

ПОДХОДЫ К ЭФФЕКТИВНОЙ СТАБИЛИЗАЦИИ БЕЛКОВ С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ШАПЕРОНОВ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХЗенин В.А.¹, Куров К.А.¹, Саввин О.И.¹, Шарапова О.А.², Юркова М.С.^{1,2}, Федоров А.Н.^{1,2}¹ Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр

«Фундаментальные основы биотехнологии» РАН»

Ленинский пр., 33, стр. 2, г. Москва, 119071, РФ

² ООО «Тропоген»

ул. Наро-фоминская, 17, помещение III, г. Москва, 119619, РФ

e-mail: zenanmail@icloud.com

Аннотация. Разработан эффективный подход к продукции практически нерастворимых гидрофобных белков в стабильной растворимой форме. Предложенный метод основан на получении слитых белков, включающих целевые белки и белок-носитель. В качестве носителя использован белок GrAD - апикальный домен термофильного шаперона GroEL. Для обеспечения возможности отделения белка-носителя путем избирательного гидролиза бромцианом был создан безметиониновый вариант GrAD. Изучены слитые белки с целевыми белками, соединенными с С-концом белка-носителя и слитый белок с целевым белком, соединенным с N-концом белка-носителя. Слитые белки экспрессированы в *E. coli* при различных температурах, они преимущественно образовывали тельца включения. Все слитые белки после растворения телец включения в растворе мочевины были успешно ренатурированы в стабильной растворимой форме. Изучена их стабильность и функциональность. GrAD как носитель может быть платформой для получения самых разных гидрофобных белков в растворимой форме для их исследования.

Ключевые слова: стабилизация белков, гидрофобные белки, шапероны, минишаперон, GroEL.

AN APPROACH TO PROTEIN STABILISATION WITH MOLECULAR CHAPERONES AND ITS DERIVATIVESZenin V.A.¹, Kurov K.A.¹, Sawin O.I.¹, Sharapova O.A.², Jurkova M.S.^{1,2}, Fedorov A.N.^{1,2}¹ Federal State Institution «Federal Research Centre

«Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences»

Leninsky pr., 33, Moscow, 119071, Russia

² Tropogen Inc.,

Naro-fominskaya St., 17, office III, Moskva, 119619, Russia

e-mail: zenanmail@icloud.com

Abstract. We have developed an approach to produce insoluble hydrophobic proteins in stable soluble forms. The proposed system is a fused protein construct, where a target protein is fused to the carrier. The carrier is GrAD protein, it is apical domain of thermophilic minichaperone GroEL. The Met-less version of GroEL apical domain has been made for further use of CNBr chemical cleavage. Studied proteins included hydrophobic insoluble proteins fused to the C-terminus of GrAD as well as its N-terminus. The fusions were expressed at various temperatures and inclusion bodies were harvested. All fusion proteins were dissolved in urea solution and successfully renatured in stable soluble forms. Their stability and target protein functionality were tested. This approach can be used to solubilize and stabilize hydrophobic proteins for their research by different means.

Key words: protein stabilization, hydrophobic proteins, chaperones, minichaperone, GroEL.

Малая растворимость и низкая стабильность являются распространенными проблемами при работе с белковыми молекулами. Данные препятствия усложняют изучение свойств многих полипептидов.

Растворимость белка определяется взаимодействием молекулы белка с соседними молекулами, молекулами растворителя, ионами, а так же влиянием ионов на структуру растворителя [1, 2]. За растворимость белка обычно принимают максимальную концентрацию в присутствии ко-растворителей, стабильную при центрифугировании [3, 4]. Для улучшения растворимости белка применяют добавление ионных соединений, хаотропных агентов, детергентов, изменение первичной структуры белка [5] и другие методы. Каждый из подходов имеет сильные и слабые стороны. Добавление ионных соединений позволяет снизить энергию системы за счет увеличения в растворе концентрации противоионов к заряженным участкам молекулы белка. В высоких концентрациях ионные соединения могут вызывать преципитацию растворов белка. Хаотропные агенты влияют на структуру воды, позволяя более липофильным частицам существовать в растворе, высокие концентрации хаотропных агентов вызывают потерю нативной структуры и функциональности белка [6]. Детергенты в водных растворах связываются с липофильными частями молекулы белка и позволяют поддерживать комплекс в растворе за счет наличия полярных участков в структуре. Мощные детергенты легко разрушают нативную структуру белка, а неденатурирующие детергенты слабо влияют на белок-белковые взаимодействия [7]. Детергенты мембранотоксичны, что так же ограничивает их использование.

