

doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2017.02.088>

УДК 577.352.4:577.2

**К.Ю. Манойлов¹, О.Б. Горбатюк^{2,3}, М.О. Усенко^{2,3},
О.Я. Шатурський¹, Т.О. Борисова¹, Д.В. Колибо¹, С.В. Комісаренко¹**

¹ Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ

² Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

³ ДУ “Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України”, Київ

E-mail: manoilovmail@gmail.com; olegshatursky@biochem.kiev.ua

Характеризація очищеної рекомбінантної субодиниці В дифтерійного токсину як інструмента його дослідження

Представлено академіком НАН України С.В. Комісаренком

*Очищення препаратів рекомбінантної субодиниці В (SbV) дифтерійного токсину (DT), синтезованої в цитоплазмі, периплазмі і нерозчинних тільцях включення клітин *Escherichia coli*, проведене за допомогою металоафінної хроматографії після руйнування бактеріальної ДНК та клітинної стінки ензимами, дало можливість позбутися домішок ендогенних пороформуючих протеїнів. Показано, що рекомбінантні похідні DT, SbV та CRM197 мають однакову спорідненість з рецепторами чутливих та резистентних до токсину клітин ліній Vero і L929 відповідно. Прикладання позитивного потенціалу з боку додавання SbV (0,3 мкг/мл) до фосфатидилетаноламінвмісної бішарової мембрани у розчині 1 М KCl (рН 4,8) призводить до утворення потенціалозалежних іонних каналів з провідністю 20 пСм, як показано у класичних дослідженнях природного DT. За даними порівняльного аналізу, характеристики утворення і функціонування каналів DT найкраще відтворюються SbV, синтезованою в неактивній формі у вигляді тілець включення, та ренатурованою *in vitro*.*

Ключові слова: дифтерійний токсин, субодиниця В, CRM197, бішарові ліпідні мембрани, іонні канали.

Дифтерійний токсин (DT) є бактеріальним екзотоксином, який належить до групи токсинів А–В типу. Відомо, що серед токсинів цієї групи DT був першим охарактеризованим представником. Подібно до інших токсинів А–В типу, DT має характерний розподіл основних функцій (каталітичної, рецепторної і каналної) між двома фрагментами (субодиницями) А і В його молекули та діє із середини клітини шляхом інгібування синтезу протеїнів. Згідно з даними кристаліграфічного аналізу, молекула DT складається із трьох доменів складної вторинної структури: каталітичного домену С (субодиниця А), а також трансмембранного та рецепторного доменів Т і R, що разом утворюють субодиницю В (SbV). Причому каталітичний домен С субодиниці А здатний до інактивації фактору елонгації трансляції 2, eEF-2 у цитоплазмі еукаріотичних клітин, рецепторний домен R відповідальний за зв'я-

© К.Ю. Манойлов, О.Б. Горбатюк, М.О. Усенко, О.Я. Шатурський,
Т.О. Борисова, Д.В. Колибо, С.В. Комісаренко, 2017

зування з рецепторами клітин-мішеней, а транслокаційний домен Т бере участь у транспортуванні субодиниці А крізь клітинну мембрану в цитозоль і утворює в ній іонпровідні канали. С-Кінцевий домен R складений у β -діжку, а проміжний між ним і N-кінцевим каталітичним доменом С домен Т — у α -спіралізований пучок. Незважаючи на відсутність остаточних уявлень щодо будови та функцій Т-домену DT, згідно з існуючими даними, можна стверджувати, що дві із дев'яти α -спіралей відповідального за утворення іонного каналу DT Т-домену формують у ліпідному бішарі клітинної мембрани амфіпатичну структуру на зразок шпильки. Вірогідно, що транслокація поліпептидного ланцюжка С-домену DT у цитоплазму може відбуватися гідрофільною порожниною іонного каналу, вистеленою α -шпильками Т-домену.

Природний DT, його фрагменти і рекомбінантні похідні знаходять широке застосування в наукових дослідженнях, молекулярній біотехнології і біомедицині (створенні вакцин, проведенні протипухлинної терапії тощо). Крім цього, рекомбінантні похідні DT привертають увагу дослідників через відносну простоту і меншу вартість процедур отримання, керування змінами їхніх властивостей шляхом направленого мутагенезу або генетичного поєднання з іншими протеїнами. Шляхом синтезу рекомбінантних протеїнів у клітинах чужорідних продуцентів, таких як *Escherichia coli*, а також подальших процедур очищення і підготування проб можна змінювати притаманні природному аналогу властивості. Тому синтез і очищення будь-якого рекомбінантного похідного потребує оптимізації для одержання найбільш подібного до природного аналога рекомбінантного продукту.

З огляду на зростаючу потребу у використанні рекомбінантних похідних DT з метою кращого відтворення природних властивостей у проведеному дослідженні SbB було синтезовано в цитоплазмі, периплазмі та нерозчинних тільцях включення клітин *E. coli*. Після цього шляхом порівняльного аналізу отриманих рекомбінантних протеїнів був відібраний такий, що якнайкраще відтворював іонпровідні властивості природного DT та його здатність до зв'язування DT-чутливими клітинами. Оскільки іонпровідні властивості та зв'язування нетоксичного рекомбінантного похідного DT, CRM197 з DT-чутливими клітинами цілком відповідали таким, що були визначені для природного токсину [1], CRM197 був використаний для порівняльного аналізу з рекомбінантною SbB, отриманою в нашому дослідженні.

Посилання на публікації, в яких описано створення генетичних конструкцій для синтезу в цитоплазмі *E. coli* протеїнів EGFP-SbB (SbB, сполученої з зеленим флуоресцентним протеїном EGFP) та CRM197 (нетоксичного точкового мутанта DT), містяться в роботі [1]. Створення генетичної конструкції для синтезу SbB описано в роботі [2]. Синтез і очищення препарату CRM197, використаного для досліджень методом бішарових фосфоліпідних мембран (БЛМ), проводили згідно з процедурами, описаними в попередній публікації [1]. Конструкцію для синтезу SbB у периплазматичному просторі *E. coli* отримано шляхом вбудовування нуклеотидної послідовності SbB із конструкції *pET-24a-SubunitB* [2] для синтезу SbB у цитоплазмі бактерії між рестрикційними сайтами BamHI та NcoI плазмідного вектора *pET-22b*. Синтез SbB у всіх випадках проводили в клітинах *E. coli* штаму *BL21 Rosetta (DE3)*, індукуючи додаванням 1 мМ ізопропіл- β -D-1-тіоґалактопіранозиду або за протоколом автоіндукції [1]. Периплазматичну фракцію *E. coli* отримували за протоколом осмотичного шоку за умов низької температури згідно з [3]. Для отримання продуктів синтезу в цитоплазмі було проведено руйнування клітинних стінок і ДНК бактерій лізоцимом та ДНКазою I. Ензиматичне руйнування клітин проводили за наявності 0,04 % дезоксихолату натрію.

