

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

isoelectric point of the protein, rOmpF quickly and irreversibly aggregated. Thus, with a 10-fold dilution of a denatured rOmpF solution with a pH 5,0 buffer, formation of particles with average R_H 53 nm was already observed in the first minutes, after an hour they increased to the size of sedimenting particles (1076 nm). In the presence of rSkp under these conditions, the particle size rOmpF (average R_H 50,6 nm) only slightly changed during the day (average R_H of 61,7 nm). At pH 8,0, reversible self-association of rOmpF was observed with the formation of a wide size distribution of the protein particles (from 8 to 80-60 nm), which changed insignificantly with time. Under these conditions, Skp formed a sufficiently stable complex with rOmpF, the particle size of which (mean R_H 5,1 nm) was preserved during the day.

Key words: chaperone Skp, recombinant porin OmpF, *Yersinia pseudotuberculosis*, outer membrane protein, aggregation of proteins, protein–protein interactions, dynamic light scattering.

Одним из наиболее важных периплазматических шаперонов грамотрицательных бактерий является белок Skp. В клетке Skp существует, как тример с пространственной структурой, напоминающей по форме медузу, щупальца которой образуют полость [1]. Подобную структуру имеет префолдин, шаперон, обнаруженный в цитоплазме архей и эукариотов и относящейся к семейству шаперонов-«холдаз (holdases)». Шапероны этого семейства являются АТФ-независимыми и не участвуют прямо в сворачивании белков-субстратов, а защищают их от агрегации за счет образования с ними комплексов. В настоящее время строение этих комплексов и механизм их образования активно изучаются [2, 3]. Главными субстратами Skp является группа белков наружной мембраны (НМ). Эти белки, прежде чем встроится в НМ, должны пересечь цитоплазматическую мембрану (ЦМ) и водное периплазматическое пространство. Как предполагают, Skp связывает белки НМ, когда они выходят их транслокационной машины в ЦМ, препятствует их агрегации в периплазме и доставляет их к НМ в состоянии компетентном для встраивания [4].

Ранее мы показали нами было показано, что иммуноглобулинсвязывающий белок *Yersinia pseudotuberculosis*, идентифицированный как шаперон Skp (Swiss-Prot, Q667J8) [5], способен связываться с денатурированным трансмембранным белком OmpF *Y. pseudotuberculosis*, препятствуя его агрегации, в буфере с нейтральным значением pH [6]. В представленной работе нами было продолжено изучение шаперонных свойств Skp и поведения OmpF *Y. pseudotuberculosis* в буферных растворах с кислым и основным значениями pH (5 и 8) с целью оценить влияние pH среды на взаимодействие развернутого порина с шапероном. С этой целью полностью развернутый порин в 8 М мочеvine разбавляли в десять раз соответствующим буфером как содержащим, так и не содержащим rSkp. Молярное соотношение rOmpF : rSkp в смеси составило 1 : 3 (расчет на субъединицу белка), исходные концентрации белков определяли по УФ-спектрам в максимуме поглощения при 280 нм (молярные коэффициенты экстинкции равны 1,27 и 0,18 для rOmpF и rSkp соответственно).

Белок Skp *Y. pseudotuberculosis* экспрессировали в *E. coli*, рекомбинантный белок (rSkp) выделяли из клеток и очищали как описано нами ранее [7]. Рекомбинантный порин OmpF (rOmpF), синтезированный в *Escherichia coli* в виде телец включения (ТВ), был растворен (см. рис. 1) в 8 М мочеvine и очищен до гомогенного состояния с помощью ионообменной и гель-проникающей хроматографии [6]. Согласно результатам Ds-Na-ПААГ-электрофореза, масс-спектрометрии и N-концевого аминокислотного анализа полученный rOmpF был гомогенен. По данным ВП-МАЛДИ-МС он имел молекулярную массу $37,1 \pm 0,3$ кДа. N-концевая аминокислотная последовательность rOmpF (20 а.о.), AEIYNKDGKLDLYGKVDAR, установленная при автоматическом твердофазном секвенировании методом Эдмана, совпадает с таковой OmpF *Y. pseudotuberculosis* (UniProtKB, Q5EMM5). По данным метода динамического рассеяния света (ДРС) rOmpF *Y. pseudotuberculosis* (в буфере pH 8, содержащем 8М мочеvine) имел мономодальное распределение по размерам частиц, со средним гидродинамическим радиусом (R_H) равным $8,2 \pm 0,3$ нм (см. рис. 1).

