

6. Nagatomo, S., Okumura, M., Saito, K., Ogura, T., Kitagawa, T., & Nagai, M. Interrelationship among Fe–His Bond Strengths, Oxygen Affinities, and Intersubunit Hydrogen Bonding Changes upon Ligand Binding in the β Subunit of Human Hemoglobin: The Alkaline Bohr Effect. *Biochemistry*, 2017, vol. 56, no. 9, pp. 1261-1273.

7. Weber R.E., Jensen F.B., Cox R.P. Analysis of teleost hemoglobin by Adair and Monod-Wyman-Changeux models. Effects of nucleoside triphosphates and pH on oxygenation of tench hemoglobin. *J Comp Physiol B*, 1987, vol. 157, pp. 145-152

8. Нельсон Д., Кокс М. *Основы биохимии Ленинджера*. М.: Биомом, 2014, т. 2, 636 с. [Nelson D., Koks M. *Foundations of Biochemistry of Leninger*. Moscow: Bionom, 2014, vol. 2, 636 p. (in Rus.)]

9. Dobretsov G.E., Kurek N.K., Syrejschikova T.I., Yakimenko M.N., Clarke D.T., Jones G.R., Munro I.H. Time-resolved spectroscopy of the probe fluorescence in the study of human blood protein dynamic structure on SR beam. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, 2000, vol. 448, pp. 471-477.

10. Лакович Дж. *Основы флуоресцентной спектроскопии*. М.: Мир, 1986, 496 с. [Lakovich, J. *Principles of fluorescence spectroscopy*, Moscow: Mir, 1986, 496 p. (in Rus.)]

11. Родионова Е.Ю., Дмитриева И.Ю., Чухно А.С. Электрокинетические свойства гемоглобина в водных растворах 1-, 2- и 3-зарядных ионов. *Бутлеровские сообщения*, 2013, т. 34. № 6, с. 135-140. [Rodionova E.Yu., Dmitrieva I.Yu., Chukhno A.S. Electrokinetic properties of hemoglobin in aqueous solutions of 1-, 2-, and 3-charge ions. *Butlerov Communications*, 2013, vol. 34, no. 6, pp.135-140 (in Rus.)]

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМЕРНОГО OMPF ПОРИНА ИЗ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*

Набережных Г.А., Голотин В.А., Портнягина О. Ю. Чистюлин Д.К., Новикова О.Д.

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН

просп. 100 лет Владивостоку, 159, г. Владивосток, 690022, РФ

e-mail: naber1953@mail.ru

Аннотация. Изучено взаимодействие рекомбинантного (R-OmpF) и химерного OmpF порина из наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* (Ch-OmpF) с отрицательно заряженными липосомами. Показано, что пространственная структура порина в составе Ch-OmpF, поддерживаемая белком-шапероном DsbC, в присутствии липидного бислоя может принимать функционально активную конформацию. Эффективность порообразования зависела от состава липосомальной мембраны и присутствия липополисахарида.

Ключевые слова: порин, порообразующая активность, липосомы, липополисахарид.

FUNCTIONAL ACTIVITY OF RECOMBINANT CHEMERIC OMPF PORIN FROM *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*

Naberezhnykh G.A.¹, Golotin V.A., Portnyagina O.Yu., Chistyulin D.K., Novikova O.D.

¹G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences

100 let Vladivostoku av., 159, Vladivostok, 690022, Russia

e-mail: naber1953@mail.ru

Abstract. The interaction of recombinant (R-OmpF) and chimeric OmpF porin from outer membrane of *Yersinia pseudotuberculosis* (Ch-OmpF) with negatively charged liposomes was studied. It was shown that the porin spatial structure in Ch-OmpF supported by DsbC protein-chaperone in the presence of lipid bilayer can take a functional activity conformation. The effectiveness of pore formation depended on the composition of the liposomal membrane and the presence of lipopolysaccharide.

