



<http://dx.doi.org/10.15407/dopovidi2016.09.124>

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

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

²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

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

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

Охарактеризування очищеного рекомбінантного протеїну CRM197 як інструмента дослідження дифтерійного токсину

(Представлено академіком НАН України С.В. Комісаренком)

Очищення експресованого в клітинах *Escherichia coli* нетоксичного дифтерійного токсоїду CRM197, проведене за допомогою металоафінної хроматографії після руйнування бактеріальної ДНК та клітинної стінки ензимами, дало можливість позбутися домішок ендогенних пороформуючих протеїнів. Показано, що мічений флуоресцеїн ізотіоціанатом препарат CRM197 виявляв здатність до зв'язування та інтерналізації клітинами ссавців ліній Vero та L929. Прикладання позитивного потенціалу з боку додавання CRM197 (2–20 нМ) до фосфатидилетаноламінвмісної бішарової мембрани (БЛМ) у розчині 1 М КСl (рН 4,8) призводило до утворення потенціалозалежних іонних каналів з провідністю 20 пСм, як показано у класичних дослідженнях дифтерійного токсину природного походження. Енергія активації, визначена для стаціонарного струму через базатоканальну БЛМ у розчині 1 М КСl (рН 6,0) та самого розчину без БЛМ, становила $2,967 \pm 0,167$ і $2,933 \pm 0,115$ ккал/моль відповідно, що свідчить про утворення протеїном CRM197 трансмембранної водної пори.

Ключові слова: дифтерійний токсин, токсоїд, CRM197, бішарові ліпідні мембрани, мембранні канали.

Сучасні досягнення молекулярної біології зробили можливими дослідження структури і функцій дифтерійного токсину (DT) за допомогою рекомбінантних похідних суцільного токсину та його фрагментів. Одне із них, нетоксичне рекомбінантне похідне DT, відоме

© К.Ю. Манойлов, О.Б. Горбатюк, М.О. Усенко, О.Я. Шатурський, Т.О. Борисова, Д.В. Колибо, 2016

як дифтерійний токсоїд CRM197, було отримано за допомогою сайт-специфічного мутагенезу шляхом заміни гліцину в позиції 52 гена DT на глютамінову кислоту [1]. Втрата каталітичної активності субодиниці А молекули CRM197, яка виникла внаслідок такої заміни, була настільки значною, що, порівняно з природним DT, його похідне майже позбулося цитотоксичності [2]. Незважаючи на втрачену токсичність, усі інші структурні компоненти молекули DT залишилися в CRM197 без змін, включно з іонпровідним T-доменом, здатним до утворення іонних каналів у клітинній мембрані [3] та відповідальним за зв'язування DT із клітинним рецептором R-доменом. CRM197 та інші різноманітні рекомбінантні похідні DT застосовуються для потреб молекулярної біотехнології, а також у медичній практиці, головним чином для створення вакцин і проведення протипухлинної терапії [1, 2]. Незначні зміни первинної структури DT майже не впливають на основні властивості та функції рекомбінантного протеїну, що зберігаються такими ж, як і у природного аналога. Проте іноді навіть незначна на перший погляд зміна структури молекули, отримання протеїну в різних системах експресії та очищення за жорстких умов можуть призводити до серйозних порушень чи втрати звичайних властивостей і функцій, або навіть появи нових, які відсутні у природного аналога. Передбачити такі зміни рекомбінантних протеїнів на підставі лише теоретичних відомостей не завжди можливо. Тому будь-який рекомбінантний продукт потребує ретельного охарактеризування та порівняння з природним аналогом, який утворюється у властивому йому організмі-продуценті. Ми ставили за мету дослідження взаємодії одержаного нами препарату CRM197 з клітинами та штучними мембранами для перевірки збереження ним якостей, притаманних DT, а саме – здатності до зв'язування з клітинним рецептором, інтерналізації в цитоплазму в ендосомах та утворення іонпровідних каналів.

