

УДК 577.112

ШАПЕРОННАЯ И ИММУНОГЛОБУЛИНСВЯЗЫВАЮЩАЯ АКТИВНОСТИ Skp ИЗ *Yersinia pseudotuberculosis**

© 2020 Е.В. Сидорин**, В.А. Хоменко, Н.Ю. Ким, Т.Ф. Соловьева

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,
690022 Владивосток, Россия; электронная почта: sev1972@mail.ru

Поступила в редакцию 20.05.2019

После доработки 20.08.2019

Принята к публикации 10.09.2019

Данная работа посвящена изучению шаперонной и иммуноглобулинсвязывающей активностей рекомбинантного белка Skp (rSkp) из *Yersinia pseudotuberculosis* с помощью методов динамического рассеяния света и поверхностного плазмонного резонанса. В качестве белков-субстратов использовали коммерческие образцы поликлонального IgG человека, а также Fc- и Fab-фрагменты IgG человека. Было показано, что активность rSkp сильно зависит от pH среды. Наиболее устойчивые низкомолекулярные комплексы с гидродинамическим радиусом до 10 нм шаперон образует с белками-субстратами при кислом значении pH буферного раствора. В этих условиях rSkp *Y. pseudotuberculosis* показывает наибольшую устойчивость к самоассоциации, максимальную аффинность связывания с IgG человека и его Fc- и Fab-фрагментами и наиболее эффективно препятствует их агрегации, т.е. демонстрирует максимальную шаперонную активность. По мере увеличения pH среды сила взаимодействия rSkp с IgG и его фрагментами снижается, шаперон не может полностью предотвратить агрегацию белковых субстратов, но значительно замедляет этот процесс. Полученная информация может представлять практический интерес, поскольку стабильность терапевтических препаратов IgG является важной проблемой безопасности и эффективности их применения в медицине.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: шаперон Skp, *Yersinia pseudotuberculosis*, иммуноглобулин G человека, Fc- и Fab-фрагменты IgG, белок-белковые взаимодействия, динамическое рассеяние света, поверхностный плазмонный резонанс.

DOI: 10.31857/S0320972520010078

В современной литературе накоплено большое количество экспериментальных данных о полифункциональной активности белков. Одним из ярких примеров такого поведения биополимеров является белок шаперон Skp (seventeen kilodalton protein), широко представленный в энтеробактериях. Он относится к семейству гомологичных низкомолекулярных белков (14–20 кДа) с ярко выраженными основными свойствами (pI 9–10) [1–4]. Главными субстра-

тами Skp как шаперона являются белки наружной мембраны бактерий. Skp избирательно связывает несвернутые белки наружной мембраны, когда они после транслокации через плазматическую мембрану перемещаются в периплазму, и защищает их от агрегации [5–7]. Кроме того, Skp также функционирует как шаперон, который помогает в сворачивании растворимых белков в периплазме бактерий [8]. В этом качестве Skp при его коэкспрессии увеличивает выход и способствует корректному фолдингу экспрессированных белков, включая полноразмерные иммуноглобулины (антитела), их Fab-фрагменты и многочисленные одноцепочечные производные [9–11]. Наряду со способностью взаимодействовать с белками наружной мембраны в качестве шаперона, белки Skp обладают и другими свойствами, которые могут быть биологически и физиологически значимыми. Они проявляют липополисахарид- и ДНК-связывающую активности [1, 2, 12, 13] и являются хемоаттрактантами для моноцитов и полиморфноядерных лейкоцитов [14]. Между Skp и антигеном гистосовместимости человека HLA-B27 существует мо-

Принятые сокращения: rSkp – рекомбинантный белок Skp (seventeen kilodalton protein); IgG – иммуноглобулин G человека; ДРС – динамическое рассеяние света; Z-average – средний гидродинамический радиус частиц образца (при анализе кумулянтов); R_H – гидродинамический радиус частиц (при анализе распределения); ППР – поверхностный плазмонный резонанс; K_D – кинетическая константа диссоциации комплекса; k_d – константа скорости диссоциации комплекса; k_a – константа скорости ассоциации комплекса; RU – резонансная единица (resonance unit).

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM19-150, 02.12.2019.

** Адресат для корреспонденции.

лекулярная мимикрия: в их аминокислотных последовательностях имеются гомологичные участки [15]. Это позволило предположить, что данные белки могут обладать свойствами антигенов, иммунологически перекрестно реагирующих с HLA-B27. В то же время показано, что гомологичные участки в последовательности Skp не распознаются гуморальной иммунной системой пациентов с заболеваниями, связанными с HLA-B27 [16].

Ранее нами было показано, что Skp *Yersinia pseudotuberculosis* обладает свойством неиммунным способом (минуя антигенсвязывающие участки IgG (антител)) связывать IgG человека и кролика как в виде мономера Skp [17], так и в форме гомотримера (Skp₃) [18]. С помощью компьютерного моделирования были построены модели пространственной структуры Skp, Skp₃ и его комплексов с Fc- и Fab-фрагментами IgG1 человека. На основании полученных моделей было выявлено, что наиболее вероятные сайты связывания на молекуле иммуноглобулина находятся в области Fc- и Fab-фрагментов. Построенные модели свидетельствуют о том, что взаимодействие сразу двух молекул Skp₃ с молекулой IgG вполне вероятно. Нами было также установлено, что Skp *Y. pseudotuberculosis* связывается с порообразующим белком OmpF и фосфолипазой A из наружной мембраны этой бактерии [19].

Целью данной работы являлось определение качественных и количественных характеристик шаперонной и связывающей активностей Skp в отношении IgG человека и его Fc- и Fab-фрагментов при разных значениях pH среды.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы. В работе использовали Superdex 200 10/300 GL («GE Healthcare», США), акриламид («Serva», Германия); центрифужные пробирки для концентрирования с диаметром пор 3 кДа Amicon Ultra («Merck Millipore», Германия); Ds-Na, 96-луночные микропланшеты ProteOn, сенсорный чип GLC («Bio-Rad», США); набор окрашенных белков-маркеров («Fermentas», Литва); кумасси R-250 («Sigma», США); IgG человека и Fc-фрагмент IgG человека («ICN Biomedicals», США); Fab-фрагмент IgG человека («MP Biomedicals», США); БСА, овальбумин, химотрипсиноген, миоглобин, цитохром c («ICN Biomedicals», США); целлюлозные мембранные фильтры 0,45 мкм («Agilent», США); PBS, pH 7,4 («Helicon», Россия). Все остальные реактивы имели квалификацию х.ч. («Реахим», Россия), их использовали без дополнительной очистки.

В качестве буферных систем применяли PBS (10 mM NaH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2 mM KCl, pH 7,4); 50 или 100 mM CH₃COONa/CH₃COOH, pH 5,0 (буфер А); 50 mM Tris-HCl, pH 7,4 (буфер Б); 50 или 100 mM Tris-HCl, pH 8,0 (буфер В); 50 mM CH₃COONa/CH₃COOH, pH 6,0 (буфер Г).

Подготовка образцов IgG человека, Fc- и Fab-фрагментов IgG человека, rSkp из *Y. pseudotuberculosis*. С целью подготовки коммерческого образца каждого белка, выбранного в качестве белка-субстрата в реакции связывания с Skp *Y. pseudotuberculosis*, использовали гель-фильтрацию. Навеску каждого лиофилизованного белка растворяли в воде, полученные растворы пропускали через фильтр 0,45 мкм и проводили гель-фильтрацию на колонке Superdex 200 10/300 GL, предварительно уравновешенной раствором PBS. Образцы наносили на колонку в объеме 0,25 мл, скорость элюции составляла 0,5 мл/мин. Фракции объемом 0,5–0,7 мл, содержавшие белок, собирали и определяли интенсивность оптического поглощения элюата при 280 нм. Фракции объединяли по результатам Ds-Na-ПААГ-электрофореза и концентрировали с помощью центрифужных пробирок для концентрирования (диаметр пор 3 кДа). Общее содержание белка в полученных образцах IgG, Fc- и Fab-фрагментов определяли методом Брэдфорд [20] с использованием лизоцима в качестве калибровочного белка.