У процесі синтезу в цитоплазмі *E. coli* рекомбінантна SbB утворювалася в двох формах: розчинній (35–40 %) та нерозчинній у бактеріальних тільцях включення (60–65 %). Протеїн EGFP-SbB виявлявся головним чином у розчинній (> 95 %), а CRM197 – повністю в нерозчинній фракції клітинного лізату. Очищення SbB із розчинної та периплазматичної фракцій проводили в нативних умовах за допомогою металоафінної хроматографії (ІМАС) з використанням Ni-NTA агарози. Рекомбінантні протеїни SbB, EGFP-SbB та CRM197 виділяли із відмитих тілець включення на Ni-NTA агарозі в денатуруючих умовах, використовуючи 6 М гуанідин гідрохлорид як хаотропний агент. Ренатурацію *in vitro* здійснювали при послідовному зменшенні концентрації гуанідин гідрохлориду (6,00; 5,25; 4,5; 3,75; 3,00; 2,25; 1,5; 0,75 та 0 М). Елюцію рекомбінантних продуктів з Ni-NTA агарози проводили в градієнті імідазолу від 10 до 300 мМ. Фракції, які вміщували цільовий протеїн з найменшим процентом домішок, було позбавлено від імідазолу шляхом діалізу та сконцентровано. Чистоту та концентрацію цільових рекомбінантних протеїнів в отриманих пробах оцінювали за допомогою методу ДСН-ПААГ.

Лінії клітин ссавців Vero та L929 були отримані з Клітинного банку ліній із тканин людини та тварин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України. Як середовище для росту клітин використовували RPMI-1640 з L-глутаміном та 10 % фетальної сироватки великої рогатої худоби, що вміщувало 100 мг/л стрептоміцину, 10 000 од./л пеніциліну G та 250 мкг/л амфотерицину В. Клітини вирощували за умов 37 °C та 5 % концентрації CO₂ у повітрі.

Визначення кінетичних параметрів конкурентної взаємодії протеїнів EGFP-SbB та CRM197 з клітинами Vero і L929 проводили методом протокової цитометрії. Для цього клітини інкубували за умов змінюваної концентрації CRM197 (від 0,5 до 4 мкМ) та сталої концентрації EGFP-SbB, що була близькою до значення, за якого відбувалося повне насичення лігандом усіх молекул відповідного рецептора на поверхні клітин. Близька до насичуючої концентрація EGFP-SbB, середня для використаних клітинних ліній, була визначена експериментально методом протокової цитометрії і становила 3 мкМ. Від'єднання клітин від пластикових чашок Петрі проводили з використанням 30 мМ двонатрієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти. Кількість клітин у суспензії оцінювали за допомогою камери Горяєва. Переведення клітин у інкубаційне середовище, яке містило EGFP-SbB та CRM197, здійснювали шляхом осаджування центрифугуванням при 300 g та послідовного ресуспендування. Для пригнічення процесів ендоцитозу в клітинах застосовували 0,02 % NaN₃ та інкубацію при 4 °C, а для запобігання неспецифічній сорбції протеїнів на клітинній поверхні – 1 % бичачий сироватковий альбумін (BSA). Визначення інтенсивності флуоресценції клітин проводили на протоковому цитометрі Coulter Epics XL (“Beckman Coulter”, США). Інтенсивність флуоресценції клітин вимірювали за каналом FL1 (довжина хвилі збудження – 488 нм).

Дослідження іонпровідних властивостей SbB і CRM197 проводили на пласкій БЛМ, сформованій із розчину фосфатидилетаноламіну (ФЕА) та фосфатидилхоліну (ФХ) (Харківське ЗАТ “Біолек”, Україна) або тих самих ліпідів, виділених із яєчного жовтка і хроматографічно очищених канд. біол. наук І.О. Трикаш у відділі нейрохімії Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. Суміш ФЕА : ФХ розчиняли в *n*-гептані у співвідношенні 2 : 1 із загальною концентрацією ліпідів 20 мг/мл. Отриманий у результаті розчин ліпідів

наносили на отвір діаметром 0,15 мм у дельриновому стаканчику з робочим об'ємом 1 мл (Warner Instruments, Inc., США). Формування ліпідного бішару спостерігали візуально у відображеному світлі за допомогою біокулярного мікроскопа. Ємність мембрани компенсували за допомогою пристрою, вбудованого в підсилювач струму ВВА-02 (Eastern Scientific, LLC, США). Оточуючий мембрану водно-сольовий розчин містив 10 мМ *трис*-HCl (рН 6,0 або 4,8) і задану кількість хлоридів калію або натрію. Провідність мембрани вимірювали за допомогою електродів (Warner Instruments, Inc., США), занурених у розчин 2 М КСl з агаровими містками. Різниця потенціалів прикладалася до мембрани від джерела напруги, вбудованого в підсилювач струму, що давало можливість отримувати постійну напругу у проміжку між -150 та 150 мВ. Прикладену до мембрани напругу контролювали за допомогою цифрового вольтметра. Трансмембранний струм реєстрували підсилювачем струму і фільтрували записи струму при смузї пропускання $0,1$ кГц. Запис мікро- та макроскопічного струмів здійснювали за допомогою аналого-цифрового перетворювача ADA-1210 (Eastern Scientific, LLC, США), сполученого з комп'ютером і підсилювачем струму за допомогою спеціального програмного забезпечення (Cole-Palmer Instrument Company, США).

Селективність іонпровідних каналів SbB та CRM197 вимірювали в 10-кратному градієнті концентрації хлориду калію або натрію (1 М хлорид металу з боку прикладання потенціалу і 0,1 М хлорид того ж металу з протилежного боку мембрани) при рН 6,0 та 4,8 з обох боків модифікованої БЛМ. Потенціал Нернста визначали за зміщенням сталого сумарного струму через модифіковану БЛМ при мембранному потенціалі 0 мВ до і після утворення 10-кратного градієнта концентрації хлориду металу. Селективність каналів SbB розраховували за рівнянням Гольдмана—Ходжкіна—Хакслі відповідно знаку і абсолютній величині потенціалу (потенціал Нернста), який треба було прикласти в умовах 10-кратного градієнта концентрації омиваючої мембрану солі для відновлення нульового струму, визначеного при однаковій концентрації хлориду металу (1 М) з обох боків мембрани.