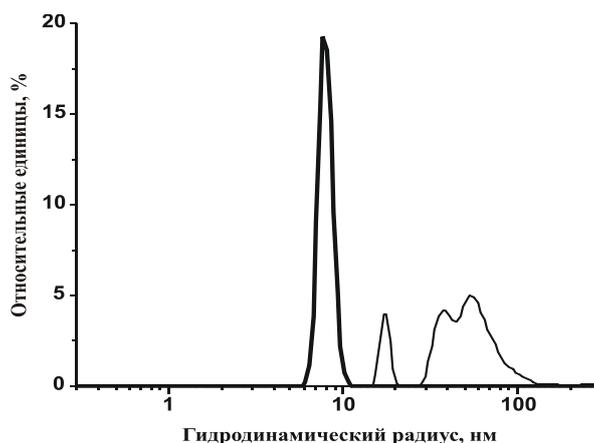


Рисунок 1 – Количественное распределение по размеру частиц ТВ (сплошная тонкая линия) и развернутого rOmpF (сплошная широкая линия) в буфере pH 8, содержащем 8 М мочеvine

Влияние pH раствора на агрегацию rOmpF порина ранее нами было изучено методом оптической спектроскопии [8]. Исходя из полученных величин оптической плотности (при 280 и 340 нм), были рассчитаны агрегационные индексы (АИ) [9] rOmpF в буферах с кислым и щелочным значениями pH. Показано, что при кислых pH (pH 5) rOmpF порин агрегирует в растворе в течение первых 20 мин (АИ 88%) и затем наблюдается медленный рост АИ белка (к 120 мин 92%). Этот эффект, скорее всего, связан с тем, что величина pH буфера близка к изоэлектрической точке

порина ($pI = 4,63$). В то же время при использовании буфера с pH 8, АИ белка соответствует слабо агрегированным растворам (до 10 %) и незначительно увеличивается в течение 2 часов (6,5%), оставаясь далее на этом уровне в течение суток.

Изменения АИ белка в растворе с течением времени не полностью отражает динамику и механизм процессов, происходящих с денатурированным порином в водных средах. Для количественного и качественного описания процессов, связанных с изменением размеров частиц при агрегации порина и образовании комплексов порина с шапероном, был использован метод ДРС (прибор ZetaSizer Nano ZS "Malvern", Великобритания). Величину R_H отдельных частиц рассчитывали с помощью программного обеспечения к прибору. На рисунке 2 приведены профили относительного количественного распределения R_H частиц $rOmpF$ и его комплексов с шапероном $rSkp$ *Y. pseudotuberculosis* в буфере pH 5, содержащем 0,8 М мочевины. Как показано на рисунке 2 *a*, при 10 кратном разбавлении раствора $rOmpF$ в 8М мочевины (R_H развернутого $rOmpF$ 8,2 нм), буфером pH 5 уже в первые минуты наблюдается увеличение R_H частиц до 53 нм (95,6 %). При увеличении времени выдержки белка в этом растворе значения R_H частиц значительно возрастают, к 30 мин до 530 и 1153 нм (82,5 и 17,5 % соответственно), а к 60 минутам порин образует частицы (1076 нм, 100 %), способные седиментировать. Подобное поведение $rOmpF$ в условиях кислой среды с pH 5, близким к изоэлектрической точке белка ($pI = 4,63$), объясняется уравниванием положительных и отрицательных зарядов на поверхности белка, что приводит процессу достаточно быстрой необратимой агрегации порина. В случае разбавления образца $rOmpF$ в аналогичных условиях буфером, содержащим $rSkp$, в первые 20 мин и последующие 2 и 24 часа наблюдалось широкое распределение частиц по размеру от 20 до 150-200 нм со средним R_H частиц около 56 ± 6 нм (см. рис. 2 *б*). Это свидетельствует о том, что $rSkp$ частично ингибирует агрегацию $rOmpF$, образуя с ним растворимые комплексы и предотвращая образование очень крупных частиц.

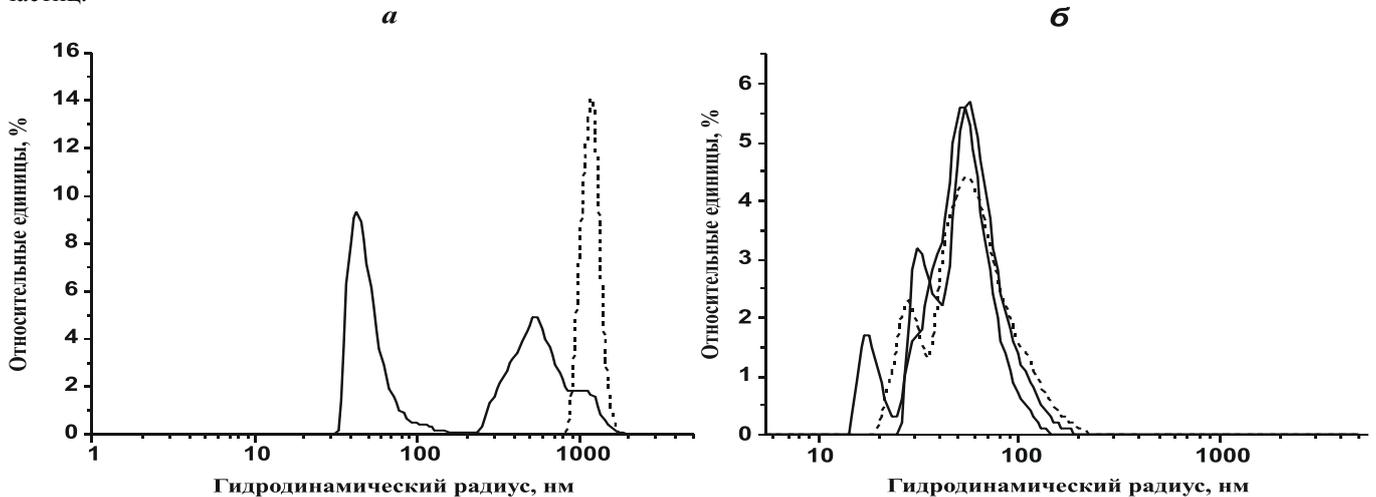


Рисунок 2 – Количественное распределение по размеру частиц (а) $rOmpF$ и (б) его комплексов с шапероном $rSkp$ *Y. pseudotuberculosis* в буфере pH 5, содержащем 0,8 М мочевины. Время инкубации растворов: (а) порина в течение 10 мин (сплошная широкая линия), 30 мин (сплошная тонкая линия), 60 мин (прерывистая линия) и (б) порина с Skp в течение 15 мин (сплошная широкая линия), 120 мин (сплошная тонкая линия) и 24 (прерывистая линия) часов

Ранее нами методом гель-проникающей хроматографии уже было показано, что сразу после удаления основной части денатуранта, при щелочных значениях pH среды в присутствии и присутствия 0,8 М мочевины, порин образует частично свернутые формы, с преобладанием интермедиатов сворачивания одного типа [8]. Эти интермедиаты более компактны, чем полностью развернутый белок, и агрегируют с образованием растворимых мультимеров. С целью изучить влияние щелочных условий на сворачивание и агрегацию $rOmpF$ наблюдали за изменениями размеров частиц порина в течение суток, используя метод ДРС. В течение первых 20 минут после 10 кратного разбавления раствора $rOmpF$ в 8 М мочевины буфером, pH 8, образец демонстрировал достаточно широкое мультимодальное количественное распределение частиц (R_H от 8 до 80 нм) (см. рис. 3(а)).