Рекомбинантный белок Skp (rSkp) *Y. pseudotuberculosis* экспрессировали в *E. coli*, выделяли из клеток и очищали, как описано нами ранее [18]. Концентрацию rSkp *Y. pseudotuberculosis* определяли по УФ-спектрам в максимуме поглощения при 280 нм, принимая величину $A_{1\text{ см}}^{0,1\%}$ равной 0,185 (Swiss-Prot, P31520 и Q667J8).

Ds-Na-ПААГ-электрофорез. Электрофорез проводили в присутствии Ds-Na по методу Лэммли [21]. Все образцы для электрофореза готовили без прогревания при 100 °С в буфере для образцов, не содержавшем меркаптоэтанол. В качестве маркеров использовали набор окрашенных белков с молекулярными массами 11, 17, 24, 33, 40, 55, 72, 100 и 130 кДа. Белки, разделенные в геле, окрашивали раствором кумасси R-250 в 10%-ной уксусной кислоте и 45%-ном этаноле.

Метод динамического рассеяния света (ДРС). Размер частиц, образованных rSkp *Y. pseudotuberculosis*, белками-субстратами и их комплексами с шапероном в растворе, в зависимости от времени инкубации и pH (5,1; 6,7 и 7,9) определяли методом ДРС на приборе ZetaSizer Nano ZS («Malvern», Великобритания), оснащенном He-Ne-лазером ($\lambda = 633$ нм, 4 мВт), при угле 173°. Измерения проводили в кювете 10 × 10 мм

при комнатной температуре (20 °С). Время накопления данных составляло 15–30 мин. Перед определением размеров частиц готовили смесь буферных растворов: 0,24 мл PBS + 0,34 мл 50 мМ буфера А + 0,62 мл либо 100 мМ буфера А (рН 5,1), либо 50 мМ буфера Б (рН 6,7), либо 100 мМ буфера В (рН 7,9). При выполнении экспериментов, в зависимости от задачи исследования, использовали PBS, содержащий либо IgG (0,15 мг/мл), либо Fc-фрагмент IgG (0,12 мг/мл), либо Fab-фрагмент IgG (0,12 мг/мл), а также 50 мМ буфер А, содержащий rSkp (0,28 мг/мл).

Расчет Z-average (среднего гидродинамического радиуса частиц образца) и R_H (гидродинамического радиуса) частиц при анализе их объемного распределения выполняли с помощью программного обеспечения к прибору (ZetaSizer Nano ZS, «Malvern», Великобритания).

Спектры КД. Спектры КД регистрировали на Chirascan-plus CD-спектрометре («Applied Photophysics», Великобритания) в кварцевых кюветах 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 молекулярную массу последнего равной 110 Да, по формуле:

$$[\theta] = [\theta]_{\text{набл}} S \times 110 / (Cd) \text{ (град м}^2 \text{ дмоль}^{-1}\text{)},$$

где S – чувствительность шкалы прибора; C – концентрация белка, мг/мл; d – толщина кюветы, см. В ароматической области спектра КД (240–320 нм) рассчитывали молярную эллиптичность $[\theta]_M$, принимая молекулярную массу белка равной 16,1 кДа. Для снятия спектров КД rSkp при разных значениях рН среды белок переводили в составные буферные растворы со значениями рН 5,1; 6,7 и 7,9, как описано выше.

Определение олигомерной структуры rSkp *Y. pseudotuberculosis*. Подтверждение олигомерной структуры rSkp *Y. pseudotuberculosis* проводили в нативных условиях с помощью FPLC-хроматографа («Amersham Pharmacia Biotech», США) в буфере А методом гель-фильтрации на колонке Superdex 200 10/300 GL, как описано нами ранее [18]. Колонку предварительно калибровали с помощью белков с известными молекулярными массами: БСА – 67, овальбумин – 45, химотрипсиноген – 24, миоглобин – 18, цитохром c – 13 кДа. Относительная ошибка определения молекулярной массы составила 7%.

Метод поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Для получения количественных характеристик взаимодействия Skp *Y. pseudotuberculo-*

sis с IgG человека и его Fc- и Fab-фрагментами использовали метод ППР. Кинетику связывания rSkp (аналит) с иммобилизованными на поверхности сенсорного чипа GLC белками-субстратами (лиганды) определяли с помощью матричного биосенсора ProteOn XPR 36 («Bio-Rad», США). Ковалентную иммобилизацию лигандов на чипе проводили с использованием набора реактивов Amin Coupling Kit («Bio-Rad», США) согласно инструкции производителя. Уровень связывания лиганда контролировали по изменению сигнала биосенсора (RU – resonance unit, резонансная единица). Плотность посадки составила 1420 RU для IgG, 690 RU для Fc-фрагмента и 1060 RU для Fab-фрагмента IgG. В качестве контрольного канала служил канал без иммобилизованного белка. В ходе выполнения экспериментов использовали буферные системы: 50 мМ буферы А, Б, В и Г. Концентрацию аналита изменяли в интервале 0,1–5,0 мкМ. В каждом эксперименте стадии ассоциации и диссоциации аналита проводили при скорости потока 25 мкл/мин в течение 500 с. Все эксперименты осуществляли при температуре 25 °С. Регенерацию поверхности сенсорного чипа выполняли 50 мМ раствором NaOH при скорости потока 30 мкл/мин в течение 60 с. Для удаления возможных артефактов связывания экспериментальные данные, полученные на реакционных поверхностях лиганд–аналит, последовательно обрабатывали путем вычитания результатов, полученных на контрольных поверхностях (reference surfaces) и при введении буферных систем без образцов белка (blank injections). Дальнейший анализ сенсограмм проводили с помощью программного обеспечения ProteOn Manager 3.0 («Bio-Rad», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние рН среды на агрегацию Skp *Y. pseudotuberculosis*. Наши наблюдения показали, что rSkp *Y. pseudotuberculosis* может длительное время храниться в буферных растворах с низкими значениями рН (4,0–5,0), сохраняя иммуноглобулинсвязывающую активность, но достаточно быстро (в течение недели) агрегирует и выпадает в осадок при нейтральных и основных значениях рН. Поэтому перед изучением шаперонной и иммуноглобулинсвязывающей активностей Skp *Y. pseudotuberculosis* методом динамического рассеяния света (ДРС) было исследовано поведение rSkp в растворах в зависимости от значения рН и времени инкубации. Полученные результаты представлены на рис. 1 и табл. 1.