Експериментальна частина. Експресію CRM197 проводили в клітинах *Escherichia coli* штаму BL21 (DE3) Rosetta. Одержання відповідних генетичних конструкцій на основі вектора *pET-28a(+)* було описане в [1]. Нарощування клітин продуцента з плазмідною *pET-28a(+)-CRM197* та експресію проводили на поживному середовищі LB або 2×YT з канаміцином. Експресію індукували додаванням ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозиду як описано в [1] або методом автоіндукції згідно з [4]. Для одержання рекомбінантного продукту з *E. coli* клітини руйнували ультразвуком або шляхом осмотичного лізису в розчині, що містив лізоцим курячих яєць, з подальшою обробкою ультразвуком за наявності дезоксихолату натрію. ДНК бактерій руйнували ультразвуком або за допомогою ДНКаз I. Одержували CRM197 із бактерій у денатуруючих умовах з подальшою ренатурацією (рефолдингом) *in vitro* методом розведення у великому об'ємі або шляхом діалізу [5]. Як хаотропні агенти використовували розчини 8 М сечовини та 6 М гуанідин гідрохлориду.

Препарати CRM197 для отримання кон'югатів із флуоресцеїн ізотіоціанатом (FITC) та забарвлення ними клітин одержували шляхом рефолдингу безпосередньо з розчину солубілізованих відмитих бактеріальних тілець включення без додаткових стадій очищення. Очищення токсоїду для вбудовування в бішарову ліпідну мембрану (БЛМ) здійснювали за допомогою металоафінної хроматографії (IMAC) на Ni-NTA агарозі. Елюцію CRM197 проводили в тому самому розчині з 500 мМ імідазолу. Концентрацію CRM197 та вміст сторонніх протеїнів в отриманих пробах оцінювали за допомогою SDS-PAGE аналізу. Очищений CRM197 був мічений реакцією кон'югації з FITC. Реакцію бичачого

сироваткового альбуміну (BSA) з FITC проводили за такою ж процедурою. Ефективність кон'югації оцінювали на пластинках SDS-PAGE під ультрафіолетовим світлом. Зв'язування та інтерналізацію міченого FITC CRM197 *in vitro*, а також цитотоксичність CRM197, порівняно з нативним токсином, досліджували на DT-чутливих клітинах лінії Vero та DT-резистентних клітинах лінії L929. Ріст клітин обох ліній підтримували в середовищі RPMI-1640 з L-глутаміном, 5 % ембріональною бичачою сироваткою та антибіотиками. Перед проведенням МТТ-тесту клітини L929 та Vero вирощували у 96-луноквих планшетах з різною концентрацією CRM197 та DT (в еквімолярних кількостях) на тому ж середовищі протягом доби.

Для дослідження впливу CRM197 на ліпідний бішар використовували БЛМ, сформовані з розчину промислових препаратів фосфатидилетаноламіну (ФЕА) “фосфатидилетаноламін-стандарт” яєчного жовтка (Харківське ЗАТ “Біолек”, Україна) і фосфатидилхоліну (ФХ) “лецитин-стандарт” яєчного жовтка (Харківське ЗАТ “Біолек”, Україна) або тих самих ліпідів, очищених за методом колонкової хроматографії к.б.н. І. О. Трикаш у Інституті біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України. Суміш ФЕА:ФХ розчиняли в *n*-гептані у співвідношенні 1:1 при загальній концентрації ліпідів 20 мг/мл. Отриманий у результаті розчин ліпідів наносили на отвір у тefлоновому стаканчику (об'єм 1 мл) з діаметром 0,6 мм або дельриновому стаканчику (об'єм 1 мл) з діаметром 0,15 мм (Warner Instruments, Inc., США). Формування ліпідного бішару спостерігали візуально у відображеному світлі за допомогою біокулярного мікроскопа. Водно-сольовий розчин, який оточував мембрану, містив 10 мМ *трис*-HCl (рН 6,0 або 4,8) та задану кількість хлориду калію. Для вимірів провідності мембрани використовували хлоросрібні електроди, занурені в розчин 2 М KCl з агаровими містками. Різниця потенціалів прикладалась до мембрани від джерела напруги, що давало можливість отримувати постійну (від -150 до 150 мВ) або лінійно змінювану напругу зі швидкістю 60 мВ/хв, використовуючи той самий діапазон амплітуд. Напругу, прикладену до мембрани, контролювали за допомогою цифрового вольтметра. Трансмембранний струм реєстрували за допомогою операційного підсилювача, до інвертувального входу якого приєднувався опір зворотного зв'язку 1 ГОм (власне виготовлення Dr. A. N. Chanturiya в Інституті біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України або науковій фірмі Eastern Scientific LLC, Rockville, США). Записи струму фільтрували при смузі пропускання 0,1 кГц. Оточуючий мембрану водно-сольовий розчин перемішували магнітною мішалкою. Лінійно змінювану або постійну температуру водно-сольового середовища в комірці з БЛМ у межах від 4 до 40 °C прикладали за допомогою трьох напівпровідникових термобатарей ТЕМО-3 (Львівський завод “Електронприладмаш”, Україна). Безперервне перемішування оточуючого мембрану розчину давало можливість позбутися похибки, пов'язаної з нерівномірністю нагрівання або охолодження його різних шарів. Провідність водно-сольового розчину без мембрани визначали за допомогою кондуктометра Radelkis ОК 102/1 (Угорщина).