Стабильность белка определяется положением текущего уровня энергии на энергетической поверхности, свойственной белку – модели, отражающей внутреннюю энергию всех возможных конформаций белка. Чем глубже в «энергетической яме» находится молекула белка по уровню своей энергии, тем стабильнее ее состояние. В большинстве случаев, нативное состояние соответствует самой нижней точке энергетической поверхности белка и является самым стабильным. Наименее стабильные белки имеют так же альтернативные или агрегированные конформации с энергией, сравнимой с нативным состоянием, и требуют малой энергии

активации для выхода из нативной конформации [8]. Таким образом, для обеспечения стабильности целевого белка важно поддержание нативной структуры и противодействие агрегации.

Как уже говорилось выше, использование амфифильных молекул для связывания гидрофобных участков белковой молекулы – один из способов увеличения растворимости и улучшения стабильности белков. В природе роль подобных стабилизаторов играют белки теплового шока, теперь обычно называемые молекулярными шаперонами. Их функции включают связывание несвернутых или неправильно свернутых белков для обеспечения из правильного фолдинга (сворачивания). Существует несколько семейств шаперонов, наиболее применимы для этих целей GroEL и HSP70.

Шапероны способны, образуя прочные комплексы, предотвращать денатурацию белков, поддерживая их структуры при повышенных температурах и других экстремальных условиях. Например, бактериальная люцифераза в комплексе с GroEL сохраняет структуру неопределенно долгое время (часы и сутки) при температуре, когда сама люцифераза инактивируется менее чем за одну минуту [9]. Проблема в использовании шаперонов для стабилизации целевых белков состоит в том, что для эффективного образования комплексов необходимо создавать слитые белки, т.е. конструкторы, в которых целевой белок и шаперон соединены в единую полипептидную цепь. Для этого на генном уровне соединяют N-конец одного белка с C-концом другого. У шаперонов N и C концы расположены неудобно для создания таких комплексов, у GroEL, к примеру, они расположены внутри белковой молекулы. К этому надо добавить, что мономеры GroEL образуют частицу, бочку из двух колец по 7 мономеров в каждом. Попытки добавить новую аминокислотную последовательность к N и C концу приводят к дестабилизации GroEL. Поэтому, хотя в литературе описаны слитые белки с шаперонами GroEL и HSP70, на практике они не могут эффективно служить для стабилизации белков, наоборот, дестабилизируют их.

Достаточно давно было показано, что часть GroEL, называемая апикальным доменом, сохраняет способность связывать белки, поддерживать их и способствует их сворачиванию [10]. Эта часть, названная минишапероном, является мономером и имеет небольшой размер (15 кДа), что также удобно (структура представлена на рисунке 1).



Рисунок 1 – Структура минишаперона GrAD, субстрат-связывающие участки отмечены красным [11]

Нами решено использовать минишаперон для создания слитых белков с целевыми белками для их стабилизации. Мы показали, что исходно полностью нерастворимые белки становятся растворимыми и стабильными в растворе в составе слитых белков с минишапероном [12]. Растворимость и стабильность могут поддерживаться и при повышенных температурах. Липофильная субстрат-связывающая поверхность белка и модель распределения зарядов по поверхности молекулы, обеспечивающие прочное связывание и стабилизацию, представлены на рисунке 2.