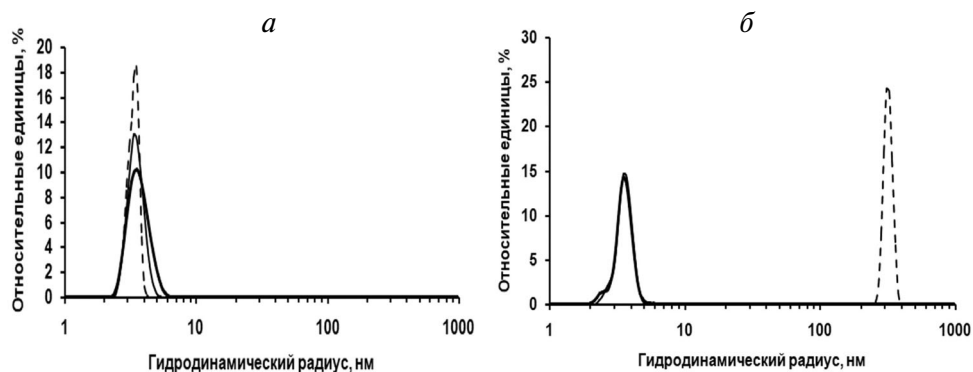


Рис. 1. Объемное распределение по размеру частиц rSkp *Y. pseudotuberculosis*: *a* – в буфере с pH 5,0, инкубация в течение 6 дней (сплошная толстая линия); в буфере с pH 6,7, инкубация в течение 4 ч (сплошная тонкая линия) и 24 ч (пунктирная линия); *б* – в буфере с pH 7,9, инкубация в течение 1 ч (сплошная толстая линия), 4 ч (сплошная тонкая линия) и 24 ч (пунктирная линия)

По данным метода ДРС, rSkp в 50 мМ натрий-ацетатном буфере (pH 5,0) имел в течение шести дней мономодальное распределение с преимущественным содержанием частиц с R_H и Z -average, равными 3,8 и 6,4 нм соответственно (рис. 1, *a*; табл. 1). Подобное распределение частиц шаперона по R_H также наблюдалось в течение первых 4 ч в растворах с нейтральным и щелочным значениями pH, но при этом величина Z -average образцов резко возрастала (табл. 1), что свидетельствует о начале процесса самоассоциации белка. Дальнейшая инкубация растворов в течение 24 ч приводила к еще большему увеличению Z -average и появлению изменений в распределении частиц по размерам: в растворе с pH 6,7 преимущественно сохранялись мелкие частицы (3,6 нм), в то время как в буфере с pH 7,9 частиц с $R_H < 200$ нм не наблюдалось (рис. 1, *б*). Таким образом, можно сделать вывод о том, что при изменении значений pH среды от кислых к щелочным наблюдаются самоассоциация и агрегация rSkp *Y. pseudotuberculosis*, и скорость этих процессов увеличивается с возрастанием pH в направлении к изоэлектрической точке белка (pI 9,33).

Таблица 1. Средние значения гидродинамических радиусов (Z -average и R_H) rSkp *Y. pseudotuberculosis* в водных растворах при разных значениях pH и сроках инкубации

Значение pH	Время инкубации	Z -average, нм	R_H , нм
5,0	6 дней	6,4	3,8
6,7	4 ч	61,1	3,7
	24 ч	341,2	3,5
7,9	1 ч	155,3	4,0
	4 ч	153,9	4,6
	24 ч	382,6	319,2

Пространственная структура rSkp. Влияние pH на структуру белка изучали с помощью КД-спектроскопии и ДРС. Спектры КД rSkp в буферных растворах с pH 5,0; 6,7 и 7,9 в дальней УФ-области имеют одинаковую интенсивность сигнала и форму с минимумами при 208 и 222 нм, что указывает на преобладание в белке α -структуры (рис. 2, *a*). Спектры остаются неизменными при инкубации белка в растворе в течение первых 24 ч (1, 4 и 24 ч). При дальнейшей выдержке rSkp (72 ч) при pH 5,0 характеристики спектра практически не изменяются, а при pH 6,7 и 7,9 заметно уменьшается амплитуда спектров при сохранении их формы, что может быть связано с присутствием в растворе белковых агрегатов, которые не определяются методом КД-спектроскопии [22].

Спектры КД rSkp в ближней УФ-области были использованы для выявления возможных трансформаций в третичной структуре белка при изменении pH среды (рис. 2, *б*). Как известно, спектры в области 260–320 нм обусловлены ароматическими аминокислотами. Зрелый Skp имеет два остатка Tyr и четыре остатка Phe на мономер, часть из которых находится в конформационно гибкой области молекулы (α -спиральный домен в форме щупалец) [18, 23]. Как видно на рис. 2, *б*, наибольшую амплитуду и наиболее выраженную тонкую структуру (пики при 260 и 270 нм, характерные для Phe, и при 278 и 285 нм, относящиеся к Tyr) имеет спектр белка в буфере с pH 5,0. При pH 6,7 наблюдаются небольшие изменения в спектре: немного уменьшается величина сигнала и высота пиков. Возрастание pH до 7,9 приводит к изменению знака спектра, дальнейшему уменьшению его амплитуды и сглаживанию при сохранении характеристических пиков. Увеличение времени инкубации белка от 1

до 72 ч не приводит к существенным изменениям в спектрах.

Согласно результатам ДРС, в интервале pH 5,0–8,0 наблюдается симметричное мономодальное распределение rSkp с небольшой шириной и R_H , равным $(3,7 \pm 0,3)$ нм (рис. 1). Как видно на рис. 2, в, рекомбинантный белок элюируется с колонки Superdex 200 10/300 GL в виде одного симметричного пика, который соответствует белку с кажущейся молекулярной массой $(45,2 \pm 3,0)$ кДа и, следовательно, тримерной форме шаперона [18].

Таким образом, увеличение pH от 5,0 до 7,9 не оказывает влияния на вторичную и олигомерную структуру rSkp, но, возможно, вызывает некоторую дестабилизацию третичной структуры.

Влияние rSkp на агрегацию IgG и его фрагментов при разных значениях pH среды. В качестве белков-субстратов для связывания с шапероном rSkp использовали коммерческие образцы поликлонального IgG, Fc- и Fab-фрагменты IgG. Перед проведением экспериментов исследуемые белки дополнительно очищали с помощью гельпроникающей хроматографии на колонке Superdex 200 10/300 GL, уравновешенной раствором PBS. По данным ДРС, образец иммуноглобулина в PBS имел мономодальное объемное распределение по размерам, R_H составлял $(5,6 \pm 0,5)$ нм, что согласуется с размером мономера IgG, приведенным в литературе [24–27], и величину Z -average, равную 17 нм. Образцы Fc- и Fab-фрагментов IgG также демонстрировали мономодальное объемное распределение по размерам и имели величины Z -average 14 и 11 нм соответственно и R_H $(3,3 \pm 0,3)$ нм, одинаковые для обоих белков.

В последние годы большое внимание уделяется изучению стабильности биофармацевтических препаратов на основе биологически активных белков. Одним из таких белков, получивших широкое применение в медицине, является IgG. Изучение различных аспектов

взаимодействия и агрегации молекул IgG [28–30] и факторов, влияющих на эти процессы [31–34], представляет не только фундаментальный, но и прикладной интерес при разработке лекарственных препаратов. В данной работе мы наблюдали агрегацию IgG, Fc- и Fab-фрагментов при переводе из PBS в буферные растворы с меньшей ионной силой с кислым, нейтральным или основным значениями pH. Исследуемые белки демонстрировали увеличение Z -average, ширины распределения по размерам (мульти-модальное распределение) и относительного содержания (%) частиц с $R_H > 10$ нм. На рис. 3 приведены диаграммы относительного содержания (%) частиц при их объемном распределении по размеру (R_H) и Z -average частиц, образованных белками-субстратами при разной длительности их инкубации в растворах при трех значениях pH (5,1; 6,7 и 7,9 соответственно) в отсутствие (рис. 3, а–в) и в присутствии rSkp *Y. pseudotuberculosis* (рис. 3, г–е).

Как можно видеть из диаграмм, IgG, Fc- и Fab-фрагменты агрегируют с разной скоростью в зависимости от значения pH среды. При кислых и щелочных значениях pH (рис. 3, а, в) скорость агрегации исследуемых белков намного выше, чем в нейтральной среде (рис. 3, б), при этом в кислых условиях она максимальна.

Рост относительного содержания мелких частиц с R_H менее 10 и 200 нм при увеличении времени выдерживания в кислых растворах до 24 ч и более (рис. 3, а), вероятно, связан с образованием крупных седиментирующих агрегатов, которые выпадают в осадок из раствора и не учитываются при анализе.

С целью изучения возможных шаперонных свойств rSkp *Y. pseudotuberculosis* в отношении IgG и его фрагментов, т.е. его способности предотвращать агрегацию исследуемых белков, образуя с ними растворимые комплексы, в растворы иммуноглобулинов с разными значениями pH добавляли шаперон в молярном соотноше-

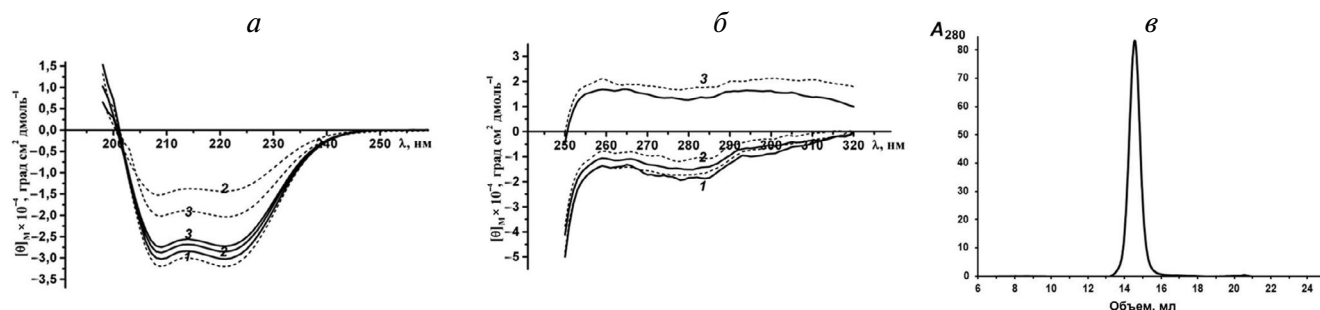


Рис. 2. Спектры КД rSkp в дальней (а) и ближней (б) областях УФ-спектра при значениях pH среды 5,0 (1), 6,7 (2) и 7,9 (3) в течение 1 ч (сплошная линия) и 72 ч (пунктирная линия). Гель-фильтрация rSkp (в) на колонке Superdex 200 HR в 50 мМ натрий-ацетатном буфере, pH 5,0

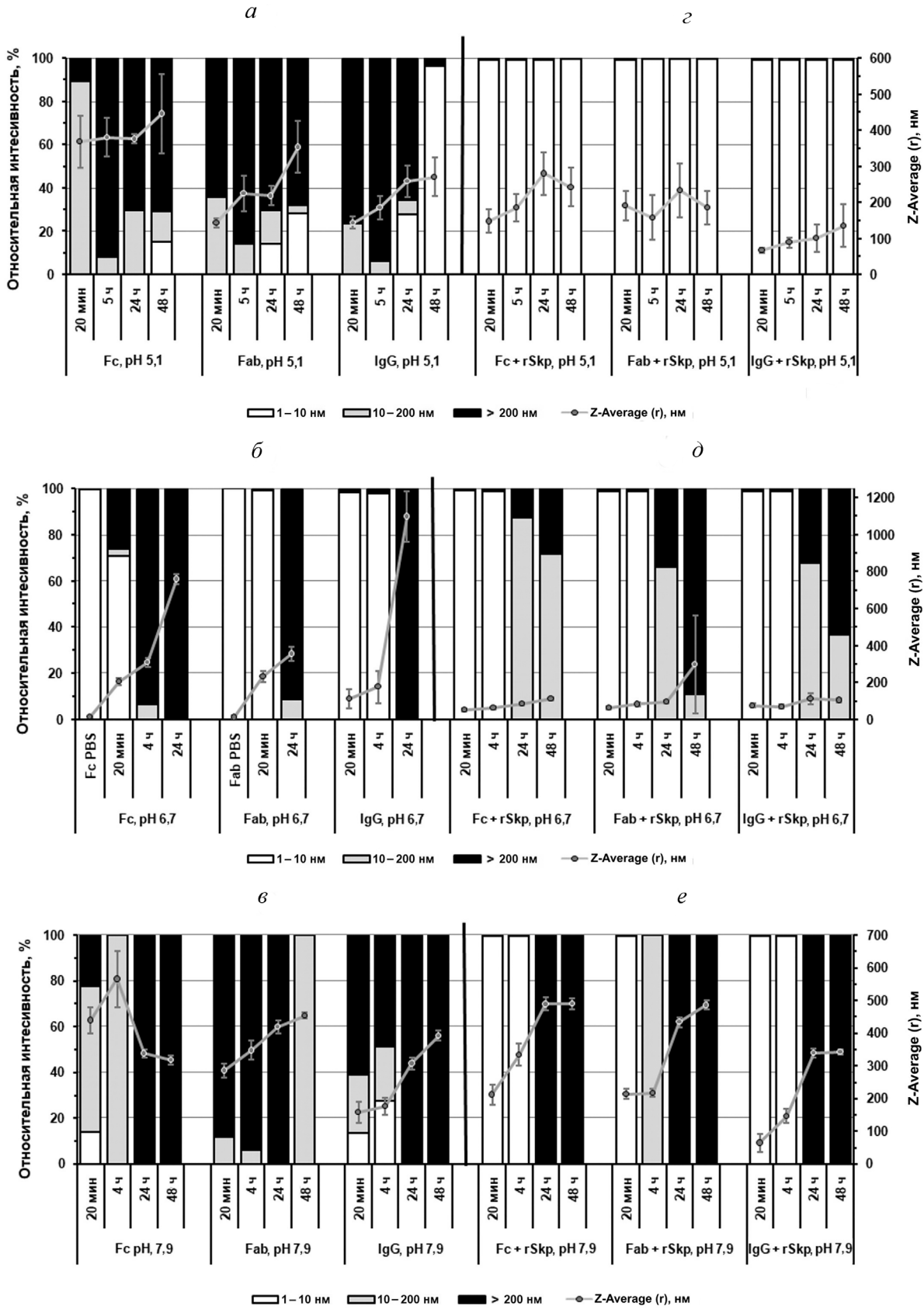


Рис. 3. Объемное распределение по размеру (R_n) и Z-average частиц, образованных белками-субстратами в растворе, в зависимости от времени инкубации и pH. Растворы белков в отсутствие (а–в) и в присутствии rSkp (г–е)

нии Skp₃: IgG (8 : 1) и Skp₃: Fc- или Fab-фрагменты IgG (3,5 : 1) (в расчетах использовали молекулярную массу тримера Skp₃). По данным ДРС, в присутствии rSkp скорость процессов самоассоциации и агрегации белков-субстратов существенно снижалась: рост относительного содержания (%) частиц с R_H > 10 нм и значений Z-average образцов заметно замедлялся (рис. 3, г–е). В проведенных экспериментах наблюдалось значительное влияние pH среды на проявление rSkp шаперонной активности. В случае кислого значения pH раствора (в условиях наибольшей стабильности rSkp) шаперон образовывал с белками устойчивые (до 48 ч) низкомолекулярные комплексы с R_H до 10 нм (99,5–99,8%; рис. 3, г). В растворах с нейтральным и щелочным значениями pH (6,7 и 7,9) шаперонная активность rSkp заметно снижалась (рис. 3, д, е). При этих значениях pH достаточно высокое (98,2–99,8%) относительное содержание образованных в первые 20 мин низкомолекулярных комплексов (R_H до 10 нм) сохранялось в течение первых 4–5 ч. Исключение составил раствор, содержащий шаперон с Fab-фрагментом IgG при pH 7,9: образующиеся частицы имели R_H в интервале 10–200 нм (100%). Дальнейшая инкубация растворов в течение 24 и 48 ч приводила к значительному увеличению доли крупных частиц (рис. 3, д, е), размер которых составлял 10–200 нм и более при pH 6,7 и свыше 200 нм (100%) при pH 7,9. Полученные результаты говорят о том, что при pH 6,7 и 7,9 rSkp не способен полностью предотвратить самоассоциацию и агрегацию IgG и его фрагментов, но может существенно замедлять эти процессы.

