

ISSN 0320-9725

Том 88, Номер 9

Сентябрь 2023



БИОХИМИЯ

www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 88, № 9, 2023

Современные способы получения рекомбинантных белков (специальный выпуск)

Приглашенные редакторы Н.А. Орлова, А.А. Жгун

- Последние разработки в области биотехнологии рекомбинантных фрагментов антител (обзор)
N. Zelenovic, L. Filipovic, M. Popovic 1445
- Новые В-клеточные эпитопы ненейтрализующих антител в рецептор-связывающем домене S-белка SARS-CoV-2 с различающимся влиянием на тяжесть течения COVID-19
А.Л. Матвеев, О.В. Пьянков, Я.А. Хлусевич, О.В. Тяжелкова, Л.А. Емельянова, А.М. Тимофеева, А.В. Шиповалов, А.В. Чечушков, Н.С. Зайцева, Г.А. Кудров, Г.М. Юсубалиева, С.М. Юсубалиева, О.А. Жукова, А.Ю. Тикунов, В.П. Баклаушев, С.Е. Седых, Г.И. Лифшиц, Н.В. Тикунова 1461
- Состояние развития подходов к гетерологичной экспрессии биспецифических антител, направленных против солидных опухолей (обзор)
А.К. Мисорин, Д.О. Чернышова, М.С. Карбышев 1473
- Синтетические связывающие белки неиммуноглобулиновой природы для онкологии (обзор)
Т.И. Дэвид, Н.Б. Пестов, Т.В. Корнеенко, Н.А. Барлев 1493
- Гетерологичная экспрессия рекомбинантных белков и их производных, используемых в качестве носителей конъюгированных вакцин (обзор)
Ю.А. Ходак 1513
- Создание клеточной линии, селективно продуцирующей функционально активный транспортёр OATP1B1
М.С. Котлярова, А.В. Шулькин, П.Д. Ерохина, П.Ю. Мыльников, Е.Н. Якушева, Н.И. Надолинская, М.В. Замахаев, А.В. Гончаренко 1536
- Димерный ACE2-FC эквивалентен мономерному ACE2 в суррогатном тесте вирус-нейтрализующей активности антител
Д.Э. Колесов, Е.А. Гаямова, Н.А. Орлова, И.И. Воробьев 1545
- Анализ некоторых биохимических свойств рекомбинантного химозина сибирской косули (*Capreolus pygargus*), полученного в культуре клеток млекопитающих (СНО-K1)
Д.Е. Мурашкин, С.В. Беленькая, А.А. Бондарь, В.В. Ельчанинов, Д.Н. Шербаков 1556
- Реконструкция кальциевого канала Orai3 в липосомах для изучения функции этого белка
Ch. Liang, F. Wu 1570
- Создание системы гетерологичной экспрессии и оптимизация способа наработки β -субъединицы холерного токсина в клетках *E. coli*
Х.Х. Жамгочян, М.В. Замахаев, Н.Н. Случанко, А.В. Гончаренко, М.С. Шумков 1581

- Повышение уровня синтеза белка YсіМ позволяет снизить загрязнение эндотоксинами рекомбинантных белков, получаемых в *Escherichia coli*
П.А. Бобровский, Д.Д. Харламбиева, С.А. Кириллин, К.А. Бровина, Е.Н. Графская, В.Н. Лазарев, В.А. Манувера 1597
- Влияние расположения и ориентации генетического токсин-антитоксинового элемента *hok/sok* на уровень биосинтеза фармацевтически значимых белков в бактериальной системе экспрессии
Ю.А. Ходак, Р.Р. Шайфутдинов, Д.С. Хасанов, Н.А. Орлова, И.И. Воробьев 1606
- Редактирование генома *Komagataella phaffii* с использованием системы CRISPR/Cas9 для получения безмаркерного штамма-продуцента фитазы
А.А. Ткаченко, Л.Н. Борщевская, С.П. Синеокий, Т.Л. Гордеева 1620
- Экспрессия синтетического гена *CYP102A1-LG23* и функциональный анализ рекомбинантного цитохрома P450 BM3-LG23 в актинобактериях *Mycolicibacterium smegmatis*
В.Ю. Пошехонцева, Н.И. Стрижов, М.В. Карпов, В.М. Николаева, А.В. Казанцев, О.И. Сазонова, А.А. Шутлов, М.В. Донов 1631
- Получение и характеристика фоторина, нового белкового ингибитора протеаз из энтомопатогенной бактерии *Photorhabdus laumondii*
И.М. Бердышев, А.О. Светлова, К.Н. Чухонцева, М.А. Карасева, А.М. Варижук, В.В. Филатов, С.Ю. Клеймёнов, С.В. Костров, И.В. Демидюк 1642
- Влияние дефицита биотина на экспрессию генов в клетках дрожжей *Komagataella phaffii*
А.С. Макеева, А.В. Сидорин, В.В. Иштуганова, М.В. Падкина, А.М. Румянцев 1655
- NAD⁺-Зависимая формиатдегидрогеназа из термотолерантных дрожжей *Ogataea raparolytormpha*: свойства и белковая инженерия N-концевой последовательности
А.А. Пометун, Л.А. Шапошников, С.А. Зубанова, Р.П. Ковалевский, Д.Л. Атрошенко, Е.В. Пометун, С.С. Савин, В.И. Тишков 1667

РЕГУЛЯРНЫЕ СТАТЬИ

- Сверхбыстрая хроматомасс-спектрометрия в биохимии растений: протеомный ответ озимой пшеницы на предпосевную обработку препаратами железа
Т.Т. Кусаинова, Д.Д. Емеева, Е.М. Казакова, В.А. Горшков, Ф. Кьелдсен, М.Л. Кусков, А.Н. Жигач, И.П. Ольховская, О.А. Богословская, Н.Н. Глущенко, И.А. Тарасова 1681
- Нарушение антиоксидантного статуса в эритроцитах крыс при аммоний-индуцированной гепатоэнцефалопатии: роль NMDA-рецепторов
Е.А. Косенко, Г.А. Алилова, Л.А. Тихонова 1698

CONTENTS

Vol. 88, Issue 9, 2023

Modern Methods for Recombinant Proteins Production (Special Issue)

Guest Editors: Dr. Nadezhda A. Orlova, Dr. Alexander A. Zhgun

- Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Antibody Fragments (Review)
N. Zelenovic, L. Filipovic, and M. Popovic 1445
- Novel B-Cell Epitopes of Non-Neutralizing Antibodies in the Receptor-Binding Domain of the S-Protein of SARS-CoV-2 with Differing Effects on the Severity of the Course of COVID-19
A. L. Matveev, O. V. Pyankov, Y. A. Khlusevich, O.V. Tyazhelkova, L. A. Emelyanova, A. M. Timofeeva, A. V. Shipovalov, A. V. Chechushkov, N. S. Zaitseva, G. A. Kudrov, G. M. Yusubaliyeva, S. M. Yussubaliyeva, O.A. Zhukova, A. Yu. Tikunov, V. P. Baklaushev, S. E. Sedykh, G. I. Lifshits, and N. V. Tikunova 1461
- State-of-the-Art Approaches for Heterologous Expression of Bispecific Antibodies Targeting Solid Tumors (Review)
A. K. Misorin, D. O. Chernyshova, and M. S. Karbyshev 1473
- Non-Immunoglobulin Synthetic Binding Proteins for Oncology (Review)
T. I. David, N. B. Pestov, T. V. Korneenko, and N. A. Barlev 1493
- Heterologous Expression of Recombinant Proteins and Their Derivatives Used as Carriers for Conjugate Vaccines (Review)
Yu. A. Khodak 1513
- Generation of a Cell Line Selectively Producing the Functionally Active OATP1B1 Transporter
M. S. Kotliarova, A. V. Shchulkin, P. D. Erokhina, P. Y. Mylnikov, E. N. Yakusheva, N. I. Nadolinskaia, M. V. Zamakhaev, and A. V. Goncharenko 1536
- Dimeric ACE2-FC is Equivalent to Monomeric ACE2 in the Surrogate Virus Neutralization Test
D. E. Kolesov, E. A. Gaiamova, N. A. Orlova, and I. I. Vorobiev 1545
- Analysis OF Some Biochemical Properties of Recombinant Siberian Roe Deer (*Capreolus pygargus*) Chymosin Obtained in the Mammalian Cell Culture (CHO-K1)
D. E. Murashkin, S. V. Belenkaya, A. A. Bondar, V. V. Elchaninov, and D. N. Shcherbakov 1556
- Reconstitution of Calcium Channel Protein Orai3 into Liposomes for Functional Studies
Ch. Liang and F. Wu 1570
- Development of a Heterologous Expression System and Optimization of the Algorithm for Cholera Toxin β -Subunit Production in *E. coli*
H. H. Jamgochian, M. V. Zamakhaev, N. N. Sluchanko, A. V. Goncharenko, and M. S. Shumkov 1581
- Upregulation of YciM Expression Reduces Endotoxin Contamination of Recombinant Proteins Produced in *Escherichia coli* Cells
P. A. Bobrovsky, D. D. Kharlampieva, S. A. Kirillin, K. A. Brovina, E. N. Grafkskaia, V. N. Lazarev, and V. A. Manuvera 1597

- Location and Orientation of the Genetic Toxin-Antitoxin Element *hok/sok* in the Plasmid Affects the Expression Level of Pharmaceutically Significant Proteins
Yu. A. Khodak, R. R. Shaifutdinov, D. S. Khasanov, N. A. Orlova, and I. I. Vorobiev 1606
- CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing of the *Komagataella phaffii* to Obtain a Phytase-Producer Markerless Strain
A. A. Tkachenko, L. N. Borshchevskaya, S. P. Sineoky, and T. L. Gordeeva 1620
- Expression of the Synthetic *CYP102A1-LG23* Gene and Functional Analysis of Recombinant P450 BM3-LG23 Cytochrome in Actinobacteria *Mycolicibacterium smegmatis*
V. Y. Poshekhontseva, N. I. Strizhov, M. V. Karpov, V. M. Nikolaeva, A. V. Kazantsev, O. I. Sazonova, A. A. Shutov, and M. V. Donova 1631
- Production and Characterisation of Photorin, a New Protein Protease Inhibitor from the Entomopathogenic Bacteria *Photorhabdus laumondii*
I. M. Berdyshev, A. O. Svetlova, K. N. Chukhontseva, M. A. Karaseva, A. M. Varizhuk, V. V. Filatov, S. Y. Kleymenov, S. V. Kostrov, and I. V. Demidyuk 1642
- Effect of Biotin Starvation on Gene Expression in *Komagataella phaffii* Cells
A. S. Makeeva, A. V. Sidorin, V. V. Ishtuganova, M. V. Padkina, and A. M. Rumyantsev 1655
- NAD⁺-Dependent Format Dehydrogenase from the Thermotolerant Yeast *Ogataea parapolymorpha*: Properties and Protein Engineering of the N-Terminal Sequence
A. A. Pometun, L. A. Shaposhnikov, S. A. Zubanova, R. P. Kovalevskii, D. L. Atroshenko, E. V. Pometun, S. S. Savin, and V. I. Tishkov 1667

REGULAR ARTICLES

- Ultra-Fast Mass Spectrometry for Plant Biochemistry: Proteomics Response of Winter Wheat to Iron Pre-Sowing Treatment
T. T. Kusainova, D. D. Emekeeva, E. M. Kazakova, V. A. Gorshkov, F. Kjeldsen, M. L. Kuskov, A. N. Zhigach, I. P. Olkhovskaya, O. A. Bogoslovskaya, N. N. Glushchenko, and I. A. Tarasova 1681
- Impaired Enzymatic Antioxidant Defense in Erythrocytes of Rats with Ammonia-Induced Encephalopathy: Role NMDA Receptors
E. Kosenko, G. Alilova, and L. Tikhonova 1698

ПОСЛЕДНИЕ РАЗРАБОТКИ В ОБЛАСТИ БИОТЕХНОЛОГИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ФРАГМЕНТОВ АНТИТЕЛ

Обзор

© 2023 N. Zelenovic¹, L. Filipovic², M. Popovic^{3*}

¹ Center for Chemistry, Institute for Chemistry, Technology and Metallurgy,
National Institute of Republic of Serbia, University of Belgrade, 11000 Belgrade, Serbia

² Innovative Centre, Faculty of Chemistry, University of Belgrade, 11000 Belgrade, Serbia

³ Department of Biochemistry, Faculty of Chemistry, University of Belgrade,
11000 Belgrade, Serbia; e-mail: la_bioquimica@chem.bg.ac.rs

Поступила в редакцию 13.05.2023

После доработки 12.07.2023

Принята к публикации 18.08.2023

Применение антител в биотехнологии и биомедицине неуклонно растёт с 1980-х гг. Будучи уникальными и высокоспецифичными биореагентами, моноклональные антитела (monoclonal antibodies, mAb) широко используются и одобрены в качестве терапевтических агентов. Однако использование mAb в терапевтических целях имеет определённые ограничения. Фрагменты антител (antibody fragments, AbF) с сохранёнными антигенсвязывающими сайтами потенциально способны преодолеть недостатки обычных mAb, такие как гетерогенное распределение в тканях после системного применения, особенно в случае солидных опухолей, а также Fc-опосредованная активация иммунной системы в присутствии свидетеля. AbF имеют лучший коэффициент биораспределения благодаря более низкой молекулярной массе. Они сохраняют функциональные особенности mAb, такие как специфичность к антигену и возможность его связывать, при этом гораздо лучше проникая в ткани. Дополнительным преимуществом AbF является возможность их производства в бактериальных и дрожжевых клетках благодаря небольшому размеру, более прочной структуре и отсутствию посттрансляционных модификаций. В данном обзоре описываются разные подходы к получению AbF, приводятся недавние примеры их синтеза в бактериальных и дрожжевых системах экспрессии и методы оптимизации их получения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фрагменты антител, бактериальная экспрессия, дрожжевая экспрессия, scFv, VHH.

DOI: 10.31857/S0320972523090014, **EDN:** WSLAON

ВВЕДЕНИЕ

Применение антител стало неотъемлемой частью диагностики, медицинской визуализации и терапии. В частности, они регулярно используются в различных клинических анализах, включая иммуноблоттинг, проточную цитометрию и иммуногистохимию [1], например, для обнаружения антигенов или токсинов. Антитела можно получить в моноклональной форме, что делает возможным их широкое применение в лечении рака и воспалительных заболеваний. Однако продукция моноклональных

антител (monoclonal antibodies, mAb) с использованием классической гибридомной технологии имеет ограничения, поскольку гибридомы обычно имеют слабую секрецию и генетически нестабильны [2]. Таким образом, на получение достаточного количества mAb требуется в среднем от 6 до 8 месяцев. Мышиные mAb иммуногенны и малоэффективны из-за ксеногенной структуры Fc, поэтому для их терапевтического применения требуется дальнейшая гуманизация, что повышает цену изготовления [1].

Разработка методов производства рекомбинантных mAb в 1980-х гг. дала возможность

Принятые сокращения: AbF – antibody fragment, фрагмент антитела; mAb – monoclonal antibody, моноклональное антитело; scFv – single-chain variable fragments, одноцепочечные переменные фрагменты; VHH – variable domains of heavy-chain antibody, переменные домены антител из тяжёлых цепей.

* Адресат для корреспонденции.

производить антитела в большом масштабе для использования в доклинических и клинических испытаниях. Несмотря на очевидные преимущества, mAb также имеют некоторые недостатки, такие как высокая стоимость и временные ограничения, связанные с их производством. Большая молекулярная масса и гетеротетрамерная структура как классических, так и гуманизированных mAb делают их неподходящими для некоторых применений *in vivo*. В качестве альтернативы были созданы различные типы фрагментов антител (antibody fragments, AbF). Самые распространённые из них — одноцепочечные переменные фрагменты (single-chain variable fragments, scFv), однодоменные антитела или переменные домены антител из тяжёлых цепей (variable domains of heavy-chain antibodies, VHH), а также переменные фрагменты нового антиген-рецептора иммуноглобулина (variable fragments of immunoglobulin new antigen receptor, VNAR) [3]. Благодаря технике фагового и дрожжевого дисплея, которые существенно ускорили выявление антител к различным антигенам и дали возможность оптимизировать структуру антител для улучшения их связывающих свойств, стал возможным скрининг больших библиотек

AbF. Методы дисплея, особенно фагового, являются важной движущей силой для открытия антител, которые в дальнейшем можно модифицировать, оптимизировать и синтезировать [4].

AbF можно получить с помощью протеолиза или генной инженерии (рис. 1). Самыми хорошо изученными типами AbF являются участки связывания антигена (fragment antigen-binding regions, Fab), scFv и VHH. Fab можно получить с помощью ферментного расщепления IgG папаином или пепсином, дающего по два Fab- или F(ab')₂-фрагмента соответственно. Прорыв в производстве рекомбинантных антител произошёл с получением scFv путём соединения переменных доменов тяжёлых и средних цепей (VH и VL соответственно) пептидным линкером с формированием единой полипептидной цепи. AbF такого типа сохраняют антигенсвязывающие свойства mAb, но могут экспрессироваться в *E. coli* [5]. VHH, полученные из антител, состоящих только из тяжёлых цепей (встречающихся в природе у верблюдовых), стабильны и могут связываться с антигеном, несмотря на отсутствие лёгкой цепи. Структура и функции VHH сходны с таковыми для VH-доменов обычных антител, за исключением ключевых мутаций в каркасном

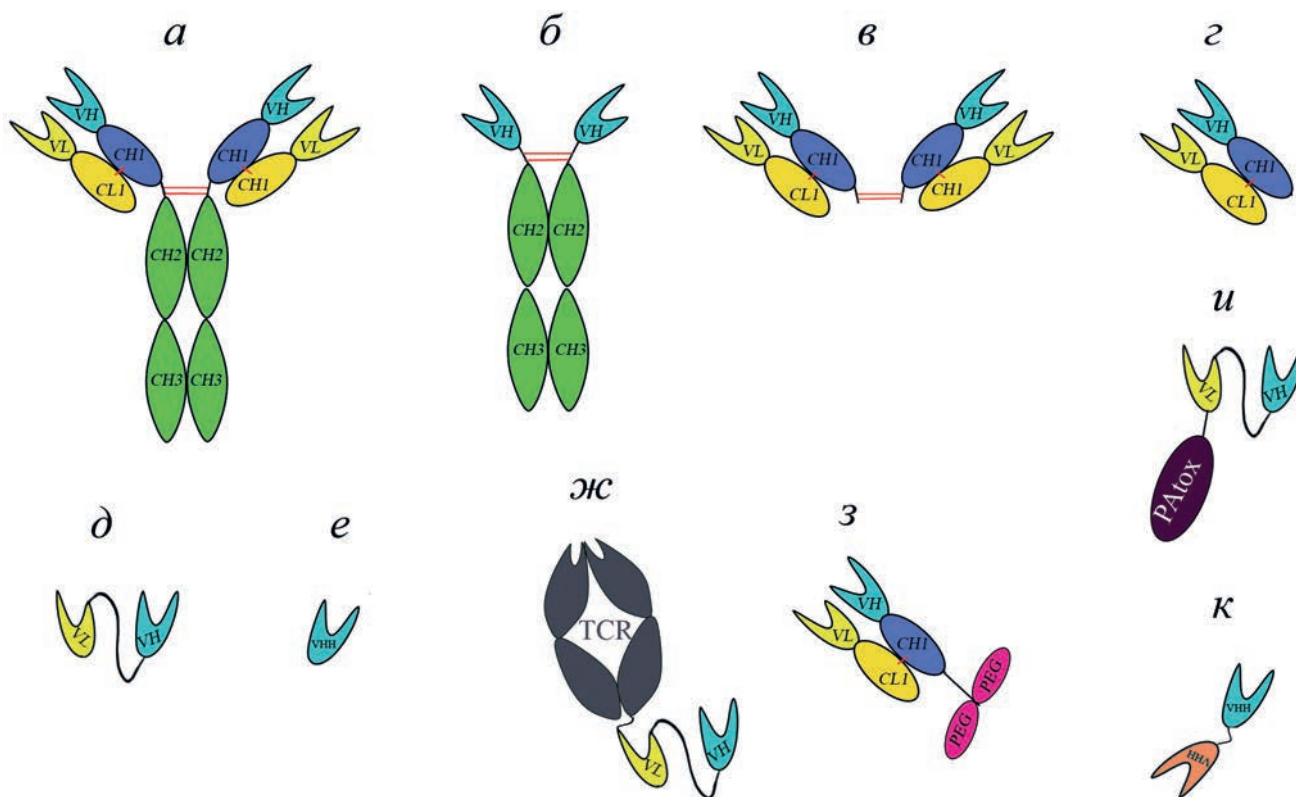


Рис. 1. Структура антител различных форматов. *a* — Обычные mAb; *б* — антитела только из тяжёлых цепей; *в* — фрагмент F(ab')₂, *г* — фрагмент Fab, *д* — scFv; *е* — VHH; *ж* — биспецифичный слитный белок рецептор Т-клеток (TCR)—scFv; *з* — пегилированный Fab; *и* — слитный белок scFv—усечённый экзотоксин А *Pseudomonas*; *к* — тандемные VHH. Красные линии показывают межцепочечные дисульфидные мостики, внутрицепочечные дисульфидные мостики не показаны

участке 2, отвечающем за взаимодействие между вариабельными доменами в обычных иммуноглобулинах. Благодаря своей повышенной структурной стабильности и пониженной склонности к агрегации V_HN предпочтительны в условиях, требующих высокостабильных антител (повышенная концентрация детергента, низкий pH), и могут использоваться для визуализации и лечения онкологических, инфекционных, воспалительных и нейродегенеративных заболеваний [3]. Несмотря на более короткий период полувыведения из кровообращения путём фильтрации в почках, AbF обладают рядом уникальных преимуществ перед классическими mAbs, в частности, улучшенным проникновением в ткани, особенно солидные опухоли [6], более высоким соотношением опухоль/орган [7] и способностью эффективно проникать через биологические (например, эпителиальные и эндотелиальные) барьеры [8].

scFv и V_HN становятся биотерапевтическими агентами, поскольку их малый размер обеспечивает лучшее проникновение в ткани [9]. Для эффективной оценки концентрации белков в плазме на основании их фармакокинетики можно использовать коэффициент биораспределения (biodistribution coefficient, BC – отношение концентраций mAb в ткани и плазме). Соотношение между BC и размером белка дало возможность вывести значения BC₅₀ для всех тканей. Большая молекулярная масса приведёт к уменьшению величины 50%-ного поглощения белка тканью. Для большинства тканей значение BC₅₀ составило ~35 кДа, указывая на то, что распределение AbF в ткани может происходить более эффективно по сравнению с mAb [10]. Меньший размер AbF и лучшие значения BC₅₀ могут помочь в подборе дозировки и введении AbF, особенно в случае несистемного применения [11]. AbF обладают высокими значениями BC₅₀ для почек, показывая, что они с высокой вероятностью будут фильтроваться и реабсорбироваться из мочи [10, 12]. За последние годы рекомбинантные AbF стали одними из самых широко используемых биофармацевтических продуктов для терапевтического применения, а также для иммунодетекции, очистки и биосепарации [3]. Причиной популярности AbF в биотехнологии является возможность их биосинтеза в бактериальных и/или дрожжевых клетках и, следовательно, более низкие затраты на производство каждого миллиграмма белка. Данный обзор сосредоточен на последних достижениях в области продукции AbF в прокариотических и эукариотических системах экспрессии, таких как *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*.

ПРОДУКЦИЯ AbF В КЛЕТКАХ *E. coli*

E. coli как клетка-хозяин экспрессии AbF.

Прокариотические системы экспрессии широко используются для биосинтеза различных типов рекомбинантных белков, в том числе аллергенов, ферментов и AbF [13–15]. Чаще всего в качестве бактериальной клетки-хозяина используется *E. coli*, которая из модельного организма для исследований превратилась в продуцент гетерологичных белков в промышленных масштабах. Около 30% биофармацевтических препаратов всего мира синтезируются именно в *E. coli*, которая всё ещё используется как золотой стандарт синтеза рекомбинантных белков [9, 14]. Этот организм хорошо изучен и тщательно охарактеризован, его можно легко контролировать различными молекулярными инструментами. *E. coli*, как клетка-хозяин экспрессии рекомбинантных AbF, имеет преимущества перед другими системами экспрессии, включая быстрый рост, минимальную сложность среды, низкую стоимость производства и лёгкость его масштабирования. Она остаётся оптимальным вариантом для масштабного и недорогого производства негликозилированных рекомбинантных белков. Поскольку AbF не гликозилированы, их можно синтезировать в клетках *E. coli* без потери функциональных свойств [16]. Несколько лекарств, основанных на AbF и одобренных FDA и EMA, были успешно синтезированы в *E. coli* (табл. 1). AbF можно синтезировать в различных клеточных компартментах, например, в периплазме (ранибизумаб и цертолизумаб пегол) и внеклеточном пространстве (каплацизумаб и опортузумаб), или же производить в составе телец включения с последующим рефолдингом (тебентафусп и бролуцизумаб) [9, 17].

Разработано множество стратегий получения высокого выхода рекомбинантных AbF. При использовании в качестве продуцента *E. coli* следует учесть три главных аспекта продукции AbF: штаммы, векторы и условия культивирования.

Традиционные подходы к синтезу AbF в клетках *E. coli*. AbF могут быть успешно получены в цитоплазме и периплазме, хотя у каждого из этих вариантов есть свои ограничения [19]. Например, если достигнуть высокого уровня синтеза AbF в цитоплазме, белки могут неправильно свернуться и сформировать нерастворимые тельца включения. Секреция в периплазму делает возможным формирование естественных дисульфидных связей, но периплазматическое пространство ограничено, что приводит к меньшему выходу или формированию агрегатов.

Таблица 1. Одобренные FDA и EMA терапевтические AbFs, синтезированные в клетках *E. coli* [18]

Название	Терапевтическое применение	Формат AbF	Год одобрения (FDA или EMA)
Блинатумомаб	острый лимфобластный лейкоз	мышинный биспецифический тандемный scFv	2014
Моксетумомаб пасудотокс	волосатоклеточный лейкоз	стабилизированный дисульфидом слитный белок Fv (dsFv)-PE38–фрагмент экзотоксина A <i>Pseudomonas</i>	2018
Каплацизумаб	приобретённая тромботическая тромбоцитопеническая пурпура	гуманизированное нанотело	2019
Бролуцизумаб	неоваскулярная возрастная макулярная дегенерация	гуманизированный scFv	2019
Тебентафусп	неоперабельная или метастатическая увеальная меланома	биспецифичный слитный белок TCR–scFv	2022
Ранибизумаб	возрастная макулярная дегенерация, диабетическая ретинопатия, макулярный отёк	Fab	2006
Цертолизумаб пегол	активный псориатический артрит	пегилированный Fab	2008
Опортузумаб монатокс	рак мочевого пузыря	гуманизированный слитный белок scFv–усечённый экзотоксин A <i>Pseudomonas</i>	2021

Периплазма обеспечивает более прямой подход к очистке белков, поскольку её можно лизировать в очень мягких условиях. Внешняя мембрана может быть разрушена с помощью осмотического шока, механического воздействия или лёгкой термической обработки. Также периплазматическое пространство, в отличие от цитоплазмы, содержит лишь 4–8% от нативных белков *E. coli*, что упрощает процесс очистки [20].

Самой распространённой стратегией продукции AbF является экспрессия белков в растворимой форме в цитоплазме – она проста, обычно даёт высокий выход белка и не требует введения сигнальной последовательности в вектор [21]. Однако экспрессия белка в цитоплазме бактериальной клетки может приводить к некорректному формированию дисульфидных связей, что вызывает накопление рекомбинантных антител главным образом в виде телец включения. Тельца включения можно подвергнуть рефолдингу и формированию дисульфидных связей *in vitro*, после чего очистить для восстановления функциональной активности [22]. Рекомбинантные AbF также могут продуцироваться в цитозоле с использованием мутантных штаммов *E. coli*, сверхэкспрессирующих дисульфид-изомеразу для усиленного формирования дисульфидных связей [23, 24].

Чтобы обеспечить синтез рекомбинантных белков в растворимой форме, лучше стремиться к оптимальной, а не максимальной их про-

дукции. Некоторые группы исследователей показали, что активность дисульфид-изомеразы DsbC может увеличить выход функциональных AbF. Например, комбинирование этого подхода с коэкспрессией оксидоредуктаз оказалось лучшей стратегией синтеза белка в цитоплазме с высоким выходом (до 72 мг/л) [25, 26]. Слияние с другими белками (например, GFP) может улучшить растворимость целевого белка. Другие метки для слияния, такие как SNAP и SORT, могут привести к лучшей экспрессии, но также и усложнить процесс очистки [27].

Хотя AbF не гликозилированы, другие посттрансляционные модификации важны для их функциональной активности. Так, scFv содержат две дисульфидные связи, а Fab – пять или шесть. Производство AbF с естественными дисульфидными связями является сложным, особенно в больших масштабах. Примером успешного биосинтеза AbF с корректно сформированными дисульфидными связями в цитоплазме *E. coli* является использование системы CyDisCo, основанной на коэкспрессии фермента Ery1p, формирующего дисульфидные связи, и дисульфид-изомеразы белка (protein disulfide isomerase, PDI). Данную систему протестировали для экспрессии и очистки одиннадцати scFv и одиннадцати Fab, экспрессированных с одинаковых векторов при одинаковых условиях. Применение CyDisCo дало большое количество AbF, прошедших естественный фолдинг и обладающих биоло-

Таблица 2. Модификации штаммов *E. coli* [39]

Вид модификации	Название штамма	Характеристики/Применение
Отсутствие протеаз (Lon и OmpT)	BL21(DE3), BL21Star(DE3)	сниженная деградация чужеродного белка
Дополнение редкими тРНК	CodonPlus-RIL (BL21-RIL), CodonPlus-RP (BL21-RP), Rosetta	экспрессия редких кодонов (arg, ile, leu, pro)
Мутации в генах глутатионредуктазы (<i>gor</i>) и тиоредоксинредуктазы (<i>trxB</i>)	Origami, Shuffle T7, Rosetta-gami («Novagen»)	повышенное образование дисульфидных связей в цитозоле
Введение промотора (<i>araBAD</i>) или ингибитора промотора <i>T7</i> (лизоцим фага <i>T7</i>)	BL21-AI, pLysS	экспрессия токсичных белков
Введение хорошо титруемого промотора рамнозы (<i>Prha</i>)	Lemo21(DE3)	экспрессия глобулярных или мембранных белков
Введение рестрицирующей метилцитозин-эндонуклеазы	McrA, McrBC, Mrr	сниженное метилирование
Козэкспрессия шаперона	штамм от «Agilent Technologies»	снижение неправильного фолдинга белка

гической активностью, что было показано на спектрах кругового дихроизма. Выход очищенных scFv и Fab-фрагментов составлял до 240 и 42 мг/л соответственно [28].

По сравнению с цитоплазмой (с восстанавливающей средой) периплазма лучше подходит для формирования дисульфидных связей в AbF, поскольку предоставляет для них более окисляющую среду. Кроме того, присутствие множества шаперонов и изомераз, таких как система Dsb, способствует правильному формированию дисульфидных связей. Большинство белков сначала продуцируется в цитоплазме и затем секретируется в периплазму различными путями (Sec, SRP и Tat). Для переноса в периплазму белкам требуется наличие на N-конце сигнального пептида (SpA, PhoA, PelB, OmpA, OmpT, DsbA, TorT или TolT), который вместе с молекулярными шаперонами и дисульфид-изомеразой (система Dsb) помогает белкам правильно сворачиваться и формировать дисульфидные связи. Для прямой секреции белков в периплазму можно использовать около 20 сигнальных пептидов [29]. Подобная таргетная периплазматическая секреция использовалась во многих случаях, например, для экспрессии PGT135 в количествах до ~1,2 г/л [8] или нескольких гуманизованных Fab' с выходом до 2,4 г/л [30].

Штаммы *E. coli*, использованные для синтеза AbF. В биотехнологии часто используется несколько штаммов (табл. 2), в частности, штаммы *E. coli* K-12 (MG1655, JM109, W3110, BW25113, DH5 α , DH1, WK6) и B (BL21, BL21(DE3), BL21(DE3) pLysS, BL21(DE3) Rosetta) [31]. Чаще используются штаммы K,

хотя они продуцируют большое количество ацетата, который может негативно влиять на синтез белка и рост клеток [32]. Штаммы B, полученные на основе штаммов K, напротив, производят меньше ацетата, что позволяет выращивать клетки при более высоких концентрациях глюкозы [33]. Таким образом, штаммы K лучше подходят для скрининга, в то время как штаммы B – для продукции белка для биофармацевтического применения [34].

VNH обычно продуцируются в системе экспрессии *E. coli* WK6 [35], разработанной на основе штамма K12 и используемой для индуцируемой экспрессии генов VNH. Клетки этих штаммов обладают высокой скоростью репликации и оказались наилучшим вариантом для корректного формирования дисульфидной связи. VNH, экспрессируемые в периплазматическом пространстве, обычно модифицированы различными метками, что существенно снижает вероятность формирования телец включения [35, 36]. Клетки *E. coli* WK6 успешно использовались для высокопроизводительного синтеза VNH против шиповидного белка вируса SARS-CoV-2 и пищевых аллергенов [37, 38].

ВЕКТОРЫ ДЛЯ СИНТЕЗА AbF

Выбор промотора важен для регуляции экспрессии и зависит от природы целевого белка [40–43]. Помимо промотора *T7*, используемого чаще всего, есть несколько других промоторов, обладающих определёнными преимуществами. Например, промотор *araBAD* является сильным, строго регулируемым

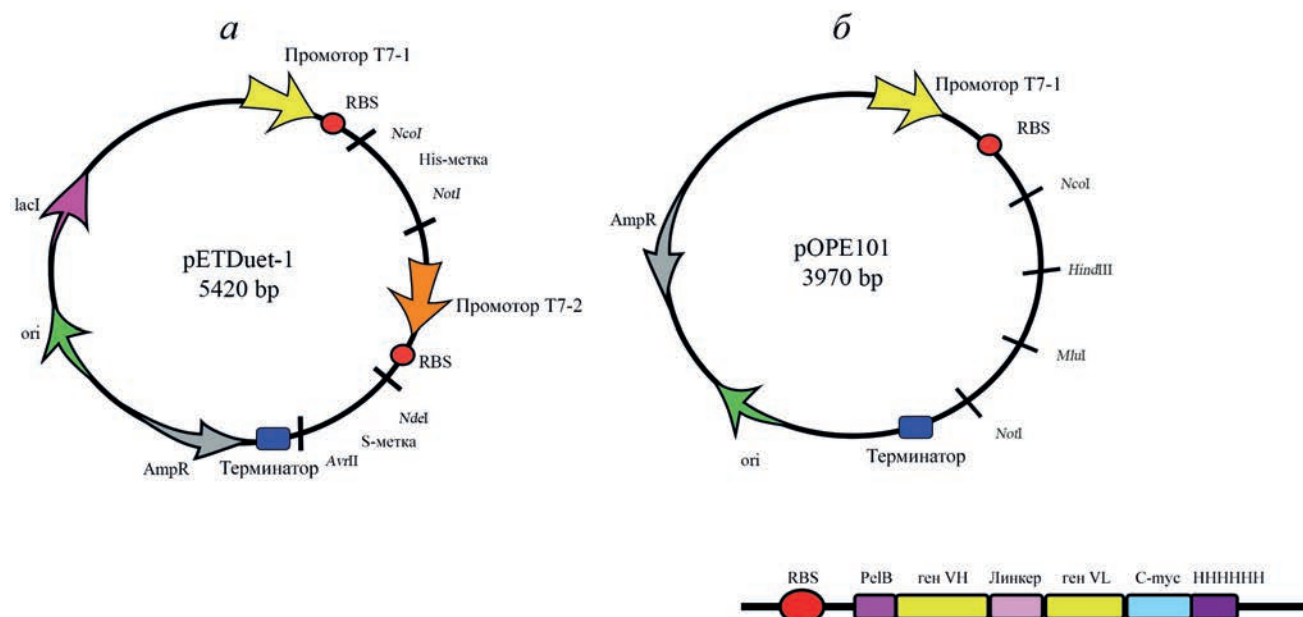


Рис. 2. Плазмиды pETDUET-1 (а) и pOPE101 (б), использованные для бактериальной экспрессии AbF

и хорошо титруемым, он используется главным образом для экспрессии токсичных белков. Ещё один промотор, *cspA* – это промотор холодового шока, дающий возможность экспрессировать белки при низких температурах (с оптимумом 10–25 °С) [44].

Для синтеза AbF обычно используется несколько векторов. Компания «Progen» разработала новый вектор для клонирования, pOPE101, который обеспечивает биосинтез scFv в растворимой форме (рис. 2) в клетках *E. coli*. Он включает сильный IPTG-индуцируемый промотор T7, ген устойчивости к ампициллину, лидерную последовательность, обеспечивающую экспрессию белка в периплазме, и метку C-мус/His₆ для облегчения очистки. В случае scFv тяжёлую цепь клонировали по сайтам *NcoI* и *HindIII*, а лёгкую – по сайтам *MluI* и *NotI*. Две цепи соединялись линкером из 18 аминокислотных остатков, который делал возможной коэкспрессию двух целевых белков. Новый вектор pETDUET-1 (рис. 2), разработанный компанией «Novagen», содержит два сайта множественного клонирования (multiple cloning sites, MCS), в каждом из которых есть промотор T7. Сайт MSC2 заканчивается терминатором T7. Этот вектор также содержит метку His₆ в сайте MSC1 и метку S в сайте MSC2, его можно использовать с любым совместимым штаммом *E. coli* [40]. Вектор pETDUET-1 применяли, например, для синтеза гHu (биоаналога ранибизумаба) с выходом до 2,8 мг/л (в этом случае лёгкие и тяжёлые цепи клонировали в два MCS) [41].

УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ДЛЯ СИНТЕЗА AbF С ВЫСОКИМ ВЫХОДОМ

Для высокого выхода AbF в клетках *E. coli* требуется оптимизировать множество параметров производства, таких как температура, перемешивание, время культивирования, аэрация, источники углерода, среда, тип индукции [42, 43].

Влияние температуры на выход AbF хорошо изучено. Хотя максимальная скорость роста *E. coli* наблюдается при 37 °С, экспрессию рекомбинантных антител оказалось лучше производить при более низких температурах (25 °С), поскольку её затрудняет деградация белка и формирование телец включения [45].

В нескольких исследованиях сообщалось, что сложные среды, такие как ТВ (terrific broth) или EnPresso, стимулируют рост клеток, что приводит к сверхэкспрессии продукта [46]. Однако насыщенность среды роста не оказывает существенного воздействия на выход белка, на который в большей степени влияет аминокислотная последовательность, чем состав среды [47].

Оптимизация концентрации источников углерода (глюкоза, глицерол, лактоза, глицин) может положительно влиять на экспрессию AbF. Как правило, снижение концентрации глюкозы и увеличение содержания глицерола в среде увеличивает количество внеклеточных VHH [48]. Глицин воздействует на пептидогликановый слой бактериальной клеточной стенки, что увеличивает проницаемость клеток, и белки могут легче выходить в культуральную среду.

После того, как было открыто, что 13% последовательности V_HN представлено остатками глицина, добавка глицина в среду для культивирования стала использоваться для снижения метаболической нагрузки; глицин действует как предшественник в синтезе AbF [49].

Снижение концентрации IPTG иногда может улучшать растворимость и активность синтезируемых белков за счёт снижения их экспрессии. Оптимальная концентрация IPTG зависит от конкретного белка и должна подбираться для каждого AbF. Сообщается о широком диапазоне возможных концентраций IPTG (от 0,005 до 5 мМ), хотя наиболее часто используемая концентрация IPTG для T7 *lac*-промотора составляет 1 мМ. В некоторых случаях нет необходимости использовать максимально возможную концентрацию IPTG, поскольку это может перегрузить клетку и индуцировать формирование телец включения. Напротив, низкий уровень IPTG часто сокращает образование телец включения и улучшает фолдинг и стабильность белка [46].

ЭКСПРЕССИЯ AbF В ДРОЖЖАХ

Хотя у продукции AbF в *E. coli* есть преимущества (быстрый рост клеток, лёгкость манипуляций и минимальная сложность среды), у неё также есть и недостатки, в том числе формирование телец включения из-за окисляющей внутриклеточной среды. Чтобы получить растворимые функциональные антитела из телец включения, требуется дополнительный рефолдинг [50]. Это привело к разработке эукариотических систем экспрессии. Самым доступным эукариотическим организмом для продукции рекомбинантных белков являются дрожжи. У этих одноклеточных эукариот есть многочисленные преимущества. Дрожжи легко растут на простых средах и достигают высокой плотности клеток при культивировании в малых и больших масштабах. Биохимия, генетика и клеточная биология дрожжей хорошо изучены, что позволяет легко проводить с ними генетические манипуляции. Как система экспрессии рекомбинантных белков, дрожжи поддерживают продукцию маленьких и больших (более 50 кДа) белков с высоким выходом и низким уровнем загрязнения эндогенными белками [51]. Дрожжи секретируют только несколько собственных белков, что облегчает очистку выделяемых во внеклеточное пространство рекомбинантных белков. Кроме того, дрожжи обеспечивают гликозилирование, метилирование, ацилирование,

формирование дисульфидных мостиков и другие посттрансляционные модификации для экспрессируемых гетерологичных белков эукариотического происхождения [52, 53]. Производство белков с помощью дрожжей мало затратно, и процесс их получения в ферментёрах легко масштабируется. Дрожжи также гораздо более толерантны к таким факторам ферментации, как pH, присутствие ингибиторов ферментации, высокая концентрация сахара и этанола и т.д., по сравнению с клетками *E. coli* (табл. 3) [54].

Распространённые виды дрожжей (табл. 4), используемые в качестве клеток-хозяев экспрессии рекомбинантных белков, могут являться неметилотрофными (*Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis*) и метилотрофными (*Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Candida boidinii*). *S. cerevisiae* и *P. pastoris* соответственно представляют две группы, наиболее часто используемые для продукции белков с терапевтическим применением [57].

S. cerevisiae является непатогенным организмом, в целом признанным безопасным (generally recognized as safe, GRAS), что способствовало его использованию в пищевой промышленности. Геном штамма *S. cerevisiae* S288C был первым полностью секвенированным эукариотическим геномом [58], который дал огромное количество информации о генетике и клеточной биологии дрожжей и сделал возможным лёгкость генетического манипулирования этим видом. Достижения в области генной инженерии, стабильность системы экспрессии и лёгкость культивирования сделали *S. cerevisiae* перспективным хозяином для биосинтеза mAb и AbF. Продукция V_HN ламы в *S. cerevisiae* является хорошо отлаженным промышленным процессом с выходом до сотен мг/л [59]. В промышленности и исследованиях применяется широкий спектр штаммов дрожжей, а для экспрессии рекомбинантных белков чаще всего используется штамм VJ5464.

Для экспрессии рекомбинантных белков требуется трансформация клетки-хозяина химическим способом или электропорацией (рис. 3) для введения вектора, несущего интересующий ген. Благодаря быстрой пролиферации дрожжей вектор размножается вместе с целевым геном. Многие эукариотические векторы, так называемые челночные, могут существовать как в бактериальных, так и в эукариотических клетках. У них два ориджина репликации и два набора маркерных генов, один из которых функционирует в *E. coli*, а другой — в эукариотической системе экспрессии, чаще всего дрожжах. Существует три типа векторов экспрессии

Таблица 3. Характеристики прокариотических и эукариотических систем экспрессии [55, 56]

Клетка-хозяин для экспрессии	Прокариотическая (<i>E. coli</i>)	Эукариотическая (дрожжевая)
Рост	быстрый рост (30 мин)	быстрый рост (90 мин)
Сложность среды	минимальная	минимальная
Стоимость производства	низкая	низкая
Возможность масштабирования производства	высокая	высокая
Внеклеточная экспрессия	отсутствует, секреция в периплазму	присутствует, секреция в среду культивирования
Фолдинг белка	обычно требуется рефолдинг	рефолдинга не требуется
Посттрансляционные модификации	отсутствие эукариотических посттрансляционных модификаций	различные посттрансляционные модификации, сильное гликозилирование маннозы
Риск загрязнения	средний (например, эндотоксинами)	низкий
Тип белка	белки низкой молекулярной массы	белки низкой и высокой молекулярной массы

Таблица 4. Наиболее часто используемые штаммы *S. cerevisiae* и *P. pastoris*

Дрожжи	Штаммы
<i>S. cerevisiae</i>	BY4716, W303, S288c, A634A, CEN.PK BJ5464, Σ 1278b, SK1, BY4741, BY4742, BY4743
<i>P. pastoris</i>	дикий тип (Y-11430, X-33) штаммы с различными способностями к использованию метанола (Mut ⁺ , Mut ^s , Mut ⁻) штаммы с отсутствием протеазной активности (SMD1163, SMD1165, SMD1168) штаммы с отсутствием гистидиндегидрогеназы (GS115, KM71, SMD1168)

для *S. cerevisiae*: эписомальные плазмиды (episomal plasmids, YEp), интегрирующиеся плазмиды (integrating plasmids, YIp) и центромерные плазмиды (centromeric plasmids, YCp).

YEp являются наиболее часто используемыми векторами как для внутри-, так и внеклеточной продукции гетерологичных белков. Эти векторы получены из небольшой (2 мкм) круговой плазмиды, множественные копии которой присутствуют во многих встречающихся в природе штаммах *S. cerevisiae*. Плазмида реплицируется независимо от хромосом дрожжей, так как содержит собственный ориджин репликации. Отбор клонов *S. cerevisiae* основан на использовании мутантных (ауксотрофных) штаммов, которым для роста требуется конкретная аминокислота (гистидин, триптофан, лейцин) или нуклеотид (урацил); они могут расти на минимальной среде только тогда, когда она дополнена соответствующим питательным веществом. В векторе содержится функциональный ген дикого типа, восполняющий мутантный ген хозяина.

У YIp отсутствует ориджин репликации, и они встраиваются в геном хозяина, в то время как YCp могут реплицироваться автономно в клетке-хозяине в небольшом количестве копий.

Гетерологичные гены помещаются под контроль особых промоторов для увеличения уровня экспрессии [50, 60]. Эти промоторы могут быть конститутивными, т.е. постоянно активными, или индуцируемыми, т.е. активируемыми специфическими стимулами. Стимулы для промоторов, полученных из генов *S. cerevisiae*, обеспечивают эффективную транскрипцию гетерологичных генов, помещённых в эписомальные векторы. Легко регулируемые индуцируемые промоторы необходимы для одновременного синтеза нескольких гетерологичных белков. Например, промоторы, индуцируемые галактозой, быстро отвечают на её добавление и усиливают транскрипцию до 1000 раз [61]. В клетках *S. cerevisiae* галактоза метаболизируется в последовательности реакций до глюкозо-6-фосфата, который вступает в гликолиз или пентозофосфатный путь.



Рис. 3. Экспрессия AbF в дрожжах: необходимый ген клонируют в векторе экспрессии, дрожжевые клетки трансформируют получившейся конструкцией, оптимизируют процесс ферментации; AbF производят в большом масштабе и анализируют их профили гликозилирования. Создано с использованием ресурса BioRender.com с разрешения

Такое превращение необходимо, поскольку гликолитические ферменты не распознают галактозу. Этот принцип используется для экспрессии гетерологичных белков в дрожжах с использованием промоторов *GAL1* и *GAL10*, которые строго регулируют экспрессию генов метаболизма галактозы. Галактоза является непривычным питательным веществом для дрожжей, которое может использоваться в качестве единственного источника углерода при отсутствии глюкозы в среде [62].

Производство рекомбинантных VHH ламы в достаточном количестве – хорошо отработанный промышленный процесс, который возможен благодаря стабильности и растворимости молекулы VHH. Растворимость VHH вызвана его гидрофильностью, которая делает возможной секрецию VHH из эндоплазматического ретикулума (ЭР). В отличие от VHH, производные scFv более гидрофобны, а поэтому менее растворимы и могут накапливаться в ЭР [63]. Эту проблему можно решить путём создания штаммов дрожжей со сверхэкспрессией шаперонов и фолдаз, т.е. белков, обеспечивающих корректный фолдинг с последующей секрецией scFv [64]. Также создаются новые штаммы для увеличения общей способности дрожжей к секреции; такого результата можно достичь, управляя внутриклеточным перемещением белков, уменьшая их расщепление протеазами и контролируя ответ на тепловой шок, что ведёт к более высокому уровню продукции белка [50].

AbF не гликозилированы и, следовательно, могут экспрессироваться в дрожжах. Так, *S. cerevisiae* использовали для получения таких основанных на AbF лекарств, как ранибизумаб (Ran, Fab-фрагмент), пекселизумаб (Pex; scFv-пептид) и другие (табл. 5). Для этого использовался штамм B184 с существенно повышенным синтезом α-амилазы, полученный из штамма AAC за счёт случайного мутагенеза и микрофлюидного скрининга. Удаление амилазной плазмиды из штамма B184 дало штамм HA, который затем трансформировали плазмидами, созданными путём введения нанотела Nan (состоящего из одного домена V-типа), генов антител Pex и Ran в вектор CROTud. Хотя три фрагмента антител обладают различной молекулярной массой и посттрансляционными модификациями, все они успешно экспрессировались в штамме HA *S. cerevisiae* [65].

Гиперманнозилирование может привести к понижению активности, повышению иммуногенности, уменьшению периода полувыведения из сыворотки и снижению терапевтической эффективности гликопротеинов (рис. 3). Однако в случае AbF гиперманнозилирования можно избежать путём инактивации генов маннозилтрансфераз *Mnn2p* и *Mnn11p*, отвечающих за этот тип гликозилирования. Нокаут гена *Och1p*, кодирующего α-1,6-маннозилтрансферазу, также увеличил продукцию рекомбинантных белков, в том числе AbF. Следовательно, модификация N-гликозилирования может приводить к усилению секреции белков [66].

Таблица 5. Терапевтические AbF, синтезированные в *S. cerevisiae* и получившие одобрение FDA либо проходящие клинические испытания

Непатентованное название	Назначение	Структура	Год одобрения
Пекселизумаб (Pex, гуманизированный)	аортокоронарное шунтирование и ангиопластика	scFv	в фазе 3
Ранибизумаб (Rap, гуманизированный)	макулярная дегенерация	Fab	2006
Вобарилизумаб (ALX-0061)	ревматоидный артрит, системная красная волчанка	бивалентные биспецифичные VHH	в фазе 2
ALX-0171	инфекции нижних дыхательных путей, профилактика РСВ-инфекции	тривалентные VHH	в фазе 2

Многие гетерологичные гены клонированы вместе с сигнальной последовательностью, кодирующей пептид, облегчающий перенос рекомбинантного белка через клеточную мембрану и его выход во внешнюю среду. Добавление сигнальной последовательности может существенно упростить процесс очистки белка. Чаще всего в дрожжах используется сигнальная последовательность, полученная из гена фактора спаривания $\alpha 1$ (mating factor $\alpha 1$, MF $\alpha 1$) (рис. 3). Обычно её вводят непосредственно перед интересующим геном [67]. Помимо сигнальной последовательности, экспрессируемый ген может содержать метку (чаще на C-конце), которая облегчает очистку белка и его количественное определение. Чаще всего используются такие метки, как полигистидиновая и GFP [62]. Так, scFv-фрагмент с присоединённым к C-концу GFP был синтезирован в штамме *S. cerevisiae* BJ5464, и для отслеживания его внутриклеточного процессинга использовалась флуоресценция GFP [68].

Однако, у дрожжей *S. cerevisiae* есть некоторые ограничения, в числе которых нестабильность плазмид, гипергликозилирование и низкий выход белка. Это послужило причиной разработки альтернативных систем экспрессии, включая метилотрофные дрожжи *P. pastoris*.

Как и *S. cerevisiae*, *P. pastoris* является одноклеточным эукариотическим организмом со статусом GRAS [50], который можно легко подвергать генетическим манипуляциям и культивировать. Клетки *P. pastoris* дают множество посттрансляционных модификаций, таких как правильный фолдинг белка, гликозилирование и формирование дисульфидных связей. По сравнению с клетками насекомых или млекопитающих клетки *P. pastoris* дают возможность проводить более быстрый, лёгкий и выгодный синтез рекомбинантных белков. Главным преимуществом *P. pastoris* по сравнению с *S. cerevisiae* является более низкая степень гетерологического гликозилирования

белков [52]. Использование *P. pastoris* для контролируемой экспрессии гетерологичных белков возможно благодаря существованию хорошо регулируемых и эффективных промоторов, возможности выращивать клетки до высокой плотности в биореакторах на простой среде, а также секретиции небольшого количества эндогенных белков, что существенно упрощает очистку белковых продуктов [67].

Вектор для трансформации *P. pastoris* должен быть линейаризован для эффективной интеграции в дрожжевой геном путём гомологичной рекомбинации с формированием стабильных трансформантов. Для экспрессии гетерологичных белков часто применяется индуцируемый промотор гена алкогольоксидазы, *AOX1*, с использованием метанола в качестве индуктора. Этот промотор ингибируется глюкозой, глицеролом и большинством других источников углерода [62, 69]. В качестве альтернативы можно использовать конститутивные промоторы, поскольку уровень экспрессии, который они обеспечивают, аналогичен таковому для индуцируемых. Наиболее часто применяемый конститутивный промотор – *pGAP*, который в норме регулирует экспрессию гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы [62].

Некоторые векторы экспрессии *P. pastoris* содержат дополнительную последовательность (например, пре-про-последовательность MF $\alpha 1$ *S. cerevisiae*) непосредственно после промотора, которая служит сигналом секреции экспрессируемого белка [69]. Очистка секретируемого белка достигается главным образом за счёт сепарации среды ферментации от дрожжевой биомассы путём центрифугирования. После этого рекомбинантные белки можно концентрировать и очищать различными методами, такими как ультрафильтрация, преципитация или хроматография, в зависимости от свойств целевого белка. В качестве примера упомянем производство нанотела анти-CEACAM5 в *P. pastoris* GS115 под контролем промотора

pGAP с выходом ~50 мг/л. Очищенные нанотела использовались в раннем обнаружении карциноэмбрионального антигена (carcinoembryonic antigen, CEA) в сыворотке у пациентов с опухолями желудочно-кишечного тракта [70].

Отбор трансформированных клонов клеток-хозяев ведётся за счёт введения генов устойчивости к антибиотикам. Существует две группы векторов, которые придают клетке-хозяину устойчивость к канамицину (pPIC3K и pPIC9K) и зеоцину (pPICZ) соответственно [57]. Эти векторы также содержат уникальные сайты для эндонуклеаз рестрикции, используемые для клонирования целевых генов, а также последовательности меток (6×His или GFP), которые позволяют проводить более простую очистку гетерологичных белков.

Новая система экспрессии белка в *P. pastoris* под названием PichiaPink может производить белок в больших количествах (до 12 г/л). Она была представлена компанией «Thermo Fischer Scientific» (США). Разница между штаммом, используемом в данной системе, и обычными штаммами заключается в методе отбора, основанном на комплементарности адениновых ауксотрофов (а не на устойчивости к антибиотикам). На настоящий момент существует четыре штамма, которые можно использовать для трансформации и внеклеточной экспрессии белка. Белки переносятся во внеклеточную среду с помощью восьми последовательностей секреции. Преимущество такой системы экспрессии в том, что её легко масштабировать от низких до больших объёмов ферментации [52].

Впервые *P. pastoris* использовали как систему экспрессии для получения человеческих AbF LR и 10FG2, которые клонировали в вектор pPICZαA и экспрессировали в штамме *P. pastoris* X33. Вектор содержал сигнальную последовательность секреции α-фактора, что делало возможной внеклеточную экспрессию рекомбинантных белков. Оба экспрессированных AbF могли связывать токсины скорпиона, показывая, что их биохимические и функциональные свойства остались неизменными. Кроме того, выход рекомбинантных белков в *P. pastoris* был выше, чем в клетках *E. coli* [71].

СТРАТЕГИИ УЛУЧШЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ AbF В ДРОЖЖАХ

Стратегии улучшения продукции гетерологичных белков основаны на варьировании условий (температуры, времени инкубации, концентрации субстрата) культивирования *S. cerevisiae* и *P. pastoris*. В качестве источ-

ника углерода дрожжи *S. cerevisiae* используют 2%-ную глюкозу или 2%-ную раффинозу, экспрессия дрожжей в них индуцируется добавлением к среде 2%-ной галактозы. Для экспрессии рекомбинантных AbF клетки *S. cerevisiae* обычно выращивают при 28–30 °C [72]. Ещё одним компонентом, необходимым для роста клеток, является метанол, используемый в качестве источника углерода. Он также индуцирует экспрессию генов, тем самым увеличивая продукцию белков. Однако чрезмерно высокие концентрации метанола (более 5%) могут быть вредны из-за формирования токсичных продуктов, в то время как его низкие концентрации (ниже 1%) вызывают протеолитическое расщепление гетерологичных белков. Оптимальная концентрация метанола – 2–2,5% [55]. Экспрессию белка можно улучшить введением 0,5–1,0%-ного сорбитола в дополнение к метанолу. Сорбитол является источником углерода, который не индуцирует и не подавляет промотор *AOX*, поэтому выращивание дрожжей на смеси метанол/сорбитол снижает токсические эффекты метанола, а также повышает плотность клеток и производительность всего процесса [55, 73].

Ещё одним важным фактором для выращивания *P. pastoris* является температура. Оптимальная температура для этих дрожжей составляет 30 °C. Её повышение до 32 °C вызывает клеточную смерть и понижение экспрессии белка, а снижение температуры ниже 28 °C обеспечивает жизнеспособность клеток, уменьшает протеолитическое расщепление экспрессируемого белка и увеличивает его выход [55, 74]. Ещё одним критическим фактором, влияющим на продукцию белка, является время экспрессии. Для получения достаточной клеточной биомассы клетки *P. pastoris* выращиваются 96 ч. Однако сообщалось, что долгое время выращивания клеток влияет на протеолитическую деградацию рекомбинантных белков. Следовательно, для успешной продукции белка требуется оптимизация времени инкубации. Было обнаружено, что экспрессия белка происходит главным образом в интервале между 72 и 96 ч, хотя начаться может уже через 48 ч после индукции роста [55, 75].

Клетки *P. pastoris* оказались прекрасным хозяином экспрессии для синтеза AbF. Два рекомбинантных нанотела, полученных в *P. pastoris* – ALX061 и ALX00171 – нашли применение в лечении ревматоидного артрита и респираторно-синцитиальной инфекции (PCV – respiratory syncytial virus, RSV) соответственно [50]. Некоторые AbF использовались для молекулярной визуализации – например,

scFv, направленный на ген специфических калиевых каналов сердца у человека (human ether-a-go-go-related gene 1, hERG1), который является отличительным признаком зарождающихся опухолей. Нативный анти-hERG1 scFv и его мутантный анти-hERG1-вариант scFv-Cys были синтезированы в клетках *P. pastoris* GS115. Максимальный уровень экспрессии белка достигался через 72 ч после её индукции. Мутантный вариант scFv-hERG1-Cis, в котором остаток цистеина заменял фенилаланин в каркасном участке 3 домена VH, был более стабилен в сыворотке и обладал большей аффинностью к антигену hERG1 на поверхности клеток, что делает его удобным инструментом для молекулярной визуализации и диагностики рака *in vivo* [76].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И БУДУЩИЕ ПЕРСПЕКТИВЫ

Продукция AbF была протестирована во множестве эукариотических и прокариотических систем экспрессии, например, в клетках млекопитающих, трансгенных животных, трансгенных растениях, клетках насекомых, нитчатых грибах, водорослях, простейших, дрожжах и бактериях. Однако у *E. coli* есть ряд уникальных по сравнению с другими системами преимуществ, особенно для крупномасштабного производства. Несомненно, клетки *E. coli* имеют множество преимуществ, включая быстрый рост, высокий уровень экспрессии, возможности для генной инженерии благодаря обширным познаниям о генетике и молекулярной биологии этого организма, большое количество векторов экспрессии, мутантных штаммов клеток-хозяев и экономически выгодные среды/условия культивирования.

За два последних десятилетия дрожжевые системы экспрессии стали обычным явлением в продукции рекомбинантных AbF. У них есть ряд преимуществ перед бактериями, поскольку они непатогенны, легко выращиваются и обеспечивают высокий уровень экспрессии рекомбинантных белков. В отличие от прокариотических систем экспрессии, дрожжевые могут производить антитела с подобными человеческим паттернами гликозилирования. Экспрессия в бактериальных клетках часто приводит к формированию телец включения, в то время как дрожжи обеспечивают правильный фолдинг белка и формирование функциональных белков. Сигнальные последовательности дают возможность прямо секретировать белок в среду, что облегчает дальнейший процесс

его очистки. Выход рекомбинантных белков в дрожжах высок и может достигать от миллиграммов до граммов на литр. Таким образом, дрожжи обеспечивают быструю и экономически выгодную продукцию рекомбинантных белков.

Другими системами, разработанными для экспрессии терапевтических AbF, являются клетки млекопитающих, растения и бакуловирусы. Клетки млекопитающих – это единственная система экспрессии, которая может продуцировать нативные белки человека с правильными паттернами посттрансляционных модификаций. Экспрессия в клетках млекопитающих является дорогостоящей, сложной и времязатратной, а её выход часто низок. Очистка AbF, продуцированных в системах млекопитающих, требует удаления вирусов, что прибавляет дополнительный уровень сложности ко всей процедуре [9].

Растительные системы экспрессии также дают ряд преимуществ, включая низкую стоимость производства и высокий выход белка. Несмотря на то, что в таких системах белки могут проходить корректный фолдинг, их посттрансляционные модификации, особенно гликозилирование, отличаются от таковых в человеческих клетках и могут приводить к иммуногенности для таких AbF, что ограничивает возможности применения трансгенных растений. В зависимости от использованных промоторов синтезированные в растениях белки могут запасаться в листьях, семенах или же в тех и других. Хотя экспрессия белков может быть высокой, их препараты также могут быть загрязнены другими веществами, такими как полифенолы и протеазы, которые затрудняют очистку [9].

Бакуловирусные системы экспрессии являются прекрасной платформой для синтеза и посттрансляционных модификаций белков человека. По сравнению с другими системами они обладают выдающейся гибкостью и возможностью синтеза по принципу «включай и работай» в системах бакуловирус/клетка насекомого. Хотя разработка систем экспрессии AbF в клетках насекомых и растений ещё находится на ранней стадии как в части исследований, так и в клинических условиях, эти системы потенциально способны радикально изменить всю сферу синтеза и разработки AbF за счёт быстрой и экономически выгодной их экспрессии.

Вклад авторов. М.Р. – руководство работой; L.F., N.Z., М.Р. – написание и редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа была финансирована Министерством образования, науки и технологического развития Республики Сербия (контракты №№ 451-03-47/2023-01/200168, 451-03-47/2023-01/200288 и 451-03-47/2023-01/200026).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Данная статья не содержит описания проведённых авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mitra, S., and Tomar, P. C. (2021) Hybridoma technology; advancements, clinical significance, and future aspects, *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, **19**, 159, doi: 10.1186/s43141-021-00264-6.
- Liu, J. K. (2014) The history of monoclonal antibody development – progress, remaining challenges and future innovations, *Ann. Med. Surg. (Lond)*, **3**, 113-116, doi: 10.1016/j.amsu.2014.09.001.
- De Marco, A. (2011) Biotechnological applications of recombinant single-domain antibody fragments, *Microb. Cell Fact.*, **10**, 44, doi: 10.1186/1475-2859-10-44.
- Geyer, C. R., McCafferty, J., Dubel, S., Bradbury, A. R., and Sidhu, S. S. (2012) Recombinant antibodies and in vitro selection technologies, *Methods Mol. Biol.*, **901**, 11-32, doi: 10.1007/978-1-61779-931-0_2.
- Ahmad, Z. A., Yeap, S. K., Ali, A. M., Ho, W. Y., Alitheen, N. B., and Hamid, M. (2012) scFv antibody: principles and clinical application, *Clin. Dev. Immunol.*, **2012**, 980250, doi: 10.1155/2012/980250.
- Pluen, A., Boucher, Y., Ramanujan, S., McKee, T. D., Gohongi, T., di Tomaso, E., Brown, E. B., Izumi, Y., Campbell, R. B., Berk, D. A., and Jain, R. K. (2001) Role of tumor-host interactions in interstitial diffusion of macromolecules: cranial vs. subcutaneous tumors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 4628-4633, doi: 10.1073/pnas.081626898.
- Khawli, L. A., Biela, B., Hu, P., and Epstein, A. L. (2003) Comparison of recombinant derivatives of chimeric TNT-3 antibody for the radioimaging of solid tumors, *Hybrid Hybridomics*, **22**, 1-9, doi: 10.1089/153685903321538026.
- Thurber, G. M., and Wittrup, K. D. (2008) Quantitative spatiotemporal analysis of antibody fragment diffusion and endocytic consumption in tumor spheroids, *Cancer Res.*, **68**, 3334-3341, doi: 10.1158/0008-5472.Can-07-3018.
- Pirkalkhoran, S., Grabowska, W. R., Kashkoli, H. H., Mirhassani, R., Guiliano, D., Dolphin, C., and Khalili, H. (2023) Bioengineering of antibody fragments: challenges and opportunities, *Bioengineering (Basel)*, **10**, 122, doi: 10.3390/bioengineering10020122.
- Li, Z., Krippendorff, B. F., Sharma, S., Walz, A. C., Lavé, T., and Shah, D. K. (2016) Influence of molecular size on tissue distribution of antibody fragments, *MAbs*, **8**, 113-119, doi: 10.1080/19420862.2015.1111497.
- Balthasar, J., and Fung, H. L. (1994) Utilization of antidrug antibody fragments for the optimization of intraperitoneal drug therapy: studies using digoxin as a model drug, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **268**, 734-739.
- Dugel, P. U., Koh, A., Ogura, Y., Jaffe, G. J., Schmidt-Erfurth, U., Brown, D. M., Gomes, A. V., Warburton, J., Weichselberger, A., Holz, F. G., HAWK and HARRIER Study Investigators (2020) HAWK and HARRIER: phase 3, multicenter, randomized, double-masked trials of brolicizumab for neovascular age-related macular degeneration, *Ophthalmology*, **127**, 72-84, doi: 10.1016/j.ophtha.2019.04.017.
- Popovic, M., Andjelkovic, U., Burazer, L., Lindner, B., Petersen, A., and Gavrovic-Jankulovic, M. (2013) Biochemical and immunological characterization of a recombinantly-produced antifungal cysteine proteinase inhibitor from green kiwifruit (*Actinidia deliciosa*), *Phytochemistry*, **94**, 53-59, doi: 10.1016/j.phytochem.2013.06.006.
- Abughren, M., Popović, M., Dimitrijević, R., Burazer, L., Grozdanović, M., Atanasković-Marković, M., and Gavrovic-Jankulovic, M. (2012) Optimization of the heterologous expression of banana glucanase in *Escherichia coli*, *J. Serb. Chem. Soc.*, **77**, 43-52, doi: 10.2298/JSC110309158A.
- Arbabi-Ghahroudi, M., Tanha, J., and MacKenzie, R. (2005). Prokaryotic expression of antibodies, *Cancer Metastasis Rev.*, **24**, 501-519, doi:10.1007/s10555-005-6193-1.
- Charlton, K. A. (2004) *Expression and Isolation of Recombinant Antibody Fragments in E. coli*. in *Antibody Engineering: Methods and Protocols* (Lo, B. K. C., ed) Humana Press, Totowa, NJ, pp. 245-254.
- Walsh, G. (2010) Biopharmaceutical benchmarks 2010, *Nat. Biotechnol.*, **28**, 917-924, doi: 10.1038/nbt0910-917.
- Kang, T. H., and Seong, B. L. (2020) Solubility, stability, and avidity of recombinant antibody fragments expressed in microorganisms, *Front. Microbiol.*, **11**, 1927, doi: 10.3389/fmicb.2020.01927.
- Choi, J., and Lee, S. (2004) Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **64**, 625-635, doi: 10.1007/s00253-004-1559-9.
- Sandomenico, A., Sivaccumar, J. P., and Ruvo, M. (2020) Evolution of *Escherichia coli* expression system

- in producing antibody recombinant fragments, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 6324, doi: 10.3390/ijms21176324.
21. Challener, C. A. (2015) Fermentation for the future, *BioPharm Int.*, **28**, 30-31.
 22. Basu, A., Li, X., and Leong, S. S. J. (2011) Refolding of proteins from inclusion bodies: rational design and recipes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **92**, 241-251, doi: 10.1007/s00253-011-3513-y.
 23. Popovic, M., Mazzega, E., Toffoletto, B., and de Marco, A. (2018) Isolation of anti-extra-cellular vesicle single-domain antibodies by direct panning on vesicle-enriched fractions, *Microb. Cell Factor.*, **17**, 6, doi: 10.1186/s12934-017-0856-9.
 24. De Marco, A. (2022) Cytoplasmic production of nanobodies and nanobody-based reagents by co-expression of sulfhydryl oxidase and DsbC isomerase, *Methods Mol. Biol.*, **2446**, 145-157, doi: 10.1007/978-1-0716-2075-5_7.
 25. Veggiani, G., and de Marco, A. (2011) Improved quantitative and qualitative production of single-domain intrabodies mediated by the co-expression of Erv1p sulfhydryl oxidase, *Protein Express. Purif.*, **79**, 111-114, doi: 10.1016/j.pep.2011.03.005.
 26. Rahbarizadeh, F., Rasaei, M. J., Forouzandeh-Moghadam, M., and Allameh, A.-A. (2005) High expression and purification of the recombinant camelid anti-MUC1 single domain antibodies in *Escherichia coli*, *Protein Express. Purif.*, **44**, 32-38, doi: 10.1016/j.pep.2005.04.008.
 27. Djender, S., Schneider, A., Beugnet, A., Crepin, R., Desrumeaux, K. E., Romani, C., Moutel, S., Perez, F., and de Marco, A. (2014) Bacterial cytoplasm as an effective cell compartment for producing functional VHH-based affinity reagents and *Camelidae* IgG-like recombinant antibodies, *Microb. Cell Factor.*, **13**, 140, doi: 10.1186/s12934-014-0140-1.
 28. Gaciarz, A., Veijola, J., Uchida, Y., Saaranen, M. J., Wang, C., Hörkö, S., and Ruddock, L. W. (2016) Systematic screening of soluble expression of antibody fragments in the cytoplasm of *E. coli*, *Microb. Cell Factor.*, **15**, 22, doi: 10.1186/s12934-016-0419-5.
 29. Humphreys, D. P., Sehdev, M., Chapman, A. P., Ganesh, R., Smith, B. J., King, L. M., Glover, D. J., Reeks, D. G., and Stephens, P. E. (2000) High-level periplasmic expression in *Escherichia coli* using a eukaryotic signal peptide: importance of codon usage at the 5' end of the coding sequence, *Protein Express. Purif.*, **20**, 252-264, doi: 10.1006/prep.2000.1286.
 30. Ellis, M., Patel, P., Edon, M., Ramage, W., Dickinson, R., and Humphreys, D. P. (2017) Development of a high yielding *E. coli* periplasmic expression system for the production of humanized Fab' fragments, *Biotechnol. Prog.*, **33**, 212-220, doi: 10.1002/btpr.2393.
 31. Liu, M., Feng, X., Ding, Y., Zhao, G., Liu, H., and Xian, M. (2015) Metabolic engineering of *Escherichia coli* to improve recombinant protein production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **99**, 10367-10377, doi: 10.1007/s00253-015-6955-9.
 32. Selas Castiñeiras, T., Williams, S. G., Hitchcock, A. G., and Smith, D. C. (2018) *E. coli* strain engineering for the production of advanced biopharmaceutical products, *FEMS Microbiol. Lett.*, **365**, fny162, doi: 10.1093/femsle/fny162.
 33. Sørensen, H. P., and Mortensen, K. K. (2005) Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*, *J. Biotechnol.*, **115**, 113-128, doi: 10.1016/j.jbiotec.2004.08.004.
 34. Hayat, S. M., Farahani, N., Golichenari, B., and Sahebkar, A. (2018) Recombinant protein expression in *Escherichia coli* (*E. coli*): what we need to know, *Curr. Pharmaceut. Design*, **24**, 718-725, doi: 10.2174/1381612824666180131121940.
 35. Pardon, E., Laeremans, T., Triest, S., Rasmussen, S. G., Wohlkönig, A., Ruf, A., Muyldermans, S., Hol, W. G., Kobilka, B. K., and Steyaert, J. (2014) A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology, *Nat. Protocols*, **9**, 674-693, doi: 10.1038/nprot.2014.039.
 36. Jember, T. F. (2021) Molecular cloning, expression and purification of recombinant VHH proteins expressed in *E. coli*, *Am. J. Mol. Biol.*, **11**, 129-141, doi: 10.4236/ajmb.2021.114011.
 37. Su, Q., Shi, W., Huang, X., Wan, Y., Li, G., Xing, B., Xu, Z. P., Liu, H., Hammock, B. D., Yang, X., Yin, S., and Lu, X. (2022) Screening, expression, and identification of nanobody against SARS-CoV-2 spike protein, *Cells*, **11**, 3355, doi: 10.3390/cells11213355.
 38. Hu, Y., Wang, Y., Lin, J., Wu, S., Muyldermans, S., and Wang, S. (2022) Versatile application of nanobodies for food allergen detection and allergy immunotherapy, *J. Agricult. Food Chem.*, **70**, 8901-8912, doi: 10.1021/acs.jafc.2c03324.
 39. Hemamalini, N., Ezhilmathi, S., and Mercy, A. A. (2020) Recombinant protein expression optimization in *Escherichia coli*: a review, *Ind. J. Animal Res.*, **54**, 653-660, doi: 10.18805/ijar.B-3808.
 40. Gupta, S. K., and Shukla, P. (2017) Microbial platform technology for recombinant antibody fragment production: a review, *Crit. Rev. Microbiol.*, **43**, 31-42, doi: 10.3109/1040841X.2016.1150959.
 41. Mehta, D., Chirmade, T., Tungekar, A. A., Gani, K., and Bhambure, R. (2021) Cloning and expression of antibody fragment (Fab) I: Effect of expression construct and induction strategies on light and heavy chain gene expression, *Biochem. Engin. J.*, **176**, 108189, doi: 10.1016/j.bej.2021.108189.
 42. Henry, K. A., Sulea, T., van Faassen, H., Hussack, G., Purisima, E. O., MacKenzie, C. R., and Arbabi-Ghahroudi, M. (2016) A rational engineering strategy for designing protein A-binding camelid single-domain antibodies, *PLoS One*, **11**, e0163113, doi: 10.1371/journal.pone.0163113.

43. Bossi, S., Ferranti, B., Martinelli, C., Capasso, P., and de Marco, A. (2010) Antibody-mediated purification of co-expressed antigen-antibody complexes, *Protein Express. Purif.*, **72**, 55-58, doi: 10.1016/j.pep.2010.01.003.
44. Jia, B., and Jeon, C. O. (2016) High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives, *Open Biol.*, **6**, 160196, doi: 10.1098/rsob.160196.
45. Farshdari, F., Ahmadzadeh, M., Nematollahi, L., and Mohit, E. (2020) The improvement of anti-HER2 scFv soluble expression in *Escherichia coli*, *Braz. J. Pharm. Sci.*, **56**, doi: 10.1590/s2175-97902019000317861.
46. Zarschler, K., Witecy, S., Kapplusch, F., Foerster, C., and Stephan, H. (2013) High-yield production of functional soluble single-domain antibodies in the cytoplasm of *Escherichia coli*, *Microb. Cell Factor.*, **12**, 97, doi: 10.1186/1475-2859-12-97.
47. Farasat, A., Rahbarizadeh, F., Ahmadvand, D., and Yazdian, F. (2017) Optimization of an anti-HER2 nanobody expression using the Taguchi method, *Prepar. Biochem. Biotechnol.*, **47**, 795-803, doi: 10.1080/10826068.2017.1342259.
48. Studier, F. W. (2005) Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures, *Protein Express. Purif.*, **41**, 207-234, doi: 10.1016/j.pep.2005.01.016.
49. Zou, C., Duan, X., and Wu, J. (2014) Enhanced extracellular production of recombinant *Bacillus deramificans* pullulanase in *Escherichia coli* through induction mode optimization and a glycine feeding strategy, *Biores. Technol.*, **172**, 174-179, doi: 10.1016/j.biortech.2014.09.035.
50. Spadiut, O., Capone, S., Krainer, F., Glieder, A., and Herwig, C. (2014) Microbials for the production of monoclonal antibodies and antibody fragments, *Trends Biotechnol.*, **32**, 54-60, doi: 10.1016/j.tibtech.2013.10.002.
51. Demain, A. L., and Vaishnav, P. (2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms, *Biotechnol. Adv.*, **27**, 297-306, doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.01.008.
52. Gupta, S. K., and Shukla, P. (2017) Sophisticated cloning, fermentation, and purification technologies for an enhanced therapeutic protein production: a review, *Front. Pharmacol.*, **8**, 419, doi: 10.3389/fphar.2017.00419.
53. Vieira Gomes, A. M., Souza Carmo, T., Silva Carvalho, L., Mendonça Bahia, F., and Parachin, N. S. (2018) Comparison of yeasts as hosts for recombinant protein production, *Microorganisms*, **6**, 38, doi: 10.3390/microorganisms6020038.
54. Hong, M. S., Velez-Suberbie, M. L., Maloney, A. J., Biedermann, A., Love, K. R., Love, J. C., Mukhopadhyay, T. K., and Braatz, R. D. (2021) Macroscopic modeling of bioreactors for recombinant protein producing *Pichia pastoris* in defined medium, *Biotechnol. Bioeng.*, **118**, 1199-1212, doi: 10.1002/bit.27643.
55. Karbalaeei, M., Rezaee, S. A., and Farsiani, H. (2020) *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins, *J. Cell. Physiol.*, **235**, 5867-5881, doi: 10.1002/jcp.29583.
56. De Sá Magalhães, S., and Keshavarz-Moore, E. (2021) *Pichia pastoris (Komagataella phaffii)* as a cost-effective tool for vaccine production for low- and middle-income countries (LMICs), *Bioengineering (Basel)*, **8**, 119, doi: 10.3390/bioengineering8090119.
57. Baghban, R., Farajnia, S., Rajabibazl, M., Ghasemi, Y., Mafi, A., Hoseinpoor, R., Rahbarnia, L., and Aria, M. (2019) Yeast expression systems: overview and recent advances, *Mol. Biotechnol.*, **61**, 365-384, doi: 10.1007/s12033-019-00164-8.
58. Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., and Oliver, S. G. (1996) Life with 6000 genes, **274**, 546-567, doi: 10.1126/science.274.5287.546.
59. Gorlani, A., de Haard, H., and Verrips, T. (2012) Expression of VHHs in *Saccharomyces cerevisiae*, *Methods Mol. Biol.*, **911**, 277-286, doi: 10.1007/978-1-61779-968-6_17.
60. Chee, M. K., and Haase, S. B. (2012) New and re-designed pRS plasmid shuttle vectors for genetic manipulation of *Saccharomyces cerevisiae*, *G3 (Bethesda, Md.)*, **2**, 515-526, doi: 10.1534/g3.111.001917.
61. Berlec, A., and Strukelj, B. (2013) Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells, *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.*, **40**, 257-274, doi: 10.1007/s10295-013-1235-0.
62. Carlesso, A., Delgado, R., Ruiz Isant, O., Uwanguo, O., Valli, D., Bill, R. M., and Hedfalk, K. (2022) Yeast as a tool for membrane protein production and structure determination, *FEMS Yeast Res.*, **22**, foac047, doi: 10.1093/femsyr/foac047.
63. Joosten, V., Lokman, C., van den Hondel, C. A., and Punt, P. J. (2003) The production of antibody fragments and antibody fusion proteins by yeasts and filamentous fungi, *Microb. Cell Factor.*, **2**, 1, doi: 10.1186/1475-2859-2-1.
64. Xu, P., Raden, D., Doyle, F. J., 3rd, and Robinson, A. S. (2005) Analysis of unfolded protein response during single-chain antibody expression in *Saccharomyces cerevisiae* reveals different roles for BiP and PDI in folding, *Metab. Engin.*, **7**, 269-279, doi: 10.1016/j.ymben.2005.04.002.
65. Wang, Y., Li, X., Chen, X., Nielsen, J., Petranovic, D., and Siewers, V. (2021) Expression of antibody fragments in *Saccharomyces cerevisiae* strains evolved for enhanced protein secretion, *Microb. Cell Fact.*, **20**, 134, doi: 10.1186/s12934-021-01624-0.
66. Tang, H., Wang, S., Wang, J., Song, M., Xu, M., Zhang, M., Shen, Y., Hou, J., and Bao, X. (2016) N-hypermannose glycosylation disruption enhances recombinant protein production by regulating secretory pathway and cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*, *Scientific reports*, **6**, 25654, doi: 10.1038/srep25654.

67. Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., and Schwab, H. (2014) Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 5301-5317, doi: 10.1007/s00253-014-5732-5.
68. Huang, D., and Shusta, E. V. (2006) A yeast platform for the production of single-chain antibody-green fluorescent protein fusions, *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 7748-7759, doi: 10.1128/aem.01403-06.
69. Frenzel, A., Hust, M., and Schirrmann, T. (2013) Expression of recombinant antibodies, *Front. Immunol.*, **4**, 217, doi: 10.3389/fimmu.2013.00217.
70. Chen, Q., Zhou, Y., Yu, J., Liu, W., Li, F., Xian, M., Nian, R., Song, H., and Feng, D. (2019) An efficient constitutive expression system for Anti-CEACAM5 nanobody production in the yeast *Pichia pastoris*, *Protein Expr. Purif.*, **155**, 43-47, doi: 10.1016/j.pep.2018.11.001.
71. Gómez-Ramírez, I. V., Corrales-García, L. L., Posani, L. D., Riaño-Umbarila, L., and Becerril, B. (2023) Expression in *Pichia pastoris* of human antibody fragments that neutralize venoms of Mexican scorpions, *Toxicon*, **223**, 107012, doi: 10.1016/j.toxicon.2022.107012.
72. Guthrie, C., and Fink, G. R. (2002) *Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology, Part C*, Gulf Professional Publishing.
73. Gao, M.-J., Li, Z., Yu, R.-S., Wu, J.-R., Zheng, Z.-Y., Shi, Z.-P., Zhan, X.-B., and Lin, C.-C. (2012) Methanol/sorbitol co-feeding induction enhanced porcine interferon- α production by *P. pastoris* associated with energy metabolism shift, *Bioprocess Biosystems Engin.*, **35**, 1125-1136, doi: 10.1007/s00449-012-0697-1.
74. Gao, M. J., Zhan, X. B., Gao, P., Zhang, X., Dong, S. J., Li, Z., Shi, Z. P., and Lin, C. C. (2015) Improving performance and operational stability of porcine interferon- α production by *Pichia pastoris* with combinational induction strategy of low temperature and methanol/sorbitol co-feeding, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **176**, 493-504, doi: 10.1007/s12010-015-1590-6.
75. Farsiani, H., Mosavat, A., Soleimanpour, S., Sa-deghian, H., Akbari Eydgahi, M. R., Ghazvini, K., Sankian, M., Aryan, E., Jamehdar, S. A., and Rezaee, S. A. (2016) Fc-based delivery system enhances immunogenicity of a tuberculosis subunit vaccine candidate consisting of the ESAT-6:CFP-10 complex, *Mol. Bio-Systems*, **12**, 2189-2201, doi: 10.1039/c6mb00174b.
76. Duranti, C., Carraresi, L., Sette, A., Stefanini, M., Lottini, T., Crescioli, S., Crociani, O., Iamele, L., De Jonge, H., Gherardi, E., and Arcangeli, A. (2018) Generation and characterization of novel recombinant anti-hERG1 scFv antibodies for cancer molecular imaging, *Oncotarget*, **9**, 34972-34989, doi: 10.18632/oncotarget.26200.

RECENT DEVELOPMENTS IN BIOPROCESSING OF RECOMBINANT ANTIBODY FRAGMENTS

Review

N. Zelenovic¹, L. Filipovic², and M. Popovic^{3*}

¹ Center for Chemistry, Institute for Chemistry, Technology and Metallurgy, National Institute of Republic of Serbia, University of Belgrade, 11000 Belgrade, Serbia

² Innovative Centre, Faculty of Chemistry, University of Belgrade, 11000 Belgrade, Serbia

³ Department of Biochemistry, Faculty of Chemistry, University of Belgrade, 11000 Belgrade, Serbia; e-mail: la_bioquimica@chem.bg.ac.rs

Biotechnological and biomedical applications of antibodies have been on a steady rise since the 1980s. As unique and highly specific bioreagents, monoclonal antibodies (mAbs) have been widely exploited and approved as therapeutic agents. However, the use of mAbs has limitations for therapeutic applications. Antibody fragments (AbFs) with preserved antigen-binding sites have a significant potential to overcome the disadvantages of conventional mAbs, such as heterogeneous tissue distribution after systemic administration, especially in solid tumors, and Fc-mediated bystander activation of the immune system. AbFs possess better biodistribution coefficient due to lower molecular weight. They preserve the functional features of mAbs, such as antigen specificity and binding, while at the same time, ensuring much better tissue penetration. An additional benefit of AbFs is the possibility of their production in bacterial and yeast cells due to the small size, more robust structure, and lack of posttranslational modifications. In this review, we described current approaches to the AbF production with recent examples of AbF synthesis in bacterial and yeast expression systems and methods for the production optimization.

Keywords: antibody fragments, bacterial expression, yeast expression, scFv, VHH

НОВЫЕ В-КЛЕТОЧНЫЕ ЭПИТОПЫ НЕНЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ В РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩЕМ ДОМЕНЕ S-БЕЛКА SARS-CoV-2 С РАЗЛИЧАЮЩИМСЯ ВЛИЯНИЕМ НА ТЯЖЕСТЬ ТЕЧЕНИЯ COVID-19

© 2023 А.Л. Матвеев^{1*}, О.В. Пьянков², Я.А. Хлусевич¹, О.В. Тяжелкова¹, Л.А. Емельянова¹, А.М. Тимофеева¹, А.В. Шиповалов², А.В. Чечушков¹, Н.С. Зайцева³, Г.А. Кудров², Г.М. Юсубалиева^{4,5}, С.М. Юсубалиева⁶, О.А. Жукова⁴, А.Ю. Тикунов¹, В.П. Баклаушев^{4,7,8}, С.Е. Седых⁹, Г.И. Лифшиц¹, Н.В. Тикунова^{1,9}

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: guterus@gmail.com

² ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, 630559 Кольцово, Новосибирская обл., Россия

³ ФИЦ ФТМ, 630117 Новосибирск, Россия

⁴ ФНКЦ ФМБА, 115682 Москва, Россия

⁵ ФГБУ «ФЦМН» ФМБА, 117513 Москва, Россия

⁶ НАО Медицинский Университет «Астана», 010000 Нур-Султан, Казахстан

⁷ Институт молекулярной биологии РАН им. В.А. Энгельгардта, 119991 Москва, Россия

⁸ ФГБУ НИИ пульмонологии ФМБА России, 115682 Москва, Россия

⁹ Новосибирский государственный университет, 630090 Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 25.04.2023

После доработки 14.08.2023

Принята к публикации 18.08.2023

Антитела к рецептор-связывающему домену спайкового белка SARS-CoV-2 (RBD S-белка) вносят большой вклад в гуморальный иммунный ответ при коронавирусной инфекции (COVID-19) и после вакцинации. Основное внимание при изучении эпитопного состава RBD сконцентрировано на эпитопах, узнаваемых вируснейтрализующими антителами. Роль антител, связывающихся с RBD, но не способных нейтрализовать вирус, в иммунном ответе остаётся невыясненной. С этой целью провели исследование свойств двух моноклональных антител мыши к RBD (RS17 и S11). Показано, что оба антитела являются высокоаффинными, но при этом они не нейтрализуют вирус. Методом пептидного фагового дисплея локализованы эпитопы этих антител: эпитоп, узнаваемый антителом RS17, расположен на N-концевом участке RBD (348–SVYAVNRKRIS–358); эпитоп, узнаваемый антителом S11, находится внутри рецептор-связывающего мотива RBD (452–YRLFRKSN–459). На наличие сывороточных антител, конкурирующих с ненейтрализующими антителами S11 и RS17, исследовали три группы сывороток: 1) от ранее не болевших вакцинированных добровольцев; 2) от людей, перенесших COVID-19 в лёгкой форме; 3) от людей, перенесших COVID-19 в тяжёлой форме. Показано, что антитела, конкурирующие с антителом S11, с одинаковой частотой встречаются в каждой из исследованных групп сывороток. В то же время наличие в сыворотках антител, конкурирующих с антителом RS17, ассоциировано с тяжестью течения COVID-19 и достоверно чаще встречается в группе сывороток, полученных от тяжелобольных пациентов. Таким образом, несмотря на несомненную значимость анти-RBD антител для формирования эффективного иммунного ответа к SARS-CoV-2, важно также оценивать их вируснейтрализующую активность и подтверждать отсутствие нежелательных свойств у получаемых анти-RBD антител после вакцинации.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: коронавирусная инфекция, SARS-CoV-2, COVID-19, RBD, антитела, рецептор-связывающий домен, противовирусные свойства.

DOI: 10.31857/S0320972523090026, **EDN:** WSPWAK

Принятые сокращения: а.о. – аминокислотные остатки; МКА – моноклональные антитела; ACE2 – ангиотензин-превращающий фермент 2; CHO-S – клеточная линия яичника китайского хомячка; RBD – рецептор-связывающий домен S-белка SARS-CoV-2; RBM – рецептор-связывающий мотив.

* Адресат для корреспонденции.

ВВЕДЕНИЕ

С середины ноября 2019 г. началась пандемия COVID-19, и, по данным Всемирной организации здравоохранения, к настоящему времени выявлено более 760 млн инфицированных, а умерло более 6,9 млн человек [1].

SARS-CoV-2 – это оболочечный вирус, который содержит несегментированный одноцепочечный (+)РНК-геном и относится к роду *Betacoronavirus* [2]. Вирион SARS-CoV-2 имеет четыре структурных белка: спайк-белок (S-белок), оболочечный белок Е, мембранный белок М и нуклеокапсидный белок N [3]. S-Белок состоит из двух доменов, S1 и S2, и расположен в виде гомотримера на внешней оболочке вириона SARS-CoV-2 [4]. Для присоединения вируса к клетке необходимо, чтобы S-белок перешёл в «открытую» конформацию, и стал доступным рецептор-связывающий домен (RBD; 331–524 аминокислотные остатки, а.о.), находящийся в составе субъединицы S1 [5]. Применение блокаторов взаимодействия RBD с ангиотензин-превращающим ферментом 2 (ACE2), таких как антитела, однодоменные антитела (nanobody), аптамеры и пептиды, приводит к снижению инфекционности SARS-CoV-2 [6–9]. Это доказывает наличие в RBD так называемых вируснейтрализующих эпитопов – структур, индуцирующих образование специфических антител, которые способны нейтрализовать инфекционность вируса. Обычно основным компонентом применяемых вакцин является не RBD-домен, а полноразмерный S-белок или инактивированный вирус, которые содержат ряд дополнительных эпитопов. Такие вакцины, несмотря на свою эффективность, могут приводить к возникновению нежелательных последствий [10, 11]. Наиболее широко изучены В-клеточные эпитопы в составе RBD S-белка SARS-CoV-2, с которыми связываются вируснейтрализующие антитела. Для ряда таких эпитопов показан регион, с которым связываются антитела, для части антител определён целевой эпитоп, для некоторых – описаны линейные В-клеточные эпитопы, предсказанные *in silico* [12–15]. Вместе с тем обнаружен лишь один иммунодоминантный эпитоп в составе RBD, распознаваемый ненейтрализующими антителами, препятствующими нейтрализации вируса протективными антителами [16]. Роль других возможных эпитопов в формировании протективного иммунного ответа у вакцинированных и переболевших COVID-19 людей не установлена.

Цель данной работы – выявление новых В-клеточных эпитопов в составе RBD S-белка

SARS-CoV-2 и исследование их ассоциации с протективным иммунитетом у человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты. В работе использовали ранее охарактеризованную панель сывороток, полученных от добровольцев: 1) ранее не болевших и вакцинированных вакциной «Гам-КОВИД-Вак» ($n = 20$); 2) перенесших COVID-19 в лёгкой форме ($n = 106$); 3) перенесших COVID-19 в тяжёлой форме ($n = 48$) [17]. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. От каждого из включённых в исследование участников получено информированное добровольное согласие. Проведение исследований одобрено локальным этическим комитетом ИХБФМ СО РАН, протокол № 8 от 15.08.2021.

Вирус, клетки и животные. В работе использовали штамм коронавируса SARS-CoV-2 nCoV/Victoria/1/2020, депонированный в Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Клетки *Escherichia coli* XL1-Blue и *E. coli* ER2738 получены из Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур ИХБФМ СО РАН.

Линии клеток Sp2/0, Vero E6 и CHO-S (клетки яичника китайского хомячка) получены из Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур ИХБФМ СО РАН. Линия клеток Sp2/0 культивировалась в ростовой среде IMDM («ПанЭко», Россия), содержащей 10% (v/v) эмбриональной телячьей сыворотки («Thermo Fisher Scientific», США) и 2 мМ глутамин («ПанЭко»), при 5% CO₂ и 37 °С. Линия клеток Vero E6 культивировалась в ростовой среде DMEM («ПанЭко»), содержащей 10% (v/v) эмбриональной телячьей сыворотки («Thermo Fisher Scientific») и 2 мМ глутамин («ПанЭко»), при 5% CO₂ и 37 °С. Линия клеток CHO-S культивировалась в бессывороточной ростовой среде OptiCHO («Thermo Fisher Scientific»), содержащей 2 мМ глутамин («ПанЭко»), при 8% CO₂ и 37 °С.

В работе были использованы 6–7-месячные мыши линии BALB/c (4 самки и 5 самцов) и 5–6-месячные сирийские хомячки дикого типа (4 самки и 4 самца), приобретённые в питомнике ГНЦ ВБ «Вектор». Исследования с лабораторными животными выполнены в соответствии с законодательством РФ, положениями

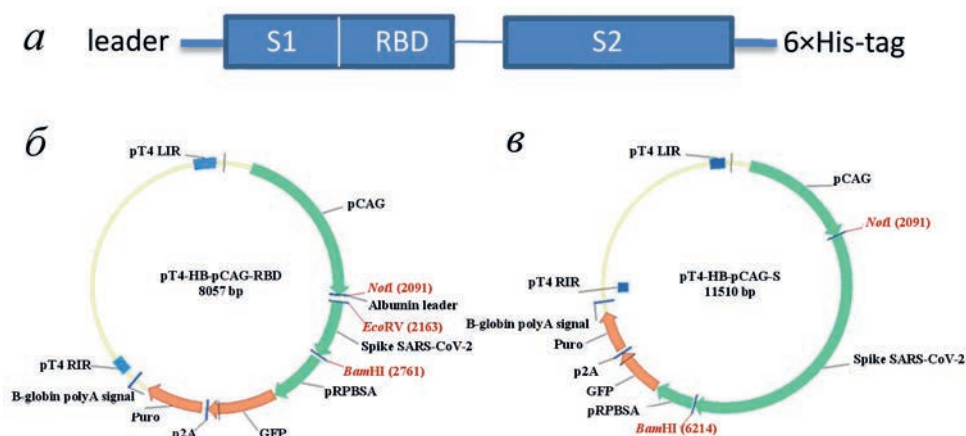


Рис. 1. Схемы рекомбинантного белка и плазмид. а – Схема S-белка SARS-CoV-2, кодируемого синтезированным *de novo* геном. б – Схема плазмиды pT4-HB-pCAG-RBD. в – Схема плазмиды pT4-HB-pCAG-S

Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (ETS N 123), в частности приложения А и статьи № 5 Конвенции, положениями Руководства по содержанию и использованию лабораторных животных («Guide for the Care and Use of Laboratory Animals», 2011) и другими нормами международного права, регламентирующими вопросы содержания и использования лабораторных (экспериментальных) животных. Все эксперименты одобрены биоэтическим комитетом ГНЦ ВБ «Вектор» (протокол № 10 от 11.09.2020).

Конструирование и наработка рекомбинантного RBD-домена S-белка SARS-CoV-2. ПЦР-Продукты генов, кодирующих последовательности RBD и эктодомен S-белка SARS-CoV-2, получали с использованием праймеров RBD_EcoRV (5'-GGGTTGATATCACTAATCTGTGCCCTTTCG-3'), RBD_BamHI (5'-GGCAA GGATCCCTAGTGTGGTGTATGATGATGTGTGGCTGGAGCATGGAGGAG-3'), S_dir_NotI (5'-GGGTTGCGGCCGCACCATGAAATGGGTCACATTCATCTCTCTGC-3'), S_rev_BamHI (5'-GGGTTTTTCGAAGGATCCGCGCGCCATTGGGATTCAGTG-3') соответственно. В качестве матрицы использовали синтетический ген «стабилизированного» варианта S-белка SARS-CoV-2 (с заменами K986P и V987P и заменами в фуриновом сайте P682G/R683S/R684A/A685S), штамм Wuhan-Hu-1 (GenBank: QHD43416.1) [18]. На 3'-конце этого гена содержится генетическая последовательность фолдона фага T4, обеспечивающая тримеризацию рекомбинантного белка, и последовательность, кодирующая гексагистидиновый тэг. Полученные ПЦР-продукты, кодирующие RBD и эктодомен S-белка SARS-CoV-2, независимо встраивали в плазмиду pT4-HB-pCAG

под контроль сильного эукариотического промотора pCAG по сайтам рестрикции NotI/VamHI и EcoRV/VamHI соответственно. Плазмиды pT4-HB-pCAG-RBD и pT4-HB-pCAG-S содержали сайты рекомбинации транспозазы Sleeping beauty и гены, обуславливающие устойчивость к пуромицину и кодирующие зелёный флуоресцентный белок (GFP, рис. 1), что позволяет быстро и эффективно получать стабильные высокопродуктивные клоны-продукты рекомбинантных белков. Плазмидные ДНК нарабатывали в клетках *E. coli* штамма XL1-Blue, очищали с помощью набора PureYield Plasmid midiprep («Promega», США) и использовали для последующей трансфекции эукариотических клеток.

Для получения штаммов, продуцирующих RBD и эктодомен S-белка SARS-CoV-2, клетки CHO-S («Thermo Fisher Scientific») трансфицировали двумя плазмидами: pT4-HB-pCAG-RBD или pT4-HB-pCAG-S и плазмидой pSB100x, кодирующей транспозазу Sleeping beauty. Трансфекцию проводили с использованием Lipofectamine 2000 («Thermo Fisher Scientific»), согласно инструкции производителя. Через 48 ч с помощью клеточного сортера SH800S («SONY», Япония) получали GFP-положительную популяцию клеток. Отдельные клоны получали методом предельных разведений при культивировании на селективной бессывороточной среде, содержащей пуромицин. Наиболее продуктивные клоны-продукты RBD и эктодомена S-белка SARS-CoV-2 использовали для наработки этих белков в среде CD FortiCHO («Thermo Fisher Scientific») с ежедневным добавлением 3% (v/v) питательной добавки CD EfficientFeed C («Thermo Fisher Scientific»).

RBD и эктодомен S-белка SARS-CoV-2 очищали из культуральной жидкости с помощью

Ni-NTA-агарозы. Хроматографическую колонку, содержащую Ni-NTA-агарозу («Sigma-Aldrich», США), уравнивали буфером А (50 мМ Na-фосфатный буфер, pH 8,0, 300 мМ NaCl, 5 мМ Tris-HCl) и наносили супернатант, содержащий рекомбинантный RBD либо рекомбинантный эктодомен S-белка SARS-CoV-2. Затем колонку промывали буфером А, после чего элюировали неспецифически сорбирующиеся белки с использованием буфера А с 25 мМ имидазола. Исследуемый белок элюировали буфером А со 100 мМ имидазола. Полученные белковые фракции диализовали против 50 мМ Na-фосфатного буфера, 150 мМ NaCl, pH 6,0. Концентрацию очищенных рекомбинантных RBD либо эктодомена S-белка SARS-CoV-2 определяли по методу Брэдфорда [19]. Белок концентрировали с использованием центрифужных концентраторов Vivospin 15 («Sartorius», Германия) с порогом отсека 10 кДа. Электрофоретический анализ очищенных эктодомена и RBD S-белка SARS-CoV-2 проводили в редуцирующих условиях в присутствии дитиотреитола, для эктодомена S-белка использовали готовый гель для градиентного электрофореза Bolt 4–12% (*m/v*) Bis-Tris plus («Thermo Fisher Scientific») в буфере MOPS SDS Running Buffer («Thermo Fisher Scientific»), для RBD S-белка SARS-CoV-2 – 12%-ный (*m/v*) ПААГ. Раствор очищенных рекомбинантных RBD и эктодомена S-белка SARS-CoV-2 фильтровали через 0,22 мкм фильтр и хранили при 4 °С в концентрации не менее 0,5 мг/мл.

Имуноферментный анализ. Рекомбинантные RBD и эктодомен S-белка SARS-CoV-2 растворяли в фосфатно-солевом буфере ФСБР (100 мМ NaCl, 33 мМ Na₂HPO₄, 17 мМ K₂HPO₄, pH 7,2) или в 0,1 М цитратном буфере (pH 5,0) соответственно и сорбировали в лунки полистироловых планшетов («Greiner», Германия). Участки неспецифического связывания блокировали 5%-ным (*m/v*) раствором сухого молока в ФСБР. После этого лунки промывали ФСБР с 0,1%-ным Tween-20 (*v/v*) и инкубировали 1 ч при 37 °С с анализируемыми моноклональными антителами (МКА), образцами культуральной жидкости от гибридом или сыворотками, полученными от вакцинированных добровольцев и реконвалесцентов, перенесших COVID-19, в различных разведениях. Затем лунки промывали ФСБР с 0,1%-ным Tween-20 (*v/v*), и образовавшиеся комплексы выявляли конъюгатом пероксидазы хрена с поликлональными антителами кролика к IgG мыши («БиоСан», Россия) либо конъюгатом пероксидазы хрена с поликлональными анти-

телами мыши к IgG человека («БиоСан»). В качестве хромогена использовали 0,1%-ный (*m/v*) раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидина в цитратном буфере (pH 5,0) с 0,01%-ным (*m/v*) раствором H₂O₂. Реакцию останавливали равным объемом 1 М HCl. Результаты регистрировали на спектрофотометре Microplate Reader Model iMark («Bio-Rad», США) (450 нм – фильтр для детекции, 620 нм – отсекающий фильтр).

Для проведения конкурентного ИФА в качестве антигена использовали S-белок. После блокировки в лунки планшета добавляли по 100 мкл исследуемой сыворотки в разведении 1 : 20 и инкубировали 1 ч при 37 °С. Затем в лунки вносили конъюгированные МКА с пероксидазой хрена в концентрации 0,3 мкг/мл. Процент конкуренции рассчитывали по формуле (1):

$$C = \left(1 - \frac{OD_{ser}}{OD_{min}}\right) \times 100, \quad (1)$$

где C – процент конкуренции, OD_{ser} – оптический сигнал в лунке с исследуемой сывороткой, OD_{min} – оптический сигнал в лунке без сыворотки.

Получение и наработка МКА RS17 и S11.

Для получения МКА к RBD-домену S-белка SARS-CoV-2 взрослых мышей линии BALB/c иммунизировали рекомбинантным эктодоменом S-белка SARS-CoV-2 с использованием полного (первая иммунизация) и неполного (остальные иммунизации) адъюванта Фрейнда. Иммунизацию проводили 4 раза с интервалом в 2–4 недели. Через 3 дня после последней иммунизации клетки из селезёнок и лимфоузлов иммунизированных мышей гибридизовали с миеломной линией SP2/0 согласно методике, описанной ранее [20]. Для отбора целевых гибридом клетки после гибридизации культивировали на селективной среде, содержащей селективные маркеры гипоксантин, аминокперин и тимидин («ПанЭко»). Образцы культуральной жидкости от выросших после селекции гибридом тестировали на наличие МКА к S-белку с помощью ИФА, а затем получали положительные клоны методом предельных разведений. Отдельные клоны тестировали на продукцию МКА к RBD-домену методом ИФА и обнаружили гибридомы RS17 и S11, продуцировавшие МКА к RBD-домену SARS-CoV-2.

МКА RS17 и S11 нарабатывали в асцитной жидкости и очищали в два этапа. На первом этапе их переосаждали в насыщенном растворе (50%, *m/v*) сульфата аммония, затем сульфат-аммонийные осадки растворяли в буфере БА, содержащем 0,75 М глицин-NaOH, 3 М NaCl, pH 8,9. Хроматографическую колонку

с сорбентом белок А: сефароза-4В («Thermo Fisher Scientific») уравнивали буфером БА и наносили раствор МКА, полученный ранее. Колонку промывали буфером БА и элюировали 0,1 М цитратным буфером, рН 3,5. К элюату добавляли 1 М буфер Tris-HCl, рН 8,8, в соотношении 1 : 10 для изменения рН до физиологических значений. Раствор МКА концентрировали с помощью фильтров Amicon Ultra-4 30K («Millipore»), заменяли буфер на ФСБР и стерилизовали с помощью фильтрации через 0,22 мкм фильтр. Концентрацию белка в препарате определяли спектрофотометрически, проводя измерение при длине волны 280 нм.

Измерение константы аффинности МКА RS17 и S11. Константу аффинности МКА определяли с использованием протокола, ранее описанного Levanov et al. [21]. Лунки 96-луночных полистироловых планшетов («Greiner», Германия) покрывали антигеном: S-белок SARS-CoV-2 разводили в 0,1 М цитратном буфере, рН 5,0, а RBD-домен S-белка SARS-CoV-2 разводили в ФСБР (200 нг/лунка в объеме 100 мкл). Участки неспецифического связывания блокировали 5%-ным (m/v) раствором сухого молока в ФСБР в течение 1 ч при температуре 37 °С. После этого добавляли последовательно разведённые МКА в ФСБР с 0,1%-ным (v/v) Tween-20, шаг разведения 1 : 2 (начальная концентрация 66 нМ), а затем инкубировали планшеты в течение 1 ч при 37 °С. Иммунные комплексы выявляли аналогично описанному ранее. Для представления зависимости OD₄₅₀ от lg(DM) строили сигмовидные кривые. DM представляет собой количество МКА, кратное разведению. Аффинное сродство рассчитывали в соответствии со следующим уравнением (2):

$$OD_{450}(A_0) = N \times \left(A_0 + \frac{b_0}{V} + K_d - \sqrt{\left(A_0 + \frac{b_0}{V} + K_d \right)^2 - 4 \times A_0 \times \frac{b_0}{V}} \right), \quad (2)$$

где OD₄₅₀ – оптическая плотность раствора в лунке планшета, A₀ – общая концентрация МКА в растворе, b₀ – общая концентрация антигена, K_d – константа диссоциации комплекса антиген-МКА на поверхности, V – общий объём раствора в лунке микропланшета, N – коэффициент нормализации. Анализ проводили с использованием программного обеспечения Origin 7.0.

Изучение вируснейтрализующих свойств МКА RS17 и S11 in vitro. Вируснейтрализующие свойства МКА определяли в реакции ингибирования цитопатического действия

(ЦПД), как описано в работе Borgoyakova et al. [22].

Клетки Vero E6 высевали в 96-луночные планшеты и культивировали в течение 24 ч до образования монослоя. Последовательные пятикратные разведения МКА, начиная с концентрации 100 мкг/мл, смешивали в соотношении 1 : 1 с раствором, содержащим 100 цитопатических доз в 1 мл (TCID₅₀) вируса SARS-CoV-2, штамм nCoV/Victoria/1/2020, и инкубировали 1 ч при комнатной температуре, а затем добавляли к монослою клеток Vero E6. Планшеты инкубировали в течение 4 дней при 37 °С, затем окрашивали 0,2%-ным (m/v) раствором генциана фиолетового. Наличие специфического ЦПД оценивали визуально путём микроскопического исследования клеточного монослоя. Разведения антител, полностью предотвращающие ЦПД в 50% лунок, рассчитывали по методу Рида–Мюнча [23].

Эпитопное картирование МКА RS17 и S11 методом пептидного фагового дисплея. Для определения таргетных эпитопов МКА RS17 и S11 использовали пептидные фаговые библиотеки Ph.D.-12 и Ph.D.-C7C («New England BioLabs», США). Биопэннинг (аффинное обогащение) библиотек и селекцию индивидуальных фаговых пептидов проводили, как описано ранее [24]. Для этого 100 нг исследуемого МКА разводили в ФСБР, рН 7,4, и сорбировали в лунки 96-луночных полистироловых планшетов (4 °С, в течение ночи). После отмывки не связавшегося МКА и блокировки мест неспецифического связывания 3%-ным (m/v) сухим обезжиренным молоком в ФСБР в лунки вносили около 10¹¹–10¹² бляшкообразующих единиц (БОЕ) пептидной фаговой библиотеки Ph.D.-12 или Ph.D.-C7C, предварительно преинкубированной с неспецифическим мышинным МКА 3G11 того же подкласса [25]. Планшеты инкубировали 1 ч при 37 °С. Затем не связавшиеся бактериофаги удаляли из лунок, а связавшиеся фаговые частицы элюировали раствором того же антитела в концентрации 100 мкг/мл в течение 30 мин при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Элюатом инфицировали клетки *E. coli* ER2738. Инфицированные клетки инкубировали при 37 °С в течение 4,5 ч, клетки осаждали центрифугированием при 12 000 g 10 мин при 4 °С. Бактериофаги из супернатанта осаждали, добавляя PEG/NaCl, с последующим центрифугированием. Полученные фаговые частицы использовали для следующего раунда аффинного обогащения пептидной библиотеки бактериофагами. Второй и третий раунды проводили аналогично первому, только в лунки

было сорбировано по 50 и 10 нг исследуемого МКА, а в качестве блокировочного раствора использовали 0,1%-ный (*m/v*) раствор казеина и 5%-ный (*m/v*) раствор обезжиренного сухого молока в ФСБР соответственно. Полученным после третьего раунда элюатом инфицировали клетки *E. coli* ER2738. Образовавшиеся на агаризованной среде бляшки использовали для выделения бактериофагов. Участок фаговой ДНК, кодирующий специфический пептид, амплифицировали методом ПЦР с помощью пары праймеров M13_rIII_F (5'-СТСТGТАGССGТТGСТАС-3') и M13_rIII_96 (5'-СССТСАТАGТТАGСGТААСG-3'), а затем секвенировали методом Сэнгера. Выведенные аминокислотные последовательности пептидов анализировали в контексте последовательности RBD-домена S-белка SARS-CoV-2. Молекулярные координаты для структурного анализа получали из базы данных белков PDB (структура 6M0J), а затем визуализировали с использованием пакета программ PyMol (версия 2.6.0).

Статистический анализ проводили с использованием одностороннего дисперсионного анализа (one-way ANOVA). Статистический анализ проводился с использованием программы Statistica 10 («StatSoft Inc.», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Получение рекомбинантных RBD и эктодомена SARS-CoV-2. Полученными плазмидами pT4-NB-pCAG-RBD и pT4-NB-pCAG-S трансформировали клетки CHO-S, после чего нарабатывали и очищали рекомбинантные RBD и эктодомен S-белка SARS-CoV-2. Электрофоретический анализ очищенного эктодомена S-белка SARS-CoV-2 (рис. 2, а) и препарата RBD S-белка SARS-CoV-2 (рис. 2, б) показал высокую степень чистоты и гомогенности препаратов. Электрофоретическая подвижность очищенных RBD и эктодомена S-белка SARS-CoV-2 соответствовала теоретически предсказанной – 35 и 180 кДа соответственно.

Получение и характеристика МКА к RBD-домену белка SARS-CoV-2. Всего получено 17 гибридом, продуцирующих МКА к эктодомену S-белка SARS-CoV-2. После тестирования образцов культуральной жидкости отобранных гибридом на наличие антител к RBD SARS-CoV-2 отобрали две гибридомы, RS17 и S11, продуцирующие такие МКА.

Способность МКА связываться с S-белком и RBD-доменом анализировали в ИФА. В результате расчётов получили значения кон-

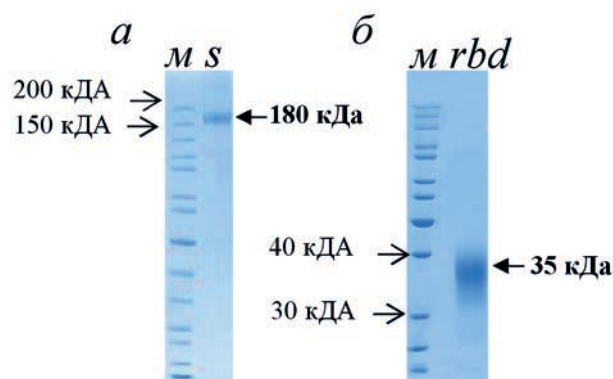


Рис. 2. Электрофореграмма S-белка SARS-CoV-2 (а) и RBD-домена S-белка SARS-CoV-2 (б) в редуцирующих условиях. М – Маркер молекулярных масс (#26614, «Thermo Fisher Scientific»)

станты аффинности для каждого МКА при использовании S-белка и RBD S-белка в качестве антигенов (таблица). Оба МКА продемонстрировали близкие константы аффинности как к S-белку, так и к RBD, причём оба антитела являются высокоаффинными. МКА RS17 имеет наномолярные константы аффинности, а МКА S11 – субнаномолярные.

Исследование МКА в реакции подавления ЦПД *in vitro* показало отсутствие у обоих антител вируснейтрализующих свойств.

Локализация эпитопов МКА RS17 и МКА S11 с использованием фагового дисплея. С целью детального картирования эпитопов, распознаваемых МКА RS17 и МКА S11, после третьего раунда аффинной селекции из каждой библиотеки для каждого из исследуемых антител проанализировали по 48 клонов, после чего секвенировали фрагменты генома фагов, кодирующих отобранные специфические пептиды.

Для МКА RS17 получили семь уникальных аминокислотных последовательностей, которые имели мотивы, сходные с RBD-доменом, расположенном на участке с 333 по 527 а.о. [18]: четыре уникальных пептида были отобраны из библиотеки Ph.D.-12, три уникальных пептида – из библиотеки Ph.D.-C7C (рис. 3). При выравнивании все эти пептиды сосредоточились на участке RBD-домена с 348 по 358 а.о.

Значения равновесных констант диссоциации МКА RS17 и МКА S11

МКА	Константа диссоциации антитела, нМ, антиген – S-белок	Константа диссоциации антитела, нМ, антиген – RBD-домен
RS17	1,33 ± 0,18	1,77 ± 0,24
S11	0,2 ± 0,05	0,14 ± 0,04

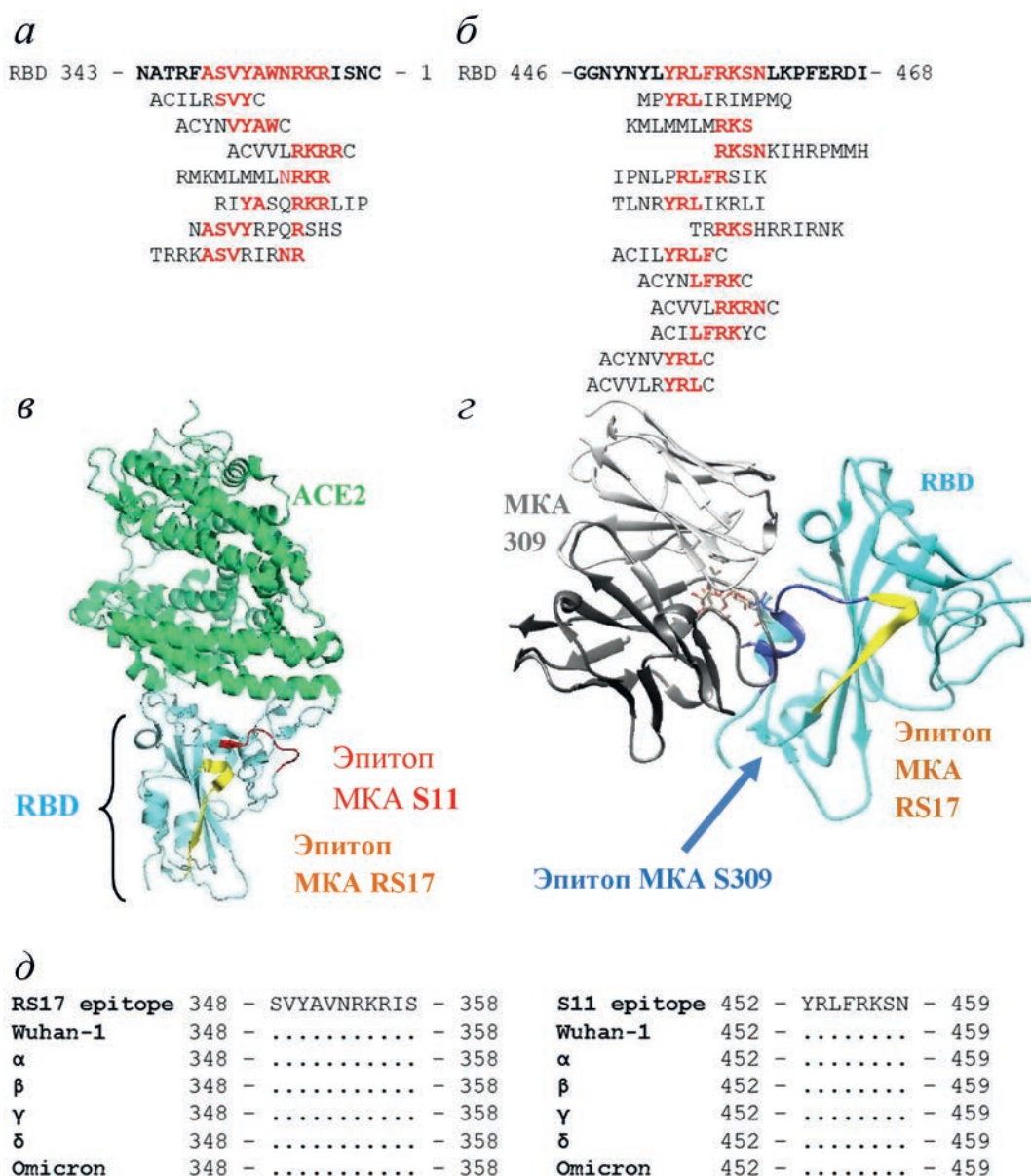


Рис. 3. Выведенные аминокислотные последовательности пептидов, отобранных из фаговых библиотек Ph.D.-12 и Ph.D.-C7C для МКА RS17 (а) и МКА S11 (б), выравненные на аминокислотную последовательность RBD. Ленточная модель комплекса RBD S-белка SARS-CoV-2 с ACE2 (PDB 6M0J) с указанными предполагаемыми эпитопами (в). Ленточная модель комплекса RBD S-белка SARS-CoV-2 (PDB 7TLY) с вируснейтрализующим антителом S309 (г). Зелёным показан ACE2, голубым – RBD, красным – предполагаемый эпитоп МКА S11, жёлтым – предполагаемый эпитоп МКА RS17, синим – эпитоп вируснейтрализующих антител 3 класса, серым – МКА 309. Конденсированное выравнивание эпитопов МКА RS17 и S11 с соответствующими участками S-белка разных вариантов вируса SARS-CoV-2 (д)

(³⁴⁸SVYAVNRKRIS³⁵⁸). Для МКА S11 выявили 11 уникальных пептидов: шесть – из библиотеки Ph.D.-12, а пять – из библиотеки Ph.D.-7C7. Все отобранные пептиды имели RBD-подобные мотивы (рис. 3) и при выравнивании локализовались на участке RBD-домена с 452 по 459 а.о. (⁴⁵²YRLFRKSN⁴⁵⁹), который расположен в области рецептор-связывающего мотива (RBM) S-белка, расположенного на участке с 438 по 506 а.о. [18]. Следовательно, МКА S11 обладает высокой аффинностью к RBD-домену и распознаёт эпитоп в составе

RBM, который непосредственно участвует в процессе проникновения вируса в клетку, но при этом не является вируснейтрализующим.

Оба антитела распознают высококонсервативные участки на S-белке SARS-CoV-2 (рис. 3, д).

Исследование сывороток на наличие антител, конкурирующих с МКА RS17 и МКА S11. Известно, что ключевые а.о., мутации в которых влияют на эффективность вируснейтрализующих антител при появлении новых вариантов SARS-CoV-2, расположены

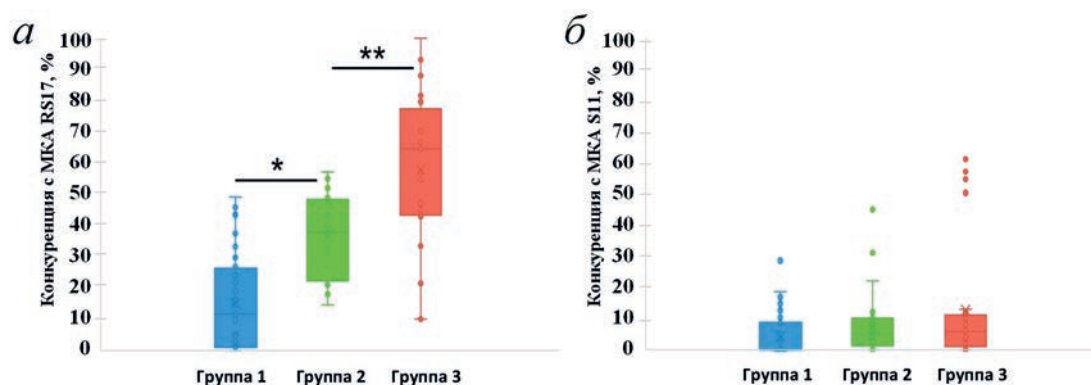


Рис. 4. Данные конкурентного ИФА сывороток с МКА RS17 (а) и S11 (б). За 100%-ную конкуренцию принимали сигнал в ИФА при конкуренции антитела самого с собой. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (one-way ANOVA). Обозначения: синий – сыворотки из группы 1, зелёный – сыворотки из группы 2, красный – сыворотки из группы 3

в RBD-домене [26, 27]. Если у больных вырабатываются высокоаффинные ненейтрализующие антитела к RBD, в том числе к RBM, то они могут экранировать эпитопы, узнаваемые вируснейтрализующими антителами и расположенные вблизи их специфического сайта узнавания. Другим важным аспектом изучения ненейтрализующих антител к RBD коронавируса является поиск иммунодоминантных эпитопов таких антител для дальнейшего создания вакцин, у которых эти эпитопы маскированы или изменены. Такие эпитопы необходимо учитывать для уменьшения количества «неэффективных» антител, способных мешать вируснейтрализующим антителам [28].

Для изучения влияния таких антител на формирование противовирусного иммунитета у людей, вакцинированных и перенесших COVID-19, проверили наличие антител к эпитопам, узнаваемым МКА RS17 и МКА S11. Предварительно получили конъюгаты этих МКА с биотином с использованием набора для биотинилирования EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit («Thermo Fisher Scientific»).

Из ранее охарактеризованной панели сывороток, полученных от добровольцев, в данной работе исследовали три группы сывороток: 1) от ранее не болевших вакцинированных добровольцев ($n = 20$); 2) от людей, перенесших COVID-19 в лёгкой форме ($n = 106$); 3) от пациентов, перенесших COVID-19 в тяжёлой форме ($n = 48$). Сыворотки группировали по анамнезу и дополнительно тестировали на наличие антител к RBD, N- и S-белкам SARS-CoV-2 [17]. В группу 1 вошли сыворотки, полученные по анамнезу от вакцинированных доноров, содержащие антитела к S-белку и RBD SARS-CoV-2, но не содержащие антител к N-белку, т.е. были исключены сыворотки от вакцинированных лиц, болевших бессимптомно. В группы 2 и 3 вошли сыворотки, содержа-

щие антитела ко всем трём белкам и относящиеся по анамнезу к переболевшим в лёгкой и тяжёлой форме соответственно.

С помощью конкурентного ИФА выбранные сыворотки из всех трёх групп протестировали на наличие антител к эпитопам, распознаваемым антителами S11 и RS17. Результаты показали, что в сыворотках из группы 1 отсутствовали антитела, конкурирующие с МКА S11; однако в четырёх сыворотках из 20 обнаружены антитела, конкурирующие с МКА RS17 на 50% и более, что говорит о том, что они распознают близкорасположенные эпитопы (рис. 4). В сыворотках из группы 2 не выявлены антитела, конкурирующие на 50% и более как с МКА S11, так и с МКА RS17. Обратная ситуация наблюдалась в сыворотках из группы 3: в семи из 48 обнаружены антитела, конкурирующие с МКА S11 на 50% и более, и в 30 сыворотках из 48 присутствовали антитела, конкурирующие с МКА RS17 на 50% и более. Кроме того, средний уровень конкуренции антител из сывороток группы 1 или группы 2 с антителом RS17 статистически значимо отличался от такового для группы 3. Таким образом, присутствие некоторых «неэффективных» анти-RBD антител в сыворотках может быть ассоциировано с тяжестью протекания COVID-19. Являются ли такие антитела причиной или следствием тяжёлого течения COVID-19, установить не удалось.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что наиболее эффективные вируснейтрализующие антитела к SARS-CoV-2 в сыворотках переболевших и вакцинированных направлены на RBD S-белка этого вируса [15]. Наиболее доступные для связывания эпитопы вируснейтрализующих антител на поверхности

RBD являются в то же время и высокоизменчивыми, и эволюция вируса для ухода от иммунного ответа направлена на изменения именно в этом участке белка, что приводит к уменьшению эффективности вакцинопрофилактики при появлении новых вариантов SARS-CoV-2 [14, 15]. В организме вакцинированных и переболевших также могут возникать «неэффективные» антитела, которые не способны нейтрализовать вирус. Эти антитела могут экранировать места присоединения вируснейтрализующих антител, тем самым мешая инактивации вируса, что в сочетании с появлением новых ускользающих (escape) вариантов SARS-CoV-2 может приводить к уменьшению эффективности вакцинопрофилактики. В нашей работе описаны два высокоаффинных МКА мыши – RS17 и S11, направленных к разным участкам RBD и не обладающих вируснейтрализующей активностью. Эпитоп, узнаваемый МКА RS17, находится внутри RBD (348–358 а.о.) и расположен вблизи тримерных интерфейсов RBD-RBD, этот участок является высококонсервативным и не содержит замены а.о. в разных вариантах вируса SARS-CoV-2 (рис. 3, д). Мы полагаем, что МКА RS17 может одновременно взаимодействовать с разными молекулами S-белка в составе тримера. В работе продемонстрировано, что наличие в сыворотках антител, конкурирующих с МКА RS17, ассоциировано с тяжестью течения COVID-19. Возможно, вклад таких сывороточных антител в патогенез COVID-19 определяется тем, что, связав свои эпитопы, эти антитела могут экранировать и пространственно-сближенные эпитопы, узнаваемые вируснейтрализующими антителами. Так, ранее были описаны несколько вируснейтрализующих антител (S309, CR3022, AZD1061, REGN10987), эффективных против различных вариантов SARS-CoV-2, эпитопы которых расположены на поверхности S-белка вблизи с эпитопом антитела RS17 [15]. Такие антитела классифицировали как антитела 3 класса, распознающие криптический эпитоп в участке с 333 по 347 а.о. RBD-домена SARS-CoV-2 (рис. 3, г) [15]. Уникальной особенностью эпитопа, распознаваемого вируснейтрализующими антителами 3 класса, является его расположение вблизи RBD-RBD тримерных интерфейсов, что позволяет таким вируснейтрализующим антителам связывать соседние RBD в тримере S-белка SARS-CoV-2 и стерически блокировать как переход RBD в открытую конформацию, так и связывание с ACE2 [14, 15]. Стоит отметить, что, по имеющимся данным, эпитопы таких антител, как и близкорасположенный эпитоп МКА RS17,

доступны независимо от того, находится ли RBD S-белка SARS-CoV-2 в закрытой или открытой конформации. Кроме того, эпитоп, распознаваемый антителом S309, является высококонсервативным у всех известных вариантов SARS-CoV-2 и даже других представителей подрода *Sarbecovirus*, к которому относится SARS-CoV-2.

Что касается высокоаффинного МКА S11, которое также не является вируснейтрализующим, показано, что оно связывает участок RBD с 452 по 459 а.о. Этот высококонсервативный эпитоп расположен внутри RBM, отвечающего за связывание с ACE2 (рис. 3). Связь наличия в сыворотках антител, конкурирующих с МКА S11, с тяжестью течения COVID-19 не выявлена.

Таким образом, можно сделать вывод, что, вероятно, ненейтрализующие антитела, направленные к эпитопам внутри последовательности RBM, никак не мешают протективному иммунному ответу, поскольку в подавлении инфекции, помимо антител, распознающих криптические эпитопы внутри RBM, которые могут не конкурировать друг с другом, участвуют и вируснейтрализующие антитела, распознающие эпитопы на поверхности S-белка в «закрытой» конформации. В то же время антитело RS17 распознает доступный эпитоп S-белка, находящегося в «закрытой» конформации; однако при переходе в «открытую» конформацию этот эпитоп также остаётся доступным. Таким образом, мы предполагаем, что ненейтрализующие антитела, распознающие эпитоп антитела RS17, могут мешать вируснейтрализующим антителам, связывающимся с S-белком как в открытой, так и в закрытой конформации, что, в свою очередь, приводит к более тяжёлому течению COVID-19.

Для ранее описанных ненейтрализующих антител к RBD показано, что, несмотря на их неспособность блокировать взаимодействия вируса с клеточным рецептором, они несколько снижают вирусную нагрузку в экспериментах *in vivo*. Это обусловлено эффекторными свойствами этих антител, которые опосредуют фагоцитоз SARS-CoV-2 клетками иммунной системы [29]. Однако именно такие опсонизирующие, но не вируснейтрализующие антитела рассматривают в качестве основной причины антителозависимого усиления инфекции (ADE).

Известно, что, несмотря на большое количество уже созданных вакцин, с появлением новых штаммов SARS-CoV-2 эффективность их применения снижается [16]. Это требует разработки новых улучшенных вакцин,

при создании которых следует использовать полученные данные о возможном негативном вкладе «нежелательных» эпитопов S-белка SARS-CoV-2. Кроме того, полученные результаты могут быть использованы для создания субъединичных вакцин, содержащих RBD, с «выключенными» иммунодоминантными эпитопами.

Вклад авторов. А.Л. Матвеев, Н.В. Тикунова – концепция и руководство работой; А.Л. Матвеев, Я.А. Хлусевич, Л.А. Емельянова, А.В. Шиповалов, А.М. Тимофеева, А.В. Чечушков, О.В. Тяжелкова, Н.С. Зайцева, Г.А. Кудров, А.Ю. Тикунова, С.Е. Седых, Г.И. Лифшиц, А.Ю. Тикунов – проведение экспериментов; Г.М. Юсубалиева, С.М. Юсубалиева, О.А. Жукова, В.П. Баклаушев – работа с пациентами; А.Л. Матвеев, Я.А. Хлусевич, О.В. Пьянков, Н.В. Тикунова – обсуждение результатов исследования; А.Л. Матвеев, Я.А. Хлусевич – написание текста; Н.В. Тикунова – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-74-00141). Экспрессионные плазмиды рТ4-НВ-рСАГ, клетки CHO-S и SP2/0 были получены из Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур ИХБФМ СО РАН, которая поддерживается Министерством образования и науки, проект № 121031300043-8.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все применимые институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. От каждого из включённых в исследование участников получено информированное добровольное согласие. Проведение исследований одобрено локальным этическим комитетом ИХБФМ СО РАН, протокол № 8 от 15.08.2021.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kubiak, J. Z., and Kloc, M. (2023) Coronavirus Disease Pathophysiology: Biomarkers, Potential New Remedies, Comorbidities, Long COVID-19, Post Pandemic Epidemiological Surveillance, *Int. J. Mol. Sci.*, **2023**, 12236, doi: 10.3390/ijms241512236.
2. Masters, P. S. (2006) The molecular biology of coronaviruses, *Adv. Virus Res.*, **65**, 193-292, doi: 10.1016/S0065-3527(06)66005-3.
3. Jiang, S., Hillyer, C., Du, L. (2020) Neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 and other human coronaviruses, *Trends Immunol.*, **41**, 355-359, doi: 10.1016/j.it.2020.03.007.
4. Maier, H. J., Bickerton, E., and Britton, P. (2015) Coronaviruses: methods and protocols, *Methods in Molecular Biology*, **1282**, 1-282, doi: 10.1007/978-1-4939-2438-7.
5. Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., and Veesler, D. (2020) Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein, *Cell*, **181**, 281-292.e6, doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058.
6. Guo, Y., Huang, L., Zhang, G., Yao, Y., Zhou, H., et al. (2021) A SARS-CoV-2 neutralizing antibody with extensive Spike binding coverage and modified for optimal therapeutic outcomes, *Nat. Commun.*, **12**, 2623, doi: 10.1038/s41467-021-22926-2.
7. Sun, M., Liu, S., Wei, X., Wan, S., Huang, M., et al. (2021) Aptamer blocking strategy inhibits SARS-CoV-2 virus infection, *Angew. Chem.*, **60**, 10266-10272, doi: 10.1002/anie.202100225.
8. Barh, D., Tiwari, S., Silva Andrade, B., Giovanetti, M., Almeida Costa, E., et al. (2020) Potential chimeric peptides to block the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain, *F1000Res.*, **9**, 576, doi: 10.12688/f1000research.24074.1.
9. Chaouat, A. E., Achdout, H., Kol, I., Berhani, O., Roi, G., et al. (2021) SARS-CoV-2 receptor binding domain fusion protein efficiently neutralizes virus infection, *PLoS Pathog.*, **17**, e1010175, doi: 10.1371/journal.ppat.1010175.
10. Nassar, M., Nso, N., Gonzalez, C., Lakhdar, S., Alshamam, M., et al. (2021) COVID-19 vaccine-induced myocarditis: case report with literature review, *Diabetes Metab. Syndrome*, **15**, 102205, doi: 10.1016/j.dsx.2021.102205.
11. Morgan, M. C., Atri, L., Harrell, S., Al-Jaroudi, W., Berman, A. (2022). COVID-19 vaccine-associated myocarditis, *World J. Cardiol.*, **14**, 382-391, doi: 10.4330/wjc.v14.i7.382.
12. Wang, C., Li, W., Drabek, D., Okba, N. M. A., van Haperen, R., et al. (2020) A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection, *Nat Commun.*, **4**, 2251, doi: 10.1038/s41467-020-16256-y.
13. Liu, L., Wang, P., Nair, M. S., Yu, J., Rapp, M., Wang, Q., Luo, Y., Chan, J. F., Sahi, V., Figueroa, A., Guo, X. V., Cerutti, G., Bimela, J., Gorman, J., Zhou, T., Chen, Z., Yuen, K. Y., Kwong, P. D., Sodroski, J. G., Yin, M. T., Sheng, Z., Huang, Y., Shapiro, L., and Ho, D. D. (2020) Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2

- spike, *Nature*, **584**, 450-456, doi: 10.1038/s41586-020-2571-7.
14. Deshpande, A., Harris, B. D., Martinez-Sobrido, L., Kobie, J. J., and Walter, M. R. (2021) Epitope classification and RBD binding properties of neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 variants of concern, *Front. Immunol.*, **12**, 691715, doi: 10.3389/fimmu.2021.691715.
 15. Chen, Y., Zhao, X., Zhou, H., Zhu, H., Jiang, S., and Wang, P. (2023) Broadly neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 and other human coronaviruses, *Nat. Rev. Immunol.*, **23**, 189-199, doi: 10.1038/s41577-022-00784-3.
 16. Shi, J., Zheng, J., Tai, W., Verma, A. K., Zhang, X., et al. (2022) A glycosylated RBD protein induces enhanced neutralizing antibodies against omicron and other variants with improved protection against SARS-CoV-2 infection, *J. Virol.*, **96**, e0011822, doi: 10.1128/jvi.00118-22.
 17. Timofeeva, A. M., Sedykh, S. E., Ermakov, E. A., Matveev, A. L., Odegova, E. I., et al. (2022) Natural IgG against S-protein and RBD of SARS-CoV-2 do not bind and hydrolyze DNA and are not auto-immune, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 13681, doi: 10.3390/ijms232213681.
 18. Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C. L., et al. (2020) Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation, *Science*, **367**, 1260-1263, doi: 10.1126/science.abb2507.
 19. 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.
 20. Matveev, A. L., Krylov, V. B., Emelyanova, L., Solovev, A. S., Khlusevich, Y. A., et al. (2018) Novel mouse monoclonal antibodies specifically recognize *Aspergillus fumigatus* galactomannan, *PLoS One*, **13**, e0193938, doi: 10.1371/journal.pone.0193938.
 21. Levanov, L. N., Matveev, L. E., Goncharova, E. P., Lebedev, L. R., Ryzhikov, A. B., et al. (2010) Chimeric antibodies against tick-borne encephalitis virus, *Vaccine*, **28**, 5265-5271, doi: 10.1016/j.vaccine.2010.05.060.
 22. Borgoyakova, M. B., Karpenko, L. I., Rudometov, A. P., Shanshin, D. V., Isaeva, A. A., Nesmeyanova, V. S., et al. (2021) Immunogenic properties of the DNA construct encoding the receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 spike protein, *Mol. Biol.*, **55**, 889-898, doi: 10.1134/S0026893321050046.
 23. Reed, L. J., and Muench, H. (1938) A simple method of estimating fifty percent endpoints, *Am. J. Hyg.*, **27**, 493-497, doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408.
 24. Khlusevich, Y. A., Matveev, A. L., Baykov, I. K., Bulychev, L. E., Bormotov, N. I., et al. (2018) Phage display antibodies against ectromelia virus that neutralize variola virus: selection and implementation for p35 neutralizing epitope mapping, *Antivir. Res.*, **152**, 18-25, doi: 10.1016/j.antiviral.2018.02.006.
 25. Matveev, A. L., Krylov, V. B., Khlusevich, Y. A., Baykov, I. K., Yashunsky, D. V., et al. (2019) Novel mouse monoclonal antibodies specifically recognizing β -(1-3)-D-glucan antigen, *PLoS One*, **14**, 4, e0215535, doi: 10.1371/journal.pone.0215535.
 26. Yang, M., Li, J., Huang, Z., Li, H., Wang, Y., et al. (2021) Structural basis of a human neutralizing antibody specific to the SARS-CoV-2 spike protein receptor-binding domain, *Microbiol. Spectr.*, **9**, e01352-21, doi: 10.1128/Spectrum.01352-21.
 27. Yuan, M., Huang, D., Lee, C. D., Wu, N. C., Jackson, A. M., Zhu, X., Liu, H., Peng, L., van Gils, M. J., Sanders, R. W., Burton, D. R., Reincke, S. M., Prüss, H., Kreye, J., Nemazee, D., Ward, A. B., and Wilson, I. A. (2021) Structural and functional ramifications of antigenic drift in recent SARS-CoV-2 variants, *Science*, **373**, 818-823, doi: 10.1126/science.abh1139.
 28. Khlusevich, Y. A., Matveev, A. L., Emelyanova, L. A., Goncharova, E. P., Golosova, N. N., et al. (2022) New p35 (H3L) epitope involved in vaccinia virus neutralization and its deimmunization, *Viruses*, **14**, 1224, doi: 10.3390/v14061224.
 29. Bahnan, W., Wrighton, S., Sundwall, M., Bläckberg, A., Larsson, O., et al. (2022) Spike-dependent opsonization indicates both dose-dependent inhibition of phagocytosis and that non-neutralizing antibodies can confer protection to SARS-CoV-2, *Front. Immunol.*, **12**, e808932, doi:10.3389/fimmu.2021.808932.

NOVEL B-CELL EPITOPES OF NON-NEUTRALIZING ANTIBODIES IN THE RECEPTOR-BINDING DOMAIN OF THE S-PROTEIN OF SARS-CoV-2 WITH DIFFERING EFFECTS ON THE SEVERITY OF THE COURSE OF COVID-19

A. L. Matveev^{1*}, O. V. Pyankov², Y. A. Khlusevich¹, O.V. Tyazhelkova¹, L. A. Emelyanova¹,
A. M. Timofeeva¹, A. V. Shipovalov², A. V. Chechushkov¹, N. S. Zaitseva³, G. A. Kudrov²,
G. M. Yusubaliev^{4,5}, S. M. Yussubaliyeva⁶, O.A. Zhukova⁴, A. Yu. Tikunov¹, V. P. Baklaushev^{4,7,8},
S. E. Sedykh⁹, G. I. Lifshits¹, and N. V. Tikunova^{1,9}

¹ *Federal State Public Scientific Institution "Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine", Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: guterus@gmail.com*

² *State Research Center of Virology and Biotechnology "VECTOR", Federal Service for the Oversight of Consumer Protection and Welfare, 630559 Koltsovo, Novosibirsk region, Russia*

³ *FIC FTM, 630117 Novosibirsk, Russia*

⁴ *Federal Research and Clinical Center of Specialized Medical Care and Medical Technologies FMBA of Russia, 115682 Moscow, Russia*

⁵ *Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies, FMBA of Russia, 117513 Moscow, Russia*

⁶ *Astana Medical University, 010000 Nur-Sultan, Kazakhstan*

⁷ *Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia*

⁸ *Pulmonology Research Institute FMBA of Russia, 115682 Moscow, Russia*

⁹ *Novosibirsk State University, 630090 Novosibirsk, Russia*

Antibodies against the receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 spike protein (RBD of S-protein) contribute significantly to the humoral immune response during coronavirus infection (COVID-19) and after vaccination. The main focus of the study of the epitope composition of RBD is concentrated on the epitopes recognized by viral neutralizing antibodies. The role of antibodies that bind to RBD but are unable to neutralize the virus in the formation of the immune response remains unclear. In this investigation, the immunochemical properties of two mouse monoclonal antibodies RS17 and S11 against RBD were examined. Both antibodies were shown to have high affinity, but they did not neutralize the virus. The epitopes of these antibodies were localized using phage display: the epitope recognized by the RS17 antibody is located at the N-terminal site of RBD (348-SVYAVNRKRIS-358); the epitope recognized by the S11 antibody is inside the receptor-binding motif of RBD (452-YRLFRKSN-459). Three groups of sera were tested for antibodies competing with non-neutralizing antibodies S11 and RS17: 1) from unvaccinated volunteers, who did not suffer from COVID-19 previously; 2) from people who had had a mild form of COVID-19; 3) from people who had had a severe form of COVID-19. Antibodies competing with the S11 antibody were shown to occur with equal frequency in each of the serum groups studied. At the same time, the presence of antibodies competing with antibody RS17 in the sera was associated with the severity of COVID-19 and was significantly more frequent in the group of sera obtained from patients with severe COVID-19. In conclusion, despite the clear significance of anti-RBD antibodies for the formation of an effective immune response against SARS-CoV-2, it is important to analyze their viral neutralizing activity and to confirm the absence of negative features of obtained anti-RBD antibodies after vaccination.

Keywords: coronavirus infection, SARS-CoV-2, COVID-19, RBD, antibody, receptor binding domain, antivirals

СОСТОЯНИЕ РАЗВИТИЯ ПОДХОДОВ К ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ ЭКСПРЕССИИ БИСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ, НАПРАВЛЕННЫХ ПРОТИВ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ

Обзор

© 2023 А.К. Мисорин, Д.О. Чернышова, М.С. Карбышев*

АО «Биокад», 198515 пос. Стрельна, Санкт-Петербург, Россия;
электронная почта: karbyshevms@biocad.ru

Поступила в редакцию 15.05.2023

После доработки 09.08.2023

Принята к публикации 23.08.2023

Биспецифические антитела (бсАт) относятся к группе многообещающих биотерапевтических препаратов, поскольку их структурные и функциональные особенности расширяют спектр их применения. бсАт способны связываться одновременно с двумя антигенами (или двумя эпитопами на одном антигене), кроме того, они могут направлять эффекторные иммунные клетки на опухолевые и доставлять различные вещества (радионуклиды, токсины и иммунологические агенты) к клеткам-мишеням, что позволяет широко использовать их в клинической практике. Настоящий обзор посвящён технологиям разработки платформ для создания бсАт, текущему прогрессу и перспективам их использования, а также выбору различных гетерологичных экспрессионных систем для производства белков. Кроме того, мы делимся своим мнением о перспективных платформенных решениях, предопределяющих векторы развития бсАт для терапии солидных опухолей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: биспецифические антитела, инженерия антител, экспрессионные системы антител, СНО, НЕК293, *E. coli*, дизайн антител, солидные опухоли.

DOI: 10.31857/S0320972523090038, **EDN:** WSSNXQ

ВВЕДЕНИЕ

На протяжении долгого времени человечество опирается на природные структуры и процессы для создания лекарств и методов лечения многих заболеваний [1]. Для разработки новых лекарственных средств в качестве альтернативы традиционным синтетическим, химически получаемым препаратам фармацевтическая и биотехнологическая промышленность обращается к биологическим компонентам, таким как пептиды, белки, ферменты или их комплексы, а также олигонуклеотиды, такие как ДНК или малые интерферирующие РНК [2].

Принятые сокращения: бсАт – биспецифические антитела; мкАт – моноклональные антитела; ПТМ – посттрансляционные модификации; ViTE – биспецифический Т-клеточный энгейджер; СНО – клетки яичников китайского хомячка; CL – константная лёгкая цепь; HC – тяжёлая цепь; НЕК293 – клеточная линия, полученная из эмбриональных почек человека; scFv – одноцепочечный переменный фрагмент; TCR – Т-клеточный рецептор.

* Адресат для корреспонденции.

Среди различных видов лекарственных средств термин «биотерапевтические препараты» или «биологические препараты» относится к широкой категории макромолекулярных лекарственных средств, включающих цитокины, факторы роста, гормоны, вакцины, белки, пептиды, а также препараты, состоящие из антител, действующее вещество которых получено из биологического источника. Моноклональные антитела (мкАт) представляют собой подкласс наиболее быстро развивающихся биотерапевтических препаратов, которые применяются для лечения хронических заболеваний, включая рак, аутоиммунные и инфекционные болезни [3, 4]. В настоящее время центральное место в терапевтическом применении мкАт отводится таргетной терапии опухолей и комплексной иммунотерапии рака [5] в сочетании с другими терапевтическими подходами [6]. Помимо применения при системной таргетной иммунотерапии, мкАт также являются ценным инструментом для диагностики [7, 8] и визуализации опухолей [9, 10].

Высокая антигенсвязывающая активность, стабильность и низкая иммуногенность — три основные физико-химические свойства, которые должны характеризовать антитела в контексте терапии [11]. Более того, было показано, что антитела поддаются белковой инженерии и обладают врождённой способностью связывать и антигены, и эндогенные иммунные рецепторы. Таким образом, универсальные характеристики терапевтических антител, включающие распознавание антигенов, их эффекторные свойства и увеличенный период полувыведения, обуславливают их механизм действия и эффективность [12].

Моноспецифический формат IgG может быть не идеальным для многих терапевтических применений [13, 14], поэтому был изобретён целый ряд форматов мультиспецифических антител (мсАт), способных связываться с разными антигенами или разными эпитопами на одном и том же антигене [15]. Несмотря на множество различных типов мсАт, основная проблема при их производстве заключается в том, что эти биомолекулы не всегда обладают желаемыми физическими и химическими характеристиками, что делает сложным их перевод в формат терапевтических продуктов. Более того, инновационные препараты из упомянутой группы, такие как биспецифические антитела (бсАт), состоят из разных цепей антитела с разной структурой и связывающими свойствами, поэтому существует много разных аспектов, связанных с белковой инженерией, которые должны учитываться в течение ранней разработки молекулы и процесса реализации технологий производства [16, 17]. Последние достижения генетики и белковой биохимии, а также доступность биопроцессов позволили успешно бороться с упомянутыми проблемами, и к настоящему времени отработаны различные методики получения бсАт в промышленных масштабах [18–20]. Данная статья посвящена потенциалу различных гетерологических систем экспрессии для продукции бсАт, исследуемых на поздних фазах клинических исследований, направленных на терапию солидных опухолей, а также объясняет необходимость дальнейшего развития рекомбинантной технологии антител.

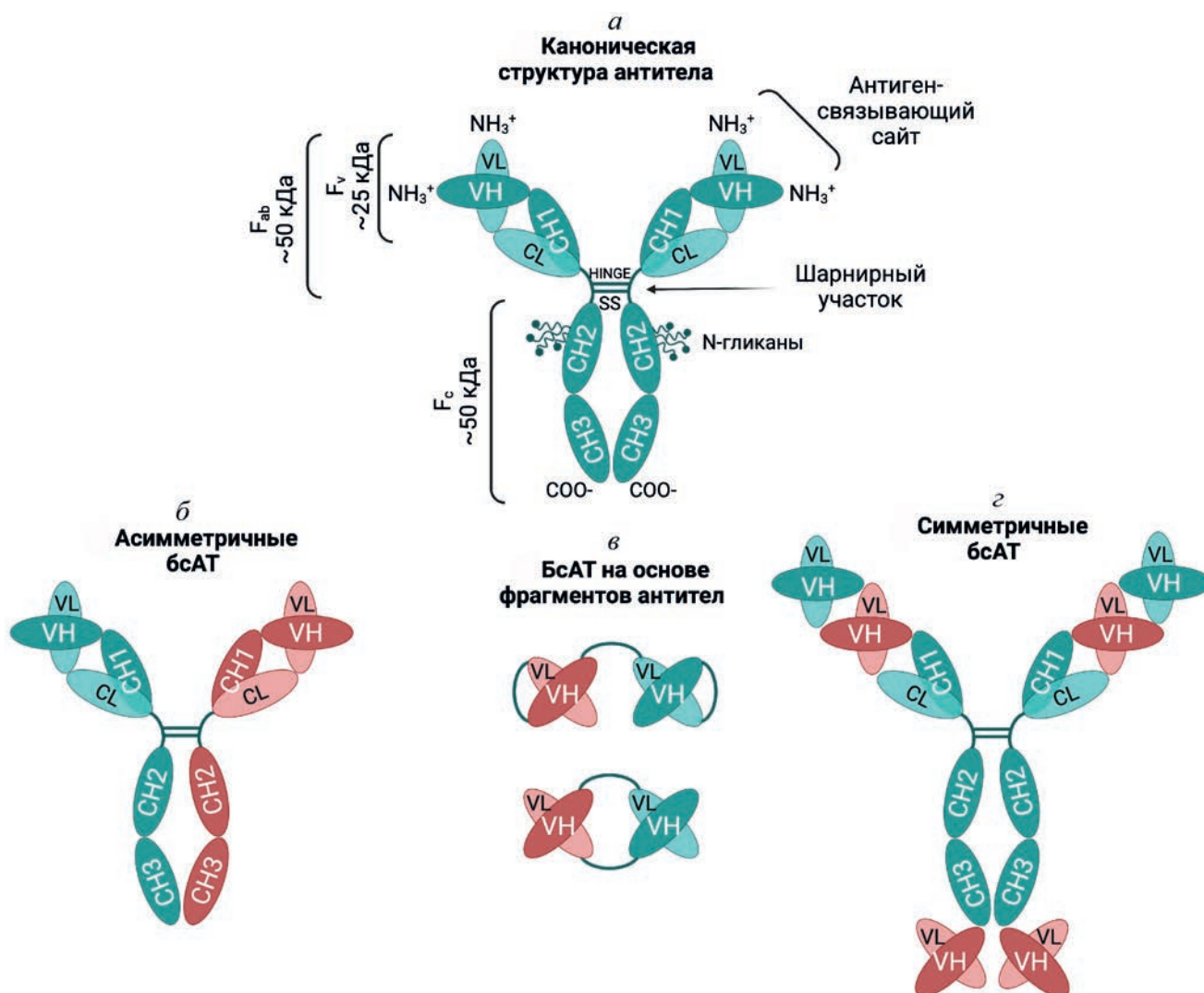
ДИЗАЙН СТРУКТУРЫ И СБОРКИ МОНО- И БИСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ

Каноническое IgG-антитело представлено различными Y-образными молекулярными формами и состоит из двух идентичных тяжё-

лых цепей (НС) и двух лёгких цепей (LC). Тяжёлая цепь состоит из 4-х доменов: трёх константных и одного переменного (СН1-СН3 и VH). Лёгкая цепь представлена двумя доменами: одним константным (CL) и одним переменным (VL). Дисульфидные связи соединяют тяжёлые цепи в шарнирном регионе между СН1- и СН2-доменами. Более того, каждая тяжёлая цепь соединена с лёгкой дисульфидной связью на стыке СН1 и CL. Константные домены СН2 и СН3 каждой тяжёлой цепи формируют Fc-фрагмент. Переменные домены лёгкой и тяжёлой цепей (VH и VL) соединены с близко расположенными СН1- и CL-доменами, формируя Fab-фрагмент антитела.

Существует несколько подходов к получению бсАт: получение разных типов антигенсвязывающих фрагментов (Fab, scFv, VHH) [21] и оптимизация канонической структуры антитела посредством различных типов мутаций, направленных на гетеродимеризацию лёгких и тяжёлых цепей [18, 22]. Из широкого ряда классификаций и систематизаций бсАт [14, 16] мы сосредоточились на подходящем подходе для уже упомянутых целей стратификации, который был определён недавно [18] и стал широко использоваться благодаря своей простоте. Основываясь на упомянутой систематике, все типы бсАт делятся на три группы: (i) асимметричные, (ii) симметричные и (iii) бсАт на основе фрагментов антител (рисунок).

Простейшим случаем являются бсАт на основе фрагментов, обычно получаемые путём слияния двух или более антигенсвязывающих фрагментов с различной специфичностью, таких как scFv-, VHH- или Fab-форматы, с помощью полипептидных линкеров. Чтобы обеспечить пролонгирование периода полувыведения, к молекуле может быть добавлен человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) [23, 24]. В результате может быть получена молекула, состоящая из одной полипептидной цепи. Благодаря своей простой структуре этот тип молекулы не сталкивается с проблемой некорректного спаривания цепи [25]. Между тем молекулы, которые принадлежат симметричному типу, могут содержать Fc-фрагмент, но в то же время иметь два антигенсвязывающих фрагмента к двум разным эпитомам на одной полипептидной цепи. Как правило, это либо канонические антитела, к которым через линкеры добавляются фрагменты scFv или VHH, либо бсАт на основе фрагментов, слитых с Fc-фрагментом. Обычно такие молекулы имеют тетравалентную структуру с двумя валентностями на каждую мишень. Для таких молекул не существует проблем, связанных



Структурные особенности трёх основных классов бсАт: *a* – каноническое IgG-антитело; *б* – асимметричное бсАт (Бивалент (1+1)); *в* – бсАт на основе фрагментов антител (tandem scFv, BiTE и Diabody), *г* – симметричное бсАт (Тетравалент (2+2))

с неправильной сборкой цепей. Третий тип бсАт является асимметричным и состоит из тяжёлой и лёгких цепей, полученных из разных родительских антител [26]. Для молекул этого типа при рекомбинантном получении наблюдается такая техническая проблема, как неправильное спаривание цепей, которая обычно решается путём введения мутаций, способствующих корректной гетеродимеризации тяжёлых и лёгких цепей.

Далее мы дадим подробное описание, в котором будут представлены основные направления и достижения коммерчески доступных технологических платформ для производства рекомбинантных бсАт, уделяя особое внимание прогрессу клинических разработок для лечения солидных опухолей.

Асимметричные бсАт. Xmab®. XmAb-платформа, разработанная компанией «Xencor», представляет собой набор аминокислотных

замен, предназначенных для введения в константные домены антител (от шарнирного региона до CH3) для снижения или усиления эффекторных свойств, увеличения периода полувыведения антитела и создания биспецифических молекул [27]. Коллеги из компании «Xencor» использовали рациональный *in silico* дизайн для определения оригинальных аминокислотных замен для гетеродимеризации тяжёлых цепей, одновременно обеспечивая и правильную сборку молекулы, и высокую термостабильность финальных биспецифических кандидатов [28]. Используя полученные модифицированные тяжёлые цепи, также дополнительно было оптимизировано смещение изоточки для каждой цепи для облегчения процесса очистки [27].

Azymetric®. Компанией «Zymeworks» был разработан альтернативный *in silico* алгоритм, основная особенность которого связана

с уникальными аминокислотными заменами для гетеродимеризации тяжёлых цепей. Также отметим, что компания смогла создать бсАт, состоящее из двух разных тяжёлых цепей и двух разных лёгких цепей посредством введения мутаций не только в СН3-домен, но и также в СН1- и СL-домены. Этот подход можно комбинировать с использованием каппа- и лямбда-семейств лёгких цепей.

CrossMab®. Разработанная компанией «Hoffman la Roche» платформа «CrossMab» облегчает правильную сборку бсАт с двумя разными лёгкими цепями и двумя разными тяжёлыми цепями. Основное преимущество этой технологии заключается в правильной межцепочечной димеризации, которая обеспечивается мутациями «knob-into-hole» [29]. Сама технология может быть реализована в трёх различных вариантах.

Первый вариант предполагает изоляцию СН1 и VL из тяжёлой цепи для второй специфичности в отдельную лёгкую цепь, тогда как соответствующие домены лёгкой цепи второй специфичности вставляются в тяжёлую цепь; этот вариант также называется «CrossMab Fab». При этом варианте инженерии бсАт основной проблемой становится образование независимых побочных продуктов, состоящих из димеров тяжёлых цепей (из-за комплементарности «knob-into-hole» и комплементарности СН1 на тяжёлой цепи первой специфичности и СL на тяжёлой цепи второй специфичности) и Fab-фрагмента (также из-за комплементарности СН1-СL на разных лёгких цепях). Второй вариант называется «CrossMab СН1-СL», при нём между лёгкими и тяжёлыми цепями второй специфичности меняются только домены СН1-СL. Теоретически такая замена предотвращает образование побочного продукта. Третий вариант, «CrossMab VH-VL», предполагает аналогичную замену переменных доменов в тяжёлой и лёгкой цепи второй специфичности. Используя такую замену, возможно получить нежелательный побочный продукт с общей лёгкой цепью. Потенциальная возможность для оптимизации этого варианта определяется введением зарядовых замен в константные домены лёгких и тяжёлых цепей первой специфичности. Этот подход предполагает предотвращение образования нежелательных примесей. Простота упомянутого платформенного решения позволяет создавать бивалентные бсАт (с одной специфичностью на валентность, 1+1) и трёх- и четырёхвалентные мсАт [30].

FIT-Ig®. Компания «EriMab» разработала оригинальную платформу для создания четырёхвалентных бсАт на основе подхода

«CrossMab» – так называемые «Fabs-In-Tandem Immunoglobulin (FIT-Ig)». Здесь константные и переменные домены лёгкой цепи со специфичностью ко второму антигену добавляются к N-концам тяжёлых цепей, уже обладающих специфичностью к первому антигену. Таким образом, данные бсАт состоят из двух канонических лёгких цепей со специфичностью к первому антигену и двух лёгких цепей, содержащих константные и переменные домены тяжёлой цепи со специфичностью ко второму антигену. Благодаря потенциалу платформы «CrossMab» задача правильной димеризации лёгкой цепи с тяжёлой цепью полностью решена [31, 32].

cLC®. Этот формат структуры бсАт похож на каноническую молекулу иммуноглобулина, но специфичность к двум разным антигенам достигается за счёт разных тяжёлых цепей, гетеродимеризованных с использованием таких мутаций, как «knob-into-hole». Лёгкая цепь здесь подбирается таким образом, чтобы она также была комплементарна к обоим тяжёлым цепям и не приводила к потере функциональной активности или изменениям физико-химических свойств бсАт [33, 34].

Triomab®. В формате «Triomab» бсАт получается путём соматического слияния двух гибридов, каждая из которых экспрессирует уникальное мсАт. Два гибридома, экспрессирующие антитела, объединяются, и полученная гибридная клетка экспрессирует тяжёлые и лёгкие цепи антител от родительских клеток. Процесс сборки антител позволяет образовывать как родительские, так и гибридные иммуноглобулины. Технология «quadroma» является историческим базисом для получения бсАт, но имеет такие недостатки, как низкая производительность и высокая гетерогенность получаемого продукта. Фактический процент функциональных бсАт в линии клеток квадрома непредсказуем, и в данной ситуации требуется трудоёмкий процесс, связанный с изоляцией бсАт от побочных продуктов. Впоследствии эта технология была усовершенствована путём слияния гибридомы мыши и крысы. Содержание химерных бсАт мышь/крыса было значительно выше благодаря преимущественной димеризации тяжёлой и лёгкой цепей, ограниченной видовой принадлежностью, в отличие от случайной димеризации в обычных квадромах типа мышь/мышь или крыса/крыса [35].

Biclomics®. Компания «Merus» использует широко известный формат с общей лёгкой цепью с отличием в том, что вместо популярной мутации «knob-into-hole» они используют собственные мутации для гетеродимеризации

НС – DEKK (L351K, T366K/L351D, L368E) [33]. Так, антитело зенукутузумаб (MCLA-128) было разработано с использованием упомянутой технологии.

HLE-BiTE®. Разработанная компанией «Amgen» платформа «HLE-BiTE» является биспецифическим Т-клеточным энгейджером (BiTE) – классом бсАт, которые задействуют цитотоксические Т-клетки, направляя их на опухолевые. BiTE – это слитый белок, состоящий из двух одноцепочечных переменных фрагментов (scFvs) различных антител. Один из этих фрагментов связывается с Т-клетками, обычно через рецептор CD3, в то время как другой связывается со злокачественными клетками через специфическую для опухоли молекулу. «HLE» в этом формате является аббревиатурой для «Half-Life Extended», что обозначает увеличение времени полувыведения бсАт в организме пациента, которое достигается добавлением Fc-фрагмента к каждой молекуле BiTE.

CRIB. Компания «Alphamab» разработала свою платформу для гетеродимеризации тяжёлых цепей. Основанием для новой платформы под названием «Charge Repulsion Induced Bispecific (CRIB)» выступили мутации «knob-into-hole». После оптимизации этой платформы путём добавления одной аминокислотной замены к каждой тяжёлой цепи доля корректно собранных гетеродимеров увеличилась с 74% до 94% [36].

Симметричные бсАт. Tandem sdAb-Fc®. «Alphamab» активно использует VHH-фрагменты, слитые с Fc-фрагментом человеческого IgG, для разработки антител. Для получения бсАт использовали слияние двух VHH-фрагментов, и полученный димер был непосредственно связан с Fc-фрагментом. В результате гомодимеризации Fc-фрагментов можно получить тетравалентное бсАт с двумя валентностями (к одной мишени).

TETRABODY – ITAB®. Компания «Akesobio» разработала передовую платформу под названием «Tetrabody», которая основана на добавлении scFv, специфичного для второй цепи, к C-концу каждой тяжёлой цепи. Эта манипуляция приводит к получению молекулы с четырьмя связывающими сайтами для двух мишеней.

DVD-Ig®. Формат «Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig)» был описан в 2007 г. [37, 38]. Эта четырёхвалентная молекула состоит из двух тяжёлых цепей и двух лёгких, имеет функциональный Fc-регион и константные домены в конфигурации, аналогичной каноническому IgG. Однако каждое плечо молекулы содержит два переменных домена

(VD) в тяжёлых и лёгких цепях, соединённых линкерными последовательностями. Как и формат Tetrabody, DVD-Ig является тетравалентным антителом, способным взаимодействовать двумя связывающими сайтами с каждой из двух мишеней. Антитело DVD-Ig можно сконструировать, соединив последовательно переменный домен любой пары антител. Оно может состоять из полностью человеческих последовательностей, что уменьшает потенциальную иммуногенность и позволяет сохранять стабильность в сыворотке крови, как обычный IgG. Утверждается, что антитело DVD-Ig можно эффективно производить с использованием стандартных систем экспрессии млекопитающих, и оно обладает физико-химическими свойствами, сравнимыми с обычным IgG, несмотря на его увеличенный размер и нестандартную структуру.

IgG + TGFβ-receptor. Этот формат также похож на формат Tetrabody за исключением того, что вместо использования фрагмента scFv для второй специфичности к антителу, взаимодействующему с PDL1, добавляется связывающий домен TGF-βRII, способный взаимодействовать с тремя изоформами TGF-β.

БсАт на основе фрагментов. TriTAC®. «Tri-specific T-cell Activating Construct (TriTAC)» – это новый формат Т-клеточного энгейджера, разработанный «Harpoon Therapeutics». Этот новый класс иммунотерапии на основе Т-клеток направлен на достижение более высокой эффективности в терапии солидных опухолей по сравнению с таким золотым стандартом, как Т-клеточная терапия. БсАт формата «TriTAC» состоит из трёх антиген-связывающих доменов, один из которых связывается с альбумином, необходимым для увеличения периода полувыведения молекул в сыворотке. Антитела «TriTAC» имеют молекулярный вес около 53 кДа, что делает их меньше большинства форматов Т-клеточных энгейджеров. Одно из главных преимуществ этих антител заключается в том, что их маленький размер обеспечивает более быстрое распространение в тканях солидных опухолей [39].

ImmTAC®. Молекула ImmTAC® представляет собой слитый белок, состоящий из рекомбинантного рецептора Т-клеток (TCR), соединённого через линкер с одноцепочечным переменным фрагментом антитела scFv. Он взаимодействует с CD3 и активирует поликлональные Т-клетки для высвобождения провоспалительных цитокинов и цитолитических белков, что приводит к прямому лизису опухолевых клеток. Существенное отличие от канонических бсАт или слитых антиген-

связывающих фрагментов заключается в том, что молекулы этого формата используют TCR для взаимодействия с опухолевыми антигенами. В то время как антитела могут взаимодействовать только с антигенами на поверхности клетки или с секретируемыми молекулами, CR могут распознавать пептиды, которые являются фрагментами внутриклеточных мишеней, представленными в составе молекул человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) [40, 41].

ЭКСПРЕССИОННЫЕ СИСТЕМЫ И ПОДХОДЫ К ПОЛУЧЕНИЮ БИСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ

Спрос на высокопроизводительные экспрессионные системы растёт по мере увеличения числа новых биопродуктов и биоаналогов. Выбор гетерологичной системы экспрессии тесно связан с экономическими предпосылками (например, выход целевого белка и затраты на получение продукта), а также с биохимическими и биофизическими свойствами конечного продукта (например, число цепей в молекуле белка, характер гликозилирования) и с характеристиками самого биопроцесса.

Относительно простые белки, такие как слитые фрагменты антител, состоящие из одной полипептидной цепи, могут быть получены с помощью прокариотических систем, например, *Escherichia coli* [42]. В случае более сложных белков на основе полноразмерных антител, состоящих из нескольких полипептидных цепей, широко используются эукариотические системы, как правило, клеточные линии млекопитающих [43]. Эти системы могут предоставить производителям необходимые профили фолдинга и посттрансляционных модификаций (ПТМ) белков в соответствии с человеческими биохимическими путями. Кроме того, экспрессионные системы на основе клеток млекопитающих могут быть использованы в крупномасштабном производстве и способны синтезировать большие объёмы терапевтических антител [44]. В данном разделе статьи мы рассмотрим такие гетерологичные экспрессионные системы для получения бсАт, которые уже продемонстрировали отличную эффективность в промышленном производстве.

Прокариотические клетки (*E. coli*). Штаммы *E. coli* являются широко используемой экспрессионной системой для получения рекомбинантных белков. Эта бактерия обладает рядом преимуществ для производства белковых молекул, включая высокие уровни экспрессии,

экономичность, быстрый рост и масштабируемость. На основе *E. coli* получено множество рекомбинантных терапевтических белков, включая антитела, цитокины и гормоны роста. Антитела могут быть получены в *E. coli* в различных форматах, включая scFvs, Fab-фрагменты и даже полноразмерные антитела. Однако получение полноразмерных антител может быть затруднено из-за сложности этих молекул и необходимости их правильной сборки и фолдинга [45].

Производство бсАт в *E. coli* также возможно, но может быть ещё более сложным, чем производство моноспецифических антител, из-за сложной структуры данных молекул и необходимости сохранения естественной структуры антитела. Поэтому, согласно недавнему исследованию [42], только некоторые фрагменты антител и слитые белки, полученные на базе экспрессионной системы *E. coli*, были одобрены в качестве терапевтических средств для лечения различных заболеваний; полноразмерные мкАт или бсАт, полученные с помощью *E. coli*, на данный момент не были клинически апробированы.

Однако последние достижения в области белковой инженерии и экспрессионных систем позволили получать бсАт в *E. coli* с применением различных подходов, используя разные форматы белков. Один из подходов к получению бсАт в *E. coli* предполагает использование фрагментов белков, таких как ViTE или триспецифические киллерные энгейджеры (TriKEs). Эти форматы состоят из небольших фрагментов, которые могут быть получены в *E. coli* и соединены в бсАт или триспецифические антитела. В настоящее время известно, что одним из терапевтических препаратов, полученных с использованием системы *E. coli* и одобренных для лечения рака, является тебентафусп – новый формат иммунотерапии на основе платформы ImmTAC®. Он включает в себя растворимый TCR, слитый с одноцепочечным вариабельным анти-CD3 фрагментом. Домен TCR Tebentafusp таргетирует клетки, на поверхности которых представлен HLA-A*02:01 в комплексе с меланома-ассоциированным антигеном gp100 [46]. Данное бсАт получено в виде телец включения и требует сложных процедур рефолдинга.

Известен случай синтеза бсАт в *E. coli* для молекулы, состоящей из обычного Fab-фрагмента, нацеленного на CD3, и VHH, нацеленного на HER2. Очищенное антитело способно вызывать опосредованную Т-клетками цитотоксичность против HER2-положительных клеток как *in vitro*, так и *in vivo*. Авторы предпо-

лагают, что с помощью этого подхода можно эффективно получать бсАт, направленные на другие опухолевые антигены [47].

Другой подход к рекомбинантному получению бсАт в *E. coli* предполагает совместную экспрессию двух полуантител, каждое из которых состоит из НС и ЛС. Эти полуантитела могут спонтанно собираться в интактную молекулу бсАт с естественной архитектурой антигена [48]. Данный метод получения бсАт подразумевает совместное культивирование двух штаммов бактерий, каждый из которых экспрессирует своё полуантитело. С использованием этого подхода было получено 28 различных бсАт. Одно из этих антител, нацеленное на тирозинкиназы рецепторов MET и EGFR, ингибирует их сигналы и подавляет рост опухолевых клеток. Данный метод позволяет быстро и недорого получать бсАт из любых двух существующих антител в количествах, необходимых для ранней разработки и доклинических исследований.

Производство как моноспецифических антител, так и бсАт в *E. coli* по-прежнему сопряжено с определёнными трудностями, связанными с потенциально необратимой агрегацией или деградацией экспрессируемых белков и отсутствием некоторых ПТМ [49]. Несмотря на эти трудности, *E. coli* остаётся привлекательной экспрессионной системой для гетерологического производства бсАт благодаря высоким уровням экспрессии и масштабируемости. Крупномасштабное производство бсАт в *E. coli* возможно при использовании технологии ферментации, которая позволяет выращивать клетки с высокой плотностью и получать большие количества рекомбинантных белков [50].

Эукариотические клетки (СНО). Система экспрессии в клетках яичников китайского хомячка (СНО) широко используется для получения рекомбинантных белков, в частности канонических мкАт [51]. Клетки СНО являются наиболее привлекательной системой благодаря стабильной клеточной пролиферации, эффективной ПТМ и устоявшимся стандартам надлежащей производственной практики (GMP). Эти клетки были всесторонне изучены и оптимизированы для производства белков, что делает их надёжной и эффективной платформой для крупномасштабного производства. Важной характеристикой клеточной линии является производительность. На ранних стадиях разработки из-за своей простоты и скорости используются транзистентные экспрессионные системы. На более поздних стадиях разработки необходимо получить стабильную клеточную линию, способную продуцировать антитело

с неизменным качеством. Клетки СНО используются в качестве клеточной линии-производителя для более 50% существующих биотехнологических препаратов [52].

В 1957 г. Теодор Пак выделил из ткани яичника китайского хомячка клетку, которая оказалась бессмертной и превратилась в клеточную линию СНО-ori. Позже, в 1968 г., из неё была получена клеточная линия СНО-K1. Обе клеточные линии выращивались как адгезионные культуры и были малоприспособны для крупномасштабных процессов. В 1971 г. Томпсон из Университета Торонто создал другую подлинию, известную сейчас как СНО-S, для выращивания в суспензионном формате, что позволило нарабатывать клетки в более крупных масштабах в биореакторах [53].

В настоящее время для производства мкАт преимущественно используется родительская клеточная линия СНО. По состоянию на 2017 г. около 2/3 всех одобренных мкАт были получены в клетках СНО [54]. Аналогичное соотношение сохраняется и для бсАт. По состоянию на 2022 г. девять одобренных бсАт были получены с помощью экспрессионных систем млекопитающих (за исключением катумаксамаба), среди них шесть – в клетках СНО.

Благодаря таким преимуществам, как быстрый рост в суспензионной культуре и высокий выход рекомбинантных белков, эта платформа в настоящее время активно используется для получения бсАт как на стадии ранней разработки, так и в промышленном производстве. Кроме того, клетки СНО могут осуществлять ПТМ, такие как гликозилирование, которые важны для функционирования и стабильности многих рекомбинантных белков. Также некоторые исследования показали, что одни и те же белки, в частности бсАт, полученные в клетках *E. coli* и СНО, показывают существенно разные результаты в тестах на функциональную активность [55, 56].

Сложной проблемой при использовании экспрессионной системы млекопитающих (например, клеток СНО и НЕК293) является необходимость использования дорогостоящих производственных платформ и строгих условий культивирования клеток для обеспечения их жизнедеятельности и предотвращения выделения побочных продуктов в процессе производства. Условия культивирования могут существенно влиять на ПТМ и функциональную активность конечного продукта [57]. Для достижения желаемых качественных характеристик клеточных линий необходимо иметь полное представление о параметрах процесса и контролировать их. При внедрении техно-

логий в новую лабораторию или при расширении производства эти коррективы и оптимизации могут оказаться непростыми.

Одной из проблем при получении чистых продуктов бсАт является правильная сборка антитела. Лишь немногие исследования системно изучали стратегии оптимизации клеточных линий СНО, которые могут способствовать дальнейшему увеличению чистоты бсАт, полученных в клетках СНО. Например, рекомендуется экспрессировать НС и ЛС с помощью отдельных векторов, поскольку манипулирование соотношением плазмид является простым и эффективным подходом к оптимизации сборки белков для получения желаемых продуктов. В другом подходе описан метод двухступенчатой селекции пула, который позволяет повысить чистоту экспрессии бсАт с 44,5 до 88,6% [58].

Другой проблемой синтеза бсАт является образование агрегатов, которые повышают риск нежелательной иммуногенности. Данные агрегаты должны быть удалены, что приводит к снижению выхода целевых белков. Согласно полученным данным, нарушение регуляции глутатиона в клетках СНО является причиной агрегации бсАт. Оценивалось образование агрегатов при использовании процессов «fed-batch» и перфузии. В результате перфузионного процесса содержание агрегатов бсАт оказалось значительно ниже, чем при использовании процесса «fed-batch» [59].

В отдельных работах рассматривались подходы к повышению выхода антител в клетках СНО. Одним из таких подходов является генная инженерия клеток с целью достижения сверхэкспрессии генов, участвующих в клеточном цикле. Так, давно известно, что, воздействуя на отдельные стадии клеточного цикла с целью ускорения или замедления скорости роста клеток на разных фазах (G0/G1 или G2/M), можно увеличить выход рекомбинантных белков. Так, достижение сверхэкспрессии генов *CDKL3* и *COX15*, участвующих в регуляции клеточного цикла, приводит к значительному увеличению продукции белка [60].

Альтернативным способом повышения продуктивности может быть нокаут генов, снижающих экспрессию белков клетки-хозяина (БКХ). БКХ могут секретироваться живыми клетками, а также высвобождаться при их гибели. Они сами по себе являются нежелательной примесью, которую необходимо удалять из препарата антител. В соответствующих экспериментах было показано, что нокаут генов нескольких БКХ может приводить к значительному повышению титра антител. Основная

гипотеза заключается в том, что это позволяет использовать ресурсы клеток для усиления экспрессии интересующего гена. Это также позволило добиться большей чистоты конечного препарата антител [61].

На продуктивность клеток можно влиять не только путём целенаправленной регуляции экспрессии генов с помощью генной инженерии. Было показано, что непрерывное культивирование клеток СНО при низких температурах (33 °C) и добавление в культуральную среду бутирата натрия приводит к увеличению продуктивности рекомбинантных белков. Это было связано с остановкой клеточного цикла в фазе G1/G0. Также было показано, что культивирование при низких температурах или с добавлением бутирата натрия приводит к изменениям в клеточном транскриптоме, особенно в отношении регуляции клеточного цикла. В то же время транскриптомы, связанные с клеточным циклом и пролиферацией, различались между культурами клеток, культивируемых при низкой температуре и с добавлением бутирата натрия. Это позволяет предположить, что в таких подходах клеточный цикл регулируется разными механизмами. Предположительно, культивирование при низкой температуре приводит к остановке клеточного цикла р53-зависимым образом. р53 является одним из основных регуляторов клеточного цикла и апоптоза, и его активация приводит к остановке клеточного цикла за счёт активации ряда генов-мишеней р53 (например, *CDKN1A*, *BAX*, *MDM2*). С другой стороны, добавление бутирата натрия приводит к остановке клеточного цикла за счёт модуляции экспрессии и активности циклин-зависимых киназ (CDK) и ингибиторов CDK, которые являются регуляторными белками клеточного цикла, участвующими в переходе G-фазы [62].

Эукариотические клетки (НЕК293). Клетки НЕК293 представляют собой линию, изначально полученную из клеток эмбриональной почки человека. НЕК293 являются ещё одной широко используемой экспрессионной системой для получения рекомбинантных белков. Они обладают рядом преимуществ, в том числе способностью к активной пролиферации и лёгкой трансфекции. Кроме того, поскольку это клетки человеческого происхождения, в них можно получать белки с человекоподобными ПТМ [63].

Профиль гликозилирования белков может быть важным фактором для их использования в качестве биотерапевтических препаратов. Гликопротеины с необходимым профилем гликозилирования могут обладать более

высокой активностью, стабильностью, периодом полураспада и сниженной иммуногенностью. Основное преимущество использования НЕК293 в качестве экспрессионной платформы заключается в специфическом требовании к профилю гликозилирования биотерапевтических молекул [64]. Кроме того, было создано множество подтипов и производных этой линии, среди которых НЕК293, НЕК293-Т и НЕК293-Ф часто используются в производстве биофармацевтических препаратов.

Например, НЕК293ЕВНА1 (или 293Е) — это подтип клеток НЕК293, стабильно экспрессирующих ядерный антиген-1 Эпштейна–Барр (*EBNA1*). При использовании экспрессионных векторов, имеющих точку начала репликации EBV (*oriP*), этот подтип может демонстрировать трёхкратное увеличение выхода рекомбинантных белков по сравнению с аналогичным вектором без *oriP*. Это является одним из основных преимуществ использования клеток НЕК293ЕВНА1 по сравнению с каноническими клетками НЕК293 для производства рекомбинантных белков.

Аналогичным образом была создана клеточная линия НЕК293-6Е, экспрессирующая усечённый EBNA-1, лишённый домена Gly-Gly-Ala. НЕК293-6Е продемонстрировала более высокую транзистентную экспрессию генов и активную пролиферацию клеток по сравнению с НЕК293-Е [65].

Хотя клетки НЕК293F являются клональной клеточной линией, полученной из родительской клеточной линии НЕК293 и продаваемой под торговой маркой GIBCO®, эти клетки были адаптированы для выращивания в суспензионной культуре в бессывороточной среде. Клетки НЕК293F были использованы для получения нескольких рекомбинантных терапевтических препаратов, одобренных Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA). К ним относятся рекомбинантный слитый белок FVIII (rFVIII_{Fc}, ELOCTA®) и агонист рецепторов глюкагоноподобного пептида 1 (дулаглутид; TRULICITY®) для лечения гемофилии А и диабета 2-го типа соответственно.

Также существуют клетки, стабильно экспрессирующие биосенсор cAMP GloSensor™ (20F) и полученные компанией «Promega» (Мадисон, США), которые были названы НЕК293G [66].

Хорошо известная линия НЕК293-Т является производной клеточной линии НЕК293, созданной путём экспрессии термочувствительного мутантного Т-антигена SV40. Экс-

прессия Т-антигена позволяет плазмидам, несущим точку начала репликации SV40, активно реплицироваться в клетках [67].

Клетки НЕК293 также могут быть использованы для крупномасштабного производства антител. Однако масштабирование производства в данной системе сопряжено с определёнными трудностями, включая поддержание высокого уровня экспрессии белка и качества продукта.

Исследования показали, что нокаут гена *CASP8AP2* положительно влияет на производство рекомбинантных белков. *CASP8AP2* кодирует FLICE-ассоциированный большой белок (FLASH). В процессе Fas-опосредованного апоптоза FLASH входит в состав сигнального комплекса, индуцирующего смерть (DISC), который собирается после связывания рецептора смерти Fas с его лигандом FasL. Сборка DISC активирует прокаспазу 8 с образованием протеолитической каспазы 8, которая инициирует апоптотический каскад. FLASH также участвует в созревании гистоновых мРНК и регуляции транскрипции гистоновых генов в S-фазе клеточного цикла, а также в активации транскрипционных факторов cMYB и NF-κB. В клетках НЕК293, лишённых *CASP8AP2*, наблюдается семикратное увеличение специфической экспрессии рекомбинантной люциферазы и 2,5-кратное увеличение специфической экспрессии рекомбинантного *SEAP* без существенного влияния на рост и жизнеспособность клеток. Транскриптомный анализ показал, что нарушение регуляции клеточного цикла, в частности активация ингибитора циклин-зависимой киназы 2A (*CDKN2A*), способствовало повышению экспрессии рекомбинантного белка в клетках с дефицитом *CASP8AP2*. Полученные результаты подтверждают, что ген *CASP8AP2* является важной инженерной мишенью для улучшения экспрессии рекомбинантных белков в клеточной линии НЕК293 [68].

Несмотря на сходный с человеком профиль гликозилирования, использование клеток НЕК293 для производства терапевтических белков связано с трудностями, обусловленными высоким содержанием в них терминального N-ацетилгалактозамина (GalNAc) и низким уровнем сиалилирования. В терапевтических белках такие N-гликаны часто вызывают быстрый клиренс из кровотока пациента за счёт эффективного связывания с рецептором асиалогликопротеина (ASGP-R) и рецептором маннозы (MR). Однако недавно исследователи разработали новую клеточную линию НЕК293F, которая устраняет терминальный GalNAc

и увеличивает сиалилирование путём нокаута GalNAc-трансфераз *B4GALNT3* и *B4GALNT4* и сверхэкспрессии сиалилтрансфераз *ST6GAL1* и *ST3GAL6*. Данная гликоинженерная клеточная линия хорошо подходит для получения терапевтических белков с полностью человеческим N-гликозилированием и отличными фармакокинетическими свойствами [69].

Использование клеток НЕК293 для получения терапевтических препаратов, в том числе бсАт, несколько ограничено. Хотя во многих исследованиях сообщалось о транзientной экспрессии в клетках НЕК293 для получения бсАт [70, 71], для производства биофармацевтических препаратов чаще всего используются стабильные линии клеток СНО. С 2015 г. FDA одобрило семь препаратов, полученных из клеток НЕК. В шести клеточных и генотерапевтических подходах используется клеточная линия НЕК293 или её производные для получения вирусных векторов.

Несмотря на это, многие бсАт, полученные с помощью транзientной экспрессии, в настоящее время находятся на стадии клинической разработки. Это свидетельствует о перспективности использования данной системы экспрессии для получения бсАт. Помимо традиционных методов создания терапевтических бсАт, когда каждый фрагмент проверяется отдельно, а один или несколько лучших вариантов отбираются и объединяются в биспецифический формат, разрабатываются и новые подходы. Один из таких предполагает тестирование различных бсАт в клеточных тестах, в которых могут участвовать до 22 000 кандидатов [72]. В литературе описано, что клетки НЕК293 наиболее подходят для транзientной экспрессии благодаря высоким титрам белка — диапазон титров антител, полученных при экспрессии НЕК293, составляет от десятков до сотен миллиграммов на литр [73–75]. Однако авторы данного обзора не согласны с приведённым описанием, поскольку при транзиторной экспрессии антител клетками СНО удалось получить антитела с титрами не менее 150 мг/л. Этого вполне достаточно для характеристики ведущих кандидатов. Тем не менее задача повышения титров антител как при транзientной экспрессии, так и при производстве стабильных клеточных линий является актуальной. Низкая продуктивность конкретного антитела может стать причиной прекращения дальнейшей разработки.

Также было показано, что транзientная сверхэкспрессия отдельных субъединиц эукариотического фактора трансляции eIF3 (eIF3i и eIF3c) в клетках СНО и НЕК293 приводит

к умеренному увеличению общего количества eIF3i (максимальное увеличение на 40% выше контроля) и примерно 10%-ному увеличению скорости глобального синтеза белка в клетках СНОК1. Модифицированные клетки НЕК293 со сверхэкспрессией eIF3i имели более быстрый рост, связанный с повышенной экспрессией *MYC*, достигали большей биомассы и обеспечивали более высокий выход продукции рекомбинантных белков. Инженерные клетки СНОК1 с eIF3c имели более высокую скорость пролиферации и улучшенный синтез рекомбинантных белков [76].

Таким образом, клетки НЕК293 представляют собой универсальную экспрессионную систему, которая может использоваться для получения рекомбинантных белков, в том числе бсАт. Хотя использование клеток НЕК293 для получения антител сопровождается определёнными трудностями, их преимущества делают их ценным инструментом для исследователей и биотехнологических компаний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном обзоре мы представили краткую информацию о форматах бсАт, платформах для их производства и успешных случаях их разработки от исследований до клинических испытаний. Критерием для включения в обзор послужили препараты бсАт, успешно применяемые против солидных опухолей и находящиеся на второй и более поздних фазах клинических испытаний (таблица).

Исходя из уникальных молекулярных особенностей, трудно определить универсальную «волшебную пулю». Тем не менее из множества разнообразных экспрессионных платформ, эукариотических (клетки млекопитающих, растений и насекомых) и прокариотических (*E. coli*, *Bacillus subtilis* и т.д.), в промышленности используются только три клеточные системы гетерологичной продукции. При этом даже при использовании современных платформ для производства антител возможны случаи, когда кандидатные препараты с требуемой биологической активностью обладают неблагоприятными физико-химическими характеристиками. Для бсАт сложной структуры использование прокариотических систем экспрессии нецелесообразно и рискованно. Эти системы весьма ограничены в модификациях, поэтому стоит обратить внимание на альтернативные платформы, более подходящие для усовершенствования системы, такие как эукариотические СНО и НЕК293.

Системы гетерологичной экспрессии и структурные форматы бсАт против солидных опухолей

Тип экспрессионной системы	Экспрессионная клеточная линия	Преимущества	Недостатки	Пример, патентообладатель, этап клинической разработки	Структура бсАт
Эукариоты	CHO	устойчивый рост клеток; эффективная и корректная ПТМ; устоявшиеся стандарты GMP; корректная сборка; правильное гликозилирование; высокое качество и выход продукта	высокая стоимость; высокий риск заражения вирусами; медленный рост и низкая продуктивность; нестабильная клеточная линия; большие сроки производства; комплексная технология	HPN424, «Niproon Therapeutics» досрочное прекращение: рак простаты (фаза I/II)	бсАт на основе фрагментов антител «TriTac» асимметричное бсАт «Azumetic»
		устойчивый рост клеток; легкая трансфекция; эффективная ПТМ; устоявшиеся стандарты GMP; корректная сборка; правильное гликозилирование; высокое качество и выход продукта	высокая стоимость; медленный рост и низкая продуктивность; нестабильные клеточные линии; долгие сроки производства; комплексная технология; риск контаминации патогенными вирусами человека; дополнительный анализ для проверки на безопасность; сложности на этапе получения регистрационного одобрения (FDA, EMA); отсутствие метаболитических селективных маркеров (GS, DHFR); необходимость использования антибиотиков	Нависизумаб, «Merck BioPharma»/«OncoXeta Therapeutics» фаза II: рак молочной железы, колоректальный рак, рак фаллопиевых труб, рак желудка, рак яичников, перитонеальный рак	симметричное бсАт «cLC»
Эукариоты	HEK293	устойчивый рост клеток; легкая трансфекция; эффективная ПТМ; устоявшиеся стандарты GMP; корректная сборка; правильное гликозилирование; высокое качество и выход продукта	высокая стоимость; медленный рост и низкая продуктивность; нестабильные клеточные линии; долгие сроки производства; комплексная технология; риск контаминации патогенными вирусами человека; дополнительный анализ для проверки на безопасность; сложности на этапе получения регистрационного одобрения (FDA, EMA); отсутствие метаболитических селективных маркеров (GS, DHFR); необходимость использования антибиотиков	Эрфонрилимаб, «Alphamab» фаза III: немелкоклеточный рак лёгкого, рак поджелудочной железы фаза II/III: злокачественная тимома фаза II: рак желудка, рак печени, рак пищевода, солидные опухоли фаза I/II: трижды негативный рак молочной железы	симметричное бсАт «Tandem sdAb-Fc» симметричное бсАт IgG + TGFβ receptor
		устойчивый рост клеток; легкая трансфекция; эффективная ПТМ; устоявшиеся стандарты GMP; корректная сборка; правильное гликозилирование; высокое качество и выход продукта	высокая стоимость; медленный рост и низкая продуктивность; нестабильные клеточные линии; долгие сроки производства; комплексная технология; риск контаминации патогенными вирусами человека; дополнительный анализ для проверки на безопасность; сложности на этапе получения регистрационного одобрения (FDA, EMA); отсутствие метаболитических селективных маркеров (GS, DHFR); необходимость использования антибиотиков	Ретлирафусп альфа, «Jiangsu Hengrui Medicine» фаза III: рак шейки матки, рак желудка, немелкоклеточный рак лёгкого, рак пищевода фаза II/III: колоректальный рак фаза II: билиарный рак, рак поджелудочной железы, рак прямой кишки, плоскоклеточный рак фаза I/II: солидные опухоли	асимметричное бсАт «CrossMab» асимметричное бсАт «CrossMab»
	HEK293 EBNA	устойчивый рост клеток; легкая трансфекция; эффективная ПТМ; устоявшиеся стандарты GMP; корректная сборка; правильное гликозилирование; высокое качество и выход продукта	высокая стоимость; медленный рост и низкая продуктивность; нестабильные клеточные линии; долгие сроки производства; комплексная технология; риск контаминации патогенными вирусами человека; дополнительный анализ для проверки на безопасность; сложности на этапе получения регистрационного одобрения (FDA, EMA); отсутствие метаболитических селективных маркеров (GS, DHFR); необходимость использования антибиотиков	RG 7827, «Roche Innovation Center Zurich» фаза I/II: колоректальный рак, уротенитальный рак фаза I: солидные опухоли	асимметричное бсАт «CrossMab»
		устойчивый рост клеток; легкая трансфекция; эффективная ПТМ; устоявшиеся стандарты GMP; корректная сборка; правильное гликозилирование; высокое качество и выход продукта	высокая стоимость; медленный рост и низкая продуктивность; нестабильные клеточные линии; долгие сроки производства; комплексная технология; риск контаминации патогенными вирусами человека; дополнительный анализ для проверки на безопасность; сложности на этапе получения регистрационного одобрения (FDA, EMA); отсутствие метаболитических селективных маркеров (GS, DHFR); необходимость использования антибиотиков	RG 6232, «Roche» фаза I: злокачественная меланома, увеальная меланома	асимметричное бсАт «CrossMab»

Таблица (продолжение)

Тип экспрессионной системы	Экспрессионная клеточная линия	Преимущества	Недостатки	Пример, патентообладатель, этап клинической разработки	Структура бсАг
Эукариоты	HEK293E	устойчивый рост клеток; лёгкая трансфекция; эффективная ПТМ; устоявшиеся стандарты GMP; корректная сборка; правильное гликозилирование; высокое качество и выход продукта	высокая стоимость; медленный рост и низкая продуктивность; нестабильные клеточные линии; долгие сроки производства; комплексная технология; риск контаминации патогенными вирусами человека; дополнительный анализ для проверки на безопасность; сложности на этапе получения регистрационного одобрения (FDA, EMA); отсутствие метаболитических селективных маркеров (GS, DHFR); необходимость использования антибиотиков	Вудалимаб, «Xencor» фаза II: билиарный рак, гинекологический рак, рак простаты, уrogenитальный рак	асимметричное бсАг «CrossMab»
	HEK293F			Бафизонтамаб, «ErimAb Biotherapeutics» фаза I/II: рак желудочно-кишечного тракта, немелкоклеточный рак легкого, солидные опухоли	симметричное бсАг «CrossMab»
				Ивонесцимаб, «Akeso Biopharma» фаза III: немелкоклеточный рак лёгкого фаза II: колоректальный рак, гинекологический рак, трижды негативный рак молочной железы фаза I/II: рак яичников, солидные опухоли фаза I: мелкоклеточный рак лёгкого	симметричное бсАг «IgG-ScFv»
				Кадонилимаб, «Akeso Biopharma» на рынке: рак шейки матки фаза III: рак желудка, рак печени, рак пищевода фаза II: рак носоглотки, немелкоклеточный рак лёгкого, карцинома почек, солидные опухоли фаза I/II: злокачественная меланома, периферическая Т-клеточная лимфома, мелкоклеточный рак лёгкого	симметричное бсАг «Tab»
				RO 7121661, «Roche» фаза II: рак пищевода	симметричное бсАг «CrossMab»
				Вануцизумаб, «Roche»	симметричное бсАг «CrossMab»
				RO 7247669, «Roche» фаза II: немелкоклеточный рак лёгкого, рак пищевода, уrogenитальный рак фаза I/II: злокачественная меланома фаза I: солидные опухоли	симметричное бсАг «CrossMab»
				RO 7300490, «Roche» фаза I: солидные опухоли	асимметричное бсАг «CrossMab»
				Зенкутузумаб, «Merus» фаза II: рак молочной железы, немелкоклеточный рак лёгкого, рак простаты фаза I/II: солидные опухоли	асимметричное бсАг «CrossMab»

Таблица (продолжение)

Тип экспрессионной системы	Экспрессионная клеточная линия	Преимущества	Недостатки	Пример, патентообладатель, этап клинической разработки	Структура бсАт
Эукариоты	HEK293G		<p>высокая стоимость; медленный рост и низкая продуктивность; нестабильные клеточные линии; долгие сроки производства; комплексная технология; риск контаминации патогенными вирусами человека; дополнительный анализ для проверки на безопасность; сложности на этапе получения регистрационного одобрения (FDA, EMA); отсутствие метаболитических селективных маркеров (GS, DHFR); необходимость использования антибиотиков</p>	<p>Дилпацимаб, «AbbVie» фаза II: колоректальный рак фаза I: солидные опухоли</p>	<p>симметричное бсАт «DVD-Ig»</p>
Прокариоты	<i>E. coli</i>	<p>высокая экономичность; быстрое получение белка; высокая скорость роста клеток, масштабируемость; хорошо охарактеризованные штаммы; хорошая масштабируемость; присутствие регуляторных элементов; высокая экспрессия</p>	<p>отсутствие машинерии для удаления интронов; отсутствие ПТМ; значительные ошибки в фолдинге белка; нечеловеческое гликозилирование; накопление эндотоксинов; смещение кодонов</p>	<p>Тебентафусл, «Immunosote» на рынке: увеальная меланوما фаза II/III: злокачественная меланوما</p>	<p>бсАт на основе фрагментов антител</p>

Грамотная оптимизация и инженерия биохимических путей, использование различных производных клеточных линий, углубление в их транскриптомные и геномные профили, возможно, позволят повысить эффективность производства белков. Настройка выбранной платформы на требуемый выход продукта — это перспективное направление в области систем для гетерологичной экспрессии [77, 78].

Перечисленные выше подходы, представленные множеством различных форматов бсАт и несколькими дополнительными экспрессионными системами, такими как *B. subtilis*, *Streptomyces*, дрожжи, трансгенные растения, трансгенные животные, клетки насекомых, к сожалению, пока неэффективны для получения больших количеств рекомбинантных белков и редко используются для производства антител [79].

Однако среди перспективных, но малоизвестных с точки зрения коммерческого потенциала применения существует платформа, которая может стать прорывом в сфере получения белков, в частности бсАт. Это система бесклеточного синтеза белков (СБСБ), популяризированная в основном компанией «Sutro Biopharma, Inc.» (США). Она стала важна для синтетической биологии [80–87] не только как платформа для отбора и прямой эволюции полипептидов из больших библиотек, но и как ценный инструмент для структурной и функциональной характеристики интегральных мембранных белков [85, 88] и различных форматов мкАт и бсАт. Данный тип экспрессионных систем основан на экстракте прокариотических или эукариотических клеток, включающем рибосомы, факторы трансляции, аминоацил-тРНК-синтетазу и дополненном подходящей экзогенной линейной или кольцевой ДНК-матрицей, аминокислотами, тРНК, dNTPs, АТФ, системой регенерации клетки и другими необходимыми факторами [82, 89, 90]. Прокариотические и эукариотические системы бесклеточной экспрессии всё чаще используются для получения фрагментов [88, 91] и полноразмерных [92] антител даже против сложных трансмембранных антигенов, таких как рецепторы, связанные с G-белками [93, 94], и внеклеточных областей других политопных интегральных мембранных белков [89].

Системы СБСБ заслуживают внимания по целому ряду причин. Несмотря на то, что в их основе — лизаты различных про- или эукариотических клеток, что позволяет избежать проблем «клеточных» систем, бесклеточные системы синтеза имеют некоторые ограничения, зависящие от того, насколько конкретная систе-

ма подходит для получения выбранного белка, но разнообразие существующих платформ и подходов позволяет преодолевать возможные препятствия. Бесклеточные системы используют в основном два популярных формата: «в объёме» и непрерывный бесклеточный синтез. Последний предполагает относительно стабильную подачу свежих компонентов в реакционную камеру, что увеличивает время синтеза и, следовательно, повышает выход белка. Благодаря широкому спектру применения бесклеточных систем их преимущества могут быть использованы в различных областях — от инженерии антител до производства вакцин.

Несмотря на преимущества бесклеточной системы с точки зрения открытости и гибкости, одним из краеугольных камней на сегодняшний день остаётся экономическая целесообразность, и здесь бесклеточная система требует определённых доработок, чтобы в будущем стать более конкурентоспособной на рынке производства антител. В рамках тематического исследования была проведена оценка группы параметров, определяющих экономическую целесообразность применения бесклеточной системы на основе экстракта бактериальных клеток по сравнению с привычной СНО-платформой для производства коммерческих белков. Согласно проведённому анализу, себестоимость продукта, произведённого на бесклеточной платформе, значительно выше, чем на СНО-платформе, причём основной статьёй расходов являлся вышеупомянутый бактериальный экстракт. Тем не менее в долгосрочной перспективе бесклеточные системы предлагают больше преимуществ [95].

В целом, эукариотические бесклеточные системы позволяют получать белки, подходящие как для прямого функционального анализа, так и, при соответствующей настройке, для промышленных или терапевтических нужд. Это позволяет проводить быстрый скрининг, разделять процессы и экономить время при получении как обычных, так и трудносинтезируемых белков. Бесклеточные системы более гибки и восприимчивы к модификациям, как и белки, получаемые с их помощью, что является важным свойством, ценным для разработчиков биологических препаратов. Это открывает путь к крупномасштабному производству белков [96, 97].

Примером успешной коммерческой бесклеточной платформы является технология «XpressCF+™». Это быстрая, точная и высокоэффективная система, способная производи-

ровать отвечающий всем необходимым требованиям препарат бсАт менее чем за сутки. Существовавшая ранее проблема надлежащего источника энергии для производства белка была решена путём изготовления экстракта на основе *E. coli*, содержащего необходимые элементы в нужной форме, что позволило повысить общее качество системы. Указанная платформа позволяет легче встраивать неприродные аминокислоты (npAA) и конъюгированные вещества, преодолевая гетерогенность и создавая сложный, корректно собранный продукт. На сегодняшний день компания «Sutro» имеет в своём портфеле четыре препарата конъюгированных антител и бсАт, созданных с помощью вышеупомянутой системы, и продолжает расширять своё влияние, сотрудничая с различными компаниями [98, 99].

В конечном счёте, каждая платформа и формат имеют свои достоинства и недостатки, и выбор одной из них должен зависеть от целей и задач, стоящих перед исследователем в академической науке или промышленности.

Вклад авторов. А.К. Мисорин – анализ и обобщение данных, написание рукописи; Д.А. Чернышова – редактирование рукописи и написание заключительного раздела; М.С. Карбышев – обобщение данных, руководство, редактирование рукописи.

Благодарности. Авторы выражают искреннюю благодарность д-ру Айше К. Лаггерре («Roche», США) за ценные замечания и корректуру рукописи. Также авторы благодарят Нисканена С.А., Кокинос Е.К. и Баскакову К.О. за ценное обсуждение рукописи.

Финансирование. При написании данного обзора не было использовано никаких источников финансирования.

Конфликт интересов. А.К. Мисорин, Д.О. Чернышова и М.С. Карбышев являются штатными сотрудниками АО «Биокад», занимающегося разработкой терапевтических антител к сложным мембранным белкам-мишеням для лечения различных заболеваний.

Соблюдение этических норм. В данной статье отсутствуют исследования с участием людей и животных, выполненные авторами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fougner, C., Cannon, J., The, L., Smith, J. F., and Leclerc, O. (2023) Herding in the drug development pipeline, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **22**, 617-618, doi: 10.1038/d41573-023-00063-3.
2. Vargason, A. M., Anselmo, A. C., and Mitragotri, S. (2021) The evolution of commercial drug delivery technologies, *Nat. Biomed. Eng.*, **5**, 951-967, doi: 10.1038/s41551-021-00698-w.
3. Wang, Z., Wang, G., Lu, H., Li, H., Tang, M., and Tong, A. (2022) Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases, *Mol. Biomed.*, **3**, 35, doi: 10.1186/s43556-022-00100-4.
4. Bayer, V. (2019) An overview of monoclonal antibodies, *Semin. Oncol. Nurs.*, **35**, 150927, doi: 10.1016/j.soncn.2019.08.006.
5. Mach, J. P. (2017) Recombinant monoclonal antibodies, from tumor targeting to cancer immunotherapy: a critical overview [in Russian], *Mol. Biol. (Mosk.)*, **51**, 1024-1038, doi: 10.7868/S0026898417060131.
6. Jin, H., Wang, L., and Bernards, R. (2023) Rational combinations of targeted cancer therapies: background, advances and challenges, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **22**, 213-234, doi: 10.1038/s41573-022-00615-z.
7. Schmidt, G., Guhl, M. M., Solomayer, E. F., Wagenpfeil, G., Hammadeh, M. E., Juhasz-Boess, I., Endrikat, J., Kasoha, M., and Bohle, R. M. (2022) Immunohistochemical assessment of PD-L1 expression using three different monoclonal antibodies in triple negative breast cancer patients, *Arch. Gynecol. Obstet.*, **306**, 1689-1695, doi: 10.1007/s00404-022-06529-w.
8. Karbyshev, M. S., Grigoryeva, E. S., Volkomorov, V. V., Kremmer, E., Huber, A., Mitrofanova, I. V., Kaigorodova, E. V., Zavyalova, M. V., Kzhyshkowska, J. G., Cherdyntseva, N. V., and Choynzonov, E. L. (2018) Development of novel monoclonal antibodies for evaluation of transmembrane prostate androgen-induced protein 1 (TMPAP1) expression patterns in gastric cancer, *Pathol. Oncol. Res.*, **24**, 427-438, doi: 10.1007/s12253-017-0247-x.
9. Parakh, S., Lee, S. T., Gan, H. K., and Scott, A. M. (2022) Radiolabeled antibodies for cancer imaging and therapy, *Cancers (Basel)*, **14**, 1454, doi: 10.3390/cancers14061454.
10. Wei, W., Rosenkrans, Z. T., Liu, J., Huang, G., Luo, Q. Y., and Cai, W. (2020) ImmunoPET: concept, design, and applications, *Chem. Rev.*, **120**, 3787-3851, doi: 10.1021/acs.chemrev.9b00738.
11. Goulet, D. R., and Atkins, W. M. (2020) Considerations for the design of antibody-based therapeutics, *J. Pharm. Sci.*, **109**, 74-103, doi: 10.1016/j.xphs.2019.05.031.
12. Chiu, M. L., Goulet, D. R., Teplyakov, A., and Gilliland, G. L. (2019) Antibody structure and function: the basis for engineering therapeutics, *Antibodies (Basel)*, **8**, 55, doi: 10.3390/antib8040055.

13. Elshiaty, M., Schindler, H., and Christopoulos, P. (2021) Principles and current clinical landscape of multispecific antibodies against cancer, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 5632, doi: 10.3390/ijms22115632.
14. Ma, J., Mo, Y., Tang, M., Shen, J., Qi, Y., Zhao, W., Huang, Y., Xu, Y., and Qian, C. (2021) Bispecific antibodies: from research to clinical application, *Front. Immunol.*, **12**, 626616, doi: 10.3389/fimmu.2021.626616.
15. Husain, B., and Ellerman, D. (2018) Expanding the boundaries of biotherapeutics with bispecific antibodies, *BioDrugs*, **32**, 441-464, doi: 10.1007/s40259-018-0299-9.
16. Gera, N. (2022) The evolution of bispecific antibodies, *Expert. Opin. Biol. Ther.*, **22**, 945-949, doi: 10.1080/14712598.2022.2040987.
17. Du, Y., and Xu, J. (2021) Engineered bifunctional proteins for targeted cancer therapy: prospects and challenges, *Adv. Mater.*, **33**, e2103114, doi: 10.1002/adma.202103114.
18. Chen, S. W., and Zhang, W. (2021) Current trends and challenges in the downstream purification of bispecific antibodies, *Antib. Ther.*, **4**, 73-88, doi: 10.1093/abt/tba007.
19. Tripathi, N. K., and Shrivastava, A. (2019) Recent developments in bioprocessing of recombinant proteins: expression hosts and process development, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **7**, 420, doi: 10.3389/fbioe.2019.00420.
20. Kunert, R., and Reinhart, D. (2016) Advances in recombinant antibody manufacturing, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **100**, 3451-3461, doi: 10.1007/s00253-016-7388-9.
21. Blanco, B., Dominguez-Alonso, C., and Alvarez-Vallina, L. (2021) Bispecific immunomodulatory antibodies for cancer immunotherapy, *Clin. Cancer Res.*, **27**, 5457-5464, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-3770.
22. Labrijn, A. F., Janmaat, M. L., Reichert, J. M., and Parren, P. (2019) Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **18**, 585-608, doi: 10.1038/s41573-019-0028-1.
23. Muller, D., Karle, A., Meissburger, B., Hofig, I., Stork, R., and Kontermann, R. E. (2007) Improved pharmacokinetics of recombinant bispecific antibody molecules by fusion to human serum albumin, *J. Biol. Chem.*, **282**, 12650-12660, doi: 10.1074/jbc.M700820200.
24. Bern, M., Nilsen, J., Ferrarese, M., Sand, K. M. K., Gjolberg, T. T., Lode, H. E., Davidson, R. J., Camire, R. M., Baekkevold, E. S., Foss, S., Grevys, A., Dalhus, B., Wilson, J., Hoydahl, L. S., Christianson, G. J., Roopenian, D. C., Schlothauer, T., Michaelsen, T. E., Moe, M. C., Lombardi, S., et al. (2020) An engineered human albumin enhances half-life and transmucosal delivery when fused to protein-based biologics, *Sci. Transl. Med.*, **12**, eabb0580, doi: 10.1126/scitranslmed.abb0580.
25. Zhang, J., Yi, J., and Zhou, P. (2020) Development of bispecific antibodies in China: overview and prospects, *Antib. Ther.*, **3**, 126-145, doi: 10.1093/abt/tbaa011.
26. Klein, C., Sustmann, C., Thomas, M., Stubenrauch, K., Croasdale, R., Schanzer, J., Brinkmann, U., Kettenberger, H., Regula, J. T., and Schaefer, W. (2012) Progress in overcoming the chain association issue in bispecific heterodimeric IgG antibodies, *mAbs*, **4**, 653-663, doi: 10.4161/mabs.21379.
27. Moore, G. L., Bernett, M. J., Rashid, R., Pong, E. W., Nguyen, D. T., Jacinto, J., Eivazi, A., Nisthal, A., Diaz, J. E., Chu, S. Y., Muchhal, U. S., and Desjarlais, J. R. (2019) A robust heterodimeric Fc platform engineered for efficient development of bispecific antibodies of multiple formats, *Methods*, **154**, 38-50, doi: 10.1016/j.ymeth.2018.10.006.
28. Moore, G. L., Bautista, C., Pong, E., Nguyen, D. H., Jacinto, J., Eivazi, A., Muchhal, U. S., Karki, S., Chu, S. Y., and Lazar, G. A. (2011) A novel bispecific antibody format enables simultaneous bivalent and monovalent co-engagement of distinct target antigens, *mAbs*, **3**, 546-557, doi: 10.4161/mabs.3.6.18123.
29. Merchant, A. M., Zhu, Z., Yuan, J. Q., Goddard, A., Adams, C. W., Presta, L. G., and Carter, P. (1998) An efficient route to human bispecific IgG, *Nat. Biotechnol.*, **16**, 677-681, doi: 10.1038/nbt0798-677.
30. Surowka, M., Schaefer, W., and Klein, C. (2021) Ten years in the making: application of CrossMab technology for the development of therapeutic bispecific antibodies and antibody fusion proteins, *mAbs*, **13**, 1967714, doi: 10.1080/19420862.2021.1967714.
31. Gong, S., and Wu, C. (2019) Generation of Fabs-in-tandem immunoglobulin molecules for dual-specific targeting, *Methods*, **154**, 87-92, doi: 10.1016/j.ymeth.2018.07.014.
32. Gong, S., Ren, F., Wu, D., Wu, X., and Wu, C. (2017) Fabs-in-tandem immunoglobulin is a novel and versatile bispecific design for engaging multiple therapeutic targets, *mAbs*, **9**, 1118-1128, doi: 10.1080/19420862.2017.1345401.
33. De Nardis, C., Hendriks, L. J. A., Poirier, E., Arvinte, T., Gros, P., Bakker, A. B. H., and de Kruif, J. (2017) A new approach for generating bispecific antibodies based on a common light chain format and the stable architecture of human immunoglobulin G(1), *J. Biol. Chem.*, **292**, 14706-14717, doi: 10.1074/jbc.M117.793497.
34. Klein, C., Moessner, E., Hosse, R., Bruenker, P., Umana, P., and Neumann, C. (2017) *Common Light Chains and Methods of Use*, Hoffmann La Roche Inc., USA.
35. Wu, Y., Yi, M., Zhu, S., Wang, H., and Wu, K. (2021) Recent advances and challenges of bispecific antibodies in solid tumors, *Exp. Hematol. Oncol.*, **10**, 56, doi: 10.1186/s40164-021-00250-1.
36. Wei, H., Cai, H., Jin, Y., Wang, P., Zhang, Q., Lin, Y., Wang, W., Cheng, J., Zeng, N., Xu, T., and Zhou, A.

- (2017) Structural basis of a novel heterodimeric Fc for bispecific antibody production, *Oncotarget*, **8**, 51037-51049, doi: 10.18632/oncotarget.17558.
37. Wu, C., Ying, H., Grinnell, C., Bryant, S., Miller, R., Clabbers, A., Bose, S., McCarthy, D., Zhu, R. R., Santora, L., Davis-Taber, R., Kunes, Y., Fung, E., Schwartz, A., Sakorafas, P., Gu, J., Tarcsa, E., Murtaza, A., and Ghayur, T. (2007) Simultaneous targeting of multiple disease mediators by a dual-variable-domain immunoglobulin, *Nat. Biotechnol.*, **25**, 1290-1297, doi: 10.1038/nbt1345.
38. DiGiammarino, E., Ghayur, T., and Liu, J. (2012) Design and generation of DVD-Ig molecules for dual-specific targeting, *Methods Mol. Biol.*, **899**, 145-156, doi: 10.1007/978-1-61779-921-1_9.
39. Wesche, H., Aaron, W., Austin, R. J., Baeuerle, P. A., Jones, A., Lemon, B., Sexton, K., and Yu, T. (2018) Abstract 3814: TriTACs are novel T cell-engaging therapeutic proteins optimized for the treatment of solid tumors and for long serum half-life, *Cancer Res.*, **78**, 3814-3814, doi: 10.1158/1538-7445.Am2018-3814.
40. Oates, J., Hassan, N. J., and Jakobsen, B. K. (2015) ImmTACs for targeted cancer therapy: Why, what, how, and which, *Mol. Immunol.*, **67**, 67-74, doi: 10.1016/j.molimm.2015.01.024.
41. Holland, C. J., Crean, R. M., Pentier, J. M., de Wet, B., Lloyd, A., Srikanthasan, V., Lissin, N., Lloyd, K. A., Blicher, T. H., Conroy, P. J., Hock, M., Pengelly, R. J., Spinner, T. E., Cameron, B., Potter, E. A., Jeyanthan, A., Molloy, P. E., Sami, M., Aleksic, M., Liddy, N., et al. (2020) Specificity of bispecific T cell receptors and antibodies targeting peptide-HLA, *J. Clin. Invest.*, **130**, 2673-2688, doi: 10.1172/JCI130562.
42. Rashid, M. H. (2022) Full-length recombinant antibodies from *Escherichia coli*: production, characterization, effector function (Fc) engineering, and clinical evaluation, *mAbs*, **14**, 2111748, doi: 10.1080/19420862.2022.2111748.
43. Lalonde, M. E., and Durocher, Y. (2017) Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells, *J. Biotechnol.*, **251**, 128-140, doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.04.028.
44. Dangi, A. K., Sinha, R., Dwivedi, S., Gupta, S. K., and Shukla, P. (2018) Cell line techniques and gene editing tools for antibody production: a review, *Front. Pharmacol.*, **9**, 630, doi: 10.3389/fphar.2018.00630.
45. Sandomenico, A., Sivaccumar, J. P., and Ruvo, M. (2020) Evolution of *Escherichia coli* expression system in producing antibody recombinant fragments, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 6324, doi: 10.3390/ijms21176324.
46. Damato, B. E., Dukes, J., Goodall, H., and Carvajal, R. D. (2019) Tebentafusp: T cell redirection for the treatment of metastatic uveal melanoma, *Cancers (Basel)*, **11**, 971, doi: 10.3390/cancers11070971.
47. Lin, L., Li, L., Zhou, C., Li, J., Liu, J., Shu, R., Dong, B., Li, Q., and Wang, Z. (2018) A HER2 bispecific antibody can be efficiently expressed in *Escherichia coli* with potent cytotoxicity, *Oncol. Lett.*, **16**, 1259-1266, doi: 10.3892/ol.2018.8698.
48. Spiess, C., Merchant, M., Huang, A., Zheng, Z., Yang, N. Y., Peng, J., Ellerman, D., Shatz, W., Reilly, D., Yansura, D. G., and Scheer, J. M. (2013) Bispecific antibodies with natural architecture produced by co-culture of bacteria expressing two distinct half-antibodies, *Nat. Biotechnol.*, **31**, 753-758, doi: 10.1038/nbt.2621.
49. Patil, R. S., Anupa, A., Gupta, J. A., and Rathore, A. S. (2022) Challenges in expression and purification of functional Fab fragments in *E. coli*: current strategies and perspectives, *Fermentation*, **8**, 175, doi: 10.3390/fermentation8040175.
50. Baumgarten, T., Ytterberg, A. J., Zubarev, R. A., and de Gier, J. W. (2018) Optimizing recombinant protein production in the *Escherichia coli* periplasm alleviates stress, *Appl. Environ. Microbiol.*, **84**, e00270-18, doi: 10.1128/AEM.00270-18.
51. Jyothilekshmi, I., and Jayaprakash, N. S. (2021) Trends in monoclonal antibody production using various bioreactor syst, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **31**, 349-357, doi: 10.4014/jmb.1911.11066.
52. Jain, N. K., Barkowski-Clark, S., Altman, R., Johnson, K., Sun, F., Zmuda, J., Liu, C. Y., Kita, A., Schulz, R., Neill, A., Ballinger, R., Patel, R., Liu, J., Mpanda, A., Huta, B., Chiou, H., Voegtli, W., and Panavas, T. (2017) A high density CHO-S transient transfection system: comparison of ExpiCHO and Expi293, *Protein Express. Purif.*, **134**, 38-46, doi: 10.1016/j.pep.2017.03.018.
53. Wurm, F. M. (2014) 2.2 CHO History, CHO evolution and CHO genomics – an unsolvable enigma? in *Animal Cell Biotechnology: In Biologics Production*, pp. 38-59, doi: 10.1515/9783110278965.38.
54. Dhara, V. G., Naik, H. M., Majewska, N. I., and Betenbaugh, M. J. (2018) Recombinant antibody production in CHO and NS0 cells: differences and similarities, *BioDrugs*, **32**, 571-584, doi: 10.1007/s40259-018-0319-9.
55. Naddafi, F., Shirazi, F. H., Talebkhan, Y., Tabar-zad, M., Barkhordari, F., Aliabadi Farahani, Z., Bayat, E., Moazzami, R., Mahboudi, F., and Davami, F. (2018) A comparative study of the bispecific monoclonal antibody, blinatumomab expression in CHO cells and *E. coli*, *Prep. Biochem. Biotechnol.*, **48**, 961-967, doi: 10.1080/10826068.2018.1525562.
56. Jain, S., Aresu, L., Comazzi, S., Shi, J., Worrall, E., Clayton, J., Humphries, W., Hemmington, S., Davis, P., Murray, E., Limeneh, A. A., Ball, K., Ruckova, E., Muller, P., Vojtesek, B., Fahraeus, R., Argyle, D., and Hupp, T. R. (2016) The development of a recombinant scFv monoclonal antibody targeting canine CD20 for use in comparative medicine, *PLoS One*, **11**, e0148366, doi: 10.1371/journal.pone.0148366.

57. Ha, T. K., Kim, D., Kim, C. L., Grav, L. M., and Lee, G. M. (2022) Factors affecting the quality of therapeutic proteins in recombinant Chinese hamster ovary cell culture, *Biotechnol. Adv.*, **54**, 107831, doi: 10.1016/j.biotechadv.2021.107831.
58. Ding, M., Shen, L., Xiao, L., Liu, X., and Hu, J. (2021) A cell line development strategy to improve a bispecific antibody expression purity in CHO cells, *Biochem. Engin. J.*, **166**, 107857, doi: 10.1016/j.bej.2020.107857.
59. Sinharoy, P., Aziz, A. H., Majewska, N. I., Ahuja, S., and Handlogten, M. W. (2020) Perfusion reduces bispecific antibody aggregation via mitigating mitochondrial dysfunction-induced glutathione oxidation and ER stress in CHO cells, *Sci. Rep.*, **10**, 16620, doi: 10.1038/s41598-020-73573-4.
60. Jaluria, P., Betenbaugh, M., Konstantopoulos, K., and Shiloach, J. (2007) Enhancement of cell proliferation in various mammalian cell lines by gene insertion of a cyclin-dependent kinase homolog, *BMC Biotechnol.*, **7**, 71, doi: 10.1186/1472-6750-7-71.
61. Kol, S., Ley, D., Wulff, T., Decker, M., Arnsdorf, J., Schoffelen, S., Hansen, A. H., Jensen, T. L., Gutierrez, J. M., Chiang, A. W. T., Masson, H. O., Palsson, B. O., Voldborg, B. G., Pedersen, L. E., Kildegaard, H. F., Lee, G. M., and Lewis, N. E. (2020) Multiplex secretome engineering enhances recombinant protein production and purity, *Nat. Commun.*, **11**, 1908, doi: 10.1038/s41467-020-15866-w.
62. Avello, V., Torres, M., Vergara, M., Berrios, J., Valdez-Cruz, N. A., Acevedo, C., Molina Sampayo, M., Dickson, A. J., and Altamirano, C. (2022) Enhanced recombinant protein production in CHO cell continuous cultures under growth-inhibiting conditions is associated with an arrested cell cycle in G1/G0 phase, *PLoS One*, **17**, e0277620, doi: 10.1371/journal.pone.0277620.
63. Dietmair, S., Hodson, M. P., Quek, L. E., Timmins, N. E., Gray, P., and Nielsen, L. K. (2012) A multi-omics analysis of recombinant protein production in Hek293 cells, *PLoS One*, **7**, e43394, doi: 10.1371/journal.pone.0043394.
64. Tan, E., Chin, C. S. H., Lim, Z. F. S., and Ng, S. K. (2021) HEK293 cell line as a platform to produce recombinant proteins and viral vectors, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **9**, 796991, doi: 10.3389/fbioe.2021.796991.
65. Abaandou, L., Quan, D., and Shiloach, J. (2021) Affecting HEK293 cell growth and production performance by modifying the expression of specific genes, *Cells*, **10**, 1667, doi: 10.3390/cells10071667.
66. Cullum, S. A., Veprintsev, D. B., and Hill, S. J. (2023) Kinetic analysis of endogenous beta(2) -adrenoceptor-mediated cAMP GloSensor responses in HEK293 cells, *Br. J. Pharmacol.*, **180**, 1304-1315, doi: 10.1111/bph.16008.
67. DuBridge, R. B., Tang, P., Hsia, H. C., Leong, P. M., Miller, J. H., and Calos, M. P. (1987) Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system, *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 379-387, doi: 10.1128/mcb.7.1.379-387.1987.
68. Abaandou, L., Sharma, A. K., and Shiloach, J. (2021) Knockout of the caspase 8-associated protein 2 gene improves recombinant protein expression in HEK293 cells through up-regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor 2A gene, *Biotechnol. Bioeng.*, **118**, 186-198, doi: 10.1002/bit.27561.
69. Uhler, R., Popa-Wagner, R., Kroning, M., Brehm, A., Rennert, P., Seifried, A., Peschke, M., Krieger, M., Kohla, G., Kannicht, C., Wiedemann, P., Hafner, M., and Rosenlocher, J. (2021) Glyco-engineered HEK 293-F cell lines for the production of therapeutic glycoproteins with human N-glycosylation and improved pharmacokinetics, *Glycobiology*, **31**, 859-872, doi: 10.1093/glycob/cwaa119.
70. Gunasekaran, K., Pentony, M., Shen, M., Garrett, L., Forte, C., Woodward, A., Ng, S. B., Born, T., Retter, M., Manchulenko, K., Sweet, H., Foltz, I. N., Wittekind, M., and Yan, W. (2010) Enhancing antibody Fc heterodimer formation through electrostatic steering effects: applications to bispecific molecules and monovalent IgG, *J. Biol. Chem.*, **285**, 19637-19646, doi: 10.1074/jbc.M110.117382.
71. Schaefer, W., Regula, J. T., Bahner, M., Schanzer, J., Croasdale, R., Durr, H., Gassner, C., Georges, G., Kettenberger, H., Imhof-Jung, S., Schwaiger, M., Stubenrauch, K. G., Sustmann, C., Thomas, M., Scheuer, W., and Klein, C. (2011) Immunoglobulin domain crossover as a generic approach for the production of bispecific IgG antibodies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 11187-11192, doi: 10.1073/pnas.1019002108.
72. Segaliny, A. I., Jayaraman, J., Chen, X., Chong, J., Luxon, R., Fung, A., Fu, Q., Jiang, X., Rivera, R., Ma, X., Ren, C., Zimak, J., Hedde, P. N., Shang, Y., Wu, G., and Zhao, W. (2023) A high throughput bispecific antibody discovery pipeline, *Commun. Biol.*, **6**, 380, doi: 10.1038/s42003-023-04746-w.
73. Mazor, Y., Oganessian, V., Yang, C., Hansen, A., Wang, J., Liu, H., Sachsenmeier, K., Carlson, M., Gadre, D. V., Borrok, M. J., Yu, X. Q., Dall'Acqua, W., Wu, H., and Chowdhury, P. S. (2015) Improving target cell specificity using a novel monovalent bispecific IgG design, *mAbs*, **7**, 377-389, doi: 10.1080/19420862.2015.1007816.
74. Fang, X. T., Sehlin, D., Lannfelt, L., Syvanen, S., and Hultqvist, G. (2017) Efficient and inexpensive transient expression of multispecific multivalent antibodies in Expi293 cells, *Biol. Proced. Online*, **19**, 11, doi: 10.1186/s12575-017-0060-7.
75. Lu, X., Ye, Y., Wang, Y., Xu, J., Sun, J., Ji, J., Zhang, Y., and Sun, X. (2023) Rapid generation of high-quality recombinant antibodies using an Expi293F expression system for a 17 beta-estradiol immunoassay, *J. Hazard. Mater.*, **451**, 131126, doi: 10.1016/j.jhazmat.2023.131126.

76. Roobol, A., Roobol, J., Smith, M. E., Carden, M. J., Hershey, J. W. B., Willis, A. E., and Smales, C. M. (2020) Engineered transient and stable over-expression of translation factors eIF3i and eIF3c in CHOK1 and HEK293 cells gives enhanced cell growth associated with increased c-Myc expression and increased recombinant protein synthesis, *Metab. Eng.*, **59**, 98-105, doi: 10.1016/j.ymben.2020.02.001.
77. Malm, M., Saghaleyni, R., Lundqvist, M., Giudici, M., Chotteau, V., Field, R., Varley, P. G., Hatton, D., Grassi, L., Svensson, T., Nielsen, J., and Rockberg, J. (2020) Evolution from adherent to suspension: systems biology of HEK293 cell line development, *Sci. Rep.*, **10**, 18996, doi: 10.1038/s41598-020-76137-8.
78. Malm, M., Kuo, C. C., Barzadd, M. M., Mebrahtu, A., Wistbacka, N., Razavi, R., Volk, A. L., Lundqvist, M., Kotol, D., Tegel, H., Hober, S., Edfors, F., Graslund, T., Chotteau, V., Field, R., Varley, P. G., Roth, R. G., Lewis, N. E., Hatton, D., and Rockberg, J. (2022) Harnessing secretory pathway differences between HEK293 and CHO to rescue production of difficult to express proteins, *Metab. Eng.*, **72**, 171-187, doi: 10.1016/j.ymben.2022.03.009.
79. Тепап, С. Z., Anissi, J., and Bounou, S. (2023) Recent strategies to achieve high production yield of recombinant protein: A review, *J. Cell. Biotechnol.*, **9**, 25-37, doi: 10.3233/jcb-220084.
80. Perez, J. G., Stark, J. C., and Jewett, M. C. (2016) Cell-free synthetic biology: engineering beyond the cell, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **8**, a023853, doi: 10.1101/cshperspect.a023853.
81. Silverman, A. D., Karim, A. S., and Jewett, M. C. (2020) Cell-free gene expression: an expanded repertoire of applications, *Nat. Rev. Genet.*, **21**, 151-170, doi: 10.1038/s41576-019-0186-3.
82. Liu, W.-Q., Zhang, L., Chen, M., and Li, J. (2019) Cell-free protein synthesis: recent advances in bacterial extract sources and expanded applications, *Biochem. Eng. J.*, **141**, 182-189, doi: 10.1016/j.bej.2018.10.023.
83. Jin, X., and Hong, S. H. (2018) Cell-free protein synthesis for producing 'difficult-to-express' proteins, *Biochem. Eng. J.*, **138**, 156-164, doi: 10.1016/j.bej.2018.07.013.
84. Kightlinger, W., Duncker, K. E., Ramesh, A., Thames, A. H., Natarajan, A., Stark, J. C., Yang, A., Lin, L., Mrksich, M., and DeLisa, M. P. (2019) A cell-free biosynthesis platform for modular construction of protein glycosylation pathways, *Nat. Commun.*, **10**, 5404, doi: 10.1038/s41467-019-12024-9.
85. Contreras-Llano, L. E., and Tan, C. (2018) High-throughput screening of biomolecules using cell-free gene expression systems, *Synth. Biol.*, **3**, ysy012, doi: 10.1093/synbio/ysy012.
86. Dondapati, S. K., Stech, M., Zemella, A., and Kubick, S. (2020) Cell-free protein synthesis: a promising option for future drug development, *BioDrugs*, **34**, 327-348, doi: 10.1007/s40259-020-00417-y.
87. Zhang, L., Guo, W., and Lu, Y. (2020) Advances in cell-free biosensors: principle, mechanism, and applications, *Biotechnol. J.*, **15**, 2000187, doi: 10.1002/biot.202000187.
88. Ojima-Kato, T., Hashimura, D., Kojima, T., Minabe, S., and Nakano, H. (2015) In vitro generation of rabbit anti-*Listeria monocytogenes* monoclonal antibody using single cell based RT-PCR linked cell-free expression systems, *J. Immunol. Methods*, **427**, 58-65, doi: 10.1016/j.jim.2015.10.001.
89. Hashimoto, Y., Zhou, W., Hamauchi, K., Shirakura, K., Doi, T., Yagi, K., Sawasaki, T., Okada, Y., Kondoh, M., and Takeda, H. (2018) Engineered membrane protein antigens successfully induce antibodies against extracellular regions of claudin-5, *Sci. Rep.*, **8**, 8383, doi: 10.1038/s41598-018-26560-9.
90. Lee, K.-H., and Kim, D.-M. (2018) Recent advances in development of cell-free protein synthesis systems for fast and efficient production of recombinant proteins, *FEMS Microbiol. Lett.*, **365**, fny174, doi: 10.1093/femsle/fny174.
91. Stech, M., Merk, H., Schenk, J. A., Stocklein, W. F., Wustenhagen, D. A., Micheel, B., Duschl, C., Bier, F. F., and Kubick, S. (2012) Production of functional antibody fragments in a vesicle-based eukaryotic cell-free translation system, *J. Biotechnol.*, **164**, 220-231, doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.08.020.
92. Martin, R. W., Majewska, N. I., Chen, C. X., Albanetti, T. E., Jimenez, R. B. C., Schmelzer, A. E., Jewett, M. C., and Roy, V. (2017) Development of a CHO-based cell-free platform for synthesis of active monoclonal antibodies, *ACS Synth. Biol.*, **6**, 1370-1379, doi: 10.1021/acssynbio.7b00001.
93. Takeda, H., Ogasawara, T., Ozawa, T., Muraguchi, A., Jih, P. J., Morishita, R., Uchigashima, M., Watanabe, M., Fujimoto, T., Iwasaki, T., Endo, Y., and Sawasaki, T. (2015) Production of monoclonal antibodies against GPCR using cell-free synthesized GPCR antigen and biotinylated liposome-based interaction assay, *Sci. Rep.*, **5**, 11333, doi: 10.1038/srep11333.
94. Sonnabend, A., Spahn, V., Stech, M., Zemella, A., Stein, C., and Kubick, S. (2017) Production of G protein-coupled receptors in an insect-based cell-free system, *Biotechnol. Bioeng.*, **114**, 2328-2338, doi: 10.1002/bit.26346.
95. Stamatis, C., and Farid, S. S. (2021) Process economics evaluation of cell-free synthesis for the commercial manufacture of antibody drug conjugates, *Biotechnol. J.*, **16**, e2000238, doi: 10.1002/biot.202000238.
96. Stech, M., Nikolaeva, O., Thoring, L., Stocklein, W. F. M., Wustenhagen, D. A., Hust, M., Dubel, S., and Kubick, S. (2017) Cell-free synthesis of functional antibodies using a coupled in vitro transcription-translation system based on CHO cell lysates, *Sci. Rep.*, **7**, 12030, doi: 10.1038/s41598-017-12364-w.

97. Haueis, L., Stech, M., and Kubick, S. (2022) A cell-free expression pipeline for the generation and functional characterization of nanobodies, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **10**, 896763, doi: 10.3389/fbioe.2022.896763.
98. Ratner, M. (2014) Celgene wagers on Sutro's cell-free platform to ramp up ADCs, *Nat. Biotechnol.*, **32**, 1175, doi: 10.1038/nbt1214-1175.
99. Hanson, J., Groff, D., Carlos, A., Usman, H., Fong, K., Yu, A., Armstrong, S., Dwyer, A., Masikat, M. R., Yuan, D., Tran, C., Heibeck, T., Zawada, J., Chen, R., Hallam, T., and Yin, G. (2023) An integrated *in vivo/in vitro* protein production platform for site-specific antibody drug conjugates, *Bioengineering (Basel)*, **10**, 304, doi: 10.3390/bioengineering10030304.

STATE-OF-THE-ART APPROACHES FOR HETEROLOGOUS EXPRESSION OF BISPECIFIC ANTIBODIES TARGETING SOLID TUMORS

Review

A. K. Misorin, D. O. Chernyshova, and M. S. Karbyshev*

BIOCAD, 198515 Strel'na, Saint-Petersburg, Russia; e-mail: karbyshevms@biocad.ru

Bispecific antibodies (bsAbs) belong to the group of promising biotherapeutics, as their structural and functional features provide versatility. To put it simply, bsAbs bind two antigens or two epitopes on one antigen simultaneously, moreover, they are capable of directing effector immune cells to cancer cells and delivering payloads (radionuclides, toxic agents, and immunological payloads) to target cells, thus offering a broad spectrum of clinical applications. Current review is focused on bsAbs platform engineering technologies, current progress and prospects in utilization and selection of various heterologous expression systems for protein production. Furthermore we share our view on the future of the bsAbs development for solid tumor therapy.

Keywords: bispecific antibodies, antibody engineering, antibody expression systems, CHO, HEK293, *E. coli*, antibody design, solid tumors

СИНТЕТИЧЕСКИЕ СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ НЕИММУНОГЛОБУЛИНОВОЙ ПРИРОДЫ ДЛЯ ОНКОЛОГИИ

Обзор

© 2023 Т.И. Дэвид^{1,2}, Н.Б. Пестов^{1,3,4*}, Т.В. Корнеенко⁴, Н.А. Барлев^{1,3,5,6}

¹ Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, 119121 Москва, Россия; электронная почта: payeoff@yahoo.com

² Московский физико-технический институт, Физтех-школа биологической и медицинской физики, лаборатория молекулярной онкологии, 141701 Московская область, Долгопрудный, Россия

³ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, лаборатория клещевого энцефалита и других вирусных энцефалитов, 108819 Москва, поселение Московский, Россия

⁴ Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, группа кросс-сшивающих ферментов, 117997 Москва, Россия

⁵ Институт цитологии РАН, 194064 Санкт-Петербург, Россия

⁶ Назарбаев университет, медицинский факультет, 010000 Астана, Казахстан

Поступила в редакцию 06.06.2023

После доработки 01.08.2023

Принята к публикации 01.08.2023

Благодаря широкому распространению скрининга комбинаторных библиотек при помощи таких методов, как фаговый дисплей, стало возможным не только осуществлять разработки новых рекомбинантных антител, но и расширить арсенал белков, связывающих интересующие мишени, за счёт многих других полипептидных скаффолдов-каркасов, негомологичных иммуноглобулинам. Такие новые синтетические связывающие белки (ССБ) в настоящее время довольно разнообразны; к ним относятся монотела/аднектины, дарпины, липокалины/антикалины и многочисленные минипротейны (аффитела, кноттины) и другие структуры, используемые в качестве модулей для создания более сложных аффинных инструментов с потенциалом применения как в диагностике, так и в терапии. Удачные скаффолды должны иметь небольшую молекулярную массу, обладать низкой иммуногенностью, а также резистентностью к различным жёстким условиям, например, к протеолизу (то есть иметь перспективу перорального применения); предпочтительно сохранение работоспособности в восстановительных условиях внутриклеточной среды. Но главное — это устойчивость скаффолда к мутациям в значительном количестве позиций, что необходимо для создания области связывания мишени достаточного размера через приготовление библиотек и скрининг с последующей препаративной экспрессией в подходящей системе. Поэтому скаффолды с высокой термодинамической стабильностью в настоящее время особенно привлекательны для создания новых ССБ, которые уже постепенно входят в клиническую практику как антагонисты онкопротеинов в сигнальных каскадах. Настоящий обзор посвящён многообразию ССБ с особым вниманием к тем из них, которые ингибируют важнейший онкопротеин KRAS, разработка специфических ингибиторов против мутантов которого до недавнего времени была затруднена.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: монотела, аднектины, липокалины, аффитела, дарпины, альтернативные скаффолды.

DOI: 10.31857/S032097252309004X, **EDN:** WTGRQC

ВВЕДЕНИЕ

Трансформация нормальной клетки в раковую определяется несколькими молекуляр-

ными событиями, которые включают прямую или косвенную активацию онкогенов и/или потерю функции супрессоров опухоли. Эти события сопровождаются изменениями в регуляции экспрессии генов, приводя к усилению клеточной пролиферации, репликативному бессмертию и понижению чувствительности к противоопухолевому иммунитету. В поисках эффективных терапевтических средств

Принятые сокращения: а.о. — аминокислотный остаток; ОВ — онколитические вирусы; ССБ — синтетические связывающие белки.

* Адресат для корреспонденции.

разработано значительное число адресных препаратов, применяемых на практике и представленных в основном в двух вариантах: моноклональные антитела, которые действуют в основном как блокаторы рецепторов на опухолевых клетках, и низкомолекулярные вещества, которые ингибируют в основном протеинкиназы, опосредующие внутриклеточные сигнальные пути, важные для роста и инвазивности раковых клеток. Исследования механизма действия антител, конъюгированных с токсичными низкомолекулярными ингибиторами, а также нацеливание клеточных и вирусных противоопухолевых средств в настоящее время являются одним из самых перспективных направлений современной молекулярной онкологии. Трудности, связанные с лечением рака, во многом обусловлены адаптивной резистентностью опухолей в результате действия молекулярных механизмов, которые приводят к общему повышению агрессивности опухолей; одним из таких механизмов является генетическая гетерогенность опухолевых клеток, ведущая к тому, что многие препараты неспособны воздействовать на все популяции опухолевых клеток. Чем выше селективность ингибитора, тем быстрее развивается устойчивость к нему из-за высокой частоты мутаций и эпигенетической пластичности раковых клеток. Поэтому высокоэффективные препараты будущего не должны быть узкоспецифичными, а должны охватывать весь класс близкородственных молекул-мишеней, то есть необходима разработка терапевтических стратегий всё возрастающей сложности.

В данном обзоре мы концентрируемся на применении *синтетических связывающих белков* (ССБ, называемых также миметиками или даже имитаторами антител, что не вполне корректно), содержащих неиммуноглобулиновые скаффолды (скаффолд или каркас здесь – однодоменный полипептид в примерном диапазоне масс 4–20 кДа), в онкологии, а также рассматриваем проблемы их разработки и продукции, которые пока являются одним из препятствий на пути их широкого внедрения в различные сферы науки и здравоохранения. Это особенно актуально в связи с тем, что со времени публикации наиболее широко охватывающего проблематику и очень вдумчивого обзора прошло уже десять лет [1].

ДОСТОИНСТВА И НЕДОСТАТКИ АНТИТЕЛ

Наиболее универсальными и разнообразными связывающими белками у человека яв-

ляются иммуноглобулины. Их антиген-связывающие участки состоят из шести петель, соединяющих нити β -листов в переменных доменах лёгких и тяжёлых цепей. В настоящее время классические антитела доминируют среди белковых препаратов от фундаментальных научных исследований до практической адресной терапии. Необходимо тщательно взвесить как достоинства, так и недостатки иммуноглобулинов. На сегодняшний день они являются лучшими инструментами благодаря своим превосходным свойствам: они естественны по своему происхождению, принадлежат к основным белкам плазмы, они могут обладать отличным сродством и специфичностью к желаемым мишеням, их крупномасштабное производство хорошо налажено, разработаны простые протоколы конъюгации и т.д. Большого прогресса удалось достичь благодаря применению антител верблюда и ламы, поскольку они сохраняют свойства иммуноглобулинов и без лёгких цепей, что позволяет – под именем *нанотела* – также применять их и внутриклеточно. Однако в этом отношении они уступают многим другим ССБ на основе альтернативных скаффолдов, которые могут быть отобраны и сконструированы для точного воздействия на внутриклеточные онкопротеины, включая те, которые ранее считались неподдающимися ингибированию, например, GTPазу KRAS. В этой связи надо заметить, что, хотя использование моноклональных антител, в сравнении с низкомолекулярными химическими ингибиторами, оказалось более мощным средством против опухолевых клеток благодаря высокой специфичности к своей мишени, большая молекулярная масса (около 150 кДа) ограничивает их применение в части воздействия на внутриклеточные белки. Другие недостатки антител накладывают серьёзные ограничения на некоторые другие способы их использования, например, наличие дисульфидных мостиков затрудняет их применение для адресных подходов во внутриклеточной восстановительной среде. Важна также и высокая стоимость антител. Кроме того, из-за большого размера, медленного выведения из крови и неопухолевых тканей антитела менее пригодны для таких областей, как визуализация опухолей или радиоиммунотерапия. Уменьшение размера могло бы дать ряд преимуществ, например, увеличение доступности стерически затруднённых эпитопов. Также важно снижение гидрофобности, склонности к агрегации, а повышение стабильности самого скаффолда вне зависимости от редокс-потенциала является приоритетом. Поэтому остро стоит задача создания

белковых аналогов антител, обладающих высокой аффинностью, но меньшей молекулярной массой, лёгкостью продукции, высокой стабильностью снаружи и внутри клетки.

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О РАЗНООБРАЗИИ НЕИММУНОГЛОБУЛИНОВЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ

Достаточно очевидным соображением является необходимость компромисса между различными свойствами. Например, значительное повышение аффинности может быть достигнуто ценой ущерба для других важных параметров — особенно специфичности, но также зачастую и стабильности (их оптимизировать без компромиссов невозможно [2], что особенно хорошо показано на примере антител [3]), поэтому надо кратко рассмотреть пути оптимизации свойств в случае альтернативных скаффолдов ССБ. В самом деле, все моноклональные антитела в любом случае фактически являются полиспецифичными, способными связываться с эпитопами со значительно отличающейся геометрией [4, 5].

Порой возможно на основании простых фактов спрогнозировать и наметить пути к улучшению свойств ССБ, в которых зачастую много остатков лизина и аргинина: в случае антител это сильно ухудшает свойства [6], поэтому для внутриклеточного применения ССБ можно по аналогии предположить, что они будут способны неспецифически связываться с нуклеиновыми кислотами. Порой ставится вопрос о необходимости уменьшения сложности взаимодействий путём минимизации как самого молекулярного скаффолда-каркаса, так и поверхности взаимодействий. ССБ должны быть хорошими блоками молекулярного конструктора для комбинаторного подхода в создании мультифункциональных молекул. Можно рекомендовать ряд прекрасных обзоров альтернативных скаффолдов ССБ, упомянем только самые недавние — опубликованные за последние 4 года и описывающие перспективные ССБ в терапии [7], в биологии развития [8], для нейтрализации токсинов [9], для пуллаута с последующим масс-спектрометрическим анализом терапевтически важных белков и биомаркеров [10]. Основная цель нашего обзора состоит в том, чтобы рассмотреть разработки многообразных ССБ под углом перспектив их применения в онкологии.

Поиск новых вариантов ССБ обычно производится через создание рандомизированных

библиотек с последующей селекцией, анализом клонов и завершается рациональным дизайном, то есть хороший скаффолд ССБ должен позволять существенное варьирование остатков, формирующих сайт связывания своей мишени. Разумно классифицировать уже созданные платформы (рис. 1) по структурному принципу формирования связывающей поверхности на две большие группы: спирально-цепного типа (дарпины, минипротейины (включая аффитела), аффилины и другие) и петлевого типа (монотела, антикалины, авимеры, кноттины, атримеры, финомеры и другие, включая также и иммуноглобулины). Это различие очень важно, поскольку в первом типе для создания библиотек новых вариантов рандомизируются остатки, боковые цепи которых экспонированы наружу, в то время как во втором типе сам скаффолд чаще всего не затрагивается, но петли варьируются очень сильно, в том числе и по своей длине. По всей видимости, за исключением циклических минипротейинов, во всех реализованных вариантах свободны *N*- и *C*-концы, что даёт возможность слияния с другими последовательностями. До сих пор не используются такие элементы, как внутренне неупорядоченные белки [11], и очень слабо — PDZ-домен [12], так как основным требованием для хороших скаффолдов является термодинамическая стабильность. Поскольку монотела, дарпины, антикалины и аффитела в настоящее время наиболее популярны [13, 14], то их следует рассмотреть отдельно, а здесь кратко упомянуть остальные скаффолды, подчеркнув, что многие попытки создать новую продуктивную платформу на основе нового скаффолда могут показаться тупиковыми, такие как тендаместат [15].

Минипротейины условно определяются как белки с массой существенно меньше 10 кДа, к ним следует относить и аффитела (рассмотрены ниже). Характерный малый размер позволяет использовать для препаративного получения химический синтез, в своём огромном разнообразии они освещены в специальном обзоре [16]. Здесь нам следует упомянуть прототипического представителя минипротейинов: *кноттины* (knottins) [17] (размер применяемых кноттинов начинается с 14 аминокислотных остатков (а.о.), но чаще всего составляет около 30 а.о.), которые особенно ярко характеризуются чертой, распространённой среди минипротейинов — стабилизацией большим количеством дисульфидов. В кноттинах три антипараллельные β -цепи соединены петлями разной длины, 6 остатков цистеина соединены тремя дисульфидными связями, это даёт столь

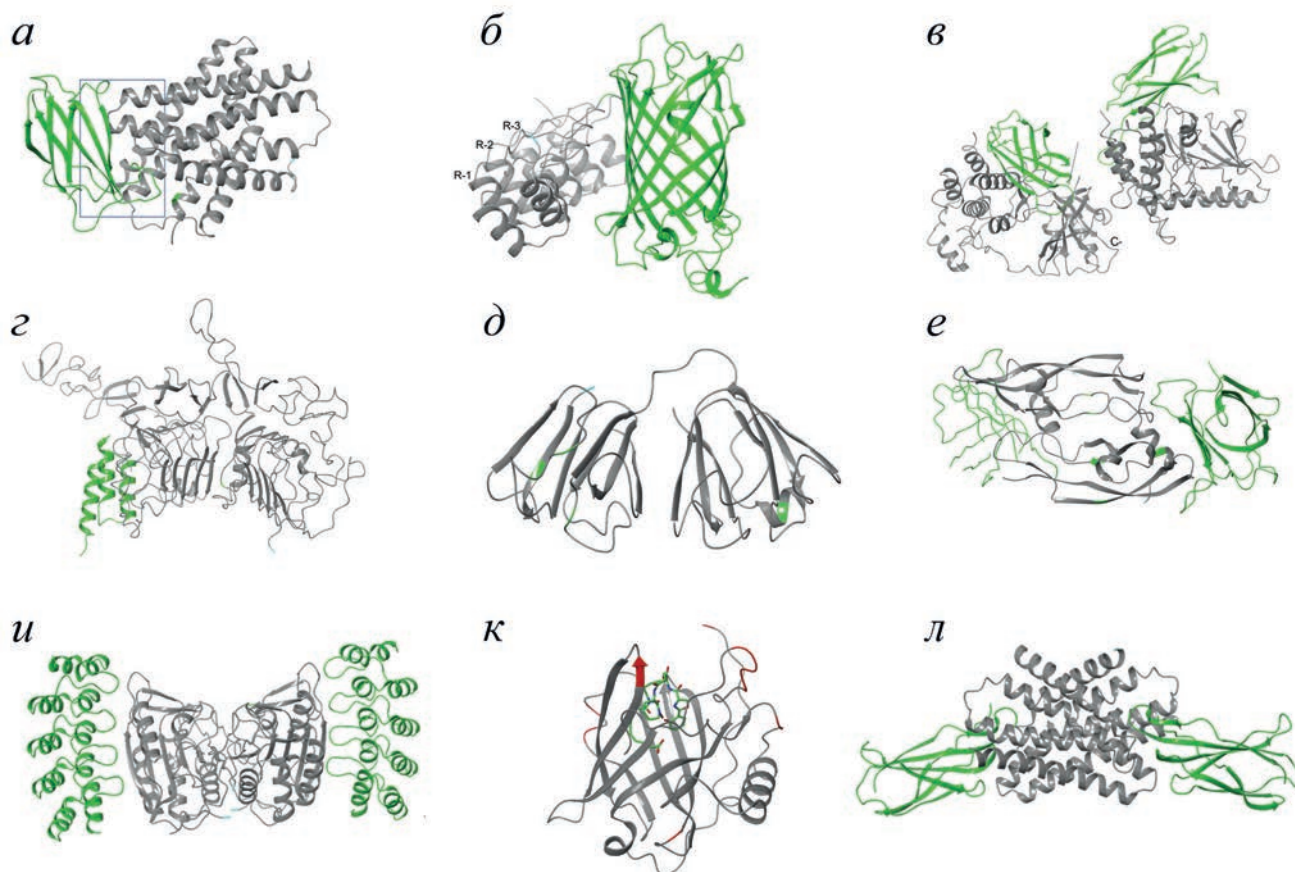


Рис. 1. Трёхмерные укладки полипептидных цепей ССБ в комплексе со своими мишенями. *a* – Монокло (зелёный) против фторидного канала (серый) 6BQO; *б* – дарпин (серый) против белка MTFP1 (зелёный), 6FP7; *в* – монокло (зелёный) против MLKL (серый), 7JXU; *г* – аффитело ZHER2 (зелёный) против белка HER2 (серый), 3MZW; *д* – кристаллиновый аффилин, 2JDG; *е* – липокалин в комплексе с VEGF, 4QAF; *и* – дарпин (зелёный) против каспазы 7 (серый), 4LSZ; *к* – липокалин (серый) против карбоксиметилкобактина (зелёный), 1X8U; *л* – монокло (зелёный) против фторидного канала (серый), 6B2B

высокую стабильность, что допустимо нагревание в сильноокислой или сильнощелочной среде. *Авимеры* доказывают, что устойчивые минипротеины, в отличие от нанопитинов, аффител и др., могут происходить и из белковых доменов человека (LRP, VLDLR и др.) длиной 35 а.о., в которых 12 а.о. консервативны, а также содержится шесть дисульфидов [18]. Из консенсусной последовательности цистатина и стефина происходят *адхирон-аффимеры*: такие ССБ без дисульфидных связей из одной α -спирали и четырёх β -цепей с двумя переменными петлями показывают замечательную термическую стабильность (точка денатурации $T_m \approx 101^\circ\text{C}$) [19, 20] и, помимо прочих применений, рассматриваются как аффинный инструмент для диагностики уровня карциноэмбрионального антигена [21]. Домен Кунитца содержит примерно 60 а.о. с тремя дисульфидными связями и тремя петлями, пригодными для варьирования, его использование подкреплено давним успехом – опытом клинического применения калбитора (Kalbitor),

ингибитора калликреина. Среди недавних разработок с применением этого домена нужно отметить *гастротело* из соевого ингибитора трипсина, выдерживающее pH 2 [22], и его гомолог из подсолнечника [23]. Разнообразие ингибиторов протеаз с доменом Кунитца среди белков человека довольно велико; например, неплохой платформой может быть такой домен из предшественника амилоида (APP1), три мутации в котором достаточны для того, чтобы он превосходно ингибировал мезотрипсин ($K_i \approx 89$ пМ) [24], и – аналогично – устойчивый к протеолизу ингибитор родственной калликреину пептидазы 6 (KLK6), обладающий $K_i \approx 160$ пМ и временем жизни в организме около 10 дней [25]. Потенциал некоторых разработок пока не вполне понятен, например, это можно сказать о SPINK2 [26] и белках из ядов змей [27].

Антитела неиммуноглобулиновой природы из бесчелюстных могут служить основой для модульного скаффолда для так называемых *репетел* (repebodies) [28], демонстрирующих

высокий уровень экспрессии в бактериях, термодинамическую стабильность, в том числе при изменениях pH, способность ингибировать мишень типа VEGFR *in vivo* [29].

SH2/SH3-Домены среди белков человека представлены более чем сотней нерцепторных тирозинкиназ семейства Src, важного для регуляции клеточного цикла, и другими ферментами. Около ста а.о. организованы как глобула с центральным β-листом, окружённым двумя α-спиралями, причём две петли можно рандомизировать. Наиболее известными представителями этого скаффолда являются *финомеры* (fynomers), происходящие из тирозинкиназы Fyn [30] и обладающие способностью к отличной бактериальной экспрессии в виде растворимых мономеров без значимой агрегации и с хорошей стабильностью ($T_m \sim 70^\circ\text{C}$) при отсутствии остатков цистеина; а их высокая консервативность позволяет надеяться на низкую иммуногенность [31].

С точки зрения стабильности несомненный интерес представляют белки и пептиды из гипертермофильных и гиперацидофильных микроорганизмов. Существенное развитие получили исследования представителей так называемого ОВ-домена, включающих ДНК-связывающие полипептиды Sac7d и Sso7d архей родов *Sulfolobus*, *Acidanus*, *Pyrobaculum* и т.д. под названиями *нанофитины* и *аффитины*. В структурном смысле они представляют из себя короткий цилиндр из пяти β-цепей, кепированный α-спиралью; они примечательны хорошей экспрессией растворимого белка в *E. coli* и высокой стабильностью (до 74°C в диапазоне pH 0–12) [32–35].

Очевидно, что примечательный своей растворимостью внутриклеточный белок глутатионтрансфераза может использоваться для создания универсального скаффолда (*глутело*) [36], однако применение глутел не получило значимого развития.

Термин *аффилины* несколько неудачен, поскольку по происхождению они могут различаться (из димеризованного убиквитина или из γВ-кристаллина с массой около 20 кДа). Можно сказать, что аффилины демонстрируют наиболее яркий пример сложностей, возникающих при попытках внедрения белков, которые сами по себе обладают прекрасными свойствами, в качестве скаффолдов для ССБ. В самом деле, аффилины высокорастворимы и очень стабильны (в 8 М мочеvine, до 75°C , в интервале pH 1–9) благодаря компактной укладке (так, убиквитин — 76 а.о. длиной — имеет 3,5 α-спирали и пять β-цепей). Однако только 6 а.о. (из цепей, экспонированных на-

ружу со стороны β-структуры и образующих связывающий регион) можно использовать для рандомизации, а внедрение переменных петель существенно обесценивает вышеуказанные достоинства и требует дополнительных усилий для снижения жёсткости вторичной структуры [37].

Поиск новых интересных скаффолдов среди белков человека не прекращается. Например, использование тщательно продуманных критериев систематического скрининга из базы данных трехмёрных структур (молекулярная масса в диапазоне 10–25 кДа, мономерность, наличие структуры с достаточно высоким разрешением ($< 3,0 \text{ \AA}$), продукция в *E. coli*) с последующим ручным отбором по дополнительным критериям (отличие от ранее опубликованных белковых скаффолдов, малое количество остатков цистеина и дисульфидных связей, отсутствие данных о высокой токсичности и/или иммуногенности, отсутствие лигандов или кофакторов, высокая растворимость, лёгкость очистки) дало новый скаффолд, названный ProBi (Protein Binder). Он содержит два поверхностно-экспонированных участка, пригодных для рандомизации, что было показано путём успешной селекции вариантов, связывающихся с человеческим интерлейкином-10 [38]. С учётом большого количества предсказанных структур подходы такого рода станут ещё более плодотворными.

Дальнейшее развитие методов *дизайна de novo* неизбежно будет всё более продуктивным. Например, было показано, что даже на основе такого простого модуля, как элемент типа петля-спираль-петля (LUCS), можно генерировать целые семейства белков с настраиваемой геометрией, включающие в себя как природные, так и ранее неизвестные искусственные последовательности [39]. Хорошим примером является *альфатело*: этот скаффолд с молекулярной массой около 10 кДа, гомологов которого в природе нет, сконструирован по принципу тройной спирали с G-богатыми линкерами [40].

МОНОТЕЛА-АДНЕКТИНЫ И ДРУГИЕ СИНТЕТИЧЕСКИЕ СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ НА ОСНОВЕ ФИБРОНЕКТИНОВОГО ДОМЕНА

Первые ключевые работы по монотелам-аднектинам были опубликованы в 2008 [41], 2011 [42] и 2013 г. [43], а надежды на монотела как лекарственные средства в онкологии впервые вдумчиво обсуждались в 2012 г. в обзоре

Weidle et al. [1]. Постепенное улучшение понимания проблем их практического использования [44, 45] способствовало тому, что в настоящее время не менее двух монотел проходят клинические испытания [7].

По своему происхождению монотела представляют собой десятый домен фибронектина 3 (FN3), обозначаемый поэтому кратко как 10Fn3. Изначально сравнивалось несколько разных доменов, и любой из них может использоваться (например, *пронектины* происходят из 14 домена фибронектина 3). Однако домен 10 выбран благодаря тому, что он является наиболее стабильным среди повторяющихся доменов FN3 человека, со средней $T_m = 84^\circ\text{C}$ [41], и толерантен к ряду мутаций в трёх поверхностно-экспонированных петлях. Итак, монотело — это простая структура типа небольшого β -сэндвича из семи β -цепей; такой скаффолд выдерживает рандомизацию и удлинение двух или трёх поверхностных петель, а температура его плавления составляет около 80°C , несмотря на отсутствие дисульфидных связей [46]. Поскольку остатки цистеина отсутствуют, стабильность монотела слабо зависит от окислительно-восстановительного потенциала, что позволяет избежать дисульфид-опосредованной агрегации. Традиционная для фибронектина мишень — интегрин, причём взаимодействие FN3 со своей мишенью характеризуется гибкостью петель и динамичностью β -листа для обеспечения оптимальной конформации связывания с целевым белком, в отличие от антител, которые проявляют жёсткость в своих β -листах из-за внутренних дисульфидных связей между тяжёлыми и лёгкими цепями [30, 31]. Достоинства монотел обуславливают их применение для ряда научных целей, например, Kükenshöner et al. сообщили об использовании монотел в качестве блокаторов белков, участников модуляции аллостерических сайтов и кристаллических шаперонов [47]. Внутриклеточная стабильность монотел также использовалась для изучения структуры и функции белков внутри клеток, где слитые с флуоресцентным белком монотела — здесь под названием *интратела* против эндогенных нейронных белков — позволили визуализировать возбуждающие и тормозные синапсы в живых нейронах [48].

Высокую стабильность монотел удалось повысить и более, создав ультрастабильный скаффолд FN3con [49], также полученный с помощью консенсусного дизайна (использованием выравнивания 2123 последовательностей), он пригоден даже для графтинга петель из других монотел [50, 51]. Но надо заметить,

что высокая стабильность может быть не всегда желательна при терапевтических применениях.

ЛИПОКАЛИНЫ-АНТИКАЛИНЫ

С эстетической точки зрения это, вероятно, самый привлекательный скаффолд, поскольку он образует элегантную чашу (*calyx* — то есть имеет форму чашечки цветка) [52, 53], где имеется центральный восьмищепочечный антипараллельный β -цилиндр и боковая α -спираль. На открытом конце β -бочонка четыре структурно изменчивые петли соединяют β -цепи попарно и вместе формируют лигандный карман, то есть имеется четыре петли, пригодные для вариации. Как правило, антикалин имеет около 188 а.о. (и благодаря гликозилированию его молекулярная масса составляет около 21–24 кДа), изоэлектрическую точку около 7,1. Таким образом, библиотеки липокалинов/антикалинов имеют четыре структурно гипервариабельные петли на ободке высококонсервативного β -бочонка. Несмотря на то, что липокалин/антикалин не является коротким пептидом, он оказался подходящим для фагового дисплея. Более того, липокалины хорошо продуцируются в виде мономеров с удовлетворительной растворимостью в бактериях [54]. Используя направленный случайный мутагенез в сочетании с методами молекулярной селекции, можно изменять области петель, создавая карманы для плотного связывания различных лигандов — от малых молекул и пептидов до белков. Происхождение этого скаффолда также чрезвычайно привлекательно, поскольку в данном случае используется нормальный человеческий белок, который секретируется и обладает высокой растворимостью: липокалин-2 (синонимы: LCN2, NGAL, онкоген 24p3, сидерокалин, секреторируемый нейтрофилами) способен активно связывать железо (с катехолатом), предотвращая рост бактерий. Его гомологом является преальбумин слёзной жидкости, который также является антибактериальным агентом благодаря секвестрации железа. К сожалению, это же свойство используется некоторыми опухолями, например, в процессе метастазирования в спинномозговую жидкость [55], при раке молочной железы [56] (более подробно рассмотрено в работах Chakraborty et al. и Crescenzi et al. [57, 58]). Однако, с другой стороны, экспрессия липокалина-2 в качестве трансгена может значительно усилить действие онколитических аденовирусов в некоторых моделях

опухолей, таких как аденокарцинома поджелудочной железы и клеточные линии колоректального рака [59, 60], также его экспрессия снижена в клетках рака желудка [61]. Поэтому практическое терапевтическое применение липокалинов будет находиться под пристальным вниманием, поскольку циркулирующие липокарины не только играют противоречивую роль в развитии рака, но и коррелируют с когнитивным расстройством у некоторых пациентов [62].

ДАРПИНЫ

Дарпины напоминают элегантную гребёнку и являются примером чрезвычайно удачного искусственного скаффолда на основе анкириновых повторов, что демонстрирует успех консенсусного подхода (использование консенсусов из множественных выравниваний гомологичных участков) в дизайне белков (к сожалению, этот простой подход редко даёт плоды). Среди белков человека этот повтор распространён среди адапторных внутриклеточных белков и содержит около 33 а.о. из двух α -спиралей и одной β -цепи с гидрофильными боковыми экспонированными остатками и гидрофобным внутренним карманом. Типичный дарпин содержит два или четыре повтора, фланкированных двумя кепирующими повторами, тем самым давая массу около 14–21 кДа (температура денатурации поэтому варьирует в широком диапазоне – от 60 до 95 °С). Надо обратить внимание, что в сравнении с большинством упоминаемых здесь ССБ дарпины имеют гораздо большую поверхность для связывания, а рандомизации возможно подвергнуть довольно значительный ряд экспонированных остатков. В настоящее время как минимум два дарпина проходят клинические испытания [7].

АФФИТЕЛА

Для тех применений ССБ, в которых критично важна как можно меньшая молекулярная масса, зачастую лучшим выбором среди других скаффолдов на сегодняшний день являются *аффитела*, происходящие из домена В IgG-связывающего участка протеина А *S. aureus*. При их дизайне небольшого числа мутаций оказалось достаточно для увеличения стабильности и потери способности связывать антитела. Три α -спирали, не имеющие остатков цистеина, находятся в единой связке, давая скаффолд массой около 6 кДа, в котором мож-

но рандомизировать экспонированные остатки α -спиралей 1 и 2.

В настоящее время удалось разработать аффитела против многих опухоль-ассоциированных мишеней, причём именно малый размер чрезвычайно выигрывает в диагностике, проводимой при помощи радиоизотопно-меченных аффител. Однако важно понимать, что как только аффитело используется в качестве партнёра для слияния с другим белком (например, токсином), важнейшее преимущество малого размера становится менее существенным по сравнению с любым другим скаффолдом. То же самое верно и при создании биспецифичных антител [63].

ПРИНЦИПЫ СОЗДАНИЯ И СКРИНИНГА БОЛЬШИХ БИБЛИОТЕК СИНТЕТИЧЕСКИХ СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ

Основные методы скрининга библиотек ССБ можно разделить на клеточный дисплей (прежде всего дрожжевой), вирусный (чаще всего фаговый, на поверхности белка рVIII нитевидного бактериофага fd/M13), а также мРНК-дисплей (улучшенный вариант рибосомного дисплея), полностью происходящий *in vitro*. Хотя фаговый дисплей неплохо работает для монотел [41, 64], а также пригоден для многих других ССБ, включая репетела [29], очевидно, что несовершенство реальных фаговых библиотек в настоящее время значительно. Можно рекомендовать отличный обзор по применению фагового дисплея для этих целей [65]. Основной принцип работы с такими библиотеками ССБ изображён на рис. 2.

Проблемы продукции синтетических связывающих белков. Нередко от довольно интересных проектов с рекомбинантными белками приходится отказываться из-за их плохой стабильности и, соответственно, низкой экспрессии, чего почти лишены антитела.

Монотела часто весьма успешно производятся в *E. coli*. В качестве примера приведём здесь монотела, для которых авторы используют термин *интратела* [66, 67], отметим также свежую работу Olson et al. [68]. Но наш опыт указывает на то, что многие монотела производятся в *E. coli* с очень низким выходом (неопубликованные данные), причём особенно ничтожные выходы в данных условиях могут давать монотела с высокой изоэлектрической точкой [69]. Любопытно также, что при анализе ряда случайных клонов отмечен следующий факт: хотя обычно монотела производятся

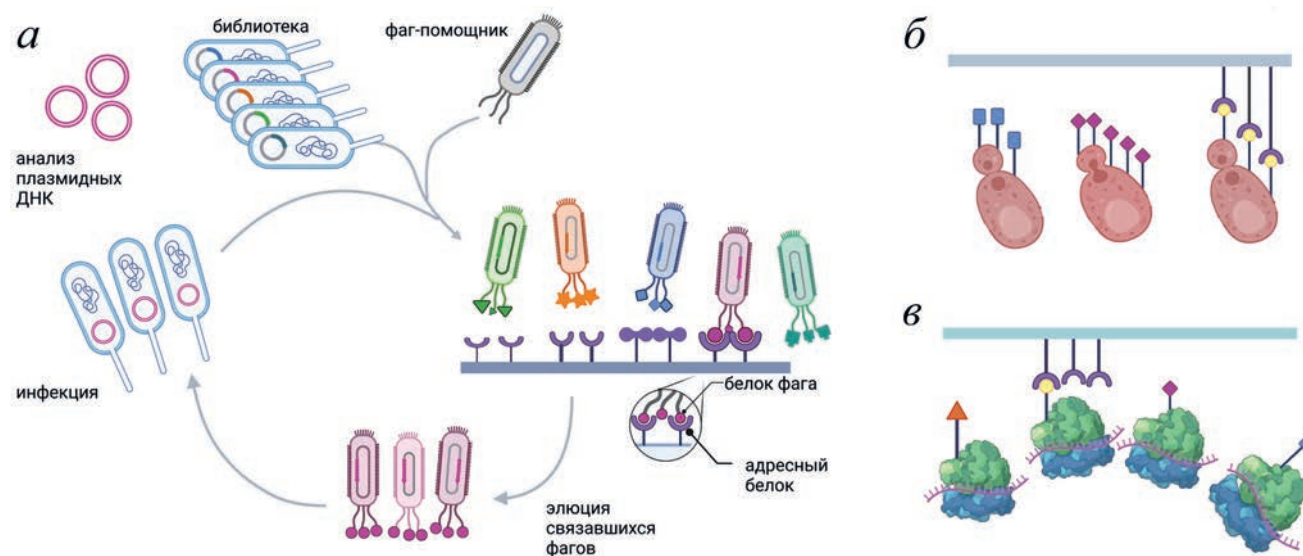


Рис. 2. Отбор синтетических связывающих белков при помощи клеточного, фагового или мРНК-дисплея. Системы экспрессии ССБ на поверхности вируса (*а*, чаще всего бактериофага), клетки (*б*, чаще всего дрожжей), или в виде синтезированных, но не диссоциированных от рибосом (*в*, благодаря пуромициновому линкеру) полипептидных цепей, позволяют проводить скрининг библиотек ССБ достаточно быстро и эффективно, например, с использованием мишеней, иммобилизованных на твёрдой фазе. Обычно требуется около трёх раундов отбора и амплификации библиотек до анализа индивидуальных клонов. Использован ресурс biorender.com

на уровне от удовлетворительного до хорошего (4–20 мг/л культуры), их стабильность и растворимость не коррелирует с общим уровнем экспрессии [68], т.е. существенная часть клонов даёт значительное количество агрегированного белка.

Поскольку эффективность монотел и других неиммуноглобулиновых скаффолдов зачастую уступает антителам, то, в частности, возникают идеи улучшения монотел при помощи кросс-сшивок, включая дисульфиды [70].

Не каждый скаффолд выдерживает мутации варибельной части, это часто приводит к дестабилизации всей белковой структуры, а неуниверсальность гетерологической экспрессии указывает на сильную ограниченность потенциала самого этого скаффолда в целом. С другой стороны, есть и свежие примеры частичных успехов, например, авимерный А-домен из 35 а.о. с 12 консервативными а.о. и шестью дисульфидными мостиками, несмотря на столь малый размер, продуцируется в *E. coli*, а нужные S-S связи образуются на воздухе, что даёт продукт размером около 4 кДа с отличной стабильностью при высокой температуре.

Возможно сильно изменить специфичность высокоаффинного природного связывающего белка, что ярко демонстрирует пример авидина, превращённого в стероид-связывающий белок [71], и дальнейшее развитие так называемых *антидинов* [72].

Очевидным, универсальным, но далеко не всегда успешным подходом следует счи-

тать графтинг. Есть много успешных примеров возможности использовать связывающие петли хороших антител для пересадки в почти любой белок, например, в зелёный флуоресцентный белок, с образованием нового аффинного инструмента, способного к связыванию мишени [73, 74]. Эти подходы предсказуемо выливаются в новые интересные, но не терапевтические направления, используемые, например, для создания флуоресцентных сенсоров важных для онкогенеза белков, таких как MDM2 [75]. Замечательно, что графтинг нередко позволяет купировать проблемы снижения стабильности после отбора: например, направленная эволюция для связывания с терапевтической мишенью VEGFR2 привела к потерям в термостабильности и неконтролируемой олигомеризации, а пересадка петель в скаффолд монотела FN3Con с особо высокой стабильностью (конструкция FN3Con-анти-VEGFR2) способна сохранять активность после 2 лет хранения при 36 °C [51].

Проблемы фармакодинамики и фармакокинетики синтетических связывающих белков. Надо отметить, что все описанные здесь малые ССБ легко выводятся через почки, поэтому для увеличения времени циркуляции используют стандартные подходы увеличения общей молекулярной массы типа ПЭГилирования, а также введение альбумин-связывающего домена [76]. Хорошо известна и проблема, типичная для большинства биопрепаратов – избыточное накопление в печени. А вот самое

важное — накопление в опухоли и удержание адресных терапевтических препаратов в ней — зависит от сложного взаимодействия таких факторов, как сродство к мишени, молекулярная масса, период полураспада, склонность к экстравазации и другие, причём и дарпины зачастую оказываются слишком велики по размеру и плохо проникают даже вглубь сфероидов в культуре [77].

С другой стороны, важно, что для диагностики полезны метки с более быстрым выведением из нецелевых тканей. Такие метки позволили бы более корректно оценивать сигналы из органов и тканей, что было бы более удобно для пациентов и позволило бы ускорить начало противоопухолевой терапии. Для этого важно использовать небольшие белки, которые могут быть визуализированы в тканях-мишенях в течение 4 ч после введения.

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЮ СИНТЕТИЧЕСКИХ СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЙ В ОНКОЛОГИИ

Конъюгирование и химеризация. ССБ на основе альтернативных скаффолдов являются чрезвычайно привлекательными модулями для создания поливалентных аффинных инструментов (обзор Sachdev et al. [78]) — существует несколько примеров удачной конъюгации ССБ с низкомолекулярными препаратами, токсинами. Для конъюгатов ССБ с липосомами и наночастицами можно рекомендовать отличный обзор Шипуновой и Деева [79], в качестве примера особо отметив работу, в которой показано, что однослойные липосомы (диаметром 80–90 нм), содержащие цитохром *c*, флуоресцентный mCherry и высокотоксичный экзотоксин А синегнойной палочки с дарпином против HER2, специфически окрашивают и уничтожают HER2⁺ клетки [80]. Но, несмотря на успех трастузумаба при раке молочной железы, специфические антитела, как правило, не оказывают влияния на солидные опухоли, поэтому столь важны разработки конъюгатов типа белок-лекарственное средство. Это важно в случае цитотоксических препаратов, которые могут денатурировать белковые структуры, поскольку для устойчивости к агрегации малые белки нуждаются в контролируемой конъюгации. Эта важная особенность имеет решающее значение, поскольку большинство цитотоксических препаратов гидрофобны и могут вызывать неконтролируемую агрегацию антител и других белков для конъюгации.

руемую агрегацию антител и других белков для конъюгации.

Аффитоксин (успешно продуцируется в *E. coli*), состоящий из укороченного дифтерийного токсина и аффитела против HER3 [81] и соединённый также с цитотоксическим ингибитором полимеризации тубулина DM1, проявлял сильное цитотоксическое действие на клетки карциномы поджелудочной железы VxPC-3 (IC₅₀ = 7 нМ) [76]. Как большое достоинство, выше упоминалось отсутствие остатков цистеина в его монотелах, но это также позволяет вставить один уникальный совместимый с конъюгацией остаток цистеина для нагрузки низкомолекулярными лекарствами [82].

Очень ценна работа, в которой было проведено сравнение разных видов дарпина против EGFR: моно- и двухвалентный дарпин, конъюгат с Fc, с антителом и с монометилауристатином E в качестве токсина. Такие конъюгаты обладают субнаномолярной цитотоксичностью в отношении клеток A431 (плоскоклеточная карцинома лёгких человека) [83].

Внеклеточная доставка синтетических связывающих белков для диагностики, тераностики и терапии онкологических заболеваний. В борьбе с опухолевыми клетками на первое место встаёт связывание ССБ с поверхностными маркерами для диагностики опухолевого роста, классической терапии и тераностики. Радиоизотопный имиджинг хорошо освещён в специальных обзорах антител и скаффолдов неиммуноглобулиновой природы [84, 85], с более широким охватом специфических молекулярных инструментов — в работах Klont et al. и Mayoral-Peña et al. [86, 87], с прицелом на теранотику опухолей — в работах Шипуновой и соавт., Шиловой и соавт. [79, 88]. Особо отметим ценную и очень редкую сравнительную работу, в которой для магнитных флуоресцентных наночастиц, направленных против HER2, сравнены между собой полно-размерные IgG, дарпин и аффитело. Оказалось, что аффитело наиболее эффективно с точки зрения специфичности и селективности при мечении раковых клеток с помощью наночастиц [89].

VEGF и VEGFR2. Среди основных молекулярных мишеней, используемых в настоящее время для разработки диагностических и терапевтических средств, прежде всего следует упомянуть антиангиогенные средства, например, репетело, нацеленное на VEGF [29] (хотя, строго говоря, VEGF, будучи секретлируемым белком, не является сам по себе опухолевым маркером). Рецептор VEGF служит ещё более

хорошей мишенью, например, монотело СТ-322 против **VEGFR2** [90] успешно прошло первую фазу клинических испытаний у пациентов с раком поджелудочной железы [51].

HER2 – архетипичный маркер для значительного количества раков молочной железы, который благодаря успеху трастузумаба привлекает повышенное внимание для разработки аналогов на основе ССБ (часть работ упомянута выше). Например, применяются токсичные дарпины против **HER2**, конъюгированные с золотыми мини-наностержнями; такой конъюгат избирательно накапливается в **HER2⁺** ксенотрансплантатных опухолях у мышей, что способствует сильному уменьшению опухоли после фотодинамической терапии [80]. Молекулы аффитела, меченные ⁶⁸Ga, позволяют точно и специфично измерять экспрессию **HER2** в метастазах рака молочной железы при ПЭТ-имиджинге [91].

EGFR. Практическое терапевтическое применение в тераностике имеют радиомеченные аффитела [92]. Успех такого тераностического подхода подкреплён примером affiFAP, который состоит из аффитела против **EGFR** и белка, активирующего флуороген. Этот компактный аффинный реагент может активировать флуоресценцию при связывании, позволяя визуализировать опухоль с низким уровнем неспецифического окрашивания тканей [93]. Центирины (происходящие из домена теназина, 10 кДа) и репетела хорошо себя показали в виде конъюгатов с красителем при интраоперационной флуоресцентной диагностике опухолей со сверхэкспрессией **EGFR** [94]. Также отметим отличную работу Maćzyńska et al. по терапевтическим аффителам, где для фотодинамической терапии аффитело против **EGFR** конъюгировали с IR700. АФК при ИР-облучении способствовали иммуногенной клеточной смерти (ИКС) с последующим созревaniem дендритных клеток, а терапевтический ответ *in vivo* наблюдался в опухолях головного мозга вскоре после облучения [95].

Экспонированный на поверхности **калрептикулин (экто-CRT)** играет решающую роль в фагоцитарном поглощении апоптотических клеток во время иммунотерапии. Два пептида, KLGFFKR из интегрин- α и GQPMYQPMY из Her-1, специфически связывают экто-CRT при индукции ИКС. Монотела с графтингом обеих указанных последовательностей показали хорошее связывание с экто-CRT, эффективно обнаруживая преапоптотические клетки при обработке доксорубицином, но не гемцитабином, который не индуцирует ИКС. Более того, используя CRT-специфические моноте-

ла, можно обнаружить индукцию экто-CRT в раковых клетках в ответ на воздействие лекарственных препаратов [66].

Путём скрининга комбинаторных библиотек кноттинов с помощью фагового дисплея обнаружены **EDB**-специфические ССБ, способные в пикомолярном диапазоне окрашивать **EDB⁺** клетки (то есть содержащие опухоль-специфичный домен фибронектина) в срезах тканей, полученных из ксенотрансплантатов человеческой глиобластомы U-87 MG у мышей [96].

Синергизм, наблюдаемый при использовании двух и более ССБ [97], хорошо иллюстрирован примером аффитоксина, состоящего из укороченной формы дифтерийного токсина и **HER3**-связывающего домена аффитела [81], а также похожим примером с двумя дарпинами [98, 99]. Конъюгаты экзотоксина А синегнойной палочки и барназы с дарпинами были применены в модели мышей с карциномой молочной железы: здесь монотерапия анти-**HER2** или анти-ЕрСАМ оказалась неэффективной, в отличие от одновременного действия против **HER2** и ЕрСАМ [99]. Похожие примеры сильного усиления действия ССБ на опухолевые клетки можно найти и в других работах [100, 101].

Онколитические вирусы (ОВ). Очевидным применением для ССБ может быть нацеливание ОВ. Ясно, что ССБ с гораздо большей лёгкостью, чем антитело, можно ввести в поверхность капсида ОВ. В самом деле, опубликованные результаты оптимистичны, например, получен вакцинный вирус кори MeV, в котором вирусный белок адгезии слит с дарпином против **EGFR** таким образом, чтобы при связывании происходила активация опухолевыми матриксными металлопротеазами. Такой ОВ с двойной мишенью реплицировался в опухолевых клетках **EGFR⁺/MMP⁺**, но был безопасен для здоровых клеток (**EGFR⁺** кератиноциты человека). Такой вирус уничтожал клетки глиобластомы и другие опухолевые клетки [102]. Аналогично были использованы и кноттины, например, СКР (связывающий интегрин $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$ и $\alpha 5\beta 1$ с наномолярной аффинностью). В данном случае ОВ, называемый MV-СКРint, инфицировал клетки глиобластомы человека, реплицировался в них и затем убивал эти клетки, а также клетки медуллобластомы, диффузной внутренней глиомы моста и меланомы *in vitro*. При внутривенной доставке такой вирус лучше достигал клеток глиобластомы, вызывая цитопатические эффекты, сходные с таковыми при внутриопухолевой инъекции вируса [103].

Доставку репликативно-дефицитных вирусов типа аденоассоциированных вирусов (ААВ) для векторной генетической терапии рака также можно успешно усилить ССБ, например, путём экспонирования HER2-специфического дарпина на поверхности ААВ [104].

Клеточная терапия. Аналогично ССБ могут быть применены и для усиления клеточной противоопухолевой терапии, например, в методе CAR-T [105]. Здесь отдельно надо отметить недавний успех большого коллектива преимущественно российских авторов, улучшивших CAR-T за счёт высокой аффинности пары «бактериальный токсин–антитоксин» барназа–барстар, где для направления CAR-T-клеток к солидным опухолям и для уничтожения карциномы HER2⁺ *in vivo* использовали конъюгаты дарпин–барназа [106].

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ ПРОТИВ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ОНКОМИШЕНЕЙ

Ингибиторы взаимодействий с MDM2. Продукт гена *Trp53* является одним из важнейших онкосупрессоров человека, подавляющим бесконтрольное деление раковых клеток [107]. В опухолях p53 часто мутирован или разрушается на белковом уровне за счёт действия убиквитинлигазы MDM2, которая, в свою очередь, также подвергается посттрансляционным изменениям [108]. Несмотря на тот факт, что был синтезирован целый ряд низкомолекулярных ингибиторов взаимодействия между p53 и MDM2 [109, 110], ни одно из клинических испытаний этих ингибиторов не увенчалось успехом. Было также создано достаточно много аффинных инструментов, например, монотела против *N*-концевого домена MDM2/X и против α -спирали, присутствующей в *N*-концевом трансактивационном домене p53 [111], которые показали хорошую активность *in vitro*, но не оправдали надежд на аналогичный эффект в клинических испытаниях.

Атака на KRAS. GTPазы семейства Ras, в особенности KRAS, часто мутированы во многих раках. В частности, KRAS-клетки протоковой аденокарциномы поджелудочной железы в более чем половине случаев содержат мутации G12D, G12C, G12R или G12V. Эти ферменты содержат карман, который способен связывать GTP и GDP с пикомолярным сродством, запуская внутриклеточные сигнальные пути, которые усиливают пролиферацию клеток. Поскольку GTP и GDP присутствуют в клетке в миллимолярных концентрациях, то любая

конкуренция со стороны экзогенных низкомолекулярных ингибиторов чрезвычайно затруднена. Остальная часть поверхности белка Ras относительно плоская и, следовательно, не имеет карманов, подходящих для высокоаффинного взаимодействия с малыми молекулами.

Было обнаружено, что монотело NS1 аллостерически ингибирует RAS-опосредованную сигнализацию. Удивительно, но NS1 связывается с поверхностью, отличающейся от таковых для других эффекторных молекул, связывающихся с RAS. NS1 делает это таким образом, что взаимодействие между RAS и киназой Raf не нарушается, но ингибирует димеризацию RAS, что далее ингибирует димеризацию уже Raf, что в конечном итоге приводит к ингибированию Ras-опосредованной сигнализации в целом [112]. Монотела против мутанта KRAS G12V впервые описаны под названием «RasIns» (или *интратела*). Эти монотела селективны для активного состояния Ras. В то же время эти фибронектины связывают как H-, так и K-Ras-GTP мутанты [67]. В случае этого монотела продукция в *E. coli* была успешной. Недавние успехи в разработке монотел против мутантов KRAS довольно значительны, например, монотело I2VC1 (рис. 3) распознаёт активное состояние KRAS с мутациями G12V и G12C [113]; монотело R15 реагирует со всеми изоформами апо-Ras (то есть в свободной от GTP или GDP конформации), но *in vivo* лучше всего работает против KRAS (G15C) [114]; интересны также перспективы ещё одного пан-Ras монотела JAM20, реагирующего с Ras вне зависимости от их связывания с GTP/GDP [115].

Дарпин K27 связывается преимущественно с неактивной формой Ras-GDP с $K_d = 4$ нМ. Внутриклеточная экспрессия K27 значительно снижает активность Ras, ингибирует нисходящую сигнализацию, в частности, уровень фосфорилированного ERK, и замедляет рост в мягком агаре клеток HCT116 [116]. Дарпины, которые специфически ингибируют изоформу KRAS путём связывания с аллостерическим сайтом, охватывающим область вокруг специфического для KRAS остатка гистидина-95, специфически ингибируют взаимодействие KRAS/эффектора и зависимые сигнальные пути в раковых клетках [117].

Ras-Связывающие минипротеины связываются с эффекторным доменом Ras в виде димеров, а точечный мутант Ras стабилизируют в открытой конформации, захваченной этими минибелками. Такой минипротеин aPP содержит *N*-концевую полипролиновую спи-

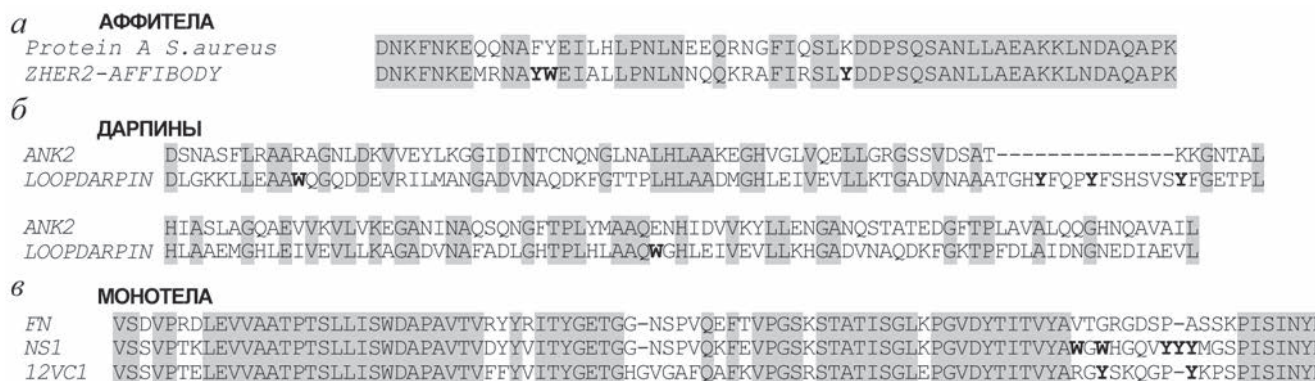


Рис. 3. Аминокислотные последовательности некоторых ССБ, выравненные со своими предшественниками. Серым выделены идентичные а.о. Уникальные остатки тирозина и триптофана в ССБ выделены жирным шрифтом. а – Аффитела: выравнивание последовательности аффитела против HER2 с участком последовательности белка А *S. aureus*; б – дарпины: выравнивание дарпина типа loopdarpin с участком последовательности анкирина человека (ANK2); в – выравнивание монотел (NS1 против Ras и 12VC1 против KRAS с мутацией G12V) с участком последовательности фибронектина человека (FN)

раль типа II, соединённую короткой петлёй с С-концевой α -спиралью, которую он стабилизирует за счёт гидрофобных взаимодействий. Он успешно экспрессируется в *E. coli* [118].

Созданы также конформационно-селективные ССБ для мутантного KRAS на основе репетела, которые эффективно блокируют взаимодействие между активным KRAS и RAS-связывающим доменом BRAF, подавляя KRAS-опосредованную передачу сигнала [119].

Идея принудительной деградации внутриклеточных мишеней связующими элементами оказалась весьма плодотворной. Например, монотела могут быть использованы для деградации белковой мишени путём селективной доставки сигнала деградации к эндогенному белку внутри клетки при конъюгации или слиянии с E3-убиквитинлигазами (схема показана на рис. 4). Наиболее популярными лигазами являются MDM2 или онкопротеин-супрессор VHL (Von-Hippel-Lindau), однако возможности для разработок гораздо шире, поскольку в клетке человека имеется около 600 различных E3-лигаз. Кажется, что среди всех ССБ оптимальным является использование именно слитых с E3-лигазами монотел [120, 121]. Проблема доставки может быть решена многими способами. В качестве примера можно упомянуть химерный бактериальный токсин, состоящий из субъединицы гомолога шигатоксина В (Stx2B) и транслокационного домена экзотоксина А (ETA-II) *P. aeruginosa*, слитого с VHL и монотелом против эндогенных тирозинкиназ [120].

Синтетические связывающие белки в качестве трансгенов онколитических вирусов. Экспрессия трансгена липокалина-2 может значительно усилить действие онколитических

аденовирусов в некоторых моделях опухолей, таких как аденокарцинома поджелудочной железы и клеточные линии колоректального рака [59, 60]. Очевидно, что ОБ следует вооружать последовательностями, которые кодируют белки слияния MDM2, VHL или другие убиквитинлигазы с монотелами против мутантов KRAS и других онкомишеней.

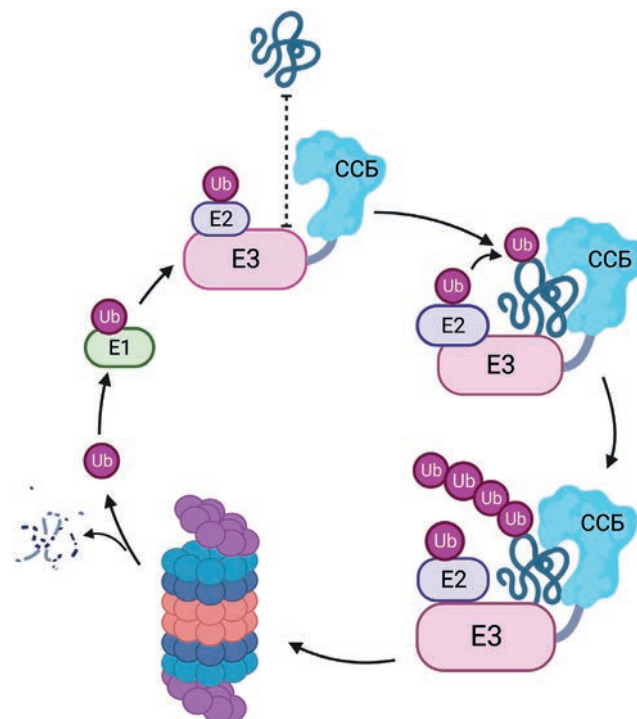


Рис. 4. Разрушение внутриклеточных мишеней при помощи слитых с E3-убиквитинлигазами ССБ. После связывания ССБ со своей мишенью активность убиквитинлигаз способствует полиубиквитинилированию мишени с последующим разрушением протеасомой. Использован ресурс biorender.com

НОВЫЕ ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ СИНТЕТИЧЕСКИХ СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Модульный подход в разработках ССБ чрезвычайно продуктивен. В случае мини-протеинов возможен твердофазный пептидный синтез, а значит, и чрезвычайно широкий спектр модификаций, включая новые кросс-сшивки, структура которых может играть особую роль. Чрезвычайно успешным примером является димеризация кноттина (33-аминокислотный полипептид из ингибитора трипсина *Ecballium elaterium*, который связывается с интегринами $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$ и $\alpha 5\beta 1$) [122]: его димер помогает увеличить чувствительность клеток рака поджелудочной железы к гемцитабину.

Лигирование белков к настоящему моменту весьма многообразно, и лучше всего обратиться к обзору, в котором обсуждаются достоинства и недостатки различных подходов: взаимодействие докерин-кохезин, система специфической транслугтаминазной реакции SpyTag-SpyCatcher, опосредованное сортирование лигирование и другие методы [123], образование альдегидных групп на поверхности белка ферментом, генерирующим формилглицин [124]. Но важно заметить, что использование кросс-сшивок следует расширять в связи, например, с открытием существования лизин-цистеиновых мостиков, чувствительных к окислительно-восстановительному потенциалу (мостики NOS и сера-кислород-азот-кислород-сера (SONOS)) [125]

Каталитические синтетические связывающие белки. Здесь следует вспомнить каталитические антитела, особенно с протеазной активностью — они могли бы не только связывать, но и разрушать свои мишени вне зависимости от протеасомы. Более того, такие ССБ должны бы быть чрезвычайно сайт-специфичными, индивидуальными и, таким образом, превосходить любые обычные протеазы. До сих пор успехи в разработке протеолитических антител были довольно скромными, поскольку в энзиматическом смысле каталитические антитела демонстрируют хорошую K_m , но довольно слабую V_{max} . Однако следует отметить, что эта ситуация может быть улучшена в будущем, и лучшими кандидатами представляются скорее не антитела, а неиммуноглобулиновые ССБ, поскольку некоторые из них не обладают вышеупомянутой жёсткостью скаффолда. Это направление в целом продолжает развиваться и на нанотелах, например,

с использованием L-аспарагиназы — амидогидролазы, которая успешно используется для лечения острого лимфобластного лейкоза уже более 50 лет. В данном случае полная замена скаффолда позволила минимизировать L-аспарагиназу, которая успешно воздействует на клетки, экспрессирующие CD19 [126].

Неканонические аминокислотные остатки в синтетических связывающих белках. Совершенно очевидно, что вариабельность связывающих карманов в иммуноглобулинах или альтернативных ССБ находится на грани предела из-за химических ограничений, хотя в модельной системе квазиспецифическое связывание может быть достигнуто и с помощью четвертичного [127, 128] или даже бинарного кода в участках, определяющих комплементарность (complementarity-determining regions, CDR) антител, например, всего с двумя аминокислотными остатками, а именно тирозином и серином типа YXS [129]. Надо отметить высокое содержание тирозина (на рис. 3 это видно для аффитела и монотела, но не дарпина) во многих из этих связывающих последовательностей [127], способствующих высокой аффинности, но разумно предположить, что появление олиготирозиновых участков может снизить специфичность антитела или ССБ к своей мишени. Также замечено, что неспецифические аутореактивные антитела богаты остатками аргинина и лизина [128], а для pH-чувствительных антител характерно обогащение остатками гистидина [130]. Очевидно из общих соображений и показано экспериментально, что 20-аминокислотные библиотеки намного превосходят 4-аминокислотные [131], соответственно, дальнейшее увеличение разнообразия также должно способствовать улучшению свойств ССБ, и можно задаться вопросом о том, как долго следует ограничиваться стандартным генетическим кодом со скудным набором всего лишь из 20 основных аминокислот? Безусловно, следует воспользоваться новыми захватывающими возможностями, которые стали доступны благодаря недавнему прогрессу в рибосомном синтезе белка с неканоническими остатками. Химическая (в том числе катализируемая ферментами) модификация карманов связывания также возможна, но она обычно проблематична с точки зрения желаемого (близкого к 100%) выхода и специфичности. Логично использовать расширенный диапазон химической функциональности — неканонические аминокислоты вблизи CDR, где их встраивание достаточно хорошо переносится: недавно было показано, что существует возможность интеграции дрож-

жевого скрининга и неканонических аминокислот при поиске белков с «химически расширенными» функциями [124].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В макроскопическом мире весьма трудно создать, например, специфические крючки для каждого отдельного вида рыб, варьируя их конструкцию в соответствии с особенностями ротовой полости. Тем более удивительно, насколько грандиозны успехи в создании всевозможных аффинных реагентов как на основе удачных изобретений природы, так и на основе различных подходов, смело предпринятых человеком и открывающих принципиально новые технологии. Также очевидна и важность продолжения изучения таких давно известных белков, как иммуноглобулины. Это наглядно показало недавнее открытие необычной структуры в CDR бычьего иммуноглобулина [132] – грибоподобного удлинения, что может быть полезно и для разработки ССБ на основе неиммуноглобулиновых скаффолдов путём внедрения ультрадлинных петель по аналогии с давней

попыткой разработки так называемых луп-дарпинов [133].

Вклад авторов. Н.А. Барлев – концепция обзора и редактирование текста; Т.И. Дэвид, Н.Б. Пестов, Т.В. Корнеев – написание текста и создание иллюстраций.

Финансирование. Работа выполнена в рамках проекта по созданию и развитию научных центров мирового уровня «Цифровой дизайн и персонализированное здравоохранение» при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение № 075-15-2022-305).

Благодарности. Авторы благодарны Ю.М. Розенбергу за вдумчивое прочтение черновой рукописи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания проведённых авторами исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте издательства Springer (www.springer.com/journal/10541), том 88, вып. 9, 2023.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Weidle, U. H., Auer, J., Brinkmann, U., Georges, G., and Tiefenthaler, G. (2013) The emerging role of new protein scaffold-based agents for treatment of cancer, *Cancer Genomics Proteomics*, **10**, 155-168.
- Rabia, L. A., Desai, A. A., Jhaji, H. S., and Tessier, P. M. (2018) Understanding and overcoming trade-offs between antibody affinity, specificity, stability and solubility, *Biochem. Eng. J.*, **137**, 365-374, doi: 10.1016/j.bej.2018.06.003.
- Cunningham, O., Scott, M., Zhou, Z. S., and Finlay, W. J. J. (2021) Polyreactivity and polyspecificity in therapeutic antibody development: risk factors for failure in preclinical and clinical development campaigns, *MAbs*, **13**, 1999195, doi: 10.1080/19420862.2021.1999195.
- Van Regenmortel, M. H. V. (2014) Specificity, polyspecificity, and heterospecificity of antibody-antigen recognition, *J. Mol. Recognit.*, **27**, 627-639, doi: 10.1002/jmr.2394.
- Пестов Н. Б., Гусакова Т. В., Костина М. Б., Шапаронов М. И. (1996) Фаговые мимотопы моноклональных антител к Ca²⁺-АТФ-азе плазматических мембран, *Биоорг. Хим.*, **22**, 664.
- Rabia, L. A., Zhang, Y., Ludwig, S. D., Julian, M. C., and Tessier, P. M. (2018) Net charge of antibody complementarity-determining regions is a key predictor of specificity, *Protein Eng. Des. Sel.*, **31**, 409-418, doi: 10.1093/protein/gzz002.
- Gebauer, M., and Skerra, A. (2020) Engineered protein scaffolds as next-generation therapeutics, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **60**, 391-415, doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010818-021118.
- Aguilar, G., Viganò, M. A., Affolter, M., and Matsuda, S. (2019) Reflections on the use of protein binders to study protein function in developmental biology, *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.*, **8**, e356, doi: 10.1002/wdev.356.
- Jenkins, T. P., Fryer, T., Dehli, R. I., Jürgensen, J. A., Fuglsang-Madsen, A., et al. (2019) Toxin neutralization using alternative binding proteins, *Toxins (Basel)*, **11**, E53, doi: 10.3390/toxins11010053.
- Olaleye, O., Govorukhina, N., van de Merbel, N. C., and Bischoff, R. (2021) Non-antibody-based binders for the enrichment of proteins for analysis by mass spectrometry, *Biomolecules*, **11**, 1791, doi: 10.3390/biom11121791.
- Bondos, S. E., Dunker, A. K., and Uversky, V. N. (2022) Intrinsically disordered proteins play diverse roles in cell signaling, *Cell Commun. Signal.*, **20**, 20, doi: 10.1186/s12964-022-00821-7.
- Karlsson, O. A., Ramirez, J., Öberg, D., Malmqvist, T., Engström, Å., et al. (2015) Design of a PDZbody, a bi-

- valent binder of the E6 protein from human papilloma-virus, *Sci. Rep.*, **5**, 9382, doi: 10.1038/srep09382.
13. Sha, F., Salzman, G., Gupta, A., and Koide, S. (2017) Monobodies and other synthetic binding proteins for expanding protein science, *Protein Sci.*, **26**, 910-924, doi: 10.1002/pro.3148.
 14. Hantschel, O., Biancalana, M., and Koide, S. (2020) Monobodies as enabling tools for structural and mechanistic biology, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **60**, 167-174, doi: 10.1016/j.sbi.2020.01.015.
 15. McConnell, S. J., and Hoess, R. H. (1995) Tendamistat as a scaffold for conformationally constrained phage peptide libraries, *J. Mol. Biol.*, **250**, 460-470, doi: 10.1006/jmbi.1995.0390.
 16. Ciesiołkiewicz, A., Lizandra Perez, J., and Berlicki, Ł. (2022) Miniproteins in medicinal chemistry, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **71**, 128806, doi: 10.1016/j.bmcl.2022.128806.
 17. Kolmar, H. (2008) Alternative binding proteins: biological activity and therapeutic potential of cystine-knot miniproteins, *FEBS J.*, **275**, 2684-2690, doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06440.x.
 18. Silverman, J., Liu, Q., Bakker, A., To, W., Duguay, A., et al. (2005) Multivalent avimer proteins evolved by exon shuffling of a family of human receptor domains, *Nat. Biotechnol.*, **23**, 1556-1561, doi: 10.1038/nbt1166.
 19. Tiede, C., Tang, A. A. S., Deacon, S. E., Mandal, U., Nettleship, J. E., et al. (2014) Adhiron: a stable and versatile peptide display scaffold for molecular recognition applications, *Protein Eng. Des. Sel.*, **27**, 145-155, doi: 10.1093/protein/gzu007.
 20. Tiede, C., Bedford, R., Heseltine, S. J., Smith, G., Wijetunga, I., et al. (2017) Affimer proteins are versatile and renewable affinity reagents, *Elife*, **6**, e24903, doi: 10.7554/eLife.24903.
 21. Shamsuddin, S. H., Jayne, D. G., Tomlinson, D. C., McPherson, M. J., and Millner, P. A. (2021) Selection and characterisation of Affimers specific for CEA recognition, *Sci. Rep.*, **11**, 744, doi: 10.1038/s41598-020-80354-6.
 22. Wicke, N., Bedford, M. R., and Howarth, M. (2021) Gastrobodies are engineered antibody mimetics resilient to pepsin and hydrochloric acid, *Commun. Biol.*, **4**, 960, doi: 10.1038/s42003-021-02487-2.
 23. Zoller, F., Markert, A., Barthe, P., Zhao, W., Weichert, W., et al. (2012) Combination of phage display and molecular grafting generates highly specific tumor-targeting miniproteins, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **51**, 13136-13139, doi: 10.1002/anie.201203857.
 24. Cohen, I., Kayode, O., Hockla, A., Sankaran, B., Radisky, D. C., et al. (2016) Combinatorial protein engineering of proteolytically resistant mesotrypsin inhibitors as candidates for cancer therapy, *Biochem. J.*, **473**, 1329-1341, doi: 10.1042/BJ20151410.
 25. Sananes, A., Cohen, I., Shahar, A., Hockla, A., De Vita, E., et al. (2018) A potent, proteolysis-resistant inhibitor of kallikrein-related peptidase 6 (KLK6) for cancer therapy, developed by combinatorial engineering, *J. Biol. Chem.*, **293**, 12663-12680, doi: 10.1074/jbc.RA117.000871.
 26. Nishimiya, D., Kawaguchi, Y., Kodama, S., Nasu, H., Yano, H., et al. (2019) A protein scaffold, engineered SPINK2, for generation of inhibitors with high affinity and specificity against target proteases, *Sci. Rep.*, **9**, 11436, doi: 10.1038/s41598-019-47615-5.
 27. Jia, Z., Liu, Y., Ji, X., Zheng, Y., Li, Z., et al. (2021) DAKS1, a Kunitz scaffold peptide from the venom gland of *Deinagkistrodon acutus* prevents carotid-artery and middle-cerebral-artery thrombosis via targeting factor Xia, *Pharmaceuticals (Basel)*, **14**, 966, doi: 10.3390/ph14100966.
 28. Lee, S.-C., Park, K., Han, J., Lee, J., Kim, H. J., et al. (2012) Design of a binding scaffold based on variable lymphocyte receptors of jawless vertebrates by module engineering, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 3299-3304, doi: 10.1073/pnas.1113193109.
 29. Hwang, D.-E., Ryou, J.-H., Oh, J. R., Han, J. W., Park, T. K., and Kim, H.-S. (2016) Anti-human VEGF rebody effectively suppresses choroidal neovascularization and vascular leakage, *PLoS One*, **11**, e0152522, doi: 10.1371/journal.pone.0152522.
 30. Liu, H., Huang, H., Voss, C., Kaneko, T., Qin, W. T., et al. (2019) Surface loops in a single SH2 domain are capable of encoding the spectrum of specificity of the SH2 family, *Mol. Cell. Proteomics*, **18**, 372-382, doi: 10.1074/mcp.RA118.001123.
 31. Schlatter, D., Brack, S., Banner, D. W., Batey, S., Benz, J., et al. (2012) Generation, characterization and structural data of chymase binding proteins based on the human Fyn kinase SH3 domain, *MAbs*, **4**, 497-508, doi: 10.4161/mabs.20452.
 32. Garlich, J., Cinier, M., Chevrel, A., Perrocheau, A., Eyerman, D. J., et al. (2022) Discovery of APL-1030, a novel, high-affinity nanofitin inhibitor of C3-mediated complement activation, *Biomolecules*, **12**, 432, doi: 10.3390/biom12030432.
 33. Gocha, T., Rao, B. M., and DasGupta, R. (2017) Identification and characterization of a novel Sso7d scaffold-based binder against Notch1, *Sci. Rep.*, **7**, 12021, doi: 10.1038/s41598-017-12246-1.
 34. Kalichuk, V., Renodon-Cornière, A., Béhar, G., Carrión, F., Obal, G., Maillason, M., et al. (2018) A novel, smaller scaffold for Affitins: showcase with binders specific for EpCAM, *Biotechnol. Bioeng.*, **115**, 290-299, doi: 10.1002/bit.26463.
 35. Steemson, J. D., Baake, M., Rakonjac, J., Arcus, V. L., and Liddament, M. T. (2014) Tracking molecular recognition at the atomic level with a new protein scaffold based on the OB-fold, *PLoS One*, **9**, e86050, doi: 10.1371/journal.pone.0086050.
 36. Napolitano, E. W., Villar, H. O., Kauvar, L. M., Higgins, D. L., Roberts, D., et al. (1996) Glubodies: randomized libraries of glutathione transferase

- enzymes, *Chem. Biol.*, **3**, 359-367, doi: 10.1016/s1074-5521(96)90119-2.
37. Lorey, S., Fiedler, E., Kunert, A., Nerkamp, J., Lange, C., et al. (2014) Novel ubiquitin-derived high affinity binding proteins with tumor targeting properties, *J. Biol. Chem.*, **289**, 8493-8507, doi: 10.1074/jbc.M113.519884.
 38. Pham, P. N., Huličiak, M., Biedermannová, L., Černý, J., Charnavets, T., et al. (2021) Protein Binder (ProBi) as a new class of structurally robust non-antibody protein scaffold for directed evolution, *Viruses*, **13**, 190, doi: 10.3390/v13020190.
 39. Pan, X., Thompson, M. C., Zhang, Y., Liu, L., Fraser, J. S., et al. (2020) Expanding the space of protein geometries by computational design of *de novo* fold families, *Science*, **369**, 1132-1136, doi: 10.1126/science.abc0881.
 40. Desmet, J., Verstraete, K., Bloch, Y., Lorent, E., Wen, Y., et al. (2014) Structural basis of IL-23 antagonism by an Alphabody protein scaffold, *Nat. Commun.*, **5**, 5237, doi: 10.1038/ncomms6237.
 41. Koide, A., Bailey, C. W., Huang, X., and Koide, S. (1998) The fibronectin type III domain as a scaffold for novel binding proteins, *J. Mol. Biol.*, **284**, 1141-1151, doi: 10.1006/jmbi.1998.2238.
 42. Lipovsek, D. (2011) Adnectins: engineered target-binding protein therapeutics, *Protein Eng. Des. Sel.*, **24**, 3-9, doi: 10.1093/protein/gzq097.
 43. Sullivan, M. A., Brooks, L. R., Weidenborner, P., Domm, W., Mattiaccio, J., et al. (2013) Anti-idiotypic monobodies derived from a fibronectin scaffold, *Biochemistry*, **52**, 1802-1813, doi: 10.1021/bi3016668.
 44. Chandler, P. G., and Buckle, A. M. (2020) Development and differentiation in monobodies based on the fibronectin type 3 domain, *Cells*, **9**, E610, doi: 10.3390/cells9030610.
 45. Akkapeddi, P., Teng, K. W., and Koide, S. (2021) Monobodies as tool biologics for accelerating target validation and druggable site discovery, *RSC Med. Chem.*, **12**, 1839-1853, doi: 10.1039/d1md00188d.
 46. Batori, V., Koide, A., and Koide, S. (2002) Exploring the potential of the monobody scaffold: effects of loop elongation on the stability of a fibronectin type III domain, *Protein Eng.*, **15**, 1015-1020, doi: 10.1093/protein/15.12.1015.
 47. Kükenshöner, T., Schmit, N. E., Bouda, E., Sha, F., Pojer, F., et al. (2017) Selective targeting of SH2 domain-phosphotyrosine interactions of Src family tyrosine kinases with monobodies, *J. Mol. Biol.*, **429**, 1364-1380, doi: 10.1016/j.jmb.2017.03.023.
 48. Gross, G. G., Junge, J. A., Mora, R. J., Kwon, H.-B., Olson, C. A., et al. (2013) Recombinant probes for visualizing endogenous synaptic proteins in living neurons, *Neuron*, **78**, 971-985, doi: 10.1016/j.neuron.2013.04.017.
 49. Porebski, B. T., Conroy, P. J., Drinkwater, N., Schofield, P., Vazquez-Lombardi, R., et al. (2016) Circumventing the stability-function trade-off in an engineered FN3 domain, *Protein Eng. Des. Sel.*, **29**, 541-550, doi: 10.1093/protein/gzw046.
 50. Porebski, B. T., Nickson, A. A., Hoke, D. E., Hunter, M. R., Zhu, L., et al. (2015) Structural and dynamic properties that govern the stability of an engineered fibronectin type III domain, *Protein Eng. Des. Sel.*, **28**, 67-78, doi: 10.1093/protein/gzv002.
 51. Chandler, P. G., Tan, L. L., Porebski, B. T., Green, J. S., Riley, B. T., et al. (2021) Mutational and biophysical robustness in a prestabilized monobody, *J. Biol. Chem.*, **296**, 100447, doi: 10.1016/j.jbc.2021.100447.
 52. Deuschle, F.-C., Ilyukhina, E., and Skerra, A. (2021) Anticalin® proteins: from bench to bedside, *Expert Opin. Biol. Ther.*, **21**, 509-518, doi: 10.1080/14712598.2021.1839046.
 53. Achatz, S., Jarasch, A., and Skerra, A. (2022) Structural plasticity in the loop region of engineered lipocalins with novel ligand specificities, so-called Anticalins, *J. Struct. Biol.*, **6**, 100054, doi: 10.1016/j.jsbx.2021.100054.
 54. Gebauer, M., Schiefner, A., Matschiner, G., and Skerra, A. (2013) Combinatorial design of an anticalin directed against the extra-domain B for the specific targeting of oncofetal fibronectin, *J. Mol. Biol.*, **425**, 780-802, doi: 10.1016/j.jmb.2012.12.004.
 55. Chi, Y., Remsik, J., Kiseliovas, V., Derderian, C., Sener, U., et al. (2020) Cancer cells deploy lipocalin-2 to collect limiting iron in leptomeningeal metastasis, *Science*, **369**, 276-282, doi: 10.1126/science.aaz2193.
 56. Yang, J., Bielenberg, D. R., Rodig, S. J., Doiron, R., Clifton, M. C., et al. (2009) Lipocalin 2 promotes breast cancer progression, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 3913-3918, doi: 10.1073/pnas.0810617106.
 57. Chakraborty, S., Kaur, S., Guha, S., and Batra, S. K. (2012) The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer, *Biochim. Biophys. Acta*, **1826**, 129-169, doi: 10.1016/j.bbcan.2012.03.008.
 58. Crescenzi, E., Leonardi, A., and Pacifico, F. (2021) NGAL as a potential target in tumor microenvironment, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 12333, doi: 10.3390/ijms222212333.
 59. Xu, B., Zheng, W., Jin, D., Wang, D., Liu, X., and Qin, X. (2012) Treatment of pancreatic cancer using an oncolytic virus harboring the lipocalin-2 gene, *Cancer*, **118**, 5217-5226, doi: 10.1002/cncr.27535.
 60. Xu, B., Zheng, W.-Y., Feng, J.-F., Huang, X.-Y., and Ge, H. (2013) One potential oncolytic adenovirus expressing Lipocalin-2 for colorectal cancer therapy, *Cancer Biother. Radiopharm.*, **28**, 415-422, doi: 10.1089/cbr.2012.1352.
 61. Nishimura, S., Yamamoto, Y., Sugimoto, A., Kushiya, S., Togano, S., et al. (2022) Lipocalin-2 negatively regulates epithelial-mesenchymal transition through matrix metalloproteinase-2 downregulation in gastric cancer, *Gastric Cancer*, **25**, 850-861, doi: 10.1007/s10120-022-01305-w.

62. Pinyopornpanish, K., Phrommintikul, A., Angkurawaranon, C., Kumfu, S., Angkurawaranon, S., et al. (2022) Circulating Lipocalin-2 level is positively associated with cognitive impairment in patients with metabolic syndrome, *Sci. Rep.*, **12**, 4635, doi: 10.1038/s41598-022-08286-x.
63. Friedman, M., Lindström, S., Ekerljung, L., Andersson-Svahn, H., Carlsson, J., et al. (2009) Engineering and characterization of a bispecific HER2 x EGFR-binding affibody molecule, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **54**, 121-131, doi: 10.1042/BA20090096.
64. Gorman, K., McGinnis, J., and Kay, B. (2018) Generating FN3-based affinity reagents through phage display, *Curr. Protoc. Chem. Biol.*, **10**, e39, doi: 10.1002/cpch.39.
65. Давыдова Е. К. (2022) Белковая инженерия: достижения фагового дисплея в науке и медицине, *Усп. Биол. Хим.*, **62**, 319.
66. Zhang, Y., Thangam, R., You, S.-H., Sultonova, R. D., Venu, A., et al. (2021) Engineering calreticulin-targeting monoclonal antibodies to detect immunogenic cell death in cancer chemotherapy, *Cancers (Basel)*, **13**, 2801, doi: 10.3390/cancers13112801.
67. Cetin, M., Evenson, W. E., Gross, G. G., Jalali-Yazdi, F., Krieger, D., et al. (2017) RasIns: genetically encoded intrabodies of activated Ras proteins, *J. Mol. Biol.*, **429**, 562-573, doi: 10.1016/j.jmb.2016.11.008.
68. Olson, C. A., and Roberts, R. W. (2007) Design, expression, and stability of a diverse protein library based on the human fibronectin type III domain, *Protein Sci.*, **16**, 476-484, doi: 10.1110/ps.062498407
69. Храмов Ю. В., Уласов А. В., Лупанова Т. Н., Георгиев Г. П., Соболев А. С. (2022) Доставка антителоподобных молекул, монободии, способных связываться с нуклеокапсидным белком вируса SARS-COV-2, в клетки-мишени, *Докл. РАН. Науки Жизни*, **506**, 68, doi: 10.31857/S2686738922050146.
70. Lipovsek, D., Lippow, S. M., Hackel, B. J., Gregson, M. W., Cheng, P., et al. (2007) Evolution of an interloop disulfide bond in high-affinity antibody mimics based on fibronectin type III domain and selected by yeast surface display: molecular convergence with single-domain camelid and shark antibodies, *J. Mol. Biol.*, **368**, 1024-1041, doi: 10.1016/j.jmb.2007.02.029.
71. Riihimäki, T. A., Hiltunen, S., