

## ТЕЛЬЦА ВКЛЮЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ПОРИНА OmpF *Yersinia pseudotuberculosis*: ИХ СВОЙСТВА И СТРУКТУРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

© 2019 В.А. Хоменко, Е.В. Сидорин, С.И. Бахолдина,  
Н.Ю. Ким, Г.А. Набережных, А.М. Стенкова,  
Н.Ю. Чернышева, М.П. Исаева, Т.Ф. Соловьева\*

Тихоокеанский институт биоорганической химии  
им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, 690022 Владивосток, Россия;  
электронная почта: soltaf@mail.ru

Поступила в редакцию 14.12.2018

После доработки 27.03.2019

Принята к публикации 27.03.2019

Зрелый порообразующий белок OmpF из наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* экспрессировали в форме телец включения (ТВ) в *Escherichia coli* при разных условиях культивирования. С помощью электронной микроскопии, динамического светорассеяния, оптической спектроскопии и специфических гидрофобных красителей исследовали свойства и структурную организацию ТВ, а также структуру рекомбинантного порина (rOmpF), растворенного из них. Для ТВ определены размер, форма и стабильность в присутствии денатурантов. Показано, что ТВ хорошо растворимы в Ds-Na и более устойчивы, по сравнению с детергентом, к действию мочевины. Растворение ТВ в обоих денатурантах приводило к образованию гетерогенной по размеру популяции олигомерных частиц. Установлено, что ТВ содержат интермедиат rOmpF с выраженной вторичной структурой, близкой к нативной, и с элементами третичной структуры, который способен встраиваться в липидный бислой, приобретая функционально активную конформацию. Исследованные ТВ, которые образуются при разной концентрации индуктора (ИПТГ), заметно не различаются между собой по свойствам и структуре. Однако следует отметить, что с увеличением концентрации индуктора в ТВ возрастает содержание амилоидных структур, что может рассматриваться как неблагоприятный фактор, снижающий выход рекомбинантного белка. Полученные результаты вносят вклад в развитие новых подходов для получения активных белков из ТВ, а также ТВ, обладающих биологической и функциональной активностью.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** *Yersinia pseudotuberculosis*, тельца включения, рекомбинантный порин OmpF, динамическое рассеяние света, электронная микроскопия, оптическая спектроскопия.

DOI: 10.1134/S0320972519060113

Многие биологически активные белки, которые находят применение в медицине, а также используются в научных исследованиях, получают с помощью современных методов биотехнологии. Рекомбинантные белки экспрессируются в генно-инженерных штаммах *Escherichia coli* и накапливаются в цитоплазме бактерий в растворимой форме или в виде нерастворимых агрегатов, т.н. телец включения (ТВ). Несмотря на то, что ТВ состоят преимущественно из целе-

вого белка, легко извлекаются из клеток и очищаются от примесей, образование их рассматривается, как неблагоприятный результат биосинтеза рекомбинантного белка. Это связано с тем, что рекомбинантные белки в ТВ, как принято считать, находятся в частично или неправильно свернутом состоянии, и получение их в нативной конформации включает стадии денатурации и ренатурации, которые являются трудоемкими и часто малоэффективными. Однако в настоящее время показано, что ТВ могут содержать корректно свернутый белок, доля которого может быть различна [1]. Кроме того, для целого ряда белков (ферменты, колониестимулирующий фактор, интерлейкин-1 $\beta$ ) были получены биологически активные ТВ, содержащие рекомбинантный белок в конформации,

Принятые сокращения: rOmpF – рекомбинантный белок OmpF; R<sub>n</sub> – гидродинамический радиус; ИПТГ – изо-пропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид; RMSF – фенилметилсульфонилфторид; ДРС – динамическое рассеяние света; КФ – карбоксифлуоресцеин; АНС – 8-анилино-1-нафталинсульфоновая кислота.

\* Адресат для корреспонденции.

которая подобна нативной [2, 3]. Такие «неклассические» ТВ весьма привлекательны как для получения активного целевого белка, так и использования их в качестве наноматериалов в биотехнологии. Образование подобных ТВ зависит как от природы белка, которая определяется его аминокислотной последовательностью, так и целого ряда факторов, влияющих на биосинтез рекомбинантного белка в клетках штамма-продукента, включая условия роста клеток [4]. Это открывает возможности контроля за конформацией белка в ТВ.

Порообразующие белки наружных мембран бактерий, митохондрий и хлоропластов относятся к семейству интегральных мембранных белков. Молекула неспецифического порина представляет собой  $\beta$ -складчатый лист, образованный 16 $\beta$ -тяжами, соединенными между собой длинными и короткими петлями, и свернутый в виде цилиндра [5]. В нативном состоянии порины существуют как гомотримеры, которые являются высокостабильными, главным образом, за счет гидрофобных взаимодействий между мономерами. В бактериальной мембране они образуют водонаполненные каналы, проницаемые для низкомолекулярных (<600 Da) гидрофильных соединений, через которые клетка получает питательные вещества и удаляет продукты метаболизма. Участки молекулы поринов, экспонированные на поверхности клетки, служат рецепторами для фагов и колицинов. Порины играют фундаментальную роль во взаимодействии хозяин–патоген, вызывая воспалительный и иммунный ответы [6]. Они влияют на устойчивость патогенных бактерий к антибиотикам и представляют важную мишень для терапевтического воздействия.

В последнее время растет интерес к порообразующим белкам и пептидам со стороны нанобиотехнологии (т.н. «биологические поры»): идет активная разработка подходов к их применению в «наномедицине», наноэлектронике и для создания биосенсоров [7].

Практическое использование поринов предполагает разработку достаточно эффективных методов их получения. Биосинтез зрелых белков наружной мембраны, включая порины в форме ТВ в *E. coli*, давно используется для получения функционально активных белков для научных исследований [8]. Стандартная процедура включает растворение ТВ в 8 М мочеvine с последующим удалением денатуранта и переводом рекомбинантного белка в раствор, содержащий мицеллы детергента, и предполагает сначала полное разворачивание молекул белка, а затем их сворачивание в нативную конформацию, что сопровождается большими потерями белка из-

за агрегации. В то же время присутствие в ТВ правильно свернутого белка дает возможность мягкой его сольubilизации в конформации, которая способна превращаться в функционально активную в присутствии добавок, имитирующих мембранное окружение. В связи с этим приобретает большое значение информация о структурной организации ТВ, образованных рекомбинантными поринами, и условиях получения ТВ с высоким содержанием корректно свернутого рекомбинантного белка.

Цель данной работы заключалась в том, чтобы изучить свойства и структурные характеристики ТВ, полученных при экспрессии порообразующего белка OmpF *Yersinia pseudotuberculosis* в *E. coli* при температуре 37 °С, разных концентрациях индуктора и в течение разного времени культивирования, влияние этих параметров на уровень экспрессии и структуру рекомбинантного порина, а также оценить принципиальную возможность получить функционально активный белок из ТВ, минуя стадию денатурации.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Бактериальные штаммы и реактивы.** В работе использовали клетки *E. coli* штамма BL21(DE3)-pLysS («Invitrogen», США); пептон BD Vacto™ и дрожжевой экстракт BD Vacto™ («BD Biosciences», США); целлюлозные мембранные фильтры 0,45 мкм («Agilent», США); акриламид, ДНКаз («Serva», Германия); Ds-Na («Bio-Rad», США); PMSF – фенилметилсульфонилфторид («Merck», Германия); 8-анилино-1-нафталинсульфоновая кислота (АНС), Nonidet P 40 (NP-40), дезоксихолат натрия, полиэтиленгликоль октиловый эфир (Octyl-POE), Кумасси R-250, Конго красный, карбоксифлуоресцеин («Sigma», США); канамицин («Amresco», США); Triton X-100 («CalBiochem», США); изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ), набор окрашенных белков-маркеров («Fermentas», Литва); *N*-додецил-*N*, *N*-диметил-3-аммоний-1-пропансульфонат (SB3–12), лауроил саркозинат натрия («Sigma-Aldrich», США); фосфатно-солевой буфер (PBS), pH 7,4 («Helicon», Россия). Все остальные реактивы имели квалификацию х.ч. («Рехим», Россия) и использовались без дополнительной очистки.

**Разработка генно-инженерных конструкций.** Создание генетической конструкции проведено как это описано ранее [9]. Полученная плазмида pET-mOmpF была введена в экспрессионный штамм *E. coli* BL21(DE3)pLysS.

Для изучения влияния концентрации индуктора (0,1; 0,2; 0,4; 0,5; 1 мМ) и времени индук-

ции (1–5 ч) клетки наращивали в среде 2 × YT с канамицином (100 мкг/мл) при 37 °С и аэрации (180 об/мин) до оптической плотности  $A_{600}$ , равной 0,5, после чего добавляли соответствующее количество ИПТГ. Накопление биомассы определяли по поглощению света бактериальными суспензиями при 600 нм на спектрофотометре Genesys™ 6 («Thermo Scientific», США).

**Выделение и очистка телец включения.** Влажную бактериальную массу суспендировали в лизирующем буфере (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA), затем добавляли ингибитор протеаз (PMSE, 1 mM) и лизоцим (1 мг/мл). После инкубации суспензии в течение 1,5 ч при 37 °С добавляли Triton X-100 (0,5%) и выдерживали 1 ч при перемешивании при комнатной температуре. Затем суспензию обрабатывали ультразвуком (УЗО Н-2Т, Россия) (44 кГц, 30 с × 6) на ледяной бане с перерывами в 1 мин, добавляли Nonidet P 40 (NP-40) до концентрации 1%, выдерживали при 8 °С в течение 1 ч и обрабатывали ДНКазой (1 мг/мл) в присутствии  $MgCl_2$  (1 M) 1 ч при 37 °С. Полученную смесь центрифугировали при 15 000 × g 20 мин при 4 °С. Осадок, содержащий ТВ, промывали два раза лизирующим буфером с Triton X-100 (0,5%) при 4 °С и несколько раз деионизованной водой для удаления солей и детергента. Для дальнейшей очистки ТВ последовательно обрабатывали растворами детергентов: 1%-ным Triton X-100, 0,2%-ным саркозилем, 1%-ным дезоксихолатом натрия в 1–2 M мочевины и 1%-ным неионным детергентом octyl-POE. Чистоту ТВ оценивали с помощью Ds-Na-ПААГ электрофореза. ТВ хранили при –70 °С.

**Ds-Na-ПААГ-электрофорез.** Белки разделяли электрофорезом в градиентном (12–25%-ном) геле в денатурирующих условиях по методу Люгтенберга [10]. В качестве маркеров использовали набор окрашенных белков с мол. массами 10, 17, 26, 34, 43, 55, 72, 92, 130 и 180 кДа. Белки, разделенные в геле, окрашивали раствором Кумасси R-250 в 10%-ной уксусной кислоте и 30%-ном метаноле. Визуализацию проводили с помощью гель-документирующей системы VersaDoc 4000 («Bio-Rad», США). Синтез рекомбинантного белка оценивали денситометрически (программное обеспечение Quantity One, «Bio-Rad»). Относительное количество белка в образце определено, как интенсивность полосы этого белка, выраженная в процентах от общей интенсивности всех полос на фореграмме данного образца.

**Электронная микроскопия.** Для исследования методом сканирующей электронной микроскопии образцы готовили по методике, описанной ранее [11]. ТВ фиксировали в 2,5%-ном глутаровом альдегиде, обезвоживали в спирте и ацетоне,

высушивали, напыляли углеродом. Анализировали образцы на сканирующем электронном микроскопе Sigma 300 VP (Великобритания).

**Связывание Конго красного.** Наличие амилоидных структур в ТВ оценивали с помощью красителя Конго красный [12]. ТВ суспендировали в 10 mM фосфатном буфере, pH 7,4 содержащем 150 mM NaCl, 10 мкМ красителя до конечной концентрации белка 25 мкг/мл. Образцы инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Спектры поглощения Конго красного в отсутствие и в присутствии ТВ регистрировали с помощью UV-Visible спектрофотометра UV-1601PC («Shimadzu», Япония) в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 1 см в области 350–700 нм.

**Растворимость ТВ в мочевины и Ds-Na.** ТВ суспендировали в 50 mM Tris-HCl-буфере, pH 8,0, содержащем от 0,02 до 0,1%-ного Ds-Na, или в водных растворах мочевины с концентрацией от 1 до 8 M и выдерживали в течение заданного времени (от 10 мин до 24 ч). Мутность образцов измеряли при 350 нм на спектрофотометре  $\mu$ Quant («Bio-TEK Instruments, INC.», США).

**Динамическое рассеяние света.** Размер частиц ТВ и рекомбинантного белка определяли методом динамического светорассеяния на приборе ZetaSizer Nano ZS («Malvern», Великобритания), оснащенном He-Ne-лазером ( $\lambda$  633 нм, 4 мВт) при угле 173°. Гидродинамический радиус ( $R_H$ ) белковых частиц рассчитывали с помощью программного обеспечения к прибору. Образцы ТВ (0,1–0,6 мг/мл) суспендировали в воде или 50 mM Tris-HCl-буфере, pH 8,0, и в этих же растворителях с добавлением мочевины или Ds-Na до концентраций (1–8 M) и (0,02–0,1%) соответственно, путем пропускания 10 раз через микроиглу шприца и инкубацией при комнатной температуре в течение заданного времени при перемешивании. Накопление данных осуществляли в течение 5–60 мин. Измерения проводили в кювете 10 × 10 мм. Время накопления данных корреляционной функции выбирали автоматически с помощью программного обеспечения к прибору, и оно составляло 5–30 мин. Измерения были выполнены в 2–3-х повторах.

**Спектры КД и флуоресценции.** Структуру рекомбинантного белка устанавливали с помощью оптической спектроскопии. Регистрацию спектров КД проводили на спектрометре Chirascanplus CD («Applied Photophysics», Великобритания) в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 0,1 и 1 см для съемки спектров в пептидной и ароматической областях соответственно. В пептидной области спектра КД (190–240 нм) рассчитывали эллиптичность  $[\theta]$  среднего остатка, принимая мол. массу последнего равной 110 Да. В ароматической области спектра КД (240–320 нм)

рассчитывали молярную эллиптичность  $[\theta]_M$ , принимая мол. массу белка равной 37,1 кДа. Содержание элементов вторичной структуры в белке было рассчитано по Провенчеру [13]. Растворы белка в мочеvine и детергенте перед снятием спектров центрифугировали 15 000 г в течение 20 мин.

Спектры флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре Hitachi 850 (Япония) при 25 °С в кварцевой кювете с толщиной слоя 1 см. Возбуждение флуоресценции проводили при 280 и 296 нм. Ширина щели на монохроматорах возбуждения и излучения 5 нм.

В экспериментах по связыванию АНС спектры были записаны в области 400–600 нм при возбуждении 375 нм. Образцы ТВ инкубировали с 50-кратным молярным избытком АНС в течение 10 мин при комнатной температуре в темноте. Основной раствор АНС готовили в 10 мМ фосфатном буфере (рН 7,4) и молярную концентрацию измеряли, используя коэффициент экстинкции  $7800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  при 372 нм [14].

Концентрацию белка в растворах мочеvine и Ds-Na определяли (после центрифугирования при 15 000 г в течение 20 мин) по УФ-спектрам в максимуме поглощения при 280 нм, принимая величину  $A_{1 \text{ cm}}^{0,1\%}$ , равной 1,27 [9]. УФ-спектры регистрировали при 25 °С в кварцевых кюветах (1 см) на спектрофотометре Cescil CE 7200 («Aquarius», United Kingdom).

**Получение моноламелярных липосом, нагруженных карбоксифлуоресцеином (КФ).** Липосомы, содержащие КФ, получали методом обращения фаз, который описан в [15]. Контроль над размерами липосом осуществляли методом ДРС, как описано выше.

**Порообразующая активность.** Активность rOmpF определяли по изменению проницаемости липосомальной мембраны для КФ. К 180 мкл суспензии КФ-липосом добавляли 20 мкл раствора rOmpF (150 мкг/мл) в 0,04 или 0,06%-ном Ds-Na и фиксировали изменение флуоресценции в течение 30 мин. Фоновую флуоресценцию определяли, добавляя 20 мкл 0,04 или 0,06%-ного Ds-Na к 180 мкл суспензии КФ-липосом. Максимальную флуоресценцию при полном лизисе липосом определяли, добавляя 100 мкл 10%-ного раствора Ds-Na. Процент специфического освобождения маркера (СОМ) рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ СОМ} = (F_{\text{эксп}} - F_{\text{фон}}) / (F_{\text{макс}} - F_{\text{фон}}) \times 100 \%,$$

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

Интенсивность флуоресценции растворов определяли на спектрофлуориметре FL-600 («Bio-TEK Instruments», США) при длине волны возбуждения 495 нм, эмиссии 530 нм.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Экспрессия рекомбинантного порина OmpF.** Зависимость роста культуры от концентрации индуктора и времени индукции изучали на трансформированных клетках *E. coli* в присутствии 0,1; 0,2; 0,4; 0,5 и 1 мМ ИПТГ и культивировании в течение 1, 2, 3, 4 и 5 ч. Анализ оптической плотности культуры клеток свидетельствует о том, что культуры с ИПТГ до 0,5 мМ характеризуются практически одинаковыми скоростями роста (5 ч,  $A_{600 \text{ нм}}$  1,61–1,70). Значительное отставание роста, в полтора раза, начиная со 2-го часа индукции, наблюдается для культуры клеток с 1 мМ ИПТГ (табл. 1).

По данным Ds-Na-ПААГ-электрофореза, белок с ожидаемой мол. массой (37,4 кДа) синтезируется в индуцированных клетках и не синтезируется в клетках без добавления ИПТГ (рис. 1, а). Количество рекомбинантного OmpF (rOmpF) зависело от концентрации индуктора и времени роста культуры (табл. 2). Повышение концентрации ИПТГ сопровождалось ростом относительного содержания rOmpF в лизате клеток. С увеличением времени экспрессии содержание rOmpF вначале, от 2 до 3 ч, увеличивается, а затем, в последующие 4–5 ч, уменьшается. Максимальное количество целевого белка обнаружено в клетках, культивируемых в течение 3 ч после индукции.

На основании полученных результатов для сравнительного изучения ТВ были взяты следующие условия экспрессии порина: 37 °С, 3 ч, концентрация ИПТГ 0,4 и 1 мМ (ТВ-0,4 и ТВ-1 соответственно). Также в ряде экспериментов использовали ТВ, образованные в клетках при 37 °С в течение 16 ч в присутствии 0,1 мМ ИПТГ (ТВ-0,1).

**Выделение и очистка ТВ.** Для того чтобы обеспечить максимальный выход продукта, что связано во многом с эффективным разрушением микробных клеток и минимальной денатурацией рекомбинантного белка, были опробованы четыре метода дезинтеграции: ферментативный лизис (обработка лизоцимом), осмотический шок, гомогенизация в жидкой среде (Френч-пресс) и обработка ультразвуком. Сравнение этих методов проводили, определяя выход и степень чистоты ТВ rOmpF визуально с помощью Ds-Na-ПААГ-электрофореза. Анализ полученных данных показал, что оптимальным является

**Таблица 1.** Влияние концентрации индуктора (ИПТГ) и времени роста на оптическую плотность культуры клеток

Концентрация ИПТГ, мМ	Время роста культуры, ч					
	0 ч	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	5 ч
	Оптическая плотность клеток, $A_{600 \text{ нм}}$					
0,1	0,40	0,91	1,25	1,45	1,54	1,62
0,2	0,40	0,84	1,22	1,42	1,52	1,61
0,4	0,40	0,88	1,30	1,51	1,63	1,70
0,5	0,40	0,80	1,27	1,48	1,60	1,66
1,0	0,40	0,77	0,91	1,00	1,03	–

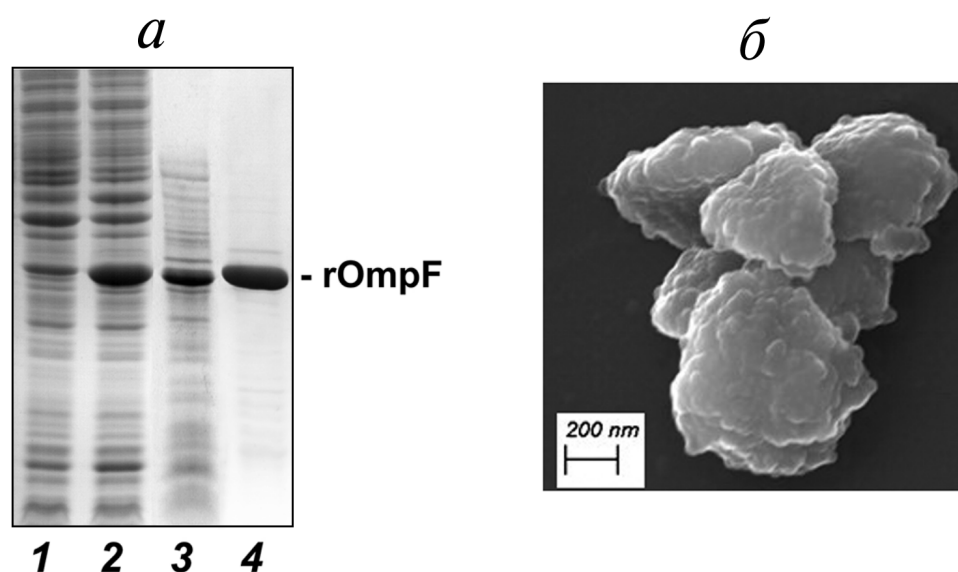
**Таблица 2.** Относительное количество рекомбинантного порина в лизате клеток в зависимости от концентрации индуктора и времени роста клеток, %

Время экспрессии, ч	Концентрация индуктора, мМ				
	0,1	0,2	0,4	0,5	1
2	10,9	12,8	16,9	17,4	23
3	10,8	15,0	22,4	24,5	24,9
4	9,0	12,6	21,9	20,6	24,4
5	8,4	11,9	21,1	21,5	–

использование лизоцима в комплексе с ультразвуком. Лизис клеток проводили в присутствии ЭДТА, ингибитора протеаз PMSF (фенилметилсульфонилфторид) и ДНКазы.

По данным Ds-Na-ПААГ-электрофореза, все полученные ТВ, наряду с целевым белком rOmpF, содержали в виде примесей белки клетки-хозяина с разной молекулярной массой (рис. 1, а).

С целью очистки ТВ последовательно обрабатывали растворами детергентов: 1%-ным Triton X-100, 0,2%-ным саркозилом, а также 1%-ным дезоксихолатом натрия в 1–2 М мочеvine. Эти детергенты эффективно экстрагировали из ТВ сопутствующие белки, не затрагивая rOmpF. Поскольку клетки *E. coli* содержат собственный порин OmpF, уровень экспрессии которого в клет-

**Рис. 1.** Характеристика ТВ rOmpF. а – Ds-Na-ПААГ-электрофорез: 1 – лизат неиндуцированных клеток, 2 – лизат индуцированных клеток, 3 – ТВ, 4 – ТВ после очистки; б – сканирующая электронная микроскопия

ке, синтезирующей рекомбинантный белок, может возрастать [16], особое внимание было уделено избирательной экстракции его из ТВ. Нами было показано, что *OmpF E. coli* переходит в раствор при обработке ТВ неионным детергентом 1%-ным octyl-POE, в то время как *rOmpF Y. pseudotuberculosis* остается в составе ТВ.

С помощью предложенной схемы были получены ТВ, которые, по данным Ds-Na-ПААГ-электрофореза, содержали достаточно чистый целевой белок и могли быть прямо использованы в биофизических и биохимических экспериментах.

**Размер и форма ТВ.** Размеры ТВ были определены методом динамического рассеяния света (ДРС). ТВ, полученные в разных условиях культивирования клеток-продуцентов, представляли собой популяции частиц с симметричным мономодальным распределением по размерам и близкими значениями средних гидродинамических радиусов ( $R_H$ ). ТВ-1, полученные в различных временных точках после индукции, 1, 2, 3 и 4 ч, имели  $R_H$  411, 462, 442 и 391 нм соответственно. Средние радиусы ТВ-0,2; ТВ-0,4; ТВ-0,5 и ТВ-1 (время экспрессии 3 ч) были равны 382, 390, 412, 442 нм соответственно. Анализ полученных данных позволил сделать заключение, что время экспрессии и концентрация индуктора не оказывают существенного влияния на размер ТВ. Однако можно отметить тенденцию к небольшому росту размеров ТВ с увеличением концентрации индуктора.

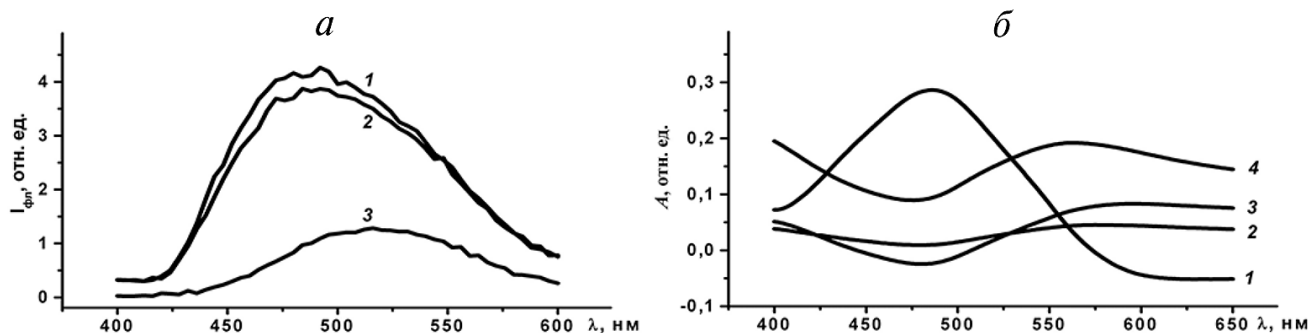
Сканирующая электронная микроскопия показала, что ТВ имеют близкую к сферической форму, шероховатую поверхность и размер, сравнимый с таковым, определенным ДРС (рис. 1, б).

**Структурная характеристика ТВ. Связывание гидрофобного зонда с ТВ.** Информация о структурной организации белка в ТВ была получена с помощью флуоресцентного красителя АНС, который способен связываться с гидрофобными поверхностями (но не с индивидуальными от-

дельными гидрофобными остатками) на белке, что сопровождается значительным увеличением интенсивности флуоресценции красителя и частото сдвигом максимума излучения в сторону более коротких длин волн [17]. В присутствии ТВ происходил рост флуоресценции красителя и смещение максимума его излучения от 509 до 487 и 494 нм для ТВ-0,4 и ТВ-1 соответственно (рис. 2, а).

Полученные данные показывают наличие в агрегатах молекул порина свободных (прямо не включенных в молекулярную агрегацию) кластеров гидрофобных остатков, доступных для связывания с зондом. Эти кластеры могут быть образованы либо внутри индивидуальных молекул, либо между соседними молекулами, что предполагает наличие организованной структуры у *rOmpF* в ТВ. Этот вывод поддерживается данными, согласно которым АНС практически не связывается с неупорядоченными полипептидными цепями (такими, как полностью развернутые белки), несмотря на присутствие гидрофобных боковых цепей [18]. Кроме того, белки порины в полностью развернутой конформации имеют низкую гидрофобность благодаря тому, что в их последовательности в областях трансмембранных  $\beta$ -тяжей имеет место чередование гидрофобных и гидрофильных остатков.

**Взаимодействие амилоид-специфичного красителя с ТВ.** Известно, что рекомбинантный белок в составе ТВ может образовывать амилоидоподобные структуры. Существует представление, что амилоидные фибриллы, построенные из рекомбинантного белка, создают каркас ТВ, в который встроены остальные молекулы белка в частично свернутом состоянии и/или в конформации близкой к нативной [19]. Для обнаружения амилоидных фибрилл в исследованных ТВ был использован специфический краситель Конго красный (СР) [12]. В присутствии ТВ наблюдали сдвиг максимума спектра поглощения СР в сторону более длинных волн, что ука-



**Рис. 2.** Взаимодействие ТВ с гидрофобными красителями. а – Спектры флуоресценции: 1 – АНС в присутствии ТВ-0,4, 2 – АНС в присутствии ТВ-1, 3 – АНС; б – спектр поглощения 1 – СР и разностные спектры поглощения СР в присутствии 2 – ТВ-0,1, 3 – ТВ-0,4 и 4 – ТВ-1. Концентрация красителя – 10 мкМ, концентрация ТВ – 25 мкг/мл

зывает на связывание красителя с ТВ и предполагает наличие в них амилоидоподобных структур. Разностные спектры, полученные в результате вычитания спектра самого CR из спектра красителя после инкубации с ТВ-0,1, ТВ-0,4 и ТВ-1, имели максимумы при 556, 591, и 563 нм соответственно (рис. 2, б). Наблюдаемые различия в положении максимумов спектров, возможно, отражают некоторые различия в организации фибрилл в ТВ, полученных при разных концентрациях индуктора.

Увеличение концентрации ТВ от 25 до 100 мкг/мл сопровождалось ростом интенсивности поглощения красителя, а в области 25–75 мкг/мл существовала прямая пропорциональная зависимость между этими параметрами. Интенсивность поглощения CR, инкубированного с ТВ-1 (25 мкг/мл) было выше, чем с ТВ-0,4 и ТВ-0,5 (в той же концентрации). Это позволяет считать, что ТВ, синтезированные при высокой концентрации индуктора, содержат большее амилоидов (если аффинность связывания амилоидов с красителем в исследованных ТВ одинакова).