Созданные генетические конструкторы включают нуклеотидную последовательность апикального домена GroEL (GrAD) организма *Thermus thermophilus* HB27, соответствующую аминокислотам 190 – 333 с метионинами, замененными на изолейцин. Последовательность с 3' стороны была дополнена нуклеотидами, соответствующими SGSGAGDDDDK аминокислотной последовательности. Конструктор GrAD-E2 содержит последовательность гликопротеина E2 вируса гепатита С генотипа 1b, прикрепленную к дополненной последовательности GrAD с 3' конца. Конструктор GrAD-E6 содержит последовательность онкобелка E6 вируса папилломы человека 16 типа, прикрепленную к дополненной последовательности GrAD с 3' конца. Конструктор E2-GrAD содержит последовательность гликопротеина E2 вируса гепатита С генотипа 1b, прикрепленную к безметиониновой последовательности GrAD с 5' конца через нуклеотидную последовательность

соответствующую SGSGAGDDDDK аминокислотной последовательности. Все полученные конструкторы были проверены путем ДНК секвенирования

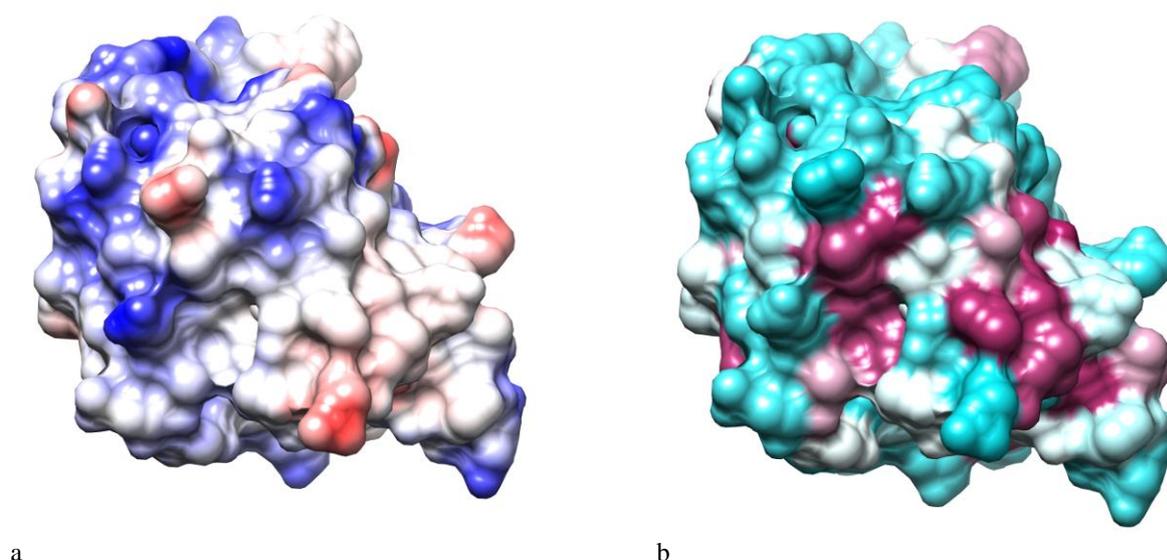


Рисунок 2 – Субстрат-связывающая поверхность минишаперона GrAD в условных цветах: а – расчетный электростатический заряд поверхности согласно закону Кулона (синий – отрицательный, красный – положительный), б – расчетная гидрофобность поверхности (бирюзовый – наименее гидрофобная, темно-бордовый – наиболее гидрофобная) [11,13]

Конструкторы были клонированы в модифицированный pET11c вектор (Novagen). Векторы были использованы для трансформации *Escherichia coli* BL21 (DE3). Рост продуцента осуществлялся в среде LB при температурах от 15 до 37 °С. Экспрессия индуцирована 0,4 ммоль изопропил-β-тио-галактопиранозидом при достижении оптической плотности 0,4 при 600 нм. Сбор клеток осуществлялся путем центрифугирования при достижении оптической плотности 4,0 при 600 нм.

Осадок, содержащий клетки, ресуспендировали в натрий-фосфатном буфере pH 7,4 с добавлением 0,1 моль/л натрия хлорида и 1 ммоль/л 4-(2-аминоэтил)-бензол сульфонил фторида при комнатной температуре. Суспензию обрабатывали ультразвуком на льду и центрифугировали. Осадок был дважды промыт натрий-фосфатным буфером pH 7,4 с добавлением 0,1 моль/л натрия хлорида и 0,1 % натрия дезоксихолата с обработкой ультразвуком. После центрифугирования очищенные тельца включения растворяли в течении ночи в натрий-фосфатном буфере pH 7,4 с добавлением 8 моль/л мочевины и 1 ммоль/л дитиотреитола. Белки были ренатурированы разбавлением в 100 раз: конструкторы с E6 - в буфере 10 ммоль/л 3-[(3-Холамидопропил)-диметиламмоний]-1-пропансульфонат и 5 мкмоль/л цинка ацетата, конструкторы с E2 – в 50 ммоль/л трис буфере pH 8 с добавлением 50 ммоль/л натрия хлорида. Конструкторы с E2 были сконцентрированы посадкой на ионообменную смолу mQ (GE Healthcare) и элюированы градиентом натрия хлорида (с последующим диализом в фосфатном буфере), конструкторы с E6 сконцентрированы на концентрирующих ячейках Amicon (Millipore) до концентрации 1-2 мг/мл.

Концентрированный конструктор GrAD-E6 был уравновешен в течении часа с гепарин-модифицированной сефарозой Heparin sepharose 6 FF (GE Healthcare). Аффинный носитель был промыт посадочным буфером и белок был элюирован градиентом натрия хлорида (пик элюции в районе 200 ммоль/л). Электрофорезы полученных элюатов представлены на рисунке 3.

Нативный белок E6 вируса папилломы человека имеет аффинность к молекулам ДНК [14]. Для конструктора GrAD-E6 была доказана способность к аффинному связыванию с гепарин-модифицированной сефарозой, что доказывает сохранение способности аффинного связывания E6 в составе слитого белка с ДНК.

Полученные растворы белков хранились при температуре 4 °С в течение 72 часов, после этого были проверены на стабильность путем центрифугирования при 16700 g в течении 30 минут при температуре 4 °С. Полученные супернатанты и осадки были проанализированы при помощи электрофореза по Лэммли, участки окрашенного геля приведены на рисунке 4. Так же для количественного обсчета была проведена денситометрия геля. В течение 72 часов в растворе сохранилось: GrAD-E2 – 87,8 %, E2-GrAD – 79 %, GrAD-E6 – 89 %

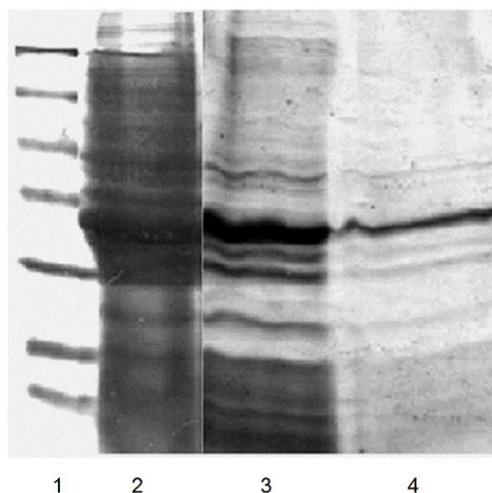


Рисунок 3 – Электрофорез результатов афинной хроматографии конструктора GrAD-E6. 1- стандарты молекулярной массы, 2 – исходный раствор конструктора, 3 – начало пика элюции, 4 – проба перед окончанием элюции

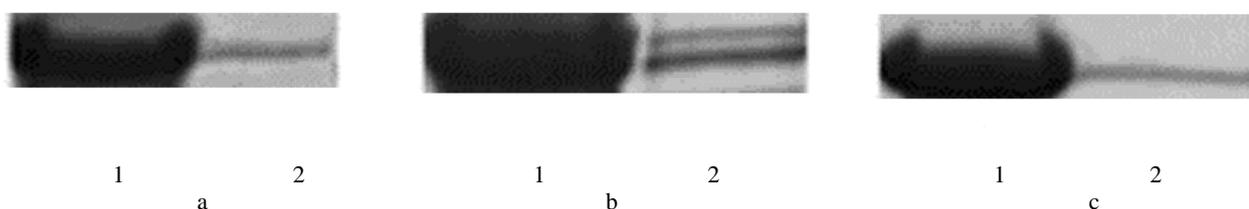


Рисунок 4 – Участки электрофорезов супернатантов (1) и осадков (2) конструкторов GrAD-E2 (a), E2-GrAD (b), GrAD-E6 (c)