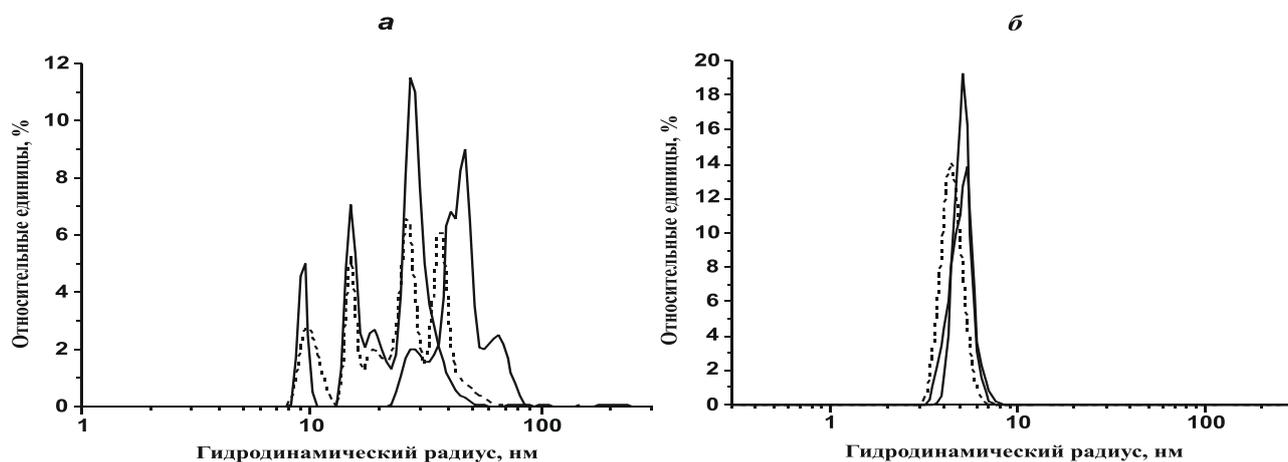


Рисунок 3 – Количественное распределение по размеру частиц (а) rOmpF и (б) его комплексов с шапероном rSkp *Y. pseudotuberculosis* в буфере pH 8, содержащем 0,8 М мочевины. Время инкубации растворов: (а) порина и (б) его комплексов с rSkp в течение 20 мин (сплошная широкая линия), после выдерживания 2 (сплошная тонкая линия) и 24 (прерывистая линия) часов

Увеличение времени инкубации сопровождалось ростом относительного содержания мелких частиц в растворе порина (R_H от 8 до 60 нм). В растворе, выдержанном в течение 20 и 120 мин, доминировали частицы с размерами и относительным числовым содержанием 41 и 47 нм (63 %); 15 и 27 нм (65 %) соответственно (см. рис. 3 а). Распределение частиц по размеру, установившееся в растворе порина к 2 часам (средний R_H 21 нм), существенно не изменялось к 24 часам (средний R_H 25,8 нм), преобладали частицы с размером 26 и 37 нм (60 %). Очевидно, присутствие мочевины в невысокой концентрации в определенной степени стабилизирует образовавшуюся популяцию частиц и препятствует формированию очень крупных агрегатов (с $R_H > 80$ нм). На основе полученных результатов можно предположить, что rOmpF в щелочных растворах при значениях pH, равных 8, образует компактные интермедиаты склонные к обратной равновесной самоассоциации. В случае разбавления раствора денатурированного rOmpF в аналогичных условиях буфером, содержащим rSkp, в течение всего времени наблюдения (от 20 мин до 24 часов) образец демонстрировал мономодальное распределение частиц от 3 до 7 нм со средним R_H частиц $4,8 \pm 0,3$ нм (см. рис. 3(б)). Подобное поведение порина в присутствии шаперона свидетельствует о том, что rSkp ингибирует динамичный процесс ассоциации-диссоциации интермедиатов rOmpF образуя с ним более стабильные растворимые комплексы.

Таким образом, pH раствора оказывает существенное влияние на образование комплекса несвернутого OmpF порина с Skp шапероном и, следовательно, на способность шаперона эффективно защитить порин в развернутой конформации от агрегации в водных средах.

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

Список литературы / References:

- Walton T.A., Sousa M.C. Crystal structure of Skp < a prefoldin-like chaperone that protects soluble and membrane proteins from aggregation. *Mol. Cell*, 2004, vol. 15, pp. 367-374.
- Schiffirin B., Calabrese A.N., Devine P.W.A., Harris S.A., Ashcroft A.E., Brockwell D.J., Radford S.E. Skp is a multivalent chaperone of outer membrane proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2016, vol. 23, pp. 786-793.
- Zaccari N.R., Sandlin C.W., Hoopes J.T., Curtis J.E., Fleming P.J., Fleming K.G., Krueger S. Deuterium labeling together with contrast variation small-angle neutron scattering suggests how Skp captures and releases unfolded outer membrane proteins. *Methods Enzymol.*, 2016, vol. 566, pp. 159-210.
- 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*, 2012, vol. 77, no. 11, pp. 1459-1477 (In Russ.)]
- 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, 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*, 2009, vol. 74, no. 4, pp. 501-514 (in Rus.)]