Більшість експериментів, за винятком тих, що потребували змін температури водно-сольового оточення в експериментах з клітинами проводили при кімнатній температурі ($20-24$ °C).

На основі даних проточної цитометрії були визначені залежності середньої інтенсивності флуоресценції клітин, забарвлених насичуючою концентрацією EGFP-SbB, від концентрації протеїну CRM197 (дані не показані). Отримані залежності були типовими для конкурентної взаємодії двох лігандів з одним рецептором [4], згідно з якими, інтенсивність флуоресценції клітин обох ліній зменшувалася зі збільшенням концентрації протеїну CRM197. Вірогідно, що протеїн CRM197 конкурентно витісняє EGFP-SbB із комплексу з рецептором токсину на клітинній поверхні, чим підтверджується специфічність зв'язування обох клітинних ліній з протеїнами EGFP-SbB та CRM197. З огляду на те, що рецептор DT має лише один сайт зв'язування з токсином, на основі експериментальних кривих за допомогою пакета програм Origin Pro 9 було обраховано величину IC_{50} для конкурентного витіснення EGFP-SbB протеїном CRM197. Для клітин Vero величина IC_{50} становила $1,35$ мкМ ($R^2 = 0,975$, стандартна похибка становить $0,146$), а для клітин L929 — $1,59$ мкМ ($R^2 = 0,956$, стандартна похибка $0,107$).

Відомо, що клітини лінії Vero чутливі до дії DT, а клітини L929 резистентні. Вважають, що така резистентність обумовлена відмінами амінокислотного складу рецепторів DT да-

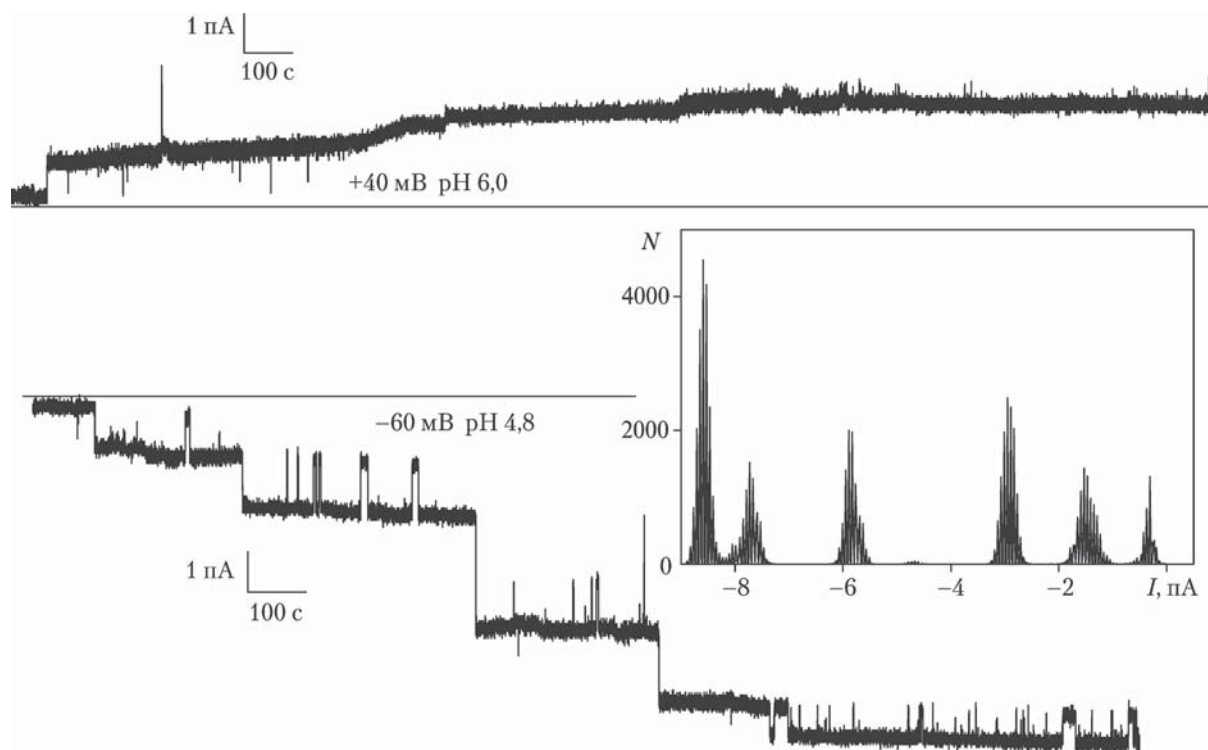


Рис. 1. Поодинокі канали SbV, синтезованої в цитоплазмі *E. coli*. На вставці знизу зображено всеточкову гістограму провідностей поодиноких каналів, одержану після обробки запису трансмембранного струму зліва. Провідності поодиноких каналів розраховано за піками гаусіанів, прикладених до кожного з піків гістограми. На записах трансмембранного струму безперервною лінією позначено нульовий струм. Потенціали прикладалися з боку БЛМ, протилежного тому, з якого знаходилася SbV. Модифікована мембрана знаходилася в розчині 1 М КСІ. Значення рН відповідають тим, що існували з боку додавання SbV. У відділенні комірці з БЛМ, до якої протеїн не додавався, рН 6,0 залишався незмінним у всіх експериментах. Кінцева концентрація протеїну в комірці становила 0,3 мкг/мл

них клітин [5]. Таким чином, отримані результати дають непряме підтвердження того, що синтезовані клітинами *E. coli* рекомбінантні похідні DT, такі як SbV і CRM197, мають однакову спорідненість з рецепторами чутливих та резистентних до токсину клітин, причому взаємодія з рецепторами має високоспецифічний характер.