Key words: porin, pore-forming activity, liposomes, lipopolysaccharide

Как известно, процесс образования белков в клетке состоит из двух этапов: биосинтеза полипептидной цепи и ее сворачивания (фолдинга) в нативную структуру. Функционально активным белок становится только после сворачивания в уникальное компактное состояние, называемое нативным. При получении рекомбинантных белков их фолдинг может осуществляться самопроизвольно или с помощью белков-шаперонов. Последние обладают способностью поддерживать «правильную» конформацию белков в процессе сборки и препятствовать агрегации. Использование шаперонов является более надежным способом получения рекомбинантного белка, подобного нативному аналогу по структуре и свойствам.

Порообразующие белки, названные поринами, являются одним из основных структурных компонентов наружной мембраны грамотрицательных бактерий [1]. В нативной мембране они существуют как гомотримеры, связанные с пептидогликановым слоем, и имеют специфическую, но не нековалентную связь с липополисахаридом. В изолированной форме эти белки сохраняют тримерную структуру и нерастворимы в водных растворах без детергентов [2]. Порины обеспечивают жизненно важные функции микробной клетки, образуя систему мембранных фильтров: заполненные водой трансмембранные каналы для транспортировки питательных веществ и продуктов обмена [3]

Данная работа посвящена изучению функциональной активности химерного OmpF порина из наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis*, полученного в результате экспрессии химерного гена, содержащего белок-

шаперон DsbC и OmpF, в клетках-продуцентах *E. coli*. Как было показано ранее, использование такой конструкции позволяет получить растворимую форму рекомбинантных белков, в том числе мембранных [4]. Растворимые белки являются более перспективными для изучения их биологических свойств и использования в качестве антигенов для медицинской диагностики. Для проверки функциональной активности полученного химерного белка была определена его способность связываться с отрицательно заряженными липосомами, в том числе имитирующими по составу мембрану эукариот, и встраиваться в липосомальную бислой.

Материалы и методы. Получение и очистку химерного OmpF порина (Ch-OmpF) проводили согласно процедуре, описанной в работе [5]. Получение из телец включения и рефолдинг рекомбинантного порина (R-OmpF) проводили, как описано ранее [6]

SDS-ПААГ-электрофорез. Чистоту полученного образца белка контролировали методом SDS-ПААГ-электрофореза [7]. Белки, разделенные в геле, окрашивали раствором Кумасси G-250 в 3% хлорной кислоте. В качестве маркеров использовали набор белков фирмы Fermentas (Литва) с молекулярными массами от 15 до 250 кДа.

УФ-спектры для определения концентрации белка регистрировали при 25 °С на УФ-видимом спектрофотометре УФ-1601РС (Shimadzu, Япония) в кварцевых кюветках с толщиной слоя в 1 см, принимая поглощение 1% раствора белка равным 1,0

Спектры КД белков были записаны на CD-спектрополяриметре Chirascan Plus CD (Applied Photophysics Limited, UK) в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 0,1 и 1 см для пептидной и ароматической спектральных областей соответственно. В пептидной области спектра КД (190-240 нм) эллиптичность (θ) рассчитывали как эллиптичность среднего остатка, принимая среднюю молекулярную массу последнего, равной 110 Да по формуле:

$$[\theta] = [\theta]_{\text{набл.}} \cdot S \cdot 110 / 10 \cdot C \cdot l \text{ (град} \cdot \text{см}^2 / \text{дмоль)},$$

где S - чувствительность, C - концентрация белка, мг / мл; l , - длина оптического пути в см.

В ароматической области спектра КД (240-320 нм) эллиптичность $[\theta]_M$ рассчитывали как молярную, принимая молекулярную массу химерного белка 67 кДа (38 кДа OmpF с 29 кДа DsbC). Содержание элементов вторичной структуры белка рассчитывали с помощью CONTINLL (пакет CDPPro) [8]. Концентрация Ch-OmpF в растворе составляла 100 мкг/мл для пептидной и 400 мкг/мл для ароматической областей спектра.

Получение дансил-меченных производных белков. Дансил-меченные белки получали реакцией с дансил хлоридом по методу [9].

Связывание белков с лецитиновыми липосомами. Для получения отрицательно заряженных липосом сухую липидную пленку, состоящую из 30,0 мг яичного лецитина, 12,5 мг холестерина и 1,8 мг дицетилфосфата (ДЦФ), гидратировали в 2 мл Трис-НСl буфера, содержащего 0,15 М NaCl (TNBS), pH 7,5. Смесь встряхивали, обрабатывали в ультразвуковой бане (Elma, Latvia) в течение 10 мин при 5 °С и 10-кратно пропускали через поликарбонатный фильтр с диаметром пор 200 нм (Nucleopore, США). Контроль размеров липосом осуществляли методом динамического светорассеяния с использованием прибора ZetaSizer Nano ZS («Malvern», Великобритания) при температуре 25 °С, фиксированном угле рассеяния 173° и длине волны лазера 633 нм. Аликвоту (50 мкл) дансил-меченного белка (32 мкг/мл) добавляли к 200 мкл липосом и инкубировали в течение 16 ч. Липосомы отмывали дважды TNBS, осаждая липосомы центрифугированием при 25000 g, затем осадок липосом растворяли в 5% SDS. Связывание белка с липосомой определяли по интенсивности флуоресценции полученных растворов на спектрофлуориметре FL-600 («Bio-TEK Instruments», США) при длине волны возбуждения 495 нм и эмиссии 517 нм. Тушение флуоресценции дансил-меченного порина, связанного с липосомами, проводили, добавляя 20 мкл раствора 0,5% трипанового синего в TNBS.

Получение моноламелярных липосом, меченных карбоксифлуоресцеином (КФ) и регистрация изменения проницаемости липосомальной мембраны. Для получения отрицательно заряженных липосом смесь, состоящую из 30 мг лецитина, 12,5 мг холестерина, 1,8 мг ДЦФ, растворенную в 300 мкл хлороформа упаривали и сушили в вакууме 3 ч. При получении липосом, моделирующих мембрану эукариот, к смеси дополнительно добавляли 20 мг сфингомиелина. Остаток растворяли в 0,3 мл сухого эфира, добавляли 50 мкл 0,2 М раствора КФ в 0,1 М Na₂CO₃ и 50 мкл воды. Смесь встряхивали, обрабатывали в ультразвуковой бане (Elma, Latvia) в течение 10 мин при 5 °С и упаривали в вакууме до полного удаления эфира. Остаток суспендировали в 4 мл TNBS и полученную суспензию липосом отмывали TNBS, осаждая липосомы центрифугированием при 25000 g, затем осадок липосом суспендировали в 4 мл TNBS.

Для определения порообразующей активности белков 50 мкл суспензии липосом добавляли к 120 мкл TNBS и определяли фоновую флуоресценцию. Затем добавляли 20 мкл раствора белка и фиксировали изменение флуоресценции в течение 30 мин. Для определения максимальной флуоресценции при полном лизисе липосом добавляли 100 мкл раствора 10 % SDS. Процент специфического освобождения маркера (СОМ) рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ СОМ} = F_{\text{эсп.}} - F_{\text{фон.}} / F_{\text{макс.}} - F_{\text{фон.}} \times 100 \%$$

где $F_{\text{эсп}}$ - флуоресценция после добавления белка, $F_{\text{макс}}$ - флуоресценция после полного лизиса липосом, $F_{\text{фон}}$ - флуоресценция без добавления белка.

Результаты и их обсуждение. Рекомбинантный химерный OmpF порин (Ch-OmpF) был очищен с помощью последовательного применения ионообменной, металл-аффинной и гель-проникающей хроматографии согласно процедуре, описанной в работе [5]. Полученный химерный белок был охарактеризован: определены его молекулярная масса и пространственная структура. По данным SDS-ПААГ-электрофореза значение кажущейся молекулярной массы

Ch-OmpF соответствовало 67 кДа (38 кДа OmpF и 29 кДа DsbC) (см. рис. 1). Это позволило предположить, что выделенный белок в растворе находится в виде мономера.