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

Результати та їхнє обговорення. Завдяки використаному методу автоіндукції вдалося значно збільшити експресію CRM197. Причому, рівень експресії досягав 23 % загальної

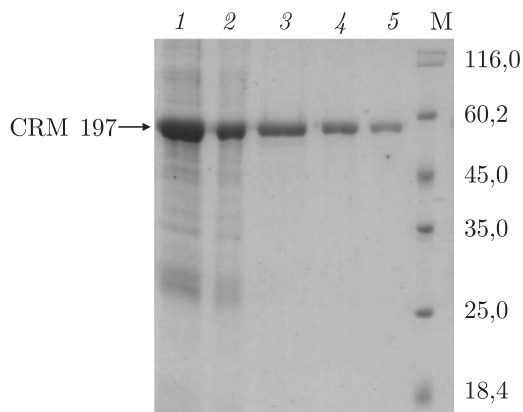


Рис. 1. Експресія та очищення CRM197: 1, 2 – ізольовані відмиті тільця включення із клітин *E. coli* після експресії CRM197 у середовищі автоіндукції; 3–5 – CRM197, очищений на Ni-NTA агарозі; М – маркери молекулярної маси

кількості протеїнів *E. coli*, що становить близько 420 мг протеїну на 1 л культури клітин. Показано, що після проведення процедур експресії CRM197 практично повністю виявлявся в нерозчинній фракції лізату клітин *E. coli* – цитоплазматичних тільцях включення. Бактеріальні тільця включення містять незначну кількість домішок, які в деяких випадках можуть складатися на 95–98 % із цільового протеїну [6]. Оскільки використані в роботі живі клітини мають на своїй поверхні рецептори, що вибірково зв'язують DT і його похідні, мінімальне очищення цільового протеїну з тілець включення цілком відповідало потребам перевірки здатності рекомбінантних молекул взаємодіяти з рецепторами на клітинах. Треба відзначити, що препарати CRM197, отримані з тілець включення згідно зі спрощеним протоколом виділення, мали набагато вищий вміст токсоїду порівняно з такими після ретельнішого очищення на Ni-NTA агарозі. Тому спрощений метод отримання препарату CRM197 також був застосований для перевірки наявності зв'язування та інтерналізації клітинами методом конфокальної мікроскопії.

Згідно з даними SDS-PAGE, використання ІМАС значно збільшувало ступінь очищення, що дало можливість довести кількість CRM197 у препараті, солюбілізованому з тілець включення, приблизно до 95 % (лінії 3–5 на рис. 1). Однак позбутися пороформуєчих бактеріальних домішок, що спричиняли небажану іонну провідність у БЛМ, яка утруднювала дослідження цільового об'єкта, вдалося лише після застосування ензиматичних методів руйнування клітинних стінок та ДНК *E. coli*.

Вагомим доказом відсутності цитотоксичності отриманого препарату CRM197 став результат МТТ-тесту на клітинах лінії Vero, що використовуються як модель клітин з високою чутливістю до дії DT [7–9]. Порівняно із CRM197, який не спричинював зниження кількості живих клітин у дослідних пробах, кількість життєздатних клітин Vero зменшувалася майже вдвічі після їх обробки DT в однакових з CRM197 молярних концентраціях. Отже, отриманий CRM197 виявився цілком безпечним для роботи без застосування спеціалізованих заходів безпеки проти особливо токсичних речовин.