Введення препарату SbV, очищеного після синтезу в цитоплазмі, периплазмі та нерозчинних тільцях включення, з боку прикладання позитивного потенціалу до БЛМ у розчині 1 М КСІ при рН 4,8 з того ж боку мембрани викликало безперешкодне, характерне для утворення іонних каналів стрибкоподібне зростання трансмембранного струму (рис. 1, 2). Пік найбільш вірогідної провідності поодиноких каналів, утворених в БЛМ препаратами SbV всіх типів, становив близько 20 пСм при потенціалі 60 мВ, що відповідало мікроскопічному трансмембранному струму 1,2 пА і збігалось з провідністю каналів CRM197, визначеною в попередньому дослідженні [1] (див. рис 1, вставка, рис. 2, вставка). Значного росту трансмембранного струму не спостерігалось, коли за тих самих умов вбудовування потенціал з боку додавання SbV змінювали на негативний або при рН середовища 6,0 і вище (див. рис. 1, 2 верхня траса). Подібна потенціало- і рН-залежність утворення іонних каналів у ФЕА-

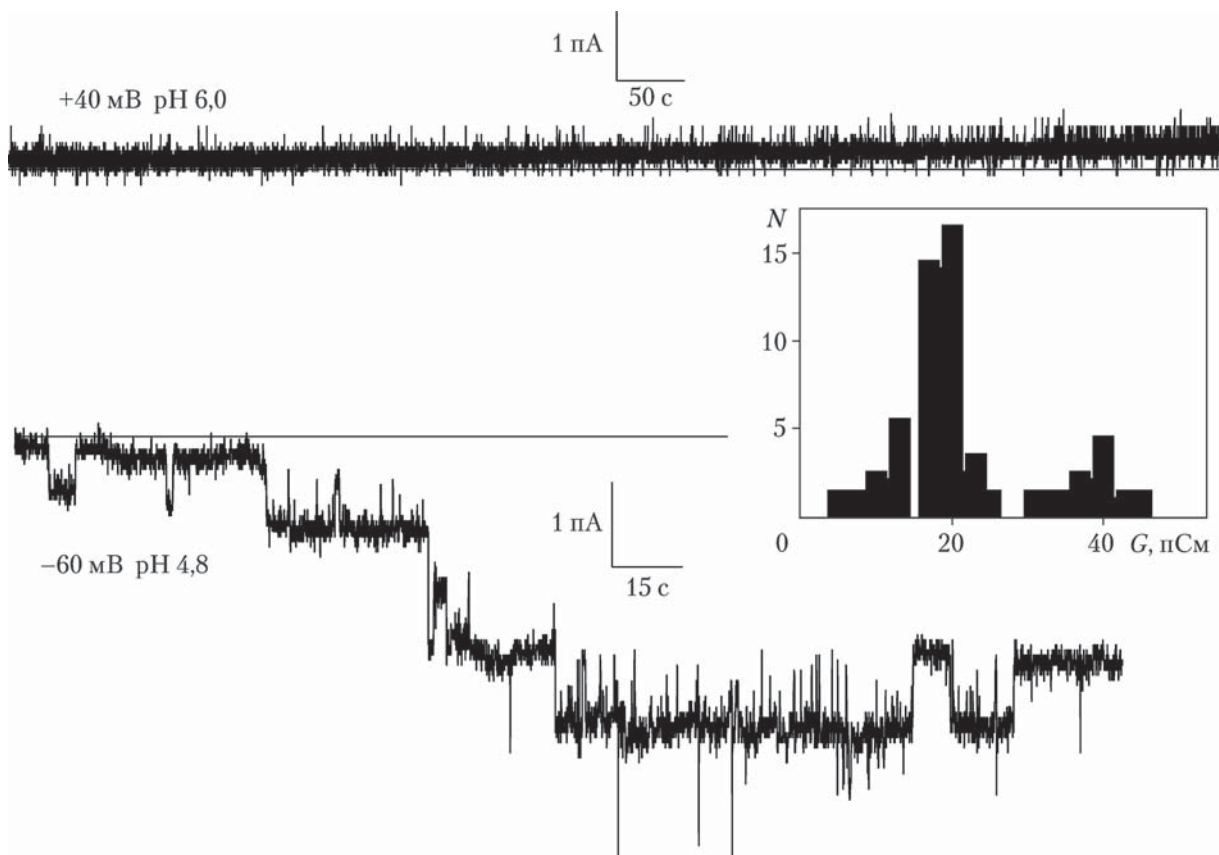


Рис. 2. Поодинокі канали SbV, синтезованої у нерозчинних тільцях включення *E. coli*. На вставці знизу показано гістограму розподілу провідностей поодиноких каналів, отриману на 70 окремих подіях. Безперервною лінією позначено нульовий струм. Потенціали прикладалися з боку БЛМ, протилежного тому, з якого знаходилася SbV. Модифікована мембрана знаходилася в розчині 1 М КСl. Значення рН відповідають тим, що існували з боку додавання SbV. У відділенні комірці з БЛМ, до якої протеїн не додавався, рН 6,0 залишався незмінним у всіх експериментах. Кінцева концентрація протеїну в комірці становила 0,3 мкг/мл

вмісний БЛМ була показана раніше для CRM197 [1] і природного DT [6]. На підставі одержаних результатів можна зробити висновок, що втрата SbV і CRM197 початкової цитотоксичності DT не позначилася на здатності рекомбінантних похідних до специфічного зв'язування з клітинами-мішенями, подальшій інтерналізації та утворенні іонних каналів, що може свідчити про відсутність будь-яких змін у структурі їхніх T- та R-доменів. Треба відзначити, що відсутність значного збільшення провідності, індукованої SbV при рН 6,0, не означала втрату здатності похідного до адсорбції на поверхні БЛМ. На користь цього припущення свідчить те, що попередня інкубація SbV, як і у випадку з CRM197 і DT, протягом 5–10 хв у комірці з мембраною при негативному потенціалі (–40 мВ) і рН 6,0 з боку додавання токсину або його похідних значно підвищувала їхню здатність до збільшення трансмембранного струму у разі подальшого зниження рН до 4,8 та зміни мембранного потенціалу на позитивний. Отже, при негативному потенціалі і рН 6,0 токсин і обидва його похідні краще адсорбуються на поверхні мембрани, тоді як зниження рН у разі позитивного потенціалу сприяє переходу зв'язаних з мембраною каналів у відкритий стан. Ос-