Анализ спектров КД показал см. рис. 1, Б и В, что Ch-OmpF имеет регулярную вторичную структуру. Форма и положение максимумов спектра в пептидной области свидетельствуют о наличии β -структурированных и α -спиральных участков в полипептидной цепи белка (см. рис.1, В). Расчеты элементов вторичной структуры показали, что в состав белка входит $21,3\pm 3\%$ α -спиралей, $46,8\pm 2\%$ суммарной β -структуры и $31,8\pm 3\%$ неупорядоченной структуры. Такое соотношение элементов вторичной структуры характерно для поринов, выделенных из мембраны. Спектры КД Ch-OmpF в ароматической области (см. рис.1, Б) имели достаточно низкую амплитуду и плохое разрешение полос. Подобный спектр соответствует довольно хорошо сформированной пространственной структуре белка, однако форма спектра предполагает довольно низкую степень ее стабилизации.

В качестве белка сравнения в работе был использован тример рекомбинантного OmpF порина (R-OmpF) из *Y. pseudotuberculosis* с молекулярной массой 110 кДа, полученный ранее из телец включения. Рефолдинг денатурированного мономера белка после растворения телец включения в 8 м мочевины был осуществлен с помощью исчерпывающего диализа. [6] Как известно, именно в тримерной форме порин проявляет свою каналобразующую активность в нативной и искусственной липидной мембране. В связи с этим, в нашу задачу входило установить влияние шаперона DsbC на поддержание функционально активной конформации рекомбинантного OmpF порина в составе химерного белка.

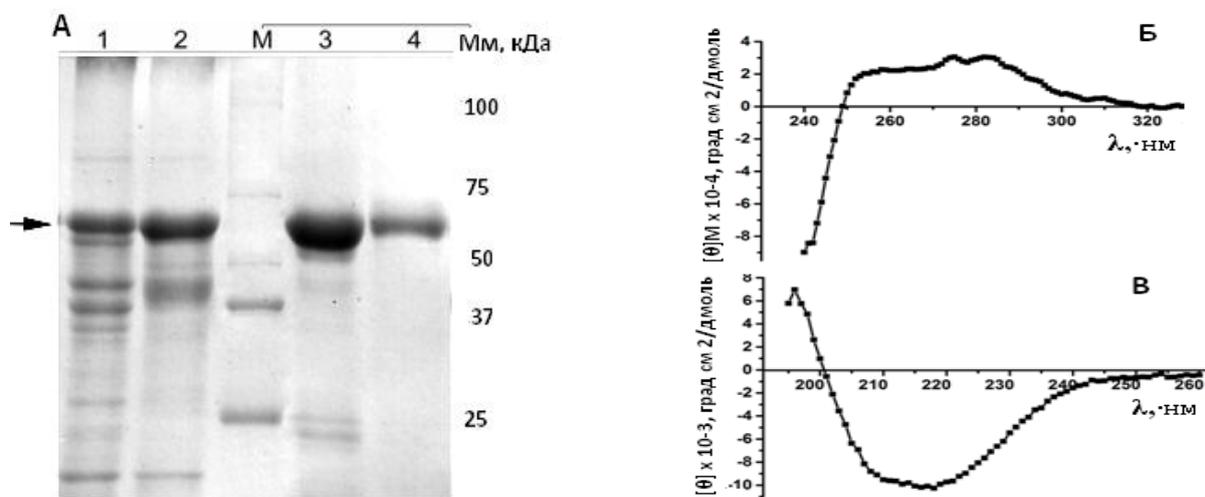


Рисунок 1 — А. SDS-ПААГ-электрофорез Ch-OmpF на различных стадиях очистки: 1 – растворимая фракция клеточного экстракта *E. coli* Rosetta (DE3)/OmpF40; 2 – фракция Ch-OmpF после хроматографии на DEAE-52 cellulose; 3 – фракция Ch-OmpF после металл-аффинной хроматографии на Ni-charged Profinity IMAC смоле; 4 – фракция Ch-OmpF после гель-хроматографии на Superdex 200. Стрелкой указан Ch-OmpF.
Б и В. Спектры КД Ch-OmpF в ближней и дальней УФ-областях спектра соответственно