В последнее время появляется все больше данных о том, что нарушения в структуре белков, вызванные изменениями pH среды, влияют на их шаперонную активность [35–37]. Полученные результаты также хорошо демонстрируют pH-зависимый характер шаперонной активности rSkp *Y. pseudotuberculosis*. Наиболее устойчивые низкомолекулярные комплексы (R_H до 10 нм) между шапероном и IgG, Fc- или Fab-фрагментами образуются только при кислых значениях pH среды. При повышении pH шаперонная активность rSkp снижается, и агрегация белков-субстратов замедляется незначительно. На основании полученных нами данных можно предложить модель ингибирующего действия шаперона на pH-индуцированную агрегацию белков, согласно которой rSkp стабильно связывает белки-субстраты при низких значениях pH, тем самым предотвращая их необратимую агрегацию, pH-нейтрализация реакционной среды вызывает медленное высвобождение белков из их комплексов с шапероном.

По своим шаперонным свойствам Skp имеет сходство с недавно открытыми гомодимерными шаперонами HdeA и HdeB, которые обеспечивают устойчивость *Escherichia coli* к кислотному стрессу [38, 39]. Эти шапероны, подобно Skp, находятся в периплазме, имеют небольшую молекулярную массу, являются АТФ-независимыми и защищают белки периплазмы от разворачивания и агрегации в кислых условиях. Они активируются при низких значениях pH и функционируют в форме частично развернутых мономеров. В то же время Skp при кислых значениях pH, как было показано, сохраняет нативную вторичную и олигомерную структуру. Однако для того чтобы однозначно говорить о различии между выше-названными шаперонами по свойствам и механизму действия, необходимо изучить шаперонную активность и структуру Skp при более низких значениях pH (< 5), при которых HdeA и HdeB активны и функционируют.

Кинетические характеристики связывания Skp с IgG, Fc- или Fab-фрагментами при разных значениях pH среды. Для изучения взаимодействия и определения количественных характеристик связывания Skp с IgG человека и его Fc- и Fab-фрагментами при разных значениях pH среды использовали метод поверхностного плазмонного резонанса (ППР).

На рис. 4 представлены сенсограммы (экспериментальные и теоретические) связывания rSkp с IgG человека и его фрагментами при разных значениях pH среды. Количественные характеристики связывания: кинетическая константа диссоциации комплексов (K_D), главный параметр, определяющий силу связывания лиганд–аналит, константы скорости ассоциации и диссоциации комплексов (k_a и k_d соответственно) – приведены в табл. 2. Графические данные (рис. 4) и значения квадратичных отклонений (χ², табл. 2) свидетельствуют в пользу того, что использованные для аппроксимации полученных результатов модели, согласно которым связывание rSkp с Fc- и Fab-фрагментами IgG наилучшим образом соответствует кинетической модели «двух состояний», а с IgG – модели «гетерогенного лиганда», можно считать удовлетворительными для расчета количественных характеристик межмолекулярных взаимодействий лиганд–аналит. Анализ связывания rSkp с белками-субстратами при одной концентрации шаперона и одном значении pH среды (5,0), но разной скорости потока аналита через ячейку (25, 35 и 45 мкл/мин; рис. 5) показал, что в реакции лиганд–аналит отсутствуют эффекты, ограничивающие массоперенос.

Константы диссоциации изученных комплексов имеют достаточно низкие значения, что

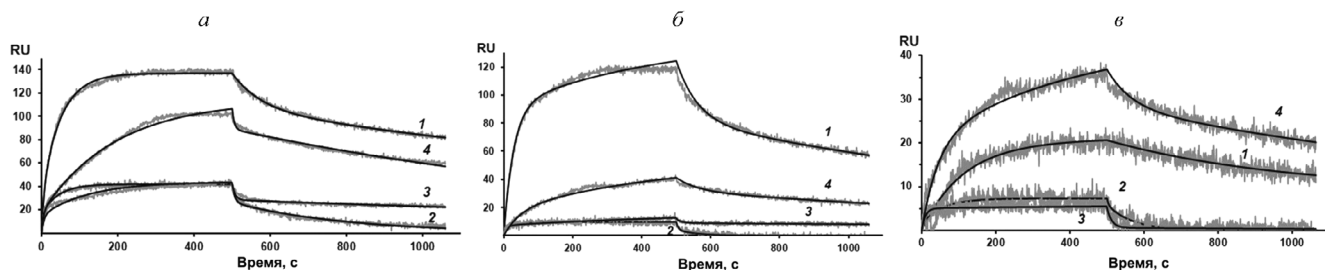
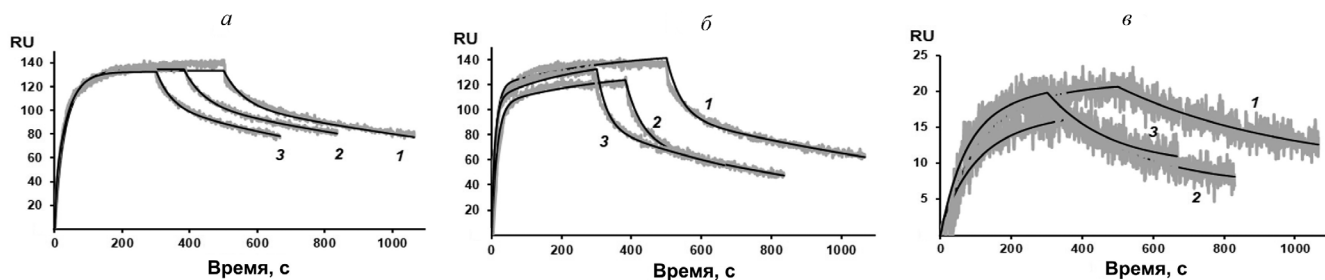
Таблица 2. Количественные характеристики связывания гSkp с IgG человека, Fc- и Fab-фрагментами IgG при разных значениях pH среды

Иммуноглобулин	pH	k_a , 1/Ms	k_d , 1/s	K_D1 , k_d/k_a	k_{a2} , 1/s	k_{d2} , 1/s	K_D2 , k_d/k_a	χ^2 , RU
Fc-фрагмент IgG	5,0	$(1,10 \pm 0,02) \times 10^5$	$(9,1 \pm 0,4) \times 10^{-3}$	$8,0 \times 10^{-8}$	$(2,1 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	$(6,8 \pm 0,7) \times 10^{-4}$	–	5,7
	6,0	$(5,4 \pm 2,5) \times 10^4$	$(1,4 \pm 0,3) \times 10^{-1}$	$2,6 \times 10^{-6}$	$(6,1 \pm 1,7) \times 10^{-3}$	$(9,0 \pm 0,01) \times 10^{-1}$	–	2,1
	7,4	$(3,0 \pm 0,2) \times 10^5$	$(5,6 \pm 0,5) \times 10^{-2}$	$1,9 \times 10^{-7}$	$(3,6 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	$(2,8 \pm 0,3) \times 10^{-4}$	–	0,8
	8,0	$(2,50 \pm 0,06) \times 10^4$	$(7,2 \pm 0,4) \times 10^{-3}$	$2,9 \times 10^{-7}$	$(2,4 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	$(4,4 \pm 0,2) \times 10^{-4}$	–	2,9
Fab-фрагмент IgG	5,0	$(7,7 \pm 0,3) \times 10^4$	$(2,4 \pm 0,3) \times 10^{-3}$	$3,1 \times 10^{-8}$	$(8,1 \pm 1,4) \times 10^{-4}$	$(6,7 \pm 1,7) \times 10^{-5}$	–	2,1
	6,0	$(1,6 \pm 0,3) \times 10^5$	$(1,5 \pm 0,4) \times 10^{-1}$	$9,7 \times 10^{-7}$	$(8,2 \pm 1,6) \times 10^{-3}$	$(4,400 \pm 0,006) \times 10^{-1}$	–	2,1
	7,4	$(5,0 \pm 0,6) \times 10^4$	$(8,5 \pm 0,7) \times 10^{-2}$	$1,7 \times 10^{-6}$	$(6,5 \pm 0,7) \times 10^{-4}$	$(8,7 \pm 3,4) \times 10^{-4}$	–	0,9
	8,0	$(4,10 \pm 0,08) \times 10^4$	$(7,5 \pm 0,4) \times 10^{-3}$	$1,8 \times 10^{-7}$	$(3,0 \pm 0,2) \times 10^{-3}$	$(6,8 \pm 0,4) \times 10^{-4}$	–	2,1
IgG	5,0	$(1,10 \pm 0,01) \times 10^5$	$(6,1 \pm 0,2) \times 10^{-4}$	$5,6 \times 10^{-9}$	$(2,3 \pm 0,3) \times 10^5$	$(1,6 \pm 0,07) \times 10^{-2}$	$6,9 \times 10^{-8}$	2,8
	6,0	$(1,9 \pm 0,1) \times 10^5$	$(5,1 \pm 0,4) \times 10^{-2}$	$2,6 \times 10^{-7}$	$(5,0 \pm 0,3) \times 10^5$	$(3,6 \pm 0,2) \times 10^{-2}$	$7,1 \times 10^{-8}$	2,9
	7,4	$(4,4 \pm 0,3) \times 10^5$	$(1,10 \pm 0,03) \times 10^{-2}$	$2,6 \times 10^{-8}$	$(9,1 \pm 0,6) \times 10^4$	$(4,4000 \pm 0,0005) \times 10^{-3}$	$6,5 \times 10^{-7}$	2,5
	8,0	$(4,3 \pm 0,3) \times 10^4$	$(4,7 \pm 0,5) \times 10^{-2}$	$1,1 \times 10^{-6}$	$(7,3 \pm 0,7) \times 10^4$	$(7,3 \pm 0,8) \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-6}$	6,8

указывает на специфические взаимодействия между компонентами. Сила связывания гSkp с IgG человека и его фрагментами сильно зависит от значений pH среды: при pH 5,0 она является максимальной со всеми белками-субстратами и значительно уменьшается при увеличении pH (рис. 6, табл. 2). Уменьшение аффинности взаимодействия с ростом величины pH обусловлено

прежде всего значительным увеличением скорости диссоциации комплексов.

В условиях pH среды, близких к нейтральным (6,0 и 7,4), наблюдаются наибольшие различия в кинетике образования и распада комплексов гSkp с белками-лигандами. Если при увеличении pH от 6,0 к 7,4 характер изменения k_d комплексов для Fc- и Fab-фрагментов IgG оди-

**Рис. 4.** Сенсограммы связывания гSkp с IgG (а), Fc-фрагментом (б) и Fab-фрагментом (в) IgG человека в буферных растворах, pH среды: 5,0 (1), 6,0 (2), 7,4 (3) и 8,0 (4)**Рис. 5.** Сенсограммы связывания гSkp с IgG (а), Fc-фрагментом (б) и Fab-фрагментом (в) IgG человека в натрий-ацетатном буфере, pH 5,0, при скорости протока аналита 25 (1), 35 (2) и 45 (3) мкл/мин

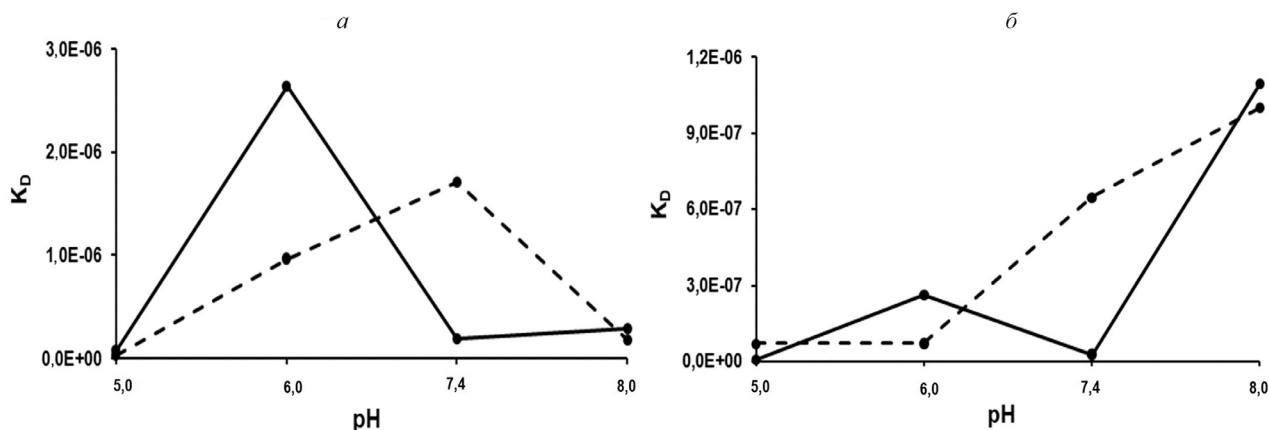


Рис. 6. Зависимость K_D комплексов rSkp *Y. pseudotuberculosis* с IgG и его Fc- и Fab-фрагментами от pH среды. Взаимодействие шаперона: а – с Fc-фрагментом (сплошная линия) и Fab-фрагментом (пунктирная линия); б – с IgG человека; K_{D1} – сплошная линия, K_{D2} – пунктирная линия

наков (уменьшение в 2,5 и 1,8 раза соответственно), то k_a для Fc-фрагмента увеличивается в 5,6 раза, а для Fab-фрагмента – уменьшается в 3,2 раза (табл. 2). Это приводит к тому, что в данном интервале pH аффинность связывания с Fc-фрагментом возрастает, а с Fab-фрагментом – уменьшается (рис. 6, а). Полученные данные коррелируют с результатами ДРС, согласно которым шаперонная активность rSkp при pH 6,7 выше по отношению к Fc-фрагменту, чем к Fab-фрагменту IgG (рис. 3, д). Возможно, различия между Fc- и Fab-фрагментами при взаимодействии с rSkp объясняются тем, что изоэлектрические точки этих белков находятся в области pH 6,0–7,4, и при этом Fc-фрагмент имеет более низкое значение pI , чем Fab-фрагмент [40]. В случае IgG характер зависимости величин констант диссоциации от pH в интервале 6,0–7,4 для сайта с K_{D1} подобен таковому для Fc-фрагмента, а для сайта с K_{D2} совпадает с таковым для Fab-фрагмента (рис. 6, б). Это позволяет предполагать, что K_{D1} и K_{D2} относятся к связыванию rSkp с Fc- и Fab-фрагментами (соответственно) на иммобилизованном IgG человека.