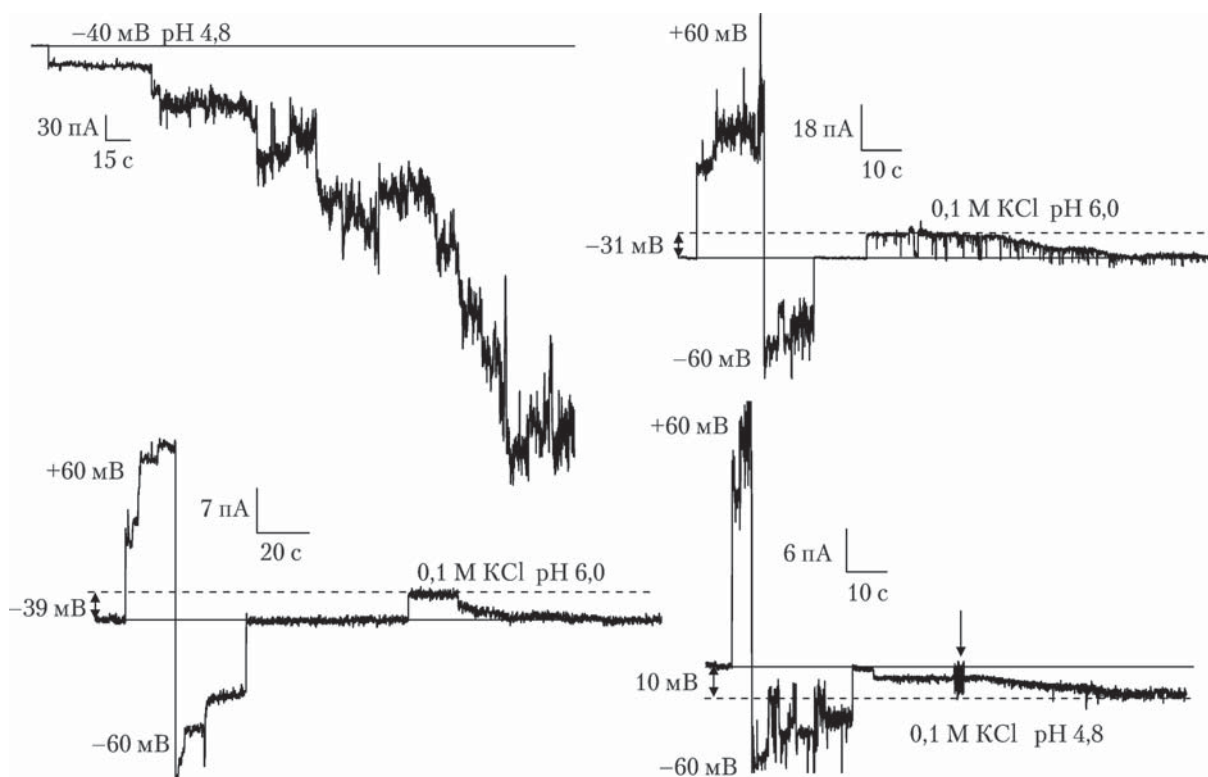


Рис. 3. Провідність, потенціалозалежність і селективність іонних каналів CRM197 (на панелях зліва) та SbV, синтезованої в твердих тільцях включення *E. coli* (на панелях справа). Безперервною лінією позначено нульовий струм. Штриховою лінією і подвійною стрілкою позначено потенціал Нернста. Стрілкою униз позначено перемішування розчину. Напругу прикладали з боку БЛМ, протилежного тому, з якого додавали протеїн. Значення рН і концентрації KCl відповідають тим, що існували з боку додавання протеїнів після заміни розчину 1 М KCl (рН 6,0). У відділенні комірки з БЛМ, до якої протеїн не додавався, 1 М KCl (рН 6,0) залишався незмінним у всіх експериментах. На верхній панелі зліва кінцева концентрація CRM197 у комірці становила 3 мкг/мл, для усіх інших випадків — 0,3 мкг/мл

танні умови цілком відповідають тим, які існують усередині ендосом або на будь-яких ділянках плазматичної мембрани, де локально зосереджена велика кількість протонів, що сприяє закисленню.

Збільшення макроскопічного струму, який відбувався за умов переходу зв'язаних з мембраною каналів у відкритий стан, включав у себе від десятків до сотень струмів через поодинокі канали, згодом досягав насичення і виходив на плато або був зупинений промиванням комірки з мембраною водно-сольовим розчином без SbV. З усіх використаних препаратів SbV лише той, що був очищений із тілець включення *E. coli*, практично не відрізнявся від CRM197 [1] та DT [6] за швидкістю, рН- і потенціалозалежністю каналоутворення (див. рис. 2). Натомість, препарати SbV, отримані із цитоплазми і периплазми *E. coli*, відрізнялися значно повільнішим утворенням поодиноких каналів та порушеннями рН- і потенціалозалежності каналоутворення, визначеними для SbV із тілець включення, CRM197 та природного токсину (див. рис. 1). Можливо, відмінності каналоутворення, визначені для SbV, синтезованої у гідрофільне середовище, пов'язані зі змінами процесів фолдингу/рефолдингу, характерних для синтезованих у нерозчинних тільцях включення SbV і CRM197.

Залежність стаціонарного струму, утвореного незмінною кількістю каналів SbV в мембрані, від знака мембранного потенціалу визначали після досягнення сталої провідності модифікованої БЛМ. Подібно до результатів попередніх досліджень [1, 6] стаціонарний макроскопічний струм, індукований SbV, збільшувався після прикладання негативного потенціалу ($-40, -60$ мВ) з боку вбудовування рекомбінантного похідного в мембрану. Натомість, зі зміною знака потенціалу на позитивний ($40, 60$ мВ) трансмембранний струм поступово зменшувався до початкового рівня сталого струму, досягнутого після завершення вбудовування каналів SbV в мембрану. Співвідношення найбільшого і найменшого струмів незмінною кількістю каналів SbV, досягнуте приблизно за півхвилини після послідовного прикладання негативного та позитивного потенціалів, дорівнює 3–4 одиницям і не змінюється для SbV, отриманої з усіх використаних джерел синтезу (рис. 3). Те ж саме співвідношення, визначене раніше для DT, становило 4,28 [1, 6]. Використана в роботі рекомбінантна SbV, як і інші іонпровідні похідні DT [1, 7], вміщують частовживаний у металоафінній хроматографії полігістидиновий таг, який може взаємодіяти з контамінантними домішками двовалентних катіонів водного середовища. Згідно з даними попередніх досліджень, зв'язування полігістидинового тагу з двовалентними катіонами збільшує стаціонарний струм через канали, утворені рекомбінантними похідними в закритому стані [1, 7]. Тому можна припустити, що незначне зменшення співвідношення сталих струмів каналами SbV у відкритому стані (при негативному потенціалі з боку вбудовування) і закритому стані (при позитивному потенціалі з боку вбудовування), порівняно з каналами DT [6], відбувається за рахунок збільшення струму через канал SbV та інших похідних з полігістидиновим тагом [1, 7] у закритому стані. Причиною збільшення струму каналами SbV у закритому стані може бути взаємодія контамінантних домішок двовалентних іонів у водно-сольовому розчині 1 М KCl або 1 М NaCl з невиданим полігістидиновим тагом, зв'язаним із залишком С-кінцевого серину R-домену в позиції 535. Виражена потенціалозалежність стаціонарного транспорту іонів каналами SbV, DT та CRM197, згідно з якою струм при негативному потенціалі з боку вбудовування в 3–4 рази перевищує такий при позитивному потенціалі з того ж боку мембрани, свідчить про однакову орієнтацію переважної більшості каналів DT та його іонпровідних рекомбінантних похідних у мембрані. Орієнтоване вбудовування іонпровідної ділянки може бути важливим у процесі інтоксикації, оскільки за таких умов каталітичний домен С опиняється назовні ендосоми [8].

