotuberculosis* с помощью методов динамического рассеяния света и иммуоферментного анализа. В качестве белков-субстратов использовали коммерческие образцы антител поликлонального IgG кролика и моноклональные иммуноглобулины мыши, изотип IgG1. На основании полученных результатов можно сказать о том, что rSkp способен замедлять процессы самоассоциации и агрегации иммуноглобулинов, сохраняя их антигенсвязывающую способность. Для антител каждого вида животного шаперонные свойства белка проявляются индивидуально. Шаперонная активность rSkp существенно зависит от значения pH среды, в которой находятся антитела.

Ключевые слова: шаперон Skp, *Yersinia pseudotuberculosis*, иммуноглобулин G, антитела, агрегация.

Благодаря разработке гибридной технологии широкое распространение в лабораторной диагностике получили моноклональные антитела (МКА). МКА имеют значительные преимущества перед поликлональными сыворотками – это высокая специфичность и активность, стандартность, возможность получения в неограниченном количестве. Благодаря своим уникальным свойствам, МКА широко используются в медицине и ветеринарии, в диагностических и лечебно-профилактических целях. Однако, широкое применение МКА ограничивается тем, что наиболее удобные для использования водные растворы антител при хранении являются достаточно нестабильными. Причина этого заключается в том, что МКА могут подвергаться разнообразным способам дегградации [1, 2] Одним из наиболее распространенных путей нестабильности является образование олигомеров антител и агрегатов с более высокой молекулярной массой [3]. Агрегация антител может представлять значительную проблему при разработке, хранении и доставке лекарств. В связи с вышесказанным, решение проблемы сохранения функциональной активности МКА является актуальной задачей.

Многие коммерчески доступные реагенты антител содержат одну или несколько добавок, которые предназначены для увеличения стабильности антител при длительном хранении [4]. Ранее было показано, что Skp *Yersinia pseudotuberculosis* обладает способностью связывать IgG кролика и человека, как в виде мономера (Skp) [5, 6] так и в форме гомотримера (Skp₃) [7]. Цель данной работы являлось изучение влияния шаперона Skp *Y. pseudotuberculosis* на агрегацию иммуноглобулинов мыши и кролика 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 [7]. В качестве модельных белков-мишеней для связывания с шапероном rSkp использовали коммерческие препараты поликлональных IgG кролика (RAN Alb, «Имтек», Россия) и моноклональные антитела мыши («HyTest», Россия), изотип IgG1. В течении 90 дней, используя метод динамического рассеяния света (ДРС), мы изучали поведение образцов белков-мишеней, а также влияние шаперона Skp на агрегацию антител в водных растворах при различных значениях pH (рис. 1 и 2 а, б). Для количественного и качественного описания процессов, связанных с изменением размеров частиц, которые образуются при самоассоциации и агрегации иммуноглобулинов, 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). Расчет среднего гидродинамического радиуса частиц всего образца (Z-average) и гидродинамических радиусов (R_H) частиц при анализе их объемного распределения проводили с помощью программного обеспечения к прибору (ZetaSizer Nano ZS “Malvern”, Великобритания).

В условиях растворения поликлональных IgG кролика в кислых средах в растворе преобладали частицы размером меньше 10 нм (97-98%). Спустя 6 дней при pH 4,0 происходило значительное уменьшение содержания мелких частиц (от 97 до 17%) (рис. 1 а). Спустя 90 дней содержание частиц с гидродинамическим радиусом (R_H) меньше 10 нм составляло 51,8 %, что может быть объяснено седиментацией агрегатов. Основной объем раствора при pH 5,0 через 6 дней занимали частицы с размером до 10 нм. Их процентное содержание уменьшается на 3,2 % по сравнению с первым часом наблюдения. После окончания эксперимента в образце значительно увеличилось содержание крупных частицы с R_H больше 200 нм (90,8%). Величина среднего гидродинамического радиуса (Z-Average) увеличивалась с момента разбавления и к 6 и 90 дням составила 677 и 940 нм соответственно (рис. 1 а). Спустя 90 дней заметно шел рост образования агрегатов IgG кролика, что позволяет предположить о необратимости этого процесса. Незначительно возрастание содержания частиц размером больше 200 нм (от 0,4 до 15,1%) при pH 6,0 через 5 дней. Дальнейшее наблюдение показало, что их вклад в основной объем раствора