При увеличении pH среды от 7,4 до 8,0 аффинность взаимодействия rSkp с Fc-фрагментом остается неизменной, а с Fab-фрагментом – увеличивается (рис. 6, а, табл. 2). Эти результаты плохо соответствуют данным ДРС, согласно которым rSkp имеет самую низкую шаперонную активность при pH 7,9 (рис. 3, е). Возможно, это является результатом занижения значений K_D за счет быстрой самоассоциации rSkp в качестве анализа в щелочной среде вблизи изоэлектрической точки (табл. 1). Подобное кажущееся увеличение аффинности, наблюдаемое методом ППР, с ростом размеров агрегатов, участвующих в реакции лиганд-рецепторного взаимодействия, ранее

было описано в литературе [41]. На молекуле IgG при pH 8,0 в сравнении с другими значениями pH оба сайта связывания демонстрируют самую низкую аффинность взаимодействия (рис. 6, б; табл. 2), что хорошо согласуется с проявлением rSkp низкой шаперонной активности, наблюдаемой методом ДРС при pH 7,9 (рис. 3, е). Однако это не исключает того, что значения K_D могут быть занижены по причине самоассоциации rSkp.

Проведенное исследование показало, что в интервале pH 5,0–8,0 максимальную иммуноглобулинсвязывающую и шаперонную активности rSkp *Y. pseudotuberculosis* проявляет в растворе с кислым значением pH, при котором он наиболее стабилен. По мере увеличения pH среды наблюдается медленная самоассоциация и агрегация шаперона, а также заметное снижение его связывающих свойств.

Полученная информация может представлять практический интерес в связи с тем, что иммуноглобулины широко используются в медицине в качестве эффективных терапевтических препаратов для лечения ряда аутоиммунных заболеваний, рака и других патологий. Агрегаты IgG, которые образуются при длительном хранении, увеличивают иммуногенность препаратов, а также изменяют их физические свойства, в первую очередь вязкость. Контроль над агрегацией является ключом к производству качественных и стабильных биофармацевтических препаратов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Holck, A., Lossius, I., Aasland, R., Haarr, L., and Kleppe, K. (1987) DNA- and RNA-binding proteins of chromatin from *Escherichia coli*, *Biochim. Biophys. Acta*, **908**, 188–199, doi: 10.1016/0167-4781(87)90058-3.
- Holck, A., and Kleppe, K. (1988) Cloning and sequencing of the gene for the DNA-binding 17K protein of *Escherichia coli*, *Gene*, **67**, 117–124, doi: 10.1016/0378-1119(88)90014-5.
- Koski, P., Rhen, M., Kantele, J., and Vaara, M. (1989) Isolation, cloning, and primary structure of a cationic 16-kDa outer membrane protein of *Salmonella typhimurium*, *J. Biol. Chem.*, **264**, 18973–18980.
- Koski, P., Hirvas, L., and Vaara, M. (1990) Complete sequence of the *ompH* gene encoding the 16-kDa cationic outer membrane protein of *Salmonella typhimurium*, *Gene*, **88**, 117–120, doi: 10.1016/0378-1119(90)90068-3.
- De Cock, Y., Schafer, U., Potgeter, M., Demel, R., Muller, M., and Tommassen, J. (1999) Affinity of the periplasmic chaperone Skp of *Escherichia coli* for phospholipids, lipopolysaccharides and nonnative outer membrane proteins. Role of Skp in the biogenesis of outer membrane protein, *Eur. J. Biochem.*, **259**, 96–103, doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00010.x.
- Harms, N., Koningstein, G., Dontje, W., Muller, M., Oudega, B., Luijck, J., and de Cock, H. (2001) The early interaction of the outer membrane protein PhoE with the periplasmic chaperone Skp occurs at cytoplasmic membrane, *J. Biol. Chem.*, **276**, 18804–18811, doi: 10.1074/jbc.M011194200.
- Соловьева Т.Ф., Новикова О.Д., Портнягина О.Ю. (2012) Биогенез β -баррельных интегральных белков наружной мембраны бактерий, *Биохимия*, **77**, 1459–1477.
- Entzminger, K.C., Chang, C., Myhre, R.O., McCallum, K.C., and Maynard, J.A. (2012) The Skp chaperone helps fold soluble proteins *in vitro* by inhibiting aggregation, *Biochemistry*, **51**, 4822–4834, doi: 10.1021/bi300412y.
- Mazor, Y., Van Blarcom, T., Mabry, R., Iverson, B.L., and Georgiou, G. (2007) Isolation of engineered, full-length antibodies from libraries expressed in *Escherichia coli*, *Nat. Biotechnol.*, **25**, 563–565, doi: 10.1038/nbt1296.
- Levy, R., Weiss, R., Chen, G., Iverson, B.L., and Georgiou, G. (2001) Production of correctly folded Fab antibody fragment in the cytoplasm of *Escherichia coli* *trxB* mutants via the coexpression of molecular chaperones protein expression and purification, *Protein Expr. Purif.*, **23**, 338–347, doi: 10.1006/prep.2001.1520.
- Sonoda, H., Kumada, Y., Katsuda, T., and Yamaji, H. (2011) Effects of cytoplasmic and periplasmic chaperones on secretory production of single-chain Fv antibody in *Escherichia coli*, *J. Biosci. Bioeng.*, **111**, 465–470, doi: 10.1016/j.jbiosc.2010.12.015.
- Geyer, R., Galanos, C., Westphal, O., and Golecki, J. (1979) A lipopolysaccharide-binding cell-surface protein from *Salmonella minnesota*. Isolation, partial characterization and occurrence in different Enterobacteriaceae, *Eur. J. Biochem.*, **98**, 27–38, doi: 10.1111/j.1432-1033.1979.tb13156.x.
- Holck, A., Lossius, I., Aasland, R., and Kleppe, K. (1987) Purification and characterization of the 17 K protein, a DNA-binding protein from *Escherichia coli*, *Biochim. Biophys. Acta*, **914**, 49–54, doi: 10.1016/0167-4838(87)90160-9.
- Shrestha, A., Shi, L., Tanase, S., Tsukamoto, M., Nishino, N., Tokita, K., and Yamamoto, T. (2004) Bacterial chaperone protein, Skp, induces leukocyte chemotaxis via C5a receptor, *Am. J. Pathol.*, **164**, 763–772, doi: 10.1016/S0002-9440(10)63164-1.
- Vuorio, R., Hirvas, L., Raybourne, R.B., Yu, D.T.Y., and Vaara, M. (1991) The nucleotide and deduced amino acid sequence of the cationic 19 kDa outer membrane protein *OmpH* of *Yersinia pseudotuberculosis*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1129**, 124–126, doi: 10.1016/0167-4781(91)90226-C.
- Lahesmaa, R., Skurnik, M., Vaara, M., Leirisalo-Repo, M., Nissila, M., Granfors, K., and Toivanen, P. (1991) Molecular mimicry between HLA B27 and *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella* and *Klebsiella* within the same region of HLA α_1 -helix, *Clin. Exp. Immunol.*, **86**, 399–404, doi: 10.1111/j.1365-2249.1991.tb02944.x.
- Сидорин Е.В., Зиганшин Р.Х., Набережных Г.А., Лихацкая Г.Н., Трифонов Е.В., Анастюк С.Д., Черников О.В., Соловьева Т.Ф. (2009) Белок шаперон Skp из *Yersinia pseudotuberculosis* обладает способностью связывать иммуноглобулины G, *Биохимия*, **74**, 501–514.
- Сидорин Е.В., Тищенко Н.М., Хоменко В.А., Исаева М.П., Дмитренко П.С., Ким Н.Ю., Лихацкая Г.Н., Соловьева Т.Ф. (2012) Молекулярное клонирование, выделение и характеристика шаперона Skp из *Yersinia pseudotuberculosis*, *Биохимия*, **77**, 1571–1583.
- Сидорин Е.В., Сидорова О.В., Тищенко Н.М., Хоменко В.А., Новикова О.Д., Соловьева Т.Ф. (2015) Шаперонная активность иммуноглобулинсвязывающего белка *Yersinia pseudotuberculosis*, *Биол. мембр.*, **32**, 217–220, doi: 10.7868/S0233475515030081.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254, doi: 10.1006/abio.1976.9999.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680–685, doi: 10.1038/227680a0.
- 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.
- Walton, T.A., and Sousa, M.C. (2004) Crystal structure of Skp, a prefoldin-like chaperone that protects soluble and membrane proteins from aggregation, *Mol. Cell*, **15**, 367–374, doi: 10.1016/j.molcel.2004.07.023.
- Hawe, A., Kasperb, J.C., Friessb, W., and Jiskoot, W. (2009) Structural properties of monoclonal antibody aggregates induced by freeze–thawing and thermal stress, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **38**, 79–87, doi: 10.1016/j.ejps.2009.06.001.
- Arosio, P., Barolo, G., Muller-Spath, T., Wu, H., and Morbidelli, M. (2011) Aggregation stability of a monoclonal antibody during downstream processing, *Pharm. Res.*, **28**, 1884–1894, doi: 10.1007/s11095-011-0416-7.
- Amani, S., Nasim, F., Khan, T.A., Fazili, N.A., Furkan, M., Bhat, I.A., Khan, J.M., Khan, R.H., and Naeem, A. (2014) Detergent induces the formation of IgG aggregates: a multi-methodological approach, *Spectrochimica Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **120**, 151–160, doi: 10.1016/j.saa.2013.09.141.
- Esfandiary, R., Parupudi, A., Casas-Finet, J., Gadre, D., and Sathish, H. (2015) Mechanism of reversible self-association of a monoclonal antibody: role of electrostatic and hydrophobic interactions, *J. Pharm. Sci.*, **104**, 577–586, doi: 10.1002/jps.24237.
- Nezlin, R. (2010) Interactions between immunoglobulin G molecules, *Immunol. Lett.*, **132**, 1–5, doi: 10.1016/j.imlet.2010.06.006.
- Joubert, M.K., Luo, Q., Nashed-Samuel, Y., Wypych, J., and Narhi, L.O. (2011) Classification and characterization of therapeutic antibody aggregates, *J. Biol. Chem.*, **286**, 25118–25133, doi: 10.1074/jbc.M110.160457.
- Luo, Q., Joubert, M.K., Stevenson, R., Ketchem, R.R., Narhi, L.O., and Wypych, J. (2011) Chemical modifications in therapeutic protein aggregates generated under different stress conditions, *J. Biol. Chem.*, **286**, 25134–25144, doi: 10.1074/jbc.M110.160440.

31. Wang, W. (2005) Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics, *Intern. J. Pharm.*, **289**, 1–30, doi: 10.1016/j.ijpharm.2004.11.014.
32. Arosio, P., Rima, S., and Morbidelli, M. (2013) Aggregation mechanism of an IgG2 and two IgG1 monoclonal antibodies at low pH: from oligomers to larger aggregates, *Pharm. Res.*, **30**, 641–654, doi: 10.1007/s11095-012-0885-3.
33. Gil, D., and Schrum, A.G. (2013) Strategies to stabilize compact folding and minimize aggregation of antibody-based fragments, *Adv. Biosci. Biotechnol.*, **4**, 73–84, doi: 10.4236/abb.2013.44A011.
34. Roberts, C.J. (2014) Therapeutic protein aggregation: mechanisms, design, and control, *Trends Biotechnol.*, **32**, 372–380, doi: 10.1016/j.tibtech.2014.05.005.
35. Poon, S., Rybchyn, M.S., Easterbrook-Smith, S.B., Carver, J.A., Pankhurst, G.J., and Wilson, M.R. (2002) Mildly acidic pH activates the extracellular molecular chaperone clusterin, *J. Biol. Chem.*, **277**, 39532–39540, doi: 10.1074/jbc.M204855200.
36. Tapley, T.L., Franzmann, T.M., Chakraborty, S., Jakob, U., and Bardwell, J.C.A. (2010) Protein refolding by pH-triggered chaperone binding and release, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 1071–1076, doi: 10.1073/pnas.0911610107.
37. Bose, D., Patra, M., and Chakrabarti, A. (2017) Effect of pH on stability, conformation, and chaperone activity of erythroid & non-erythroid spectrin, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.*, **1865**, 694–702, doi: 10.1016/j.bbapap.2017.03.012.
38. Malki, A., Le, H.-T., Milles, S., Kern, R., Caldas, T., Abdallah, J., and Richarme, G. (2008) Solubilization of protein aggregates by the acid stress chaperones HdeA and HdeB, *J. Biol. Chem.*, **283**, 13679–13687, doi: 10.1074/jbc.M800869200.
39. Tapley, T.L., Korner, J.L., Bargea, M.T., Hupfelda, J., Schauerter, J.A., Gafnic, A., Jakoba, U., and Bardwell, J.C.A. (2009) Structural plasticity of an acid-activated chaperone allows promiscuous substrate binding, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 5557–5562, doi: 10.1073/pnas.0811811106.
40. Coleman, L., and Mahler, S.M. (2003) Purification of Fab fragments from a monoclonal antibody papain digest by Gradiflow electrophoresis, *Protein Express. Purif.*, **32**, 246–251, doi: 10.1016/j.pep.2003.07.005.
41. Luo, Y., Lu, Z., Raso, S.W., Entrican, C., and Tangarone, B. (2009) Dimers and multimers of monoclonal IgG1 exhibit higher *in vitro* binding affinities to Fc γ receptors, *mAbs*, **1**, 491–504.

THE CHAPERONE AND IMMUNOGLOBULIN-BINDING ACTIVITIES OF Skp PROTEIN FROM *Yersinia pseudotuberculosis**

E. V. Sidorin**, V. A. Khomenko, N. Yu. Kim, 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: sev1972@mail.ru*

Received May 20, 2019

Revised August 20, 2019

Accepted September 10, 2019

Here, we determined qualitative and quantitative characteristics of the chaperone and immunoglobulin-binding activities of recombinant Skp protein (rSkp) from *Yersinia pseudotuberculosis* using the methods of dynamic light scattering and surface plasmon resonance. Commercial human polyclonal IgG and Fc and Fab fragments of human IgG were used as substrate proteins. The activity of rSkp strongly depended on the medium pH. The most stable low-molecular-weight complexes with a hydrodynamic radius up to 10 nm were formed by rSkp and protein substrates at acidic pH values. Under these conditions, rSkp exhibited the lowest propensity to self-association and the highest affinity for human IgG and its Fc and Fab fragments, as well as prevented their aggregation most efficiently (i.e., demonstrated the maximal chaperone activity). As the medium pH increased, the affinity of rSkp for IgG and its fragments decreased; rSkp was not able to completely prevent the aggregation of protein substrates, but significantly slowed it down. The obtained information may be of practical interest, since the stability of therapeutic IgG preparations affects their safety and efficacy in medical applications.

Keywords: Skp chaperone, *Yersinia pseudotuberculosis*, human immunoglobulin G, Fc and Fab fragments of IgG, protein–protein interactions, dynamic light scattering, surface plasmon resonance