Дослідження селективності каналів SbV, синтезованих у цитоплазмі, периплазмі і нерозчинних тільцях включення, показали, що за умов меншого закислення оточуючого мембрану середовища (рН 6,0) у більшості випадків потенціал Нернста змінювався в межах від -30 до -40 мВ (див. рис. 3), що свідчить про утворення каналами SbV переважної, хоча і не ідеальної селективності до катіонів, порівняно з іонами хлору. В окремих випадках потенціал Нернста досягав значень від -55 до -58 мВ, що відповідає утворенню ідеального катіон-селективного струму. Згідно з існуючими уявленнями про селективність іонних каналів, можна припустити, що причиною описаних вище змін відносної проникності модифікованої SbV мембрани за умов слабого закислення середовища (рН 6,0) від 5–10 іонів калію або натрію на 1 іон хлору до 39 катіонів на 1 аніон в ідеальному випадку є утворення отворів пор різного розміру. На отворах пор меншого розміру проникність для катіонів може зростати через зменшення відстані між карбоксильними групами негативно зарядженого

сайта каналної порожнини, що збільшує потужність утвореного ними електричного поля і силу, з якою це поле притягує катіони із оточуючого модифіковану мембрану середовища в канал. Відповідно, збільшення розміру отворів пор сприяє послабленню електричного поля, утвореного іоногенними угрупованнями каналу, і внаслідок цього зменшенню вибірконості каналу до катіонів [9]. Подібні перетворення також можуть відбуватися з позитивно зарядженими аміногрупами амфіпатичних α -шпильок, які вистеляють порожнину аніон-селективних каналів, що підтверджується змінами відносної проникності модифікованих каналами ДТ БЛМ від 7 іонів хлору на 1 катіон до 29 іонів хлору на катіон за умов більшого закислення (рН 3,5 з обох боків БЛМ) [10]. У нашому дослідженні симетричне зниження рН з обох боків мембрани до 4,8 також викликало зміну знака і величини потенціалу Нернста, який в умовах 10-кратного градієнта концентрації оточуючого модифіковану БЛМ водно-сольового розчину KCl не перевищував 10 мВ (відносна проникність $P_{Cl^-}/P_{K^+} = 1,62$) (див. рис. 3). Отриманий результат свідчить про зміну переважної катіонної селективності каналів SbV на слабку аніонну за умов більшого закислення водно-сольового середовища, що відповідає таким усередині клітини. Оскільки подібна заміна катіонної селективності на аніонну також показана для ДТ [10], можна припустити, що її причиною є відносно невисока ізоелектрична точка ДТ та його іонпровідних рекомбінантних похідних (рІ 5,8–6,0) [11,12]. Згідно з цим припущенням, збільшення кількості негативно заряджених гідроксильних груп в оточуючому мембрану середовищі за умов меншого закислення (рН 6,0) буде нейтралізувати локальний позитивний заряд аміногруп, що дає перевагу негативно зарядженим карбоксильним угрупованням α -шпильок каналної порожнини і сприяє переважній вибірконості каналу до катіонів. Натомість, за умов більшого закислення (рН 4,8) відбувається локальне протонування негативно заряджених карбоксильних груп, що дає перевагу позитивному заряду, який генерується аміногрупами білків і сприяє заміні катіонної селективності каналу на аніонну. Перевага позитивного заряду на поверхні молекул ДТ та його рекомбінантних іонпровідних похідних CRM197 і SBb за умов більшого закислення (рН 4,8) і прикладання позитивного потенціалу з боку додавання протеїнів до БЛМ також полегшує вбудовування попередньо сформованого на поверхні мембрани (при негативному потенціалі і рН 6,0) іонпровідного олігомеру.

Вірогідно, що формування катіон-селективного каналу ДТ відбувається в плазматичній мембрані ДТ-чутливої клітини після взаємодії R-домену з мембранним рецептором. Після цього поєднуються дві протилежно направлені сили, які одночасно діють на плазматичну мембрану: зтягаюча усередину клітини сила, що виникає внаслідок клітинного ендцитозу, індукованого взаємодією R-домену ДТ з мембранним рецептором, та зміна осмотичного тиску, що виникає через перевагу вхідного струму Na^+ в клітину над вихідним струмом K^+ катіон-селективним каналом ДТ і сприяє розбухання ураженої клітини [10, 13]. Подальшому розриву плазматичної мембрани, що передують утворенню ендосом, може сприяти значне збільшення розмірів іонпровідних пор ДТ внаслідок концентрування розчинної форми токсину навколо збагачених на ДТ-рецептори ділянок плазматичної мембрани. На користь останнього припущення свідчить подвоєння провідності поодиноких каналів рекомбінантних похідних SbV (див. рис. 1, вставка, 2, вставка), CRM197 [1], V_{45} і CRM45 [14], утворених при концентраціях 0,3–0,5 мкг/мл та щонайменше 30–50-кратне збільшення провідностей поодиноких каналів CRM197 (див. рис. 3) і SbV (дані не показа-

ні), досягнуте при концентрації 3 мкг/мл. Зміна четвертинної будови іонпровідного олігомеру DT від тетрамеру з провідністю 20 пСм до значно більших структур з провідністю 600–1000 пСм дає підставу припустити існування двох різних типів токсичної дії, пов'язаних з утворенням катіон-селективних каналів DT у плазматичній мембрані DT-чутливих клітин. Спочатку відбувається індуковане тетрамером DT зниження мембранного градієнта іонів натрію, що змінює потенціал спокою клітини [13]. Після цього збільшення розміру іонпровідних пор може сприяти локальним розривам мембрани, необхідним для утворення ендосом і лізису ураженої клітини внаслідок виходу її життєво необхідних складових порами великого розміру. В ендосомах цитотоксичність DT здійснюється шляхом транслокації каталітичного С-домену аніон-селективними каналами DT в цитоплазму. Концентраційно-залежні перетворення четвертинної будови також можуть відбуватись з іншими α -пороформуючими токсинами, у яких іонпровідний домен сформований амфіпатичними α -шпильками. Так, наприклад, іонпровідний катіон-селективний тетрамер гемолізину морської актинії *Radianthus macrodactylus*, RTX-A з діаметром пори 10–11 Å, утворений у плазматичній мембрані еритроцита, не здатний до вивільнення гемоглобіну, розмір молекули якого становить близько 67 Å. Натомість, підвищення концентрації токсину призводить до значного збільшення провідності і, відповідно, отворів пор RTX-A, що може стати причиною лізису еритроцита внаслідок втрати гемоглобіну [15].