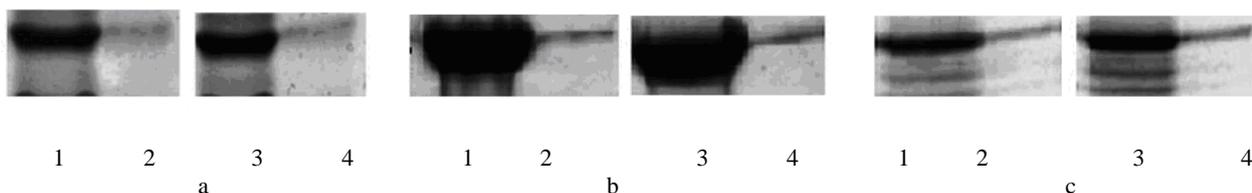


Рисунок 5 – Участки электрофорезов супернатантов (1 при замораживании и 3 при лиофилизации) и осадков (2 при замораживании и 4 при лиофилизации) конструкторов GrAD-E2 (a), E2-GrAD (b), GrAD-E6 (c)

Все полученные конструкторы были подвержены процедуре однократного замораживания-оттаивания и лиофилизации. Замораживание проводилось при температуре -20°C , лиофилизация была проведена из замороженного состояния, перерастворение проводилось добавлением соответствующего количества воды. Участки электрофорезов супернатантов и осадков после указанных процедур и центрифугирования представлены на рисунке 5. Была проведена денситометрия полученных электрофорезов, результаты показывают сохранение в растворимой форме при замораживании и оттаивании GrAD-E2 – 90,5 %, E2-GrAD – 94,5 %, GrAD-E6 – 95 % в растворе, при лиофилизации: GrAD-E2 – 91%, E2-GrAD – 90,5%, GrAD-E6 – 90 %.

Список литературы / References:

1. Arakawa T., Timasheff S.N. Theory of protein solubility. *Methods Enzymol.*, 1985, vol. 114, p. 49-77.
2. Schein C.H. Solubility as a function of protein structure and solvent components. *Biotechnol. Nat. Publ. Co.*, 1990, vol. 8, no. 4, pp. 308-317.
3. Hjelmeland L.M., Chrambach A. Solubilization of functional membrane proteins. *Methods Enzymol.*, 1984, vol. 104, pp. 305-318.
4. Kinsella J.E., Morr C.V. Milk proteins: physicochemical and functional properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1984, vol. 21, no. 3, pp. 197-262.
5. Ferreira L. [et al.] Properties and crystallization of a genetically engineered, water-soluble derivative of penicillin-binding protein 5 of *Escherichia coli* K12. *Eur. J. Biochem.*, 1988, vol. 171, no. 1-2, pp. 11-16.
6. Hatefi Y., Hanstein W.G. Solubilization of particulate proteins and nonelectrolytes by chaotropic agents. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1969, vol. 62, no. 4, pp. 1129-1136.

7. Helenius A., Simons K. Solubilization of membranes by detergents. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Rev. Biomembr.*, 1975, vol. 415, no. 1, pp. 29-79.
8. Clark P. Protein folding in the cell: reshaping the folding funnel. *Trends Biochem. Sci.*, 2004, vol. 29, no.10, pp. 527-534.
9. Fedorov A.N., Baldwin T.O. GroE modulates kinetic partitioning of folding intermediates between alternative states to maximize the yield of biologically active protein1. *J. Mol. Biol.*, 1997, vol. 268, no. 4, pp. 712-723.
10. Smoot A.L. [et al.] The Binding of Bis-ANS to the Isolated GroEL Apical Domain Fragment Induces the Formation of a Folding Intermediate with Increased Hydrophobic Surface Not Observed in Tetradecameric GroEL. *Biochemistry (Mosc.)*, 2001. vol. 40, no. 14, pp. 4484-4492.
11. Pettersen E.F. [et al.] UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.*, 2004, vol. 25, no. 13, pp. 1605-1612.
12. Sharapova O.A., Yurkova M.S., Fedorov A.N. A minichaperone-based fusion system for producing insoluble proteins in soluble stable forms. *Protein Eng. Des. Sel.*, 2016, vol. 29, no. 2, pp. 57-64.
13. Kyte J., Doolittle R.F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, 1982, vol. 157, no. 1, pp. 105-132.
14. Mallon R.G., Wojciechowicz D., Defendi V. DNA-binding activity of papillomavirus proteins. *J. Virol.*, 1987, vol. 61, no. 5, pp. 1655-1660.

НЕОБЫЧНАЯ СТРУКТУРА АГРЕГАТОВ, ОБРАЗОВАННЫХ ФРАГМЕНТОМ Аβ16-25 ПЕПТИДА, И ПЕРСПЕКТИВЫ ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В БИОТЕХНОЛОГИИ

Селиванова О.М., Горбунова Е.Ю., Мустаева Л.Г., Григорашвили Е.И.,
Суворина М.Ю., Никулин А.Д., Сури́н А.К., Галзитская О.В.

ФГБУН Институт белка РАН

Просп. науки, 4, г. Пуццоно, 142290, РФ

Филиал ФГБУН Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Просп. науки, 6, г. Пуццоно, 142290, РФ

e-mail: seliv@vega.protres.ru; ogalzit@vega.protres.ru

Аннотация. С помощью биоинформатических методов исследования был найден фрагмент участка последовательности Аβ1-42 пептида, отвечающий за его амилоидогенные свойства – KLVFFAQNVG (Аβ16-25). Данный фрагмент был химически синтезирован и получен в достаточных количествах для изучения процесса его амилоидообразования. По данным электронной микроскопии (ЭМ) этот фрагмент в условиях 5 % DMSO и 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 формирует не характерную для большинства амилоидов морфологию в виде широких плоских лент/пленок до 150 и более нм шириной. Такая морфология представляет интерес как бионаноматериал для адсорбции различных биологических объектов от белков и их комплексов с белками и нуклеиновыми кислотами до вирусных частиц. Несмотря на необычность морфологии полимеров, образованных пептидом Аβ16-25, препараты данного фрагмента по данным рентгеноструктурного анализа показывают наличие двух основных рефлексов (4,6-4,8 Å и 8-12 Å), характерных для кросс-β структуры амилоидных фибрилл.

Ключевые слова: Аβ пептид, амилоидогенные фрагменты Аβ1-42 пептида, амилоиды, бионаноматериалы, биоинформатика.

UNUSUAL STRUCTURE OF AGGREGATES FORMED BY THE FRAGMENT OF Aβ16-25 PEPTIDE AND PERSPECTIVES FOR ITS USE IN BIOTECHNOLOGY

Selivanova O.M., Gorbunova E.Yu., Mustaeva L.G., Grigorashvili E.I.,
Suvorina M.Yu., Nikulin A.D., Surin A.K., Galzitskaya O.V.

“Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences

Nauka Pr. 4, Pushchino, 142290, Russia

Branch of M.M.Shemyakin and Yu.A.Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences

Nauka Pr. 4, Pushchino, 142290, Russia

e-mail: seliv@vega.protres.ru; ogalzit@vega.protres.ru

Summary. Using bioinformatics methods, fragment KLVFFAQNVG (Aβ16-25) was found in the sequence of peptide Aβ1-42 responsible to its amyloidogenic properties. The fragment was chemically synthesized and obtained in sufficient amounts for studying the process of its amyloid formation. According to the electron microscopy data, under 5% DMSO and 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 this fragment forms morphology uncharacteristic of most amyloids. This morphology looks like wide flat ribbons/films up to 150 nm and higher. The morphology is of interest as bionanomaterial for adsorption of different biological objects from proteins and their complexes with proteins and nucleic acids to viral particles. Though the morphology of polymers formed by the Aβ16-25 fragment is unusual, according to X-ray diffraction data its preparations display the presence of two main reflections (4.6-4.8 Å and 8-12 Å) characteristic of cross-β structure of amyloid fibrils.

Key words: Aβ peptide, amyloidogenic fragments of Aβ1-42 peptide, amyloids, bionanomaterial, bioinformatics.