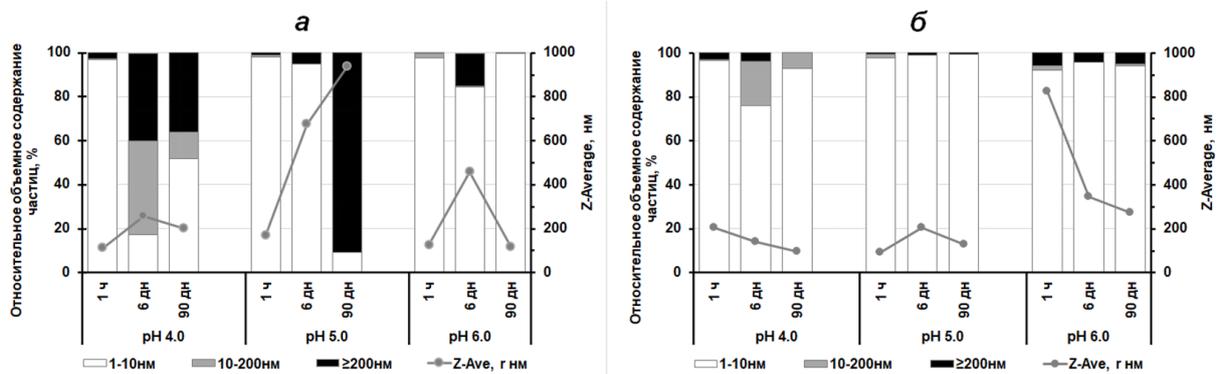


Рисунок 1. Относительное объемное содержание (%) по размеру (R_n) и Z-average частиц, образованных IgG кролика в растворе при разных значениях pH среды и времени инкубации: (а) в отсутствии и (б) в присутствии rSkp *Y. pseudotuberculosis*

снижался (0,3%) (рис. 1 а). Вероятным объяснением такого поведения иммуноглобулинов кролика может быть медленная скорость процесса оседания крупных частиц. В случае кумулянтного анализа Z-Average к 6 дню составил 459,7 нм, при дальнейшем наблюдении его значение уменьшилось до 117,3 нм (рис. 1 а), что так же свидетельствует о седиментации частиц.

В присутствии rSkp скорость самоассоциации и агрегации IgG кролика заметно уменьшается. В условиях кислой среды при pH 4,0 в присутствии шаперона происходило снижение содержания частиц размером больше 10 нм к 6 и 90 дням (23,8 и 7,2% соответственно) (рис. 1 б), по сравнению с их содержанием в образце без rSkp (рис. 1 а). Наряду с уменьшением числа крупных частиц, происходит постепенное снижение значения Z-Average (от 204,2 до 96,6нм). На протяжении всего времени наблюдения при pH 5,0 в присутствии rSkp в образце преобладали частицы с R_n до 10 нм (97,8-99,4%). Содержание rSkp в образце к 90 дню способствовало замедлению образования частиц с размером больше 200 нм (0,7%), это так же заметно по изменению среднего гидродинамического радиуса частиц образца (при анализе кумулянтов). Значение Z-Average находилось в интервале (91,5-205,3нм) (рис. 1 б). Основной объем при pH 6,0 составляли мелкие частицы в течение всего времени проведения эксперимента (92,2-94,3 %) (рис. 1 б). Несмотря на постоянство объемного распределения размеров частиц, величина Z-Average уменьшалась с момента растворения (825,9 нм) и к 6 и 90 дням составила 343,9 и 271,6нм соответственно. Для объяснения резкого падения значения Z-Average в присутствии шаперона необходимо проведение дополнительных экспериментов другими методами исследования. Наиболее активное проявление шаперонных свойств rSkp наблюдается при pH 4,0 и 5,0. В результате образования комплекса rSkp с IgG кролика происходит значительное уменьшение скорости протекания процесса самоассоциации и агрегации.