На первом этапе исследования было изучено связывание рекомбинантного и химерного поринов с отрицательно заряженными лецитиновыми липосомами. Как видно из рисунка 2, А, оба образца порина связывались с липосомами, но количество связанного рекомбинантного порина было больше по сравнению с химерным белком. Тушение флуоресценции дансил-меченного порина трипановым синим, красителем, не проникающим в липосомальный бислой, показало, что около 30% белка не доступно для тушителя. Эти данные свидетельствуют о том, что практически третья часть внесенного белка, по-видимому, включается в бислой липосом. Кроме того на взаимодействие Ch-OmpF с липосомами указывает изменение размера липосом после их связывания с химерным порином (см. рис. 2, Б, кривая 2).

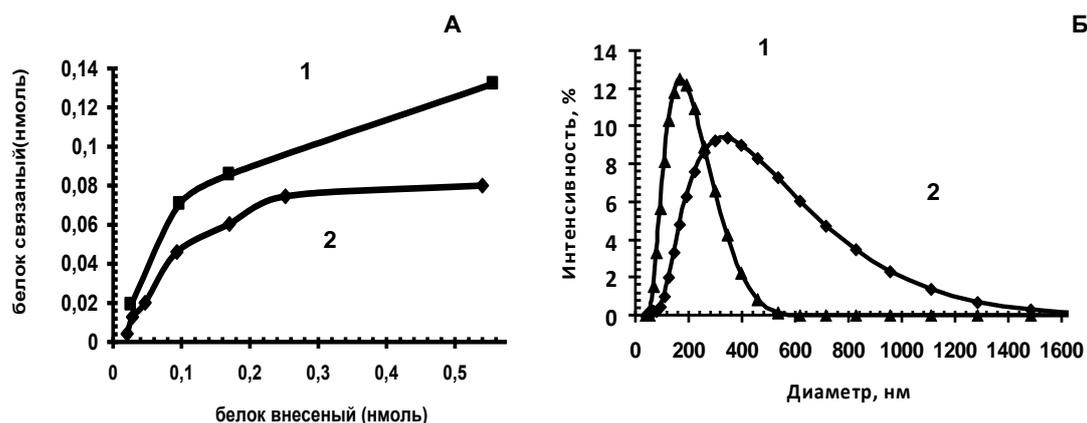


Рисунок 2 — А. Связывание (1)- R-OmpF, (2) - Ch-OmpF с лецитиновыми липосомами. Б. Размеры (1)-исходных лецитиновых липосом и (2)-после добавления Ch-OmpF порина.

Следующий этап исследования был посвящен определению функциональной активности поринов при встраивании в липидный бислои. Для этого был использован метод вытекания флуоресцентной метки из отрицательно заряженных липосом при добавлении порина. Концентрация флуорофора КФ внутри липосом в исходной суспензии превышала концентрацию его самотушения. Образование пор в липосомальной мембране при добавлении образца порина сопровождалось вытеканием флуорофора во внешний раствор и, соответственно, заметным увеличением интенсивности его флуоресценции.

Как видно из данных см. рис. 3, А, графики выхода КФ из липосом в присутствии рекомбинантного и химерного поринов существенно отличались (кривые 1 и 2 соответственно). Введение дополнительного количества отрицательно заряженного сфингомиелина в липосомы приводит к уменьшению поровой активности обоих образцов порина (см. рис. 3(Б)). Однако, добавление отрицательно заряженного липополисахарида (ЛПС) к образцам химерного порина приводит к увеличению поровой активности в 1,4 раза.

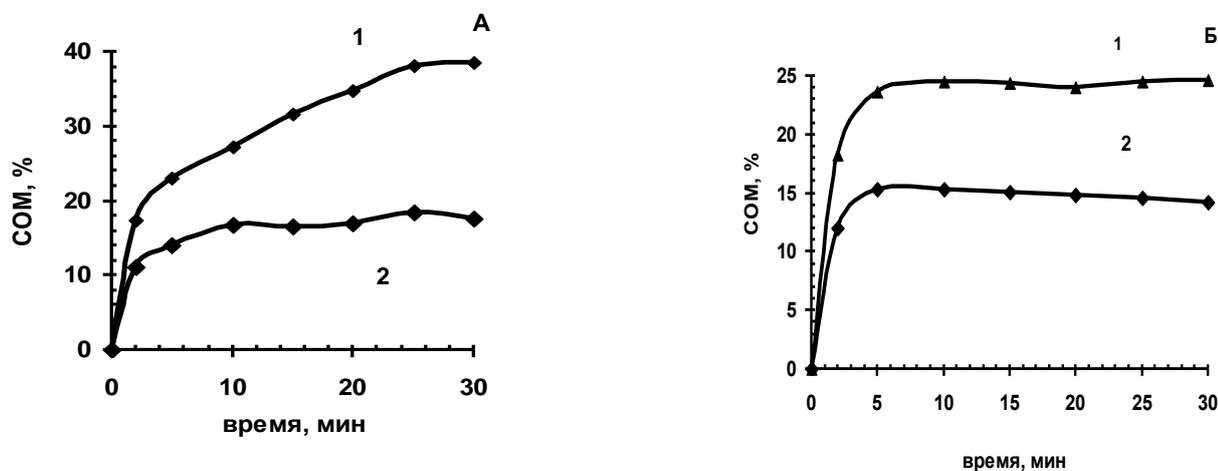


Рисунок 3 – Кинетика освобождения КФ из (А) - лецитиновых липосом, (Б) - лецитин-сфингомиелиновых липосом, при добавлении образцов (1) - R-OmpF, (2) - Ch-OmpF.
Ось ординат: COM, % - процент специфического освобождения КФ

Полученные результаты можно интерпретировать следующим образом. По-видимому, мономерный химерный порин способен связываться с липидным бислоем, но образует меньшее количество пориновых каналов по сравнению с рекомбинантным тримером белка. Кроме того, состав липидной мембраны играет определенную роль в проявлении химерным белком функциональной активности. Таким образом, пространственная структура OmpF порина в составе химерного белка в присутствии липидного бислоя может принимать функционально активную конформацию. В присутствии бактериального ЛПС, который является эффективным вектором для встраивания порина в липидный бислои, эффективность порообразования увеличивалась.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта ДВО РАН № 15-1-5-004.

Список литературы / References:

1. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2003, vol. 67, pp. 593-656.
2. Schulz, G.E.. The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, vol. 1565, pp. 308-317.
3. Delcour, A.H. Solute uptake through general porins. *Front. Biosci.* 2003, vol.8, pp. 1055-1071
4. Golotin V., Balabanova L., Likhatskaya G., Rasskazov V. Recombinant production and characterization of a highly active alkaline phosphatase from marine bacterium *Cobetia marina*. *Mar. Biotech.*, 2015, vol. 17, pp. 130-143.
5. Golotin V.A., Portnyagina O.Yu., Kim N.Yu., Chopenko N.S., Rasskazov V.A., Novikova O.D. Production of the recombinant porin from *Y. pseudotuberculosis* in a water-soluble form for pseudotuberculosis diagnostics. *Biological Chem*, 2017, in press.
6. Хоменко В.А., Портнягина О.Ю., Новикова О.Д., Исаева М.П., Ким Н.Ю., Лихацкая Г.Н., Вострикова О.П., Соловьева Т.Ф. Выделение и характеристика рекомбинантного OmpF-подобного порина из наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis*. *Биоорган. химия*, 2008. т. 34. с. 1-8. [Khomenko V.A., Portniagina O.Yu., Novikova O.D., Isaeva M.P., Kim N.Yu., Likhatskaya G.N., Vostrikova O.P., Solov'eva T.F. Isolation and characterization of recombinant OmpF-like porin from the *Yersinia pseudotuberculosis* outer membrane. *Bioorgan. Khimiya*, 2008, vol. 34, pp. 177-1849. (In Rus.)]
7. Laemmli, U.K.. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T7. *Nature*, 1970, vol. 227, pp. 680-685.
8. Sreerama, N. and Woody, R.W. Estimation of protein secondary structure from CD spectra: Comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.* 2000, vol. 287, pp.252-260.
9. Clement. N.R., Gould J.M. Pyranine (8-hydroxy-1,3,6-pyrenetrisulfonate) as a probe of internal aqueous hydrogen ion concentration in phospholipid vesicles, *Biochemistry*, 1981, vol. 20, pp. 1534-1538.