6. Сидорин Е.В., Сидорова О.В., Тищенко Н.М., Хоменко В.А., Новикова О.Д., Соловьева Т.Ф. Шаперонная активность иммуноглобулинсвязывающего белка *Yersinia pseudotuberculosis*. *Биологические мембраны*, 2015, т. 32, № 3, с. 217-220. [Sidorin E.V., Sidorova O.V., Tishchenko N.M., Khomenko V.A., Novikova O.D., Solov'eva T.F. Chaperone Activity of Immunoglobulin-binding Protein from *Yersinia pseudotuberculosis*. *Biochemistry, Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 2015, vol. 32, no. 3, pp. 217-220 (in Rus.)]

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 Rus.)]

8. Сидорин Е.В., Хоменко В.А., Ким Н.Ю., Новикова О.Д., Соловьева Т.Ф. Промежуточные состояния в сворачивании порообразующего белка *OmpF Yersinia pseudotuberculosis* и их структурные характеристики. *Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ – 2016*, Севастополь, 2016, с. 132-136. [Sidorin E.V., Khomenko V.A., Kim N.Yu., Novikova O.D., Solov'eva T.F. Intermediates states in *Yersinia pseudotuberculosis* porin folding and their structural characteristics. *Aktualnie voprosy biologicheskoy fiziki i himii. BFFH-2016*, Sevastopol, 2016, pp. 132-136. (in Rus.)]

9. Vincentelli R., Canaan 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.

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССА АМИЛОИДООБРАЗОВАНИЯ НА ПРИМЕРЕ ФРАГМЕНТОВ А β ПЕПТИДА (А β 16-25, А β 31-40, А β 33-42). НОВАЯ МОДЕЛЬ ФОРМИРОВАНИЯ ФИБРИЛЛ

Селиванова О.М., Глякина А.В., Горбунова Е.Ю., Мустаева Л.Г., Суворина М.Ю., Григоращвили Е.И., Никулин А.Д., Суринов А.К., Галзитская О.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт белка РАН

Проспект науки, 4, г. Пущино, Московская область, 142290, РФ

Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Института биорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Проспект науки, 6, г. Пущино, Московская область, 142290, РФ

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

Аннотация. С помощью биоинформатических методов исследования в А β 1-42 пептиде были определены амилоидогенные участки А β 16-25, А β 31-40 и А β 33-42, отвечающие за формирование фибрилл. Фрагменты были синтезированы в достаточных количествах, а качество препаратов проверено с помощью масс-спектрометрического анализа. Для исследования их амилоидогенных свойств были применены методы флуоресцентной спектроскопии (связывание с ThT), электронной микроскопии, рентгеноструктурного анализа (РСА). Все три фрагмента в условиях 5% DMSO и 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) взаимодействуют с ThT. При этом фрагменты А β 31-40, А β 33-42 полимеризуются в виде фибрилл разной морфологии, а фрагмент А β 16-25 формирует не свойственные для большинства амилоидов полимеры в виде пленок. Согласно данным рентгеноструктурного анализа фибриллы всех фрагментов показывают наличие двух основных рефлексов (4,6-4,8 Å и 8-12 Å), характерных для кросс- β структуры, что указывает на их амилоидную структуру. Анализ экспериментальных данных и структурное моделирование позволило заключить, что основным строительным блоком при формировании фибрилл фрагментами А β 1-42 пептида является кольцевой олигомер. Взаимодействие кольцевых олигомеров различным образом приводит к формированию полимеров разной морфологии. На основании совокупности данных предложена новая модель фибриллообразования.

Ключевые слова: А β пептид, амилоидогенные фрагменты А β 1-42 пептида, амилоиды, биоинформатика, новая модель амилоидообразования.