Залежний від часу розподіл міченого FITC CRM197 у клітинах досліджували за змінами в часі зображень клітин Vero та L929 на конфокальних знімках (дані не наведено). Показано, що CRM197-FITC в основному розташовувався на поверхні та в цитоплазмі клітин.

На підставі результатів порівняльного аналізу даних розподілу мічених FITC CRM197 та BSA в клітинах зроблено висновок, що зв'язування CRM197 з клітинами є специфічним. За умов інкубації клітин за наявності 10 мкМ феніларсин оксиду (ФАО), який інгібує формування ендосом [10], флуоресцентна мітка знаходилась переважно не в цитоплазмі, а на поверхні клітини. Це свідчить про те, що інтерналізація CRM197-FITC у клітини відбувається як рецепторзалежний активний процес. Натомість видалення ФАО із середовища інкубації призводило до переважної локалізації CRM197-FITC у цитоплазмі.

Введення CRM197 з боку прикладання позитивного потенціалу до БЛМ у розчині 1 М КСІ (рН 4,8) з того ж боку мембрани зумовило безперешкодне, характерне для утворення іонних каналів стрибкоподібне зростання трансмембранного струму. Кінцева концентрація CRM197 у комірці з БЛМ становила від 2 до 20 нМ (рис. 2, нижня траса, вставка). Провідність поодиноких каналів, утворених CRM197 у БЛМ при потенціалі +60 мВ, становила приблизно 20 пСм, що відповідало мікроскопічному трансмембранному струму 1,2 пА. Слід відзначити, що в тих самих умовах значного зростання трансмембранного струму не спостерігалось, якщо потенціал з боку додавання токсоїду змінювали на негативний або при рН середовища 6,0 і вище (див. рис. 2, посередині). Подібна потенціало- і рН-залежність утворення іонних каналів такої ж провідності у ФЕА-вмісній БЛМ показана раніше в класичних дослідженнях каналів природного DT [3]. Отже, втрата CRM197 початкової цитотоксичності DT не позначилася на здатності токсоїду до специфічного зв'язування з клітинами-мішенями, подальшій інтерналізації, а також на утворенні CRM197 іонних каналів, що підтверджується відсутністю будь-яких змін у структурі його T- і R-доменів. Відсутність значного збільшення CRM197-індукованої провідності при рН 6,0 не означала втрату токсоїдом здатності до адсорбції на поверхні БЛМ. На користь останнього припущення свідчить те, що попередня інкубація CRM197 протягом 5–10 хв у комірці з мембраною при негативному потенціалі (–40 мВ) і рН 6,0 з боку додавання токсоїду значно підвищувала його здатність до збільшення трансмембранного струму при подальшому зниженні рН і зміні мембранного потенціалу на позитивний. Таким чином, при негативному потенціалі і рН 6,0 CRM197 краще адсорбується на поверхні мембрани, тоді як при позитивному потенціалі зменшення рН приблизно до 4,8 сприяє переходу вже зв'язаних з мембраною каналів токсоїду у відкритий стан. Останні умови цілком відповідають тим, що існують усередині ендосом або на будь-яких ділянках плазматичної мембрани, де локально зосереджена велика кількість протонів [3].

Треба відзначити, що після переходу каналів CRM197 у відкритий стан при рН 4,8 подальша зміна знаку мембранного потенціалу з боку додавання токсоїду на негативний не перешкоджала існуванню довговідкритих станів утворених ним каналів (див. рис. 2, зверху). Можливо, що така властивість сприяє збільшенню індукованого CRM197 сталого макроскопічного струму в разі прикладання негативного потенціалу з боку вбудовування токсоїду в мембрану (див. рис. 3, а). Збільшення макроскопічного струму, який 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 CRM197. Визначення залежності стаціонарного струму, утвореного незмінною кількістю каналів CRM197 у мембрані, від знаку мембранного потенціалу проводили після досягнення сталої провідності модифікованої БЛМ.