**Растворимость ТВ в воде, мочеине и детергенте.** ТВ достаточно стабильны, при повышении ионной силы раствора (вода–физ. раствор) не происходит значимых изменений в распределении ТВ по размерам. Однако многократное продавливание достаточно разбавленной суспензии ТВ (0,04 мг/мл) через иглу ( $d = 0,4$  мм) шприца приводит, по данным ДРС, к появлению популяции мелких частиц ( $R_n$  45–65 нм) (рис. 3, а). Этот результат может объясняться тем, что возможен динамический переход между ТВ и растворимыми формами рекомбинантного белка, как это имеет место *in vivo* [20] и/или известным фактом, согласно которому гидростатическое давление может вызывать дезагрегацию ТВ [21].

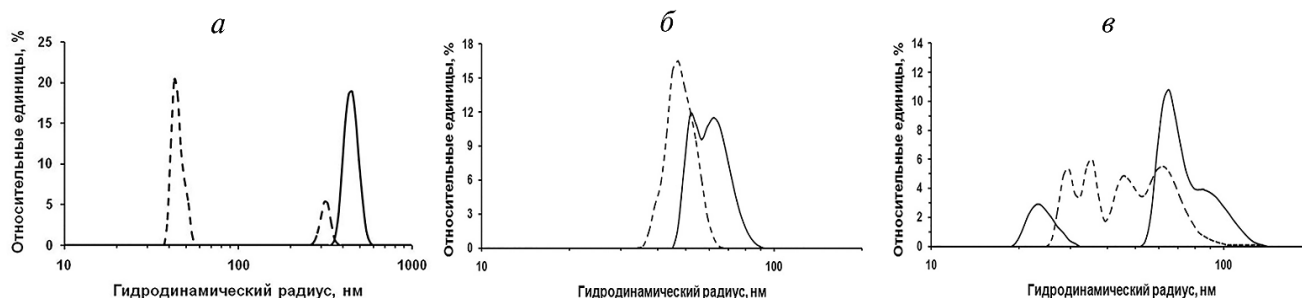
Как известно, ТВ с высоким содержанием белка в нативной или близкой к нативной конформации («неклассические») являются более рыхлыми и непрочными, в отличие от «классических» более плотно упакованных и стабиль-

ных ТВ, где белок, как правило, находится в виде частично или неправильно свернутых интермедиатов. «Неклассические» ТВ растворимы в мягких детергентах и растворах хаотропных агентов с низкой молярной концентрацией [22]. Сравнительное изучение стабильности исследуемых ТВ в растворах денатурантов позволяет косвенно судить о влиянии условий экспрессии на конформацию rOmpF в ТВ. Эти исследования также дают нам информацию о надмолекулярном состоянии в этих растворах солюбилизированного из ТВ rOmpF (размер частиц, степень полидисперсности). Процесс растворения ТВ-0,1; ТВ-0,4 и ТВ-1,0 в мочеине (1–8 М) и Ds-Na (0,02–0,1%) изучали с помощью методов турбидиметрии и ДРС.

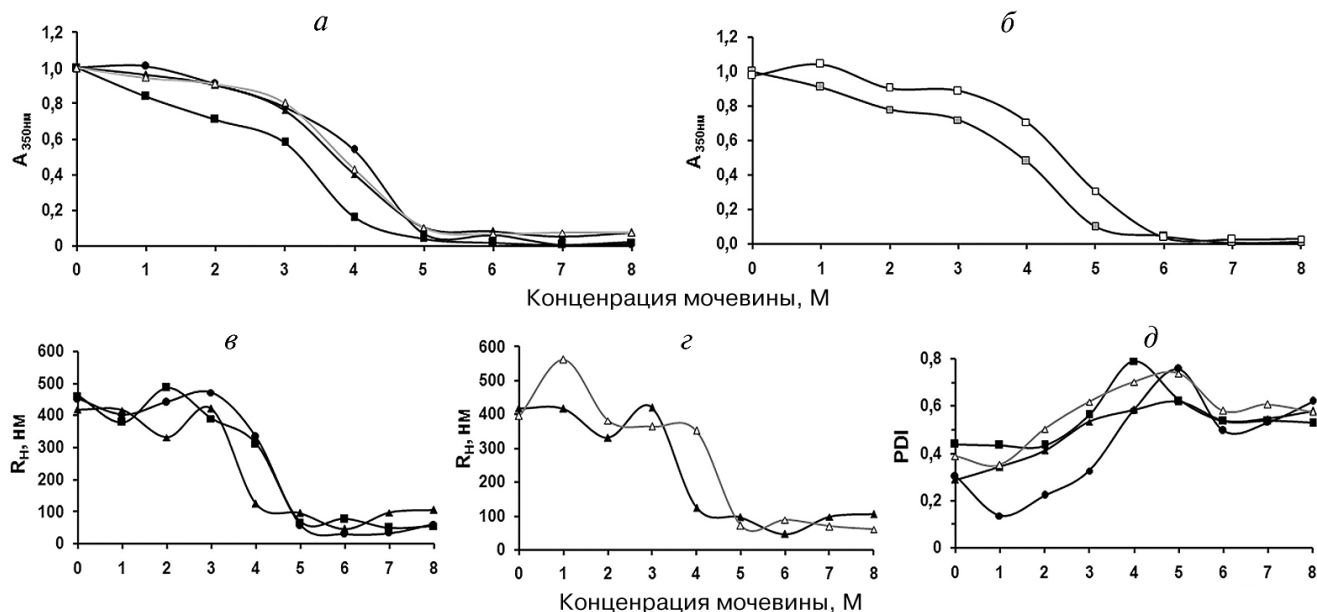
Растворение ТВ, за которым следили, измеряя мутность их растворов в мочеине при 350 нм, начинается в 1 М мочеине и нарастает по мере увеличения ее концентрации (рис. 4, а). Наиболее резкое падение мутности растворов ТВ происходит при увеличении концентрации мочеины от 3 до 5 М. Выдержка ТВ в мочеине в интервале 5–24 ч не оказывает видимого влияния на мутность растворов ТВ (данные приведены для ТВ-0,1) (рис. 4, а). В то же время метод ДРС показывает, что продолжительность инкубации в мочеине влияет на процесс растворения ТВ. Так, увеличение времени инкубации ТВ-0,1 увеличивает их растворимость: происходит сдвиг кривой концентрационной зависимости среднего  $R_n$  частиц в сторону меньших концентраций мочеины и уменьшение гетерогенности популяции частиц (рис. 4, з, д).

По результатам турбидиметрических измерений (рис. 4, а), ТВ-1 имеют меньшую устойчивость к действию мочеины, чем ТВ-0,1 и ТВ-0,4. Однако данные ДРС не поддерживают этот вывод и свидетельствуют в пользу того, что растворимость ТВ падает в ряду ТВ-1  $\geq$  ТВ-0,4 > ТВ-0,1 (рис. 4, в).

На растворимость ТВ в мочеине влияет также их концентрация в растворе: чем больше кон-



**Рис. 3.** Числовое распределение ТВ по размеру. а – ТВ-0,4 в воде: инкубировали 1 ч при 25 °С (сплошная линия) и продавливали через иглу (10 раз) (пунктирная линия); б, в – ТВ-1 с концентрацией 0,1 (пунктирные линии) и 0,6 мкг/мл (сплошные линии) в б – 5 М и в – 6 М мочеине



**Рис. 4.** Растворимость ТВ в мочеvine. Графики зависимости: *a* – мутности растворов ТВ в мочеvine, инкубированных 24 и 5 ч (ТВ-0,1), *б* – мутности растворов ТВ-1 с концентрацией 0,6 и 0,1 мг/мл в мочеvine, инкубированных 1 ч; *в*, *г* – среднего гидродинамического радиуса (числового), *в* – ТВ, инкубированных в мочеvine 24 ч и *г* – ТВ-0,1, инкубированных 5 и 24 ч, *д* – индекса полидисперсности ТВ, инкубированных 24 и 5 ч (ТВ-0,1), от концентрации мочевины. ТВ-0,1: 5 ч (белый треугольник), 24 ч (черный треугольник); ТВ-0,4: 24 ч (черный кружок); ТВ-1: 0,1 мг/мл, 1 ч (серый квадрат), 0,6 мг/мл, 1 ч (белый квадрат) и 24 ч (черный квадрат). Концентрация ТВ во всех экспериментах равна 0,6 мг/мл (исключение – 4, б)

центрация, тем выше их устойчивость к действию мочевины (рис. 4, б). Более наглядно это обнаруживается при сравнении кривых числового распределения по размеру частиц ТВ-1 с разной концентрацией (0,1 и 0,6 мкг/мл) в растворах 5 и 6 М мочевины (рис. 3, в, г).

Сравнительный анализ кривых распределения ТВ-0,1; ТВ-0,4 и ТВ-1,0 по размеру показал, что в растворах мочевины с концентрацией до 3 М присутствуют только крупные частицы, которые имеют мономодальное распределение и размеры, близкие к таковым в воде. В 4 М мочеvine максимум пика на кривой распределения сдвигается в сторону более мелких частиц ( $R_H \sim 350$  нм). Дальнейшее увеличение концентрации мочевины до 5 М приводит к образованию частиц с размером менее 100 нм и росту гетерогенности популяции. Это находит отражение в уменьшении среднего  $R_H$  и увеличении значения индекса полидисперсности (PDI), который определяется шириной распределения популяции частиц по размерам (рис. 4, в, г). В растворах ТВ в 6–8 М мочеvine появляются более мелкие частицы, при этом популяция остается полидисперсной, но ширина распределения частиц по размеру уменьшается: величина PDI падает, но при этом остается довольно высокой. В этих растворах наряду с мелкими присутствует небольшая фракция довольно крупных частиц с  $R_H$  100 нм и выше, видимо, наряду с дис-

социацией агрегатов происходит самоассоциация образующихся частиц. Этот процесс особенно выражен в растворах с высокой концентрацией мочевины (7–8 М) и определяет некоторый рост среднего размера частиц в этих растворах. Следует отметить, что при концентрации 2–3 М мочевины наблюдается некоторое увеличение размеров частиц, возможно, за счет связывания мочевины с ТВ, которое предшествует их растворению.

Поскольку светорассеяние от больших частиц может маскировать относительно мелкие частицы, для более точной оценки размеров последних крупные частицы удаляли, фильтруя растворы через мембрану с размерами пор 0,45 мкм. Средние числовые радиусы частиц в растворах мочевины разной концентрации находились в диапазоне 17–55 нм с преобладанием частиц с размером  $\sim 30$  нм. Частиц с размерами менее 10 нм обнаружено не было. Таким образом, рекомбинантный белок присутствует в растворе, в основном, в олигомерной форме ( $R_H$  развернутой молекулы  $\gamma$ OmpF равен 8,2 нм по данным ДРС [23]).

ТВ-0,4 и ТВ-1 достаточно хорошо растворяются в Ds-Na: мутность растворов резко падает при увеличении концентрации детергента от 0,02 (0,04) до 0,06% и практически не изменяется при дальнейшем ее росте (рис. 5, а). Эффективность растворения ТВ увеличивается с увеличением времени выдержки ТВ в детергенте.



Как видно из рис. 5, *а*, ТВ-0,4 растворяются в детергенте лучше, чем ТВ-1,0.

Методом ДРС было показано, что растворение ТВ в детергенте сопровождается образованием популяции частиц, размеры которых уменьшаются по мере увеличения концентрации детергента (числовое распределение частиц по размерам сдвигается в сторону меньших значений  $R_H$ ). Значение среднего (числового)  $R_H$  резко падает с увеличением концентрации детергента 0,04 (0,02) до 0,08 (0,06)% (в зависимости от времени выдержки в детергенте) и сохраняется относительно постоянным при дальнейшем повышении концентрации Ds-Na (рис. 5, *б*). Увеличение времени инкубации в детергенте повышает эффективность растворения ТВ, на что указывает сдвиг кривых зависимости  $R_H$  от концентрации Ds-Na в сторону меньших концентраций детергента (рис. 5, *б*). При этом средний радиус популяции частиц, которая образуется после инкубации ТВ в течение 24 ч в 0,04%-ном Ds-Na, для ТВ-0,4 был меньше, чем для ТВ-1, а в 0,06 и 0,1%-ном Ds-Na для обоих ТВ он был практически одинаковым, ~50 и 40 нм соответственно.

Популяция частиц, образующаяся при растворении ТВ в детергенте, достаточно гетерогенна по размерам. Степень ее полидисперсности с увеличением концентрации детергента вначале растет (в интервале концентраций Ds-Na, в котором происходит быстрое уменьшение среднего размера частиц, т.е. идет интенсивное растворение ТВ), а затем падает (при концентрациях детергента, где не наблюдается существенного изменения размера частиц), оставаясь довольно высокой: в 0,1%-ном Ds-Na величина PDI ~0,6 (рис. 5, *в*). С увеличением выдержки ТВ в растворе детергента форма кривой зависимости PDI от концентрации денатуранта сохраняется, но

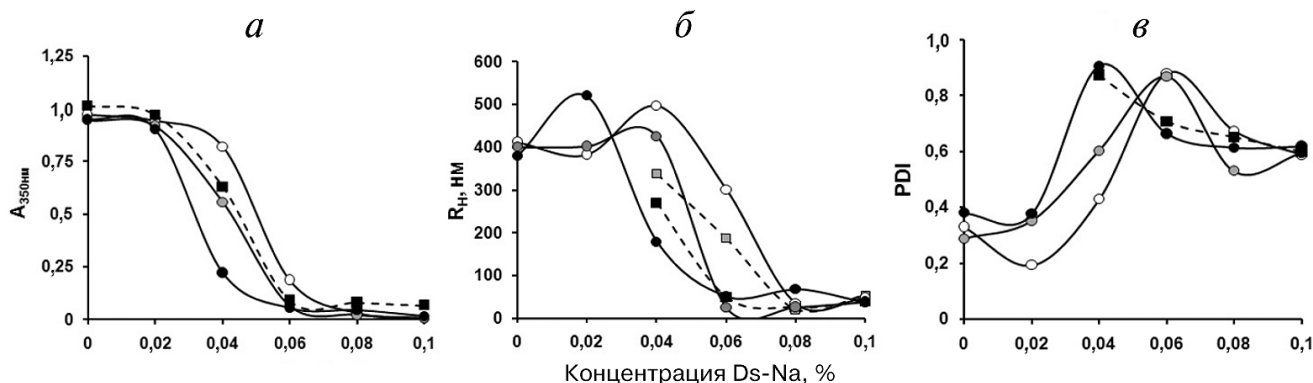
максимальное значение PDI сдвигается в область более низких концентраций Ds-Na, указывая на то, что интенсивное растворение ТВ, которое сопровождается увеличением гетерогенности образующейся популяции частиц, в этом случае происходит при более низких концентрациях детергента.

Как видно из рис. 5, *б*, размер ТВ, по сравнению с исходным, увеличивается при концентрации детергента, выше которой начинается интенсивное растворение ТВ. Можно предположить, что растворению ТВ предшествует стадия набухания в результате связывания их с молекулами детергента.

Чтобы более точно оценить размеры мелких частиц в растворах ТВ в детергенте, крупные частицы были отделены фильтрованием. Самые мелкие частицы были обнаружены в растворах 0,08%-ного Ds-Na, средний размер 11–20 нм, среди них в небольшом количестве присутствовали частицы с  $R_H$  10 нм. Следовательно, в растворе детергента rOmpF существует преимущественно в олигомерной форме.

**Структура рекомбинантного белка, солюбилизованного из ТВ.** Для растворения белков из ТВ использовали мочевины и Ds-Na. Условия солюбилизации были выбраны на основе данных турбидиметрии и ДРС. Пространственную структуру rOmpF определяли с помощью оптической спектроскопии.

Спектры КД порина из ТВ-0,4 и ТВ-1, растворенного в 0,04%-ном Ds-Na, в дальней УФ-области имеют одинаковую форму с минимумом при 221 нм и разную интенсивность сигнала и определяют, что в белке преобладает  $\beta$ -структура (рис. 6, *а*). В то же время в белке присутствует некоторое количество  $\alpha$ -спирали, о чем говорит наличие в спектре плеча при 208–210 нм. Увеличение концентрации Ds-Na до 0,06% соп-



**Рис. 5.** Растворимость ТВ в Ds-Na. Изменение: *а* – мутности растворов ТВ, инкубированных в детергенте 10 мин, 5 ч, 24 ч (ТВ-0,4) и 24 ч (ТВ-1); *б* – среднего гидродинамического радиуса (числового) ТВ, инкубированных 10 мин, 5 ч, 24 ч (ТВ-0,4) и 2 ч, 24 ч (ТВ-1); *в* – индекса полидисперсности растворов ТВ, инкубированных 10 мин, 5 ч, 24 ч (ТВ-0,4) и 24 ч (ТВ-1) как функции концентрации Ds-Na. ТВ-0,4: 10 мин (белый кружок), 5 ч (серый кружок), 24 ч (черный кружок); ТВ-1: 2 ч (серый квадрат), 24 ч (черный квадрат)

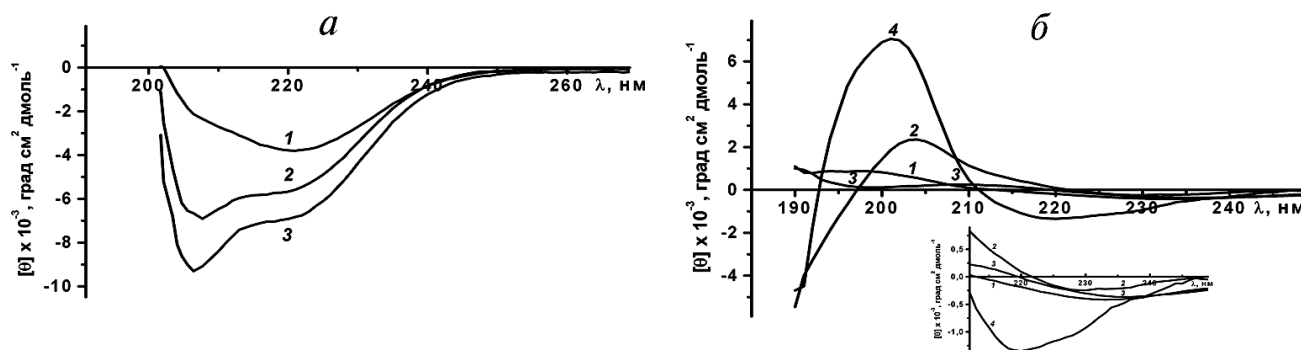


Рис. 6. КД-спектры в дальней УФ-области гOmpF из ТВ в: а – Ds-Na (1 – 0,04%, 2 – 0,06%, 3 – 0,08%) и б – мочеvine (1 и 2 – ТВ-0,4, 4 М и 5 М мочеvine, 3 и 4 – ТВ-1, 4 М и 5 М мочеvine)

ровождается увеличением интенсивности полос и изменением формы спектров: появляется четко выраженный минимум при 208 нм и плечо при 217 нм, характерные для конформаций  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -листа соответственно. Дальнейший рост концентрации детергента (до 0,08%) приводит к увеличению интенсивности отрицательной полосы с максимумом при 207 нм, что определяет увеличение относительного содержания  $\alpha$ -структуры. Поскольку наблюдаемые интермедиаты имеют в спектре полосу при 208 нм с большей величиной эллиптичности и более выраженную, чем при 222 нм, можно предположить, что они относятся к  $\alpha + \beta$  белкам [24]. В таком случае они имеют вторичную структуру, состоящую из  $\alpha$ -спиралей и антипараллельных  $\beta$ -листов, которые располагаются в разных сегментах полипептидной цепи. Из спектров КД было рассчитано содержание элементов вторичной структуры в рекомбинантном порине (табл. 3).

Анализ полученных данных показал, что гOmpF из ТВ, полученных при разной концентрации индуктора, имеет выраженную вторичную

структуру с высоким содержанием  $\beta$ -структуры. В то же время белок из ТВ, синтезированных при меньшей концентрации индуктора, содержит больше  $\beta$ -структуры и меньше неупорядоченной структуры. Увеличение концентрации детергента от 0,04 до 0,08% приводит к увеличению доли  $\alpha$ -спирали и падению относительного содержания  $\beta$ - и неупорядоченной структуры. Накопление  $\alpha$ -спирали происходит, в значительной степени (особенно в случае ТВ-0,4), за счет убывания  $\beta$ -структуры. Это позволяет предполагать, что этот детергент не только растворяет белок из ТВ, но и денатурирует его. Способность Ds-Na в определенных условиях индуцировать образование  $\alpha$ -спирали в белке была показана ранее [25]. Наибольшие изменения во вторичной структуре белка происходят при увеличении концентрации Ds-Na от 0,04 до 0,06%. Дальнейший рост концентрации детергента (до 0,08%) сопровождается заметно меньшим увеличением доли  $\alpha$ -спирали в белке. Таким образом, интермедиат порина в составе ТВ, который имеет вторичную структуру близкую к натив-

Таблица 3. Содержание элементов вторичной структуры (%) в гOmpF, растворенном в Ds-Na

Концентрация Ds-Na, %	Образец*	$\alpha$ -спираль, %	$\beta$ -структура, %	$\beta$ -изгиб, %	Неупорядоченная структура, %
0,04	ТВ-0,4	7,0	39,7	22,8	30,5
	ТВ-0,4 (24 ч)	14,9	32,1	21,8	31,2
	ТВ-1	5,6	31,3	25,9	37,2
0,06	ТВ-0,4	19,5	30,0	21,3	29,2
	ТВ-0,4 (24 ч)	21,0	29,2	20,8	29,0
	ТВ-1	20,3	28,6	21,2	29,9
0,08	ТВ-0,4	25,5	25,5	21,7	27,3
	ТВ-1	25,0	22,9	21,6	30,5
0,06 + SB3-12	ТВ-0,4	16,6	31,1	22,3	30,0
	ТВ-1	18,9	28,7	23,2	29,0

Примечание. \* Время инкубации образцов в детергенте 3 ч, за исключением образцов, для которых время инкубации указано в таблице.

ной, не стабилен и в присутствии Ds-Na денатурирует, приобретая конформацию более устойчивую к действию детергента. В пользу этого свидетельствует также влияние времени инкубации белка в растворе детергента на его конформацию. Увеличение времени выдержки от 3 до 24 ч в 0,06%-ном Ds-Na мало влияет на структуру белка, тогда как в тех же условиях в 0,04%-ном детергенте в порине происходят существенные конформационные изменения (табл. 3).

Была изучена также вторичная структура rOmpF, растворенного из ТВ-0,4 и ТВ-1 с помощью мочевины. Рекombинантный порин в 4 и 5 М мочеvine, имеет необычные КД-спектры в дальней УФ-области, которые характеризуются максимумом при 200 нм и выше, отрицательной полосой при 220–235 нм и очень низкой эллиптичностью (рис. 6, б). Повышение концентрации мочевины от 4 до 5 М сопровождается увеличением интенсивности полос (особенно в спектре rOmpF из ТВ-1) и сдвигом минимума в сторону меньших длин волн в спектрах. Интересно отметить, что спектры, подобные спектрам rOmpF в мочеvine, имеют склонные к агрегации интермедиаты сывороточных альбуминов, образованные в присутствии метилцианида, структуру которых авторы определили, как ненативный  $\beta$ -лист [26]. Согласно данным, полученным при расчете спектров КД, рекombинантный порин в растворах 4–5 М мочевины отличается высоким содержанием  $\beta$ -структуры и по соотношению элементов вторичной структуры приближается к нативному порину, rOmpF (OmpF):  $\alpha$ -спираль 3,2–4,0 (4)%;  $\beta$ -структура 40,1–44,5 (48)%;  $\beta$ -изгиб 21–21,4 (23)%; неупорядоченная структура 30,5–35,5 (25)%. Таким образом, rOmpF, солюбилизованный из ТВ

мочевиной, возможно, имеет структуру ненативного  $\beta$ -листа.

Низкая амплитуда спектров КД rOmpF в мочеvine и возможные искажения в положении полос могут определяться присутствием в растворе белковых агрегатов, не определяемых КД-спектроскопией, или неравномерным распределением молекул белка в олигомерах, в виде которых порин (по данным ДРС) присутствует в мочеvine [27, 28]. Следует отметить, что rOmpF в растворах Ds-Na также образует олигомеры. Однако спектры порина в детергенте, в отличие от таковых в мочеvine, не имеют такой низкой амплитуды и сильного смещения положения отрицательной полосы в длинноволновую область. Возможно, молекулярная организация частиц белка в мочеvine и детергенте различна. В мочеvine, вероятно, в составе олигомера могут присутствовать очень плотные кластеры молекул белка, образованные за счет гидрофобных контактов, которые являются причиной неравномерного распределения молекул белка в объеме частицы. При более высокой концентрации мочевины содержание таких кластеров может уменьшаться, и характеристики спектров могут улучшаться. В детергенте, как можно предположить, подобные кластеры не образуются, и олигомерные частицы являются однородными.

Спектры собственной суммарной и триптофановой флуоресценции rOmpF, растворенного из ТВ с помощью Ds-Na разной концентрации, отличались от спектров таковых как нативного порина дикого типа, так и полностью развернутого рекombинантного порина (табл. 4).

Максимумы спектров суммарной флуоресценции исследованных образцов рекombинантного порина (327–335 нм) сдвинуты в сторону

**Таблица 4.** Параметры спектров флуоресценции rOmpF, солюбилизованного из ТВ с помощью Ds-Na в течение 24 ч

Концентрация Ds-Na, %	Образец	Суммарная флуоресценция, ( $\lambda_{\text{возб}}$ 280 нм) $\lambda_{\text{max}}$ , нм	Триптофановая флуоресценция, ( $\lambda_{\text{возб}}$ 296 нм) $\lambda_{\text{max}}$ , нм
0,04	ТВ-0,4 ТВ-1	310, 334 311, 330	332, 346 330, 341
0,06	ТВ-0,4 ТВ-1	335 329	332, 343 330, 340
0,08	ТВ-0,4 ТВ-1	327 327	337 340
0,25	OmpF порин <i>Y. pseudotuberculosis</i> , нативный тример [29]	322	332
0,0	OmpF порин <i>Y. pseudotuberculosis</i> , развернутый мономер [23]	307, 348	350

больших длин волн по сравнению с таковым нативного белка (322 нм), но не достигают значения максимума спектра развернутого белка (348 нм). При концентрации детергента 0,04% в спектре  $\alpha$ OmpF наблюдается второй максимум (или плечо) при 311–312 нм, связанный с излучением остатков тирозина, количество которых в молекуле существенно превышает число триптофановых остатков (зрелый OmpF содержит 21Тур и 3Тр). Высокая интенсивность тирозиновой флуоресценции, вероятно, объясняется большим расстоянием между остатками тирозина и близлежащими группами тушителями, включая остатки триптофана, на которые в нативном белке передается энергия от тирозина.

Максимумы спектров триптофановой флуоресценции  $\alpha$ OmpF по сравнению с таковым развернутого белка были сдвинуты в сторону коротких длин волн. При концентрации Ds-Na 0,04 и 0,06% спектры порина имеют основной максимум (330–332 нм), практически совпадающий с таковым нативного белка ( $332 \pm 1$  нм), который принадлежит триптофанам, спрятанным внутри белка, и дополнительный максимум (плечо) в области более длинных волн (340–343 нм), соответствующих излучению флуорофоров более доступных растворителю, но не экспонированных на поверхности белка. Максимум спектра  $\alpha$ OmpF в 0,08% Ds-Na сдвинут в более длинноволновую область (337 и 340 нм для ТВ-0,4 и ТВ-1,0 соответственно), что указывает на большую доступность растворителю остатков триптофана в молекулах и, следовательно, на уменьшение компактности структуры белка. Спектры собственной флуоресценции свидетельствуют в пользу того, что  $\alpha$ OmpF, растворенный с помощью Ds-Na из ТВ, имеет третичную структуру, но она более «рыхлая», чем нативная. Флуоресцентная спектроскопия не обнаруживает заметных различий в третичной структуре поринов, полученных с помощью Ds-Na из ТВ,

экспрессированных при разных концентрациях индуктора.

Как известно, КД-спектр белка в ближнем УФ, где доминируют ароматические остатки, чувствителен к третичной структуре. Для того, чтобы подтвердить наличие элементов третичной структуры в рекомбинантном белке, были получены КД-спектры в ближней УФ-области  $\alpha$ OmpF (из ТВ-0,4) в 0,04%-ном Ds-Na, инкубированного в течение 3 и 24 ч. Для этих же образцов были сняты спектры КД в дальней УФ-области и спектры флуоресценции (рис. 7).

Как видно из рис. 7, б,  $\alpha$ OmpF, выдержанный в 0,04%-ном Ds-Na 3 ч, имеет спектр КД в ближней УФ-области с низкой эллиптичностью и положительной полосой при 283 нм, которая относится к остаткам тирозина. Более длительная инкубация в растворе детергента приводит к изменению во вторичной структуре белка: в спектре КД в дальней УФ-области наблюдается сдвиг минимума от 220 до 206 нм (рис. 7, а). В то же время происходят изменения в спектре КД в ближней УФ-области (рис. 7, б): изменяется знак спектра, происходит его сглаживание, уменьшается амплитуда сигнала, что указывает на увеличение симметрии в окружении ароматических остатков в белке. Эти изменения коррелируют с изменениями в спектрах собственной флуоресценции белка, которые заключаются в значительном падении интенсивности и появлении дополнительных максимумов при 310 нм (суммарная флуоресценция) и при 347 нм (триптофановая флуоресценция) (рис. 7, в). Это свидетельствует об увеличении расстояния между остатками тирозина и других аминокислот в молекуле белка и доступности остатков триптофана растворителю. Полученные спектральные данные указывают на уменьшение/потерю третичных взаимодействий в белке. Таким образом, в рекомбинантном порине, извлеченном из ТВ детергентом, присутствуют элементы третичной структуры.

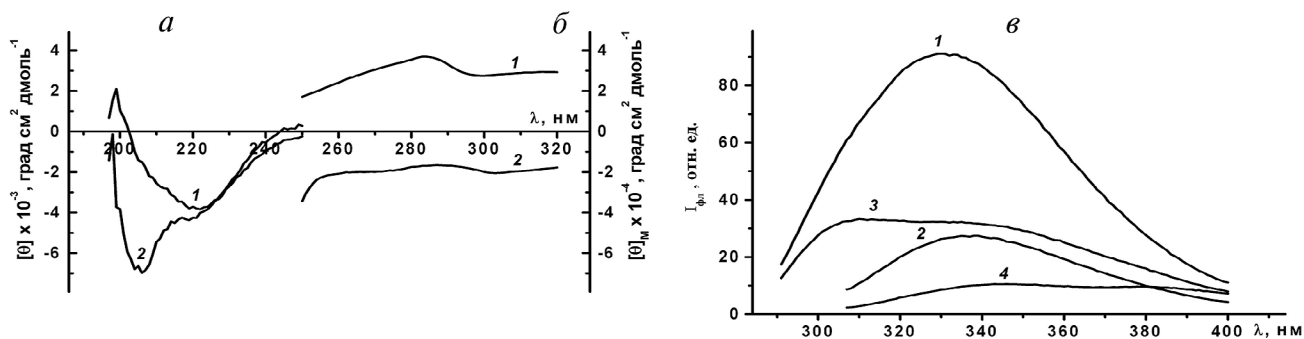


Рис. 7. Влияние времени инкубации в 0,04%-ном Ds-Na на структуру  $\alpha$ OmpF. а и б – Спектры КД в дальней и ближней УФ-области; время инкубации: 1 – 3 ч, 2 – 24 ч; в – спектры собственной флуоресценции: 1 и 3 – спектры суммарной флуоресценции, 2 и 4 – спектры триптофановой флуоресценции, время инкубации: 1 и 2 – 3 ч, 3 и 4 – 24 ч

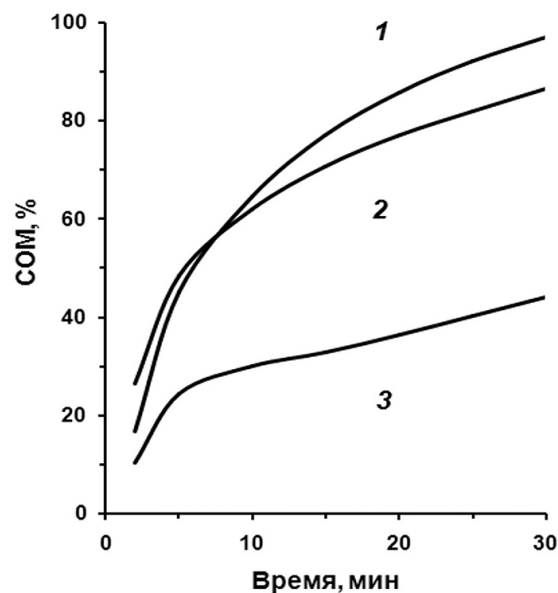
**Рефолдинг гOmpF.** Для формирования нативной конформации мембранным белкам, каковым является порин, требуется мембранное окружение, которое может быть имитировано мицеллами детергента или липидными бислоями (липосомы, смешанные липид/детергент липосомы). В связи с этим было исследовано влияние детергента SB3-12 в концентрации выше критической мицеллярной (10 мМ) и фосфолипидных липосом на конформацию рекомбинантного порина, растворенного из ТВ детергентом.

В присутствии мицелл цвиттерионного детергента SB3-12 не происходит заметных изменений во вторичной структуре гOmpF из ТВ-0,4 и ТВ-1 (табл. 3).

За образованием нативной структуры порина при его взаимодействии с липосомами судили по его функциональной активности. Для определения поровой активности рекомбинантного порина использовали метод вытекания флуоресцентной метки из отрицательно заряженных липосом. Добавление гOmpF из ТВ-0,4, растворенного в 0,04 и 0,06%-ном Ds-Na, к липосомам сопровождалось заметным увеличением интенсивности флуоресценции, что указывало на наличие у белка порообразующей активности (рис. 8). При этом гOmpF, солюбилизованный при более низкой концентрации детергента, имел заметно более высокую активность, сравнимую с таковой нативного порина. Наблюдаемые различия в активности, очевидно, связаны с тем, что гOmpF в более концентрированных растворах детергента имеет структуру более денатурированную (часть молекул порина может иметь необратимо денатурированную структуру) и поэтому хуже поддается ренатурации.

ТВ часто образуются при экспрессии гетерологичных мембранных белков в бактериальных штаммах-продуцентах. В случае гOmpF образование ТВ, помимо природы белка, определяется отсутствием сигнальной последовательности, обеспечивающей перенос белка через цитоплазматическую мембрану *E. coli*. Агрегация белка в ТВ представляет собой высоко специфичный процесс: молекулы белка могут агрегировать только с другими молекулами того же самого или высоко родственного белка [30]. Это объясняет тот факт, что ТВ, образованные гOmpF, удалось освободить от сопутствующих примесей простой обработкой ферментами и мягкими детергентами, и тем самым избежать дополнительных процедур очистки на стадии изолированного рекомбинантного белка. Получению высокоочищенных ТВ порина также способствовал большой размер ТВ, что уменьшает площадь поверхности, на которой абсорбируются посто-

ронные вещества [31]. Исследованные ТВ имели форму близкую к сферической, шероховатую поверхность и пористую структуру. В них присутствовали доступные растворителю кластеры гидрофобных остатков. ТВ были хорошо растворимы в присутствии низких концентраций Ds-Na (0,04–0,08%) и более устойчивыми к действию мочевины, по сравнению с детергентом. Их эффективное растворение наблюдается при высоких концентрациях мочевины (5 М и выше), что сопровождается денатурацией рекомбинантного порина и неблагоприятно сказывается на получении функционально активного белка. Меньшая стабильность ТВ в детергенте позволяет предполагать, что гидрофобные контакты играют важную роль во взаимодействии между молекулами гOmpF в составе агрегата. Растворение ТВ в обоих денатуратах приводит к образованию гетерогенной по размеру популяции олигомерных частиц. ТВ содержат интермедиат гOmpF с хорошо выраженной вторичной структурой, близкой к нативной, и с элементами третичной структуры, который способен встраиваться в липидный бислой, приобретая при этом функционально активную конформацию. Таким образом, ренатурация порина происходит без предварительного полного разворачивания молекулы под действием хаотропных агентов, как того требуют действующие на сегодняшний день протоколы. Однако этот интермедиат порина со структурой  $\beta$ -листа не стабилен и легко денату-



**Рис. 8.** Кинетика освобождения КФ из липосом: 1 — OmpF *Y. pseudotuberculosis*, 2 — и 3 — гOmpF, растворенный из ТВ-0,4 с помощью 0,04%-ного и 0,06%-ного Ds-Na соответственно. Порины были выдержаны с суспензией липосом при 25 °С. Ось ординат: СОМ, % — процент специфического освобождения КФ

рирует в присутствии детергента. В результате он приобретает новую конформацию, которая отличается более высоким содержанием  $\alpha$ -спирали и менее эффективно способна перестраиваться в нативную при встраивании в мембрану. В связи с этим защита интермедиатов с близкой к нативной структурой от денатурации при их выделении из ТВ является одной из ключевых задач при разработке новых эффективных методов подходов для получения функционально активных поринов. Не менее важной задачей на этом пути является увеличение содержания в ТВ корректно свернутого рекомбинантного белка и связанного с этим увеличения растворимости ТВ в присутствии хаотропных веществ и детергентов.

Исследованные ТВ, которые образуются при разной концентрации индуктора и температуре роста клеток 37 °С, существенно не различаются между собой по свойствам и структуре. Однако следует отметить, что с увеличением концентрации индуктора в ТВ несколько возрастает содер-

жание амилоидных структур и увеличивается содержание  $\alpha$ -спирали в рекомбинантном порине.

Результаты, полученные в ходе выполнения данной работы, вносят вклад в понимание структурной организации и механизма образования ТВ и в развитие новых подходов для получения активных белков из ТВ, а также ТВ, обладающих биологической и функциональной активностью.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (16-08-00679 и 19-03-00318).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей или животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gonzalez-Montalban, N., Natalello, A., Garcia-Fruitos, E., Villaverde, A., and Doglia, S.M. (2008) *In situ* protein folding and activation in bacterial inclusion bodies, *Biotechnol. Bioeng.*, **100**, 797–802, doi: 10.1002/bit.2179.
- Gatti-Lafronconi, P., Natalello, A., Ami, D., Doglia, S.M., and Lotti, M. (2011) Concepts and tools to exploit the potential of bacterial inclusion bodies in protein science and biotechnology, *FEBS J.*, **278**, 2408–2418, doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08163.x.
- Jevsevar, S., Gaberc-Porekar, V., Fonda, I., Podobnik, B., Grdadolnik, J., and Menart, V. (2005) Production of non-classical inclusion bodies from which correctly folded protein can be extracted, *Biotechnol. Prog.*, **21**, 632–639, doi: 10.1021/bp0497839.
- Peternel, S., Grdadolnik, J., Gaberc-Porekar, V., and Komel, R. (2008) Engineering inclusion bodies for non-denaturing extraction of functional proteins, *Microb. Cell Fact.*, **7**, 34, doi: 10.1186/1475-2859-7-34.
- Новикова О.Д., Соловьева Т.Ф. (2009) Неспецифические порины наружной мембраны грамотрицательных бактерий: структура и свойства, *Биол. Мем.*, **26**, 1, 6–20.
- Galdiero, S., Falanga, A., Cantisani, M., Tarallo, R., Della Pepa, M.E., D’Orlando, V., and Galdiero, M. (2012) Microbe-host interactions: structure and role of gram-negative bacterial porins, *Curr. Protein. Pept. Sci.*, **13**, 843–854, doi: 10.2174/138920312804871120.
- Majd, S., Yusko, E.C., Billeh, Y.N., Macrae, M.X., Yang, J., and Mayer, M. (2010) Applications of biological pores in nanomedicine, sensing, and nanoelectronics, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **21**, 439–447, doi: 10.1016/j.copbio.2010.05.002.
- Gupta, A., Ramasubramanian Iyer, B., Chaturvedi, D., Maurya, S.R., and Mahalakshmi, R. (2015) Thermodynamic, structural and functional properties of membrane protein inclusion bodies are analogous to purified counterparts: case study from bacteria and humans, *RSC Adv.*, **5**, 1227–1234, doi: 10.1039/C4RA11207E.
- Хоменко В.А., Портнягина О.Ю., Новикова О.Д., Исаева М.П., Ким Н.Ю., Лихацкая Г.Н., Вострикова О.П., Соловьева Т.Ф. (2008) Выделение и характеристика рекомбинантного OmpF-подобного порина из наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis*, *Биоорган. химия*, **34**, 177–184.
- Lugtenberg, B., Meijers, J., Peters, R., van der Hoek, P., and van Alphen, L. (1975) Electrophoretic resolution of the «major outer membrane protein» of *E. coli* K12 into four bands, *FEBS Lett.*, **58**, 254–258, doi: 10.1016/0014-5793(75)80272-9.
- Бахолдина С.И., Сидорин Е.В., Хоменко В.А., Исаева М.П., Ким Н.Ю., Быстрицкая Е.П., Пименова Е.А., Соловьева Т.Ф. (2018) Влияние условий экспрессии рекомбинантной фосфолипазы A<sub>1</sub> из наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* на структуру и свойства телец включения, *Биоорган. химия*, **44**, 163–174, doi: 10.7868/S0132342318020070.
- Klunk, W.E., Pettigrew, J.W., and Abraham, D.J. (1989) Quantitative evaluation of Congo Red binding to amyloid-like proteins with a beta-pleated sheet conformation, *J. Histochem. Cytochem.*, **37**, 1273–1281, doi: 10.1177/37.8.2666510.
- Provencher, S.W., and Glockner, J. (1981) Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism, *Biochemistry*, **20**, 34–37, doi: 10.1021/bi00504a006.
- Diwu, Z., Lu, Y., Zhang, C., Klaubert, D.H., and Haugland, R.P. (1997) Fluorescent molecular probes. II. The synthesis, spectral properties and use of fluorescent solvatochromic dapsyxylm dyes, *Photochem. and Photobiol.*, **66**, 424–431, doi: 10.1111/j.1751-1097.1997.tb03168.x.
- Faudry, E., Perdu, C., and Attree, I. (2013) in *Bacterial cell surfaces: methods and protocols* (Delcour A.H. ed.), Humana Press, N.Y., pp. 173–185.
- Villa, R., Lotti, M., and Gatti-Lafronconi, P. (2009) Components of the *E. coli* envelope are affected by and react to protein over-production in the cytoplasm, *Microb. Cell Fact.*, **8**, 32, doi: 10.1186/1475-2859-8-32.

17. Hawe, A., Sutter, M., and Jiskoot, W. (2008) Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization, *Pharmaceutical Res.*, **25**, 7, 1487–1499, doi: 10.1007/s11095-007-9516-9.
18. Semisotnov, G.V., Rodionova, N.A., Razgulyaev, O.I., Uversky, V.N., Gripas, A.F., and Gilmanshin, R.I. (1991) Study of the «molten globule» intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe, *Biopolymers*, **31**, 119–128, doi: 10.1002/bip.360310111.
19. Cano-Garrido, O., Rodriguez-Carmona, E., Diez-Gil, C., Vázquez, E., Elizondo, E., Cubarsi, R., Seras-Franzoso, J., Corchero, J.L., Rinas, U., Rater, I., Ventosa, N., Veciana, J., Villaverde, A., and Garcia-Fruitos, E. (2013) Supramolecular organization of protein-releasing functional amyloids solved in bacterial inclusion bodies, *Acta Biomater.*, **9**, 4, 6134–6142, doi: 10.1016/j.actbio.2012.11.033.
20. Carrio, M.M., and Villaverde, A. (2001) Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible, *FEBS Lett.*, **489**, 1, 29–33, doi: 10.1016/S0014-5793(01)02073-7.
21. Randolph, T.W., Seefeldt, M., and Carpenter, J.F. (2002) High hydrostatic pressure as tool to study protein aggregation and amyloidosis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1595**, 224–234, doi: 10.1016/S0167-4838(01)00346-6.
22. Peternel, S., Jevsevar, S., Bele, M., Gaberc-Porekar, V., and Menart, V. (2008) New properties of inclusion bodies with implications for biotechnology, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **49**, 239–246, doi: 10.1042/BA20070140.
23. Sidorin, E.V., Khomenko, V.A., Kim, N.Y., Dmitrenok, P.S., Stenkova, A.M., Novikova, O.D., and Solov'eva, T.F. (2017) Self-organization of recombinant membrane porin OmpF from *Yersinia pseudotuberculosis* in aqueous environments, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 1304–1313, doi: 10.1134/S0006297917110086.
24. Manavalan, P., and Johnson, W.C. (1983) Sensitivity of circular dichroism to protein tertiary structure class, *Nature*, **305**, 831–832, doi: 10.1038/305831a0.
25. Montserret, R., McLeish, M.J., Bockmann, A., Geourjon, C., and Penin, F. (2000) Involvement of electrostatic interactions in the mechanism of peptide folding induced by sodium dodecyl sulfate binding, *Biochemistry*, **39**, 8362–8373, doi: 10.1021/bi000208x.
26. Sen, P., Fatima, S., Khan, J.M., and Khan, R.H. (2009) How methyl cyanide induces aggregation in all-alpha proteins a case study in four albumins, *Intern. J. Biol. Macromol.*, **44**, 163–169, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2008.11.008.
27. Ioannou, J.C., Donald, A.M., and Tromp, R.H. (2015) Characterizing the secondary structure changes occurring in high density systems of BLG dissolved in aqueous pH 3 buffer, *Food Hydrocolloids*, **46**, 216–225, doi: 10.1016/j.foodhyd.2014.12.027.
28. Miles, A.J., and Wallace, V.A. (2016) Circular dichroism spectroscopy of membrane proteins, *Chem. Soc. Rev.*, **45**, 4859–4872, doi: 10.1039/c5cs00084j.
29. Ким Н.Ю., Новикова О.Д., Хоменко В.А., Лихацкая Г.Н., Вострикова О.П., Емельяненко В.И., Кузнецова С.М., Соловьева Т.Ф. (2007) Влияние pH на структуру и функциональную активность порина из наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis*. 1. Функционально значимые конформационные переходы иерсинина, *Биол. мембраны*, **24**, 150–158.
30. Speed, M.A., Wang, D.I., and King, J. (1996) Specific aggregation of partially folded polypeptide chains: the molecular basis of inclusion body composition, *Nat. Biotechnol.*, **14**, 1283–1287, doi: 10.1038/nbt1096-1283.
31. Wurm, D.J., Quehenberger, J., Mildner, J., Eggenreich, B., Slouka, C., Schwaighofer, A., Wieland, K., Lendl, B., Rajamanickam, V., Herwig, C., and Spadiut, O. (2018) Teaching an old pET new tricks: tuning of inclusion body formation and properties by a mixed feed system in *E. coli*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **102**, 667–676, doi: 10.1007/s00253-017-8641-6.

## INCLUSION BODIES OF RECOMBINANT PORIN OmpF OF *Yersinia pseudotuberculosis*: THEIR PROPERTIES AND STRUCTURAL CHARACTERIZATION

**V. A. Khomenko, E. V. Sidorin, S. I. Bakholdina, G. A. Naberezhnykh, N. U. Kim,  
A. M. Stenkova, N. U. Chernysheva, M. P. Isaeva, and T. F. Solov'eva\***

*Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-Eastern Branch  
of the Russian Academy of Sciences, 690022 Vladivostok, Russia; E-mail: soltaf@mail.ru*

Received December 14, 2018

Revised March 27, 2019

Accepted March 27, 2019

Mature pore-forming protein OmpF from the outer membrane of *Yersinia pseudotuberculosis* was expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies (IBs) under different culture conditions. Using electron microscopy, dynamic light scattering, optical spectroscopy, and specific hydrophobic dyes, the properties and structural organization of IBs as well as the structure of the recombinant porin (rOmpF) solubilized from IBs were investigated. The IB sizes, shape and stability in denaturant solutions have been determined. It was shown that IBs were well soluble in SDS and more resistant to urea. The dissolution of IBs in both denaturants led to the formation of a heterogeneous in size population of oligomeric particles. It was found that IBs contained the intermediate of rOmpF with native-like secondary structure and elements of the tertiary structure, which was able to penetrate the lipid bilayer and adopt the functionally active conformation. There were no significant differences in properties and structure between studied IBs formed at different concentrations of the inducer IPTG. Noteworthy, the increase in concentration of the inducer was accompanied by the increase in content of amyloids in IBs, thus decreasing the yield of the recombinant protein. The results obtained contribute to the development of new approaches for the production of active proteins from IBs, as well as of biologically and functionally active IBs.

**Keywords:** *Yersinia pseudotuberculosis*, inclusion bodies, recombinant OmpF porin, dynamic light scattering, electron microscopy, CD spectroscopy, fluorescence spectroscopy