ВЛИЯНИЕ ШАПЕРОНА Skp НА АГРЕГАЦИЮ OmpF ПОРИНА *Yersinia pseudotuberculosis* В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

Сидорин Е.В., Хоменко В.А., Дмитренко П.С., Стенкова А.М., 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. Изучение свойств и механизмов функционирования шаперонов представляет не только фундаментальный, но и прикладной интерес при разработке препаратов для профилактики и лечения нейродегенеративных заболеваний. В данной работе методом динамического светорассеяния продемонстрировано ингибирующее действие шаперона Skp на процесс сборки рекомбинантного OmpF порина наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* (rOmpF). Получены кривые распределения частиц белка и среднего значения их гидродинамических радиусов (R_H) при переводе из денатурированного состояния (в 8 М мочевины, R_H 8,2 нм) в водный раствор при кислых и щелочных значениях pH. Показано, что при pH 5,0, в условиях, близких к изоэлектрической точке белка, rOmpF достаточно быстро и необратимо агрегировал. Так, при 10-ти кратном разбавлении раствора денатурированного rOmpF буфером с pH 5,0 уже в первые минуты наблюдалось образование частиц с R_H 53 нм, через час они увеличивались до размера седиментирующих частиц (1076 нм). В присутствии rSkp в этих условиях размеры частиц rOmpF (средний R_H 50,6 нм) только незначительно изменялись в течение суток (до среднего R_H 61,7 нм). При pH 8,0 наблюдалась обратимая самоассоциация rOmpF с образованием широкого распределения частиц белка по размерам (от 8 до 80 - 60 нм), которое незначительно изменялось с течением времени. В этих условиях Skp образовывал с rOmpF достаточно стабильный комплекс, размер частиц которого (средний R_H 5,1 нм) сохранялся в течение суток.

Ключевые слова: шаперон Skp, рекомбинантный порин OmpF, *Yersinia pseudotuberculosis*, белок наружной мембраны, агрегация белков, белок-белковые взаимодействия, динамическое рассеяние света.

INFLUENCE CHAPERONE Skp ON AGGREGATION OF PORIN OmpF *Yersinia pseudotuberculosis* IN WATER SOLUTION

Sidorin E.V., Khomenko V.A., Dmitrenok P.S., Stenkova A.M., Novikova O.D., Solov'eva T.F.
G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences
100 Let Vladivostoku av., 159, Vladivostok, 690022, Russia
e-mail: sev1972@mail.ru

Abstract. The study of the properties and mechanisms of chaperone functioning is not only fundamental, but also of practical interest in the development of drugs for the prevention and treatment of neurodegenerative diseases. In this study, using the dynamic light scattering the inhibitory effect of Skp chaperone on the process of assembling the recombinant OmpF porin from the outer membrane of *Yersinia pseudotuberculosis* (rOmpF) was demonstrated. The distribution curves of the protein particles and the mean value of their hydrodynamic radii (R_H) were obtained from the denatured state (in 8 M urea, R_H 8,2 nm) into the aqueous solution at acidic and alkaline pH values. It was shown that at pH 5,0, under conditions close to the