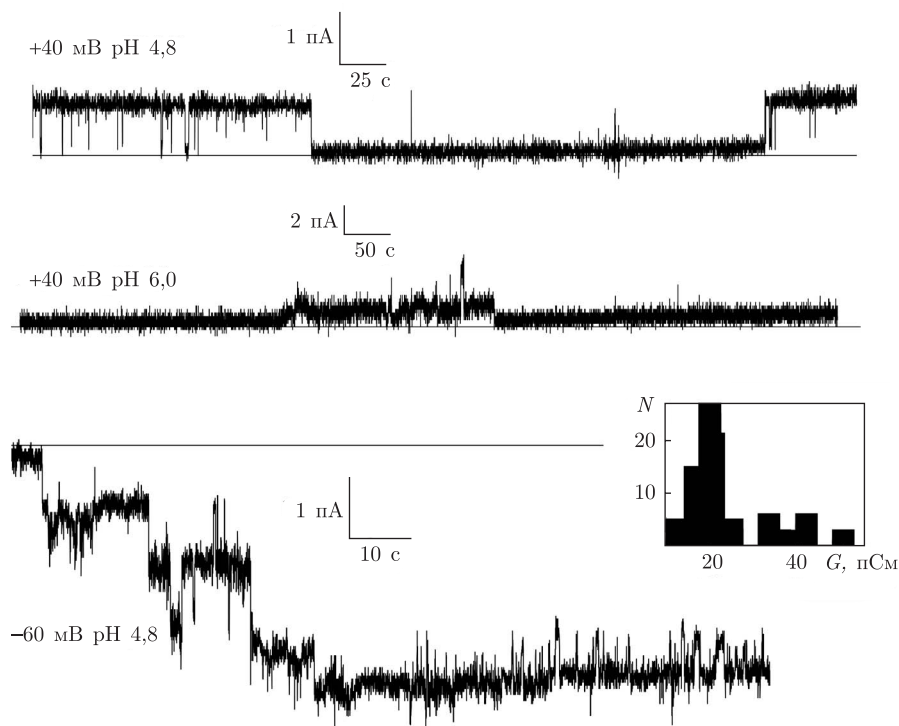


Рис. 2. Поодинокі канали CRM197 у БЛМ. На вставці знизу – гістограма розподілу провідностей поодиноких каналів, отримана на 80-ти окремих подіях. Безперечною лінією на трасах каналів позначено нульовий струм. Потенціали прикладалися з боку БЛМ, протилежного тому, де знаходився CRM197. Значення рН відповідають тим, що існували з боку додавання CRM197. У відділенні комірки з БЛМ, до якого CRM197 не додавався, рН 6,0 залишався незмінним у всіх експериментах. Кінцева концентрація CRM197 у комірці становила 2 нМ

Показано, що подібно до результатів класичних досліджень стаціонарний макроскопічний струм, індукований CRM197, збільшувався після прикладання негативного потенціалу (-40, -60 мВ) з боку вбудовування токсоду в мембрану [3]. Натомість наступна зміна знаку потенціалу на позитивний (+40, +60 мВ) поступово зменшувала трансмембранний струм. Співвідношення найбільшого та найменшого струмів незмінною кількістю каналів CRM197 у БЛМ, досягнуте приблизно за півхвилини після послідовного прикладання негативного та позитивного потенціалів, дорівнює 3–4 одиницям. Те саме співвідношення, визначене раніше для DT, становило 4,28 [3]. Відомо, що полігістидиновий таг дифтерійного токсоду та інших похідних DT, який широко використовується у металоафінній хроматографії, може взаємодіяти з контамінантними домішками двовалентних катіонів водного середовища після вбудовування в мембрану [11]. Причому зв'язування полігістидинового тагу з двовалентними катіонами збільшувало струм через канал у закритому стані. Тому можна припустити, що незначне зменшення співвідношення сталих струмів каналами CRM197 у відкритому стані (при негативному потенціалі з боку вбудовування) і закритому стані (при позитивному потенціалі з боку вбудовування), порівняно з каналами DT [3], відбувається за рахунок збільшення струму через канал токсоду в закритому стані. Причиною збільшення струму каналами CRM197 у закритому стані може бути взаємодія контамінантних домішок двовалентних іонів у водно-сольовому розчині 1 М КСІ з невидаленим полігістидиновим