На протяжении всего времени наблюдения при кислых и нейтральных значениях pH среды в растворах моноклональных IgG1 мыши преимущественно преобладали размеры частиц до 10 нм (98,8-99,7%) (рис. 2 а). При этих же временных интервалах величина Z-Average для образца белка постепенно уменьшалась при pH 5,0 и 6,0 (от 93 до 58 нм и 97 до 29 нм, соответственно). Вероятнее всего, подобные изменения значений среднего гидродинамического радиуса могут быть объяснены медленной скоростью оседания крупных частиц в этих условиях. Величина Z-Average при pH 7,0 возрастала (от 40,3 до 182,1 нм) (рис. 2 а), что говорит о медленном процесс самоассоциации и агрегации до крупных частиц. Скорость образования агрегатов при растворении IgG1 мыши в щелочном буфере pH 8,0 была значительно выше (рис. 4 а). После 6 суток в образце не были зафиксированы частицы размером до 10 нм, основной объем составляли белковые молекулы с R_n больше 200 нм (94,7%). Спустя 90 дней содержание крупных частиц снизилось до 28,3 %. Наряду с крупными частицами в

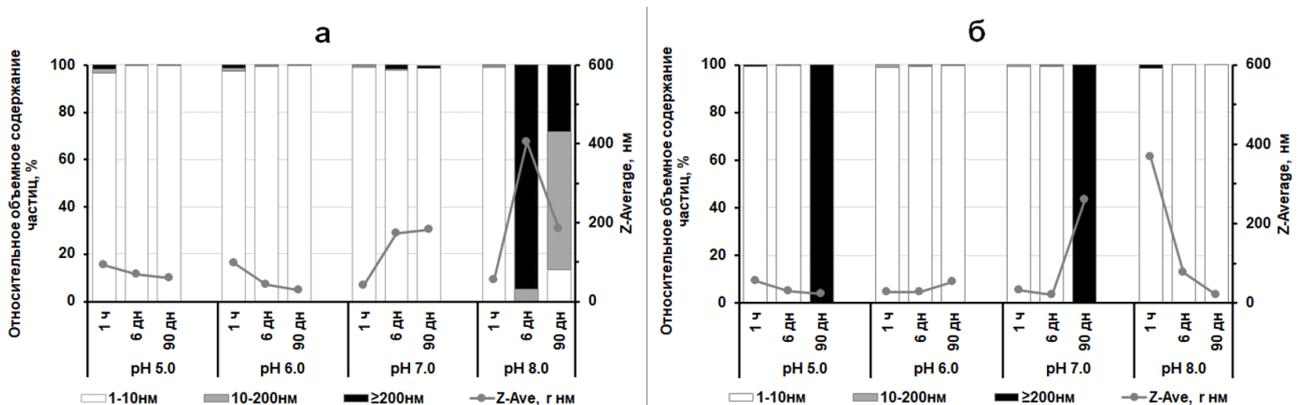


Рисунок 2. Относительное объемное содержание (%) по размеру (R_n) и Z-average частиц, образованных IgG1 мыши в растворе при разных значениях pH среды и времени инкубации: (а) в отсутствии и (б) в присутствии rSkp *Y. pseudotuberculosis*

растворе увеличилось процентное содержание частиц размерами до 10 нм и 10-200 нм до 13,5 и 58,2% соответственно. Величина Z-Average к 6 дню составляла 404,9 нм, хотя спустя 90 дней ее значение уменьшилось до 184,7 нм (рис. 2 а). Такое перераспределение между крупными и мелкими частицами, скорее всего, происходит за счет седиментации крупных агрегированных частиц.

Присутствие rSkp в образце при разных значениях pH среды оказывало различное влияние на процесс агрегации иммуноглобулинов. В течение 6 дней действие шаперона в растворе при pH 5,0 и 7,0 не заметно, преимущественно содержались мелких частиц (99,5%) (рис. 2 б). Спустя 90 дней в образцах не были обнаружены частицы с размером меньше 10 нм. Белковые молекулы агрегировали и в растворах содержались только частицы размером больше 200 нм (100%). В данных условиях присутствие шаперона в образце приводило к ускорению образования крупных белковых агрегатов. Возможно, подобный результат может быть связан со структурными изменениями (вторичной и третичной структур) моноклоальных IgG1 мыши при связывании с rSkp, но для объяснения этого эффекта требуется проведение дополнительных исследований. На протяжении всего эксперимента при pH 6,0 действие шаперона незаметно, содержание мелких частиц в образце были постоянным (99,5) (рис. 2 б). Шаперон при pH 8,0 заметно проявлял активность спустя 6 дней, в образце преобладали частицы с размером до 10 нм (100%) (рис. 2 б). Такое содержание мелких частиц сохранялось и к 90 дню. Однако, Z-Average в первый час наблюдения имел высокое значение 369,7 нм с последующим уменьшением в течение 90 дней до 19,5. Для объяснения резкого падения значения среднего гидродинамического радиуса в присутствии шаперона необходимо проведение дополнительных экспериментов другими методами исследования.

Оценить влияние rSkp на агрегацию антител так же удалось с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). В качестве антигенов использовали сывороточные альбумины человека (HSA) и быка (BSA). Согласно литературным данным HSA и BSA имеют аминокислотную последовательность гомологичную на 76% [8, 9]. Антигенсвязывающая активности, в случае HSA, при раститровки антител моноклоального IgG1 мыши показала более высокую специфичность в сравнение с поликлональным IgG кролика (рис. 3 а, б). В случае использования в качестве антигена BSA при концентрации антител 5 мкг/мл поликлональные IgG кролика демонстрируют одинаковую перекрестную реакцию (рис. 3 а) этих же антител к HSA и более высокую в сравнении с моноклоальными IgG1 мыши (рис. 3 б).

В представленной работе, используя метод ИФА, было определено влияние pH среды и шаперона rSkp на антигенсвязывающую способность иммуноглобулинов кролика и мыши при их длительном хранении (90 дней). Самое низкое значение доли связывание IgG кролика с HSA наблюдалось при pH 4,0 (0,73) (рис. 4 а). Антигенсвязывающая способность IgG кролика заметно возрастает при pH 5,0 и 6,0 (0,95 и 1 соответственно). Возможное объяснения кажущегося роста антигенсвязывающей активности IgG кролика может быть связано с агрегацией иммуноглобулинов в этих условиях как было нами показано выше (рис. 1 а). В присутствии rSkp при pH 4,0 и 5,0 не изменяется доля связывания IgG кролика с HSA, в сравнении с образцом без шаперона (рис. 4 а). Снижение антигенсвязывающей способности иммуноглобулинов кролика при добавлении rSkp при pH 6,0, по сравнению с таковой активностью без шаперона, скорее всего, обусловлено отсутствием агрегированных форм антител. Влияние rSkp на сохранение активной формы IgG кролика наблюдалось только при pH 6,0.

Среди серии проведенных экспериментов наименьшая доля связывания IgG кролика с BSA наблюдалась при pH 4,0 (0,47) (рис. 4 б). При взаимодействии с BSA антигенсвязывающая активность IgG кролика заметно возрастает при pH 5,0 и 6,0 (0,69). В образце, содержащем rSkp, при pH 4,0 антигенсвязывающая способность иммуноглобулина кролика изменялась в пределах ошибки (рис. 4 б). В присутствии шаперона при pH 5,0 и 6,0 антитела кролика активнее взаимодействуют с BSA (1 и 0,86 соответственно). Рост в присутствии rSkp антигенсвязывающей способности IgG кролика может быть объяснен преимущественным преобладанием неагрегированных форм иммуноглобулина, как было показано нами выше методом ДПС (рису. 1 а, б).

Доля связывания IgG1 мыши с HSA при кислых и нейтральных значениях pH среды отличалась в пределах ошибки и составляла от 0,97 до 0,99 (рис. 5 а). В случае щелочного значения pH 8,0 антигенсвязывающая способность IgG1 мыши заметно ниже, доля связывания с HSA равна 0,74. Изменения антигенсвязывающей активности моноклоальных иммуноглобулинов мыши в присутствии rSkp не происходили в кислых и нейтральных средах (рис. 5 а). В образце, содержащем шаперон, при pH 8,0 наблюдалось сохранение способности антитела связываться с антигеном, что хорошо согласуется с результатами ДПС (рис. 2 а, б).

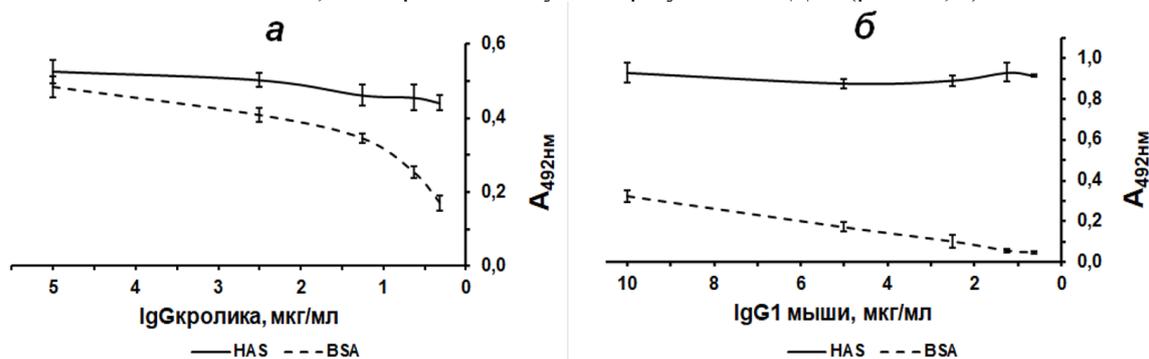


Рисунок 3. Антигенсвязывающая активность поликлонального IgG кролика (а) и моноклоального IgG1 мыши (б) при разных концентрациях

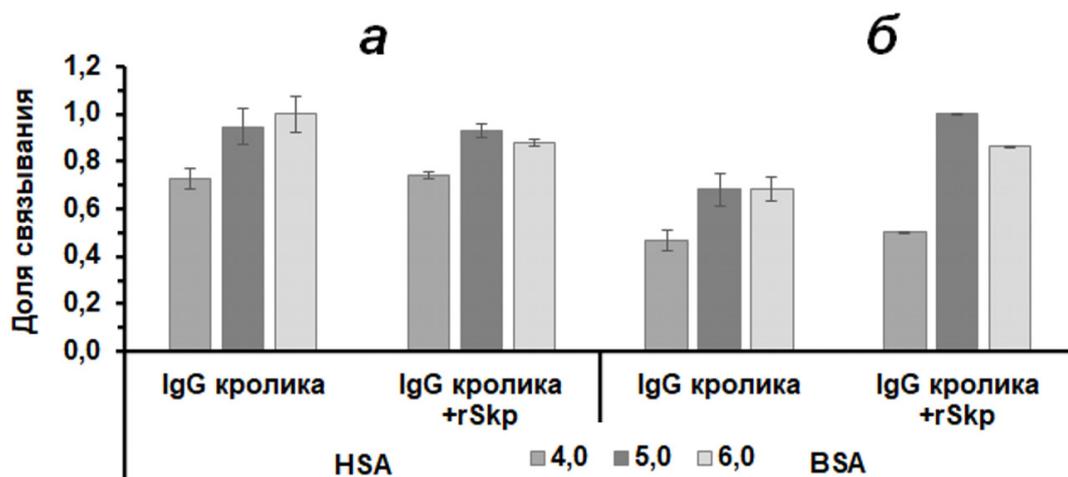


Рисунок 4. Доля связывания поликлональных IgG кролика с антигенами HSA и BSA при разных значения pH среды после длительного хранения (90 дней) в растворе при разных значениях pH среды: (а) в отсутствии и (б) в присутствии rSkp *Y. pseudotuberculosis*

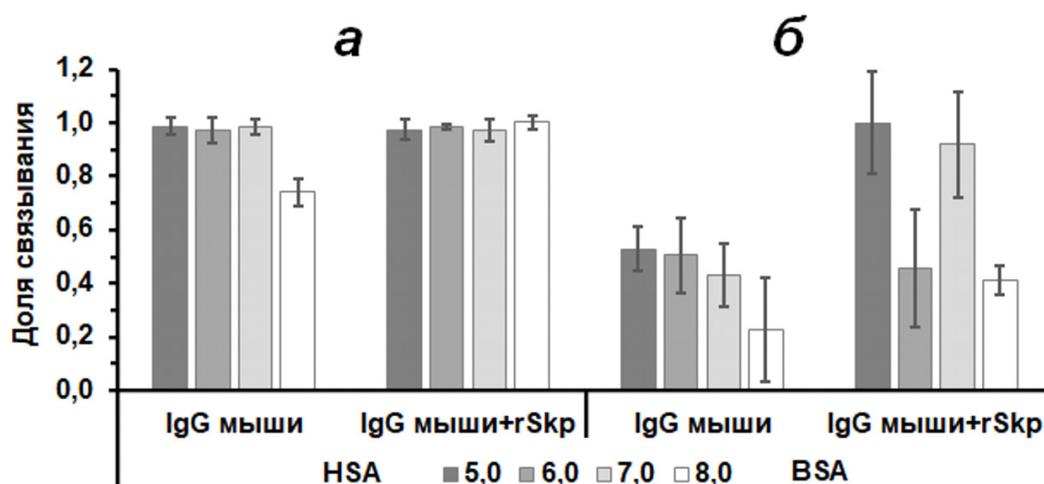


Рисунок 5. Доля связывания поликлональных IgG кролика с антигенами HSA и BSA при разных значения pH среды после длительного хранения (90 дней) в растворе при разных значениях pH среды: (а) в отсутствии и (б) в присутствии *Y. rSkp pseudotuberculosis*

Взаимодействию IgG1 мыши с BSA привело к одинаковым результатам, отличающихся в пределах ошибки, при всех значениях pH среды (рис. 5 б). В присутствии rSkp при pH 5,0 и 7,0 антигенсвязывающая способность иммуноглобулина мыши возрастает до 1 и 0,92 соответственно. Возможное объяснение кажущегося роста антигенсвязывающей активности моноклональных IgG1 мыши в присутствии rSkp, может быть связано с аномальной агрегацией иммуноглобулинов мыши в этих условиях, как было нами показано выше методом ДРС (рис. 2 б). Иммуноглобулины мыши работают точно так же, как и без шаперона при pH 6,0 и 8,0.

Влияние rSkp на сохранение активных форм иммуноглобулинов мыши и кролика, способных связываться с HSA, заметно при pH 8,0 и 6,0 соответственно (табл. 1), что обусловлено замедлением процесса агрегации шапероном. Аналогичный эффект rSkp наблюдается в случае BSA при pH 8,0 для IgG1 мыши, при pH 5,0 и 6,0 для IgG кролика.

Таблица 1. Доля связывания иммуноглобулинов с антигенами при разных значения pH среды при длительном хранении (90 дней)

pH	IgG1 мыши		IgG1 мыши с Skp		IgG кролика		IgG кролика с Skp	
	HSA	BSA	HSA	BSA	HSA	BSA	HSA	BSA
4,0	-	-	-	-	0,73	0,47	0,74	0,51
5,0	0,99	0,53	0,97	1,00	0,95	0,68	0,93	1,00
6,0	0,97	0,50	0,98	0,46	1,00	0,69	0,88	0,86
7,0	0,98	0,43	0,97	0,92	-	-	-	-
8,0	0,74	0,22	1,00	0,41	-	-	-	-

В результате проведенной работы было установлено, что при длительном хранении антител, интенсивность процесса агрегации различна в зависимости от значения pH среды. Активное проявление шаперонных свойств rSkp в случае IgG кролика наблюдалось при всех проверенных значениях pH среды, для IgG1 мыши аналогичный эффект был отмечен при pH 6,0 и 8,0. Полученные результаты говорят о том, что rSkp способен замедлять процессы агрегации иммуноглобулинов, проявление его шаперонной активности зависит от среды, в которой инкубируются антитела.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 20-04-00777).

Список литературы / References:

1. Wang W., Singh S., Zeng DL, King K., Nema S. Antibody structure, instability, and formulation. *J. Pharm. Sci.*, 2007, vol. 96, no. 1, pp. 1-26.
2. Shire S.J. Formulation and manufacturability of biologics. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2009, vol. 20, no. 6, pp. 708-714.
3. Joubert M.K., Luo Q., Nashed-Samuel Y., Wypych J., Narhi L.O. Classification and characterization of therapeutic antibody aggregates. *J. Biol. Chem.*, 2011, vol. 286, pp. 25118-25133.
4. Johnson M. *Antibody Storage and Antibody Shelf Life*, 2019. DOI: 10.13070/mm.en.2.120
5. Сидорин Е.В., Зиганшин Р.Х., Набережных Г.А., Лихацкая Г.Н., Трифонов Е.В., Анастюк С.Д., Черников О.В., Соловьева Т.Ф. Белок шаперон Skp из *Yersinia pseudotuberculosis* обладает способностью связывать иммуноглобулины G. *Биохимия*, 2009, том 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, № 4, pp. 501-514. (In Russ.)]
6. Сидорин Е.В., Хоменко В.А., Ким Н.Ю., Соловьева Т.Ф. Шаперонная и иммуноглобулинсвязывающая активности Skp из *Yersinia pseudotuberculosis*. *Биохимия*, 2020, том 85, № 1, с. 93-103. [Sidorin E.V., Khomenko V.A., Kim N.Yu., Solov'eva T.F. The chaperone and immunoglobulin binding activities of Skp protein from *Yersinia pseudotuberculosis*. *Biochemistry (Moscow)*, 2020, vol. 85, no. 1, pp. 93-103 (In Russ.)] doi: 10.31857/S0320972520010078
7. 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, том 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.)]
8. Peters T.Jr. Serum albumin. *Adv. Protein. Chem.*, 1985, vol. 37, pp. 161-245.
9. Carter D.C., Ho J.X. Structure of serum albumin. *Adv. Protein. Chem.*, 1994, vol. 45, pp. 153-203.

STUDY OF THE CHAPERONIC ACTIVITY OF Skp PROTEIN FROM YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS AT DIFFERENT pH VALUES

Kiseleva D.A.^{1,2}, Sidorin E.V.¹

¹ 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

² Far Eastern Federal University, School of Natural Sciences
Vladivostok, 690090, Russia; e-mail: kiseleva.diana99@mail.ru

Abstract. The presented work is devoted to the study of the chaperone activity of the recombinant protein Skp (rSkp) *Yersinia pseudotuberculosis* using dynamic light scattering and enzyme-linked immunosorbent assay. Commercial samples of rabbit polyclonal IgG antibodies and mouse monoclonal immunoglobulins, IgG1 isotype, were used as substrate proteins. It was found that rSkp is able to slow down the processes of self-association and aggregation of immunoglobulins, while maintaining their antigen-binding ability. For antibodies of each animal species, the chaperonic properties of the protein are manifested individually. The chaperone activity of rSkp significantly depends on the pH value of the medium in which the antibodies are located.

Key words: chaperone Skp, *Yersinia pseudotuberculosis*, immunoglobulin G, antibodies, aggregation.