Таким чином, отримані нами результати підтверджують можливість існування катіон-селективного каналу DT за умов слабого закислення водно-сольового середовища, що відповідає умовам утворення каналів DT у плазматичній мембрані клітин-мішеней. Причому концентрування DT навколо збагачених на рецептори ділянок плазматичної мембрани може призводити до значного збільшення розміру отворів його пор, що сприятиме ендцитозу і може стати причиною лізису клітини внаслідок вивільнення її водорозчинних складових. Шляхом порівняльного аналізу показано, що характеристики утворення каналів DT найбільше відповідають таким для іонпровідних рекомбінантних похідних, що були отримані ренатурацією в умовах *in vitro* із тілець включення *E.coli*. Непрямим методом показано специфічність взаємодії SbB та CRM197 з рецепторами чутливих і резистентних до DT клітин, а також однакову афінність даних протеїнів до рецепторів чутливих і резистентних видів.

Автори висловлюють глибоку вдячність Dr. A.N. Chanturiya із фірми Eastern Scientific LLC, Rockville, США за допомогу, надану у встановленні обладнання для вимірювання іонпровідних властивостей БЛМ і обробці результатів з використанням спеціального програмного забезпечення.

Всеточкова гістограма розподілу провідностей поодиноких каналів побудована канд. біол. наук Л.О. Касаткіною з відділу нейрохімії Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України з використанням спеціального програмного забезпечення.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Манойлов К.Ю., Горбатьок О.Б., Усенко М.О., Шатурський О.Я., Борисова Т.О., Колибо Д.В. Охарактеризування очищеного рекомбінантного протеїну CRM197 як інструмента дослідження дифтерійного токсину. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2016. № 9. С. 124–133. doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2016.09.124>.
2. Кабернюк А.А., Олійник О.С., Редчук Т.А., Романюк С.І., Колибо Д.В., Комісаренко С.В. Клонування генів рекомбінантних субодиниць дифтерійного токсину *Corynebacterium diphtheriae* та їх експресія в клітинах *Escherichia coli*. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2008. № 3. С. 160–166.

- Glover D.M., Hames B.D. DNA Cloning: A Practical Approach. Vol. 2: Expression Systems. Oxford: Oxford Univ. Press, 1999. 276 p.
- Mather S.J. Current Directions in Radiopharmaceutical Research and Development. Dordrecht: Springer, 1996. 240 p.
- Abraham J.A., Damm D., Bajardi A., Miller J., Klagsbrun M., Ezekowitz R.A. Heparin-binding EGF-like growth factor: characterization of rat and mouse cDNA clones, protein domain conservation across species, and transcript expression in tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993. **190**. P. 125–133.
- Donovan J.J., Simon M.I., Draper R.K., Montal M. Diphtheria toxin forms transmembrane channels in planar lipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1981. **78**, № 1. P. 172–176.
- Senzel L., Huynh P.D., Jakes K.S., Collier R.J., Finkelstein A. The diphtheria toxin channel-forming T domain translocates its own NH₂-terminal region across planar bilayers. *J. Gen. Physiol.* 1998. **112**. P. 317–324.
- Kagan B.L., Reich K.A., Collier R.J. Orientation of the diphtheria toxin channel in lipid bilayers. *Biophys. J.* 1984. **45**. P. 102–104.
- Shatursky O.Ya., Kasatkina L.A., Rodik R.V., Cherenok S.O., Shkrabak A.A., Veklich T.O., Borisova T.A., Kosterin S.O., Kalchenko V.I. Anion carrier formation by calix[4]arene-bis-hydroxymethylphosphonic acid in bilayer membranes. *Org. Biomol. Chem.* 2014. **12**. P. 9811–9821.
- Hoch D.H., Romero-Mira M., Ehrlich B.E., Finkelstein A., DasGupta B.R., Simpson L.L. Channels formed by botulinum, tetanus, and diphtheria toxins in planar lipid bilayers: relevance to translocation of proteins across membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1985. **82**. P. 1692–1696.
- Proia R. L., Wray S. K., Hart D. A., Eidels L. Characterization and affinity labeling of the cationic phosphate-binding (nucleotide-binding) peptide located in the receptor-binding region of the B-fragment of diphtheria toxin. *J. Biol. Chem.* 1980. **255**. P. 12025–12033.
- Духовлинов И.В., Федорова Е.А., Богомолова Е.Г., Добровольская О.А., Черняева Е.Н., Аль-Шехадат Р.И., Симбирцев А.С. Получение рекомбинантного белка CRM197 в клетках *E. coli*. *Инфекция и иммунитет*. 2015. **5**, № 1. С. 37–44.
- Papini E., Sandoná D., Rappuoli R., Montecucco C. On the membrane translocation of diphtheria toxin: at low pH the toxin induces ion channels on cells. *EMBO J.* 1988. **7**. P. 3353–3359.
- Misler S. Diphtheria toxin fragment channels in lipid bilayer membranes. *Biophys. J.* 1984. **45**. P. 107–109.
- Чантурия А.Н. Шатурський О.Я., Лишко В.К., Монастырня М.М., Козловская Э.П. Взаимодействие токсина морской актинии *Radianthus macrodactylus* с бислойними фосфолипидными мембранами. *Биол. мембраны*. 1990. **7**. С. 763–769.

Надійшло до редакції 03.10.2016

REFERENCES

- Manoilov, K. Yu., Gorbatiuk, O. B., Usenko, M. O., Schatursky, O. Ya., Borisova, T. O., Kolybo, D. V. (2016). *Dopov. Nac. acad. nauk Ukr.* No 9, pp. 124-133 (in Ukrainian). <https://doi.org/10.15407/dopovidi2016.09.124>
- Kaberniuk, A. A., Oliinyk, O. S., Redchuk, T. A., Romaniuk, S. I., Kolybo, D. V., Komisarenko, S. V. (2008). *Dopov. Nac. acad. nauk Ukr.* No 3, pp. 160-166 (in Ukrainian).
- Glover, D. M., Hames, B. D. (1999). *DNA Cloning: A Practical Approach, Vol. 2, Expression Systems*, Oxford: Oxford Univ. Press,
- Mather, S. J. (1996). *Current Directions in Radiopharmaceutical Research and Development*, Dordrecht: Springer.
- Abraham, J. A., Damm, D., Bajardi, A., Miller, J., Klagsbrun, M., Ezekowitz, R. A. (1993). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 190, pp.125-133.
- Donovan, J. J., Simon, M. I., Draper, R. K., Montal, M. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, No 1, pp. 172-176.
- Senzel, L., Huynh, P. D., Jakes, K. S., Collier, R. J., Finkelstein, A. (1998). *J. Gen. Physiol.*, 112, pp. 317-324.
- Kagan, B. L., Reich, K. A., Collier, R. J. (1984). *Biophys. J.*, 45, pp. 102-104.
- Shatursky, O. Ya., Kasatkina, L. A., Rodik, R. V., Cherenok, S. O., Shkrabak, A. A., Veklich, T. O., Borisova, T. A., Kosterin, S. O., Kalchenko, V. I. (2014). *Org. Biomol. Chem.*, 12, pp. 9811-9821.
- Hoch, D. H., Romero-Mira, M., Ehrlich, B. E., Finkelstein, A., DasGupta, B. R., Simpson, L. L. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82, pp. 1692-1696.
- Proia, R. L., Wray, S. K., Hart, D. A., Eidels, L. (1980). *J. Biol. Chem.*, 255, pp. 12025-12033.

12. Dukhovlinov, I. V., Fedorova, E. A., Bogomolova, E. G., Dobrovolskaya, O. A., Chernyaeva, E. N., Al-Shekhadat, R. I., Simbirtsev, A. S. (2015). *Rus. J. Infection and Immunity*, 5, No 1, pp. 37-44 (in Russian).
13. Papini, E., Sandoná, D., Rappuoli, R., Montecucco, C. (1988). *EMBO J.*, 7, pp. 3353-3359.
14. Misler, S. (1984). *Biophys J.*, 45, pp. 107-109.
15. Chanturia, A. N., Shatursky, O. Ya., Lishko, V. K., Monastyrnaya, M. M., Kozlovskaya, E. P. (1990). *Biol. Membrany*, 7, pp. 763-769 (in Russian).

Received 03.10.2016

К.Ю. Манойлов¹, О.Б. Горбатюк^{2,3}, М.О. Усенко^{2,3}, О.Я. Шатурский¹,
Т.А. Борисова¹, Д.В. Колибо¹, С.В. Комисаренко¹

¹ Інститут біохімії ім. О.В. Палладина НАН України, Київ

² Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ

³ ГУ "Інститут генетическої та регенеративної медицини НАМН України", Київ

E-mail: manoilovmail@gmail.com; olegshatursky@biochem.kiev.ua

ХАРАКТЕРИСТИКА ОЧИЩЕНОЇ РЕКОМБІНАНТНОЇ СУБЪЕДИНИЦІ В ДИФТЕРІЙНОГО ТОКСИНА ЯК ІНСТРУМЕНТА ЕГО ІССЛЕДОВАНИЯ

Очистка препаратов рекомбинантной субъединицы В (SbB) дифтерийного токсина (DT), синтезированной в цитоплазме, периплазме и твердых тельцах включения клеток *Escherichia coli*, проведенная с помощью металлоаффинной хроматографии после разрушения бактериальной ДНК и клеточной стенки энзимами, позволила удалить примеси эндогенных пороформирующих белков. Показано, что рекомбинантные производные DT, SbB и CRM197 имеют одинаковое сродство с рецепторами чувствительных и резистентных к токсину клеток линий Vero і L929. Приложение положительного потенциала со стороны добавления SbB (0,3 мкг/мл) к фосфатидилэтаноламинсодержащей бислоистой мембране в растворе 1 М KCl (pH 4,8) приводит к образованию потенциалозависимых ионных каналов с проводимостью 20 пСм, как показано в классических исследованиях DT природного происхождения. Согласно данным сравнительного анализа, характерное для DT образование и функционирование каналов лучше воспроизводятся SbB, синтезированной в неактивной форме в виде телец включения, и ренатурированной *in vitro*.

Ключевые слова: дифтерийный токсин, субъединица В, CRM197, бислоистые липидные мембраны, ионные каналы.

К.Ю. Манойлов¹, О.Б. Горбатыук^{2,3}, М.О. Усенко^{2,3}, О.Я. Шатурский¹,
Т.А. Борисова¹, Д.В. Колибо¹, С.В. Комисаренко¹

¹ Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine, Kiev

² Institute of Molecular Biology and Genetics of the NAS of Ukraine, Kiev

³ State Institute of Genetic and Regenerative Medicine of the NAMS of Ukraine, Kiev

E-mail: manoilovmail@gmail.com; olegshatursky@biochem.kiev.ua

THE CHARACTERIZATION OF PURIFIED RECOMBINANT FRAGMENT B AS A TOOL TO STUDY DIPHTHERIA TOXIN

The purification of recombinant diphtheria toxin (DT) derivative, fragment or subunit B (SbB) synthesized in cytoplasm, periplasm, and solid inclusion bodies of *E.coli*, by metal-affinity chromatography following the enzymatic digestion of bacterial cell walls and DNA allowed us to avoid the contamination by endogenous pore-forming proteins. The recombinant DT derivatives, SbB, and CRM197 are shown to bind the receptors of DT-susceptible cells Vero and non-susceptible cells L929 with equal affinity. The introduction of SbB (0.3 μg/ml) at positive voltages from the side of a phosphatidylethanolamine-containing bilayer membrane, where the derivative was added, results in the creation of potential-dependent ionic channels with the conductance of 20 pS in the bathing solution of 1M KCl buffered at pH 4.8 as had been shown in the classic studies of wild-type DT. The comparative analysis has shown that the channel-forming abilities of wild-type DT are best reproduced by SbB synthesized in the non-active form of inclusion bodies and renatured *in vitro*.

Keywords: diphtheria toxin, fragment B, CRM197, bilayer lipid membranes, ionic channels.