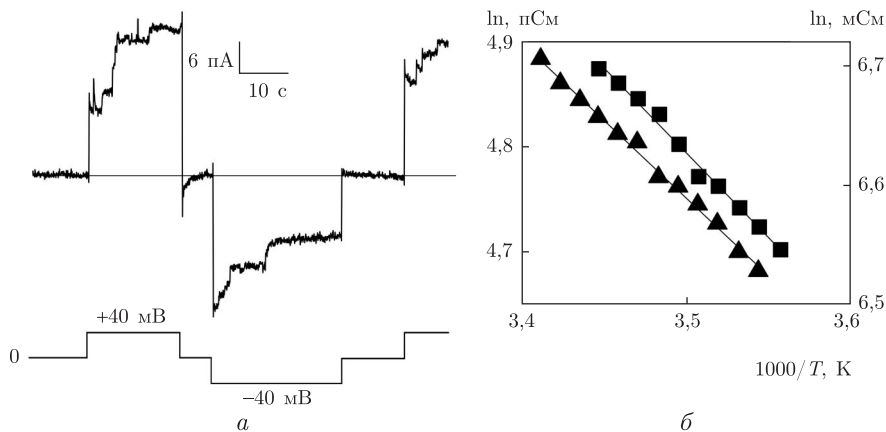


Рис. 3. Залежність стаціонарного макроскопічного струму каналами CRM197 від мембранного потенціалу і температури водно-сольового оточення. Оточуючий БЛМ розчин вміщував 1 М КСl (рН 6,0). *a* – запис струму через багатоканальну БЛМ, модифіковану CRM197; знизу показано потенціал, прикладений до БЛМ з боку, до якого CRM197 не додавався. Безперервна лінія посередині позначає нульовий струм.

б – залежність провідності водно-сольового розчину від температури без мембрани (▲) (провідність на шкалі справа); з модифікованою мембраною (■) (провідність на шкалі зліва). Запис струму через багатоканальну БЛМ проводили при потенціалі -40 мВ з боку мембрани, до якого CRM197 не додавався. Кінцева концентрація CRM197 у комірках становила 20 нМ

тагом CRM197, що зв'язаний із залишком С-кінцевого серину в позиції 535 R-домену CRM197. Виражена потенціалозалежність стаціонарного транспорту іонів каналами CRM197 та DT, згідно з якою струм при негативному потенціалі з боку вбудовування у 3–4 рази перевищує такий при позитивному потенціалі з того ж боку мембрани, свідчить про однакову орієнтацію переважної більшості каналів DT і його похідного в мембрані. Вірогідно, що така орієнтація каналів токсину та його похідного має фізіологічне значення для процесу інтоксикації, оскільки каталітичний домен DT і CRM197 опиняються з боку мембрани, що протилежний тому, де відбувалося вбудовування [12].

Зміна температури в інтервалі між 5 та 30 °С не чинила впливу на незначну провідність немодифікованої БЛМ. Однак провідність модифікованої сталою кількістю каналів CRM197 мембрани зростала з підвищенням температури водно-сольового оточення мембрани. Натомість зниження температури середовища, в якому знаходилася та сама модифікована мембрана, призводило до зменшення її провідності. Значення провідності каналів CRM197, отримані під дією лінійно змінюваної температури, цілком відповідали таким, що були визначені за тих самих значень постійної температури. Енергія активації (E_a), визначена для стаціонарної провідності каналів CRM197 у розчині 1 М КСl, становила $2,967 \pm 0,167$ ккал/моль. E_a , визначена для розчину 1 М КСl без мембрани, була майже такою самою ($2,933 \pm 0,115$ ккал/моль) (див.рис. 3, б). Схожі, хоча й дещо більші значення E_a , визначені для провідності модифікованої CRM197 БЛМ у розчині 1 М КСl і того ж розчину без мембрани, свідчать про те, що молекули води всередині каналів токсиду в основному зберігають такі самі властивості, як і у вільному об'ємі без БЛМ. У такому випадку вхідний і вихідний отвори порожнини каналу CRM197,

як і її внутрішня частина, мають бути досить великими, щоб забезпечувати вільний вхід і вихід молекул води, що є характерним для водної пори. Тому, можливо, транслокація А-домену CRM197 з боку вбудовування в мембрану на протилежний відбувається порожниною каналу токсоїду одночасно з утворенням наскрізної водної пори або відразу після цього, що не перешкоджає подальшому вільному проходженню води через неї.

На підставі одержаних результатів можна зробити висновок, що CRM197 залишається здатним до початкового етапу дії DT на клітини ссавців – специфічного зв'язування та інтерналізації, а також важливої частки завершальної фази механізму токсичної дії – перетворення водорозчинної форми CRM197 на іонпровідний олігомер, яким може відбуватися транслокація А-домену. Оскільки, за винятком цитотоксичності, CRM197 відтворював інші найважливіші властивості DT, одержані нами препарати токсоїду можуть бути використані як інструмент для подальших досліджень DT і порівняльного аналізу з його похідними.

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 із використанням спеціального програмного забезпечення.

Розробку, монтаж і встановлення приладу контролю та регулювання температури водно-сольового середовища в комірці з БЛМ здійснювали І.І. Ільницький та Д.В. Лозбін із Казенного підприємства спеціального приладобудування “Арсенал”, Київ, Україна.

Цитована література

1. *Labyntsev A.J., Korotkevych N.V., Manoilov K.J., Kaberniuk A.A., Kolybo D.V., Komisarenko S.V.* Recombinant fluorescent models for studying the diphtheria toxin // *Russ. J. Bioorgan. Chem.* – 2014. – **40**. – P. 401–409.
2. *Malito E., Bursulaya B., Chen C., Lo Surdo P., Picchianti M., Balducci E., Biancucci M., Brock A., Berti F., Bottomley M.J., Nissim M., Costantino P., Rappuoli R., Spraggon G.* Structural basis for lack of toxicity of the diphtheria toxin mutant CRM197 // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2012. – **109**. – P. 5229–5234.
3. *Donovan J.J., Simon M.I., Draper R.K., Montal M.* Diphtheria toxin forms transmembrane channels in planar lipid bilayers // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1981. – **78**. – P. 172–176.
4. *Gorbatiuk O.B., Tsapenko M.V., Pavlova M.V., Okunev O.V., Kordium V.A.* Bioaffinity sorbent based on immobilized protein A *Staphylococcus aureus*: development and application // *Biopolym. Cell.* – 2012. – **28**. – P. 141–148.
5. *Basu A., Li X., Leong S.S.J.* Refolding of proteins from inclusion bodies: rational design and recipes // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2011. – **92**. – P. 241–251.
6. *Villaverde A., Carrió M.M.* Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies // *Biotechnol. Lett.* – 2003. – **25**. – P. 1385–1395.
7. *Gablíks J., Falconer M.* Interaction of diphtheria toxin with cell cultures from susceptible and resistant animals // *J. Exp. Med.* – 1966. – **123**. – P. 723–732.
8. *Mitamura T., Higashiyama S., Taniguchi N., Klagsbrun M., Mekada E.* Diphtheria toxin binds to the epidermal growth factor (EGF)-like domain of human heparin-binding EGF-like growth factor/diphtheria toxin receptor and inhibits specifically its mitogenic activity // *J. Biol. Chem.* – 1995. – **270**. – P. 1015–1019.
9. *Moehring J.M., Moehring T.J.* Comparison of diphtheria intoxication in human and nonhuman cell lines and their resistant variants // *Infect. Immun.* – 1976. – **13**. – P. 221–228.

10. Gibson A. E., Noel R. J., Herlihy J. T., Ward W. F. Phenylarsine oxide inhibition of endocytosis: effects on asialofetuin internalization // *Am. J. Physiol.* – 1989. – **257**. – P. C182–184.
11. 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.
12. 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.

References

1. Labyntsev A. J., Korotkevych N. V., Manoilov K. J., Kaberniuk A. A., Kolybo D. V., Komisarenko S. V. *Russ. J. Bioorganic Chem.*, 2014, **40**: 401–409.
2. Malito E., Bursulaya B., Chen C., Lo Surdo P., Picchianti M., Balducci E., Biancucci M., Brock A., Berti F., Bottomley M. J., Nissum M., Costantino P., Rappuoli R., Spraggon G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2012, **109**: 5229–5234.
3. Donovan J. J., Simon M. I., Draper R. K., Montal M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1981, **78**: 172–176.
4. Gorbatyuk O. B., Tsapenko M. V., Pavlova M. V., Okunev O. V., Kordium V. A. *Biopolym. Cell.*, 2012, **28**: 141–148.
5. Basu A., Li X., Leong S. S. J. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, **92**: 241–251.
6. Villaverde A. Carrió M. M. *Biotechnol. Lett.*, 2003, **25**: 1385–1395.
7. Gabliks J., Falconer M. J. *Exp. Med.*, 1966, **123**: 723–732.
8. Mitamura T., Higashiyama S., Taniguchi N., Klagsbrun M., Mekada E. *J. Biol. Chem.*, 1995, **270**: 1015–1019.
9. Moehring J. M., Moehring T. J. *Infect. Immun.*, 1976, **13**: 221–228.
10. Gibson A. E., Noel R. J., Herlihy J. T., Ward W. F. *Am. J. Physiol.*, 1989, **257**: C182–184.
11. Senzel L., Huynh P. D., Jakes K. S., Collier R. J., Finkelstein A. *J. Gen. Physiol.*, 1998, **112**: 317–324.
12. Kagan B. L., Reich K. A., Collier R. J. *Biophys. J.*, 1984, **45**: 102–104.

Надійшло до редакції 04.04.2016

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

¹Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев

²Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев

³ГУ “Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины”, Киев

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

Характеристика очищенного рекомбинантного белка CRM197, как инструмента исследования дифтерийного токсина

Очистка экспрессированного в клетках Escherichia coli нетоксичного дифтерийного токсоида CRM197, проведенная с помощью металлоаффинной хроматографии после разрушения бактериальной ДНК и клеточной стенки ферментами, позволила удалить примеси эндогенных пороформирующих белков. Показано, что меченый флуоресцеин изотиоцианатом препарат CRM197 проявлял способность к связыванию и интернализации клетками млекопитающих линий Vero и L929. Приложение положительного потенциала со стороны добавления CRM197 (2–20 нМ) к фосфатидилэтаноламинсодержащей бислоидной мембране (БЛМ)

в растворе 1 М КСl (рН 4,8) приводило к образованию потенциалозависимых ионных каналов с проводимостью 20 пСм, как показано в классических исследованиях дифтерийного токсина природного происхождения. Энергия активации, определенная для стационарного тока через многоканальную БЛМ в растворе 1 М КСl (рН 6,0) и сам раствор без БЛМ, составила $2,967 \pm 0,167$ и $2,933 \pm 0,115$ ккал/моль соответственно, что свидетельствует об образовании протеином CRM197 трансмембранной водной поры.

Ключевые слова: дифтерийный токсин, токсид, CRM197, бислоиные липидные мембраны, мембранные каналы.

**К. Yu. Manoilov¹, O. B. Gorbatiuk^{2,3}, M. O. Usenko^{2,3},
O. Ya. Shatursky¹, T. A. Borisova¹, D. V. Kolibo¹**

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

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

³State 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 protein CRM197 as a tool to study diphtheria toxin

The purification of non-toxic diphtheria toxoid CRM197 expressed in Esherichia coli by metal-affinity chromatography following the enzymatic digestion of a bacterial cell wall and DNA allowed us to avoid the contamination by endogenous pore-forming proteins. It was shown that the fluorescein isothiocyanate-labeled samples of CRM197 are capable of binding and internalizing by mammalian cells Vero and L929. The introduction of CRM197 (2–20 nM) at positive voltages from the side of phosphatidylethanolamine-containing bilayer membrane (BLM), where the toxoid was added, resulted 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 classic studies of wild-type diphtheria toxin. The activation energies measured for the CRM197-created steady-state macroscopic current on one side of BLM in the solution of 1 M KCl (pH 6.0) and the solution without membrane are equal to 2.967 ± 0.167 kcal/mol and 2.933 ± 0.115 kcal/mol, respectively, which suggests the formation of a transmembrane water pore by CRM197.

Keywords: diphtheria toxin, toxoid, CRM197, black lipid membranes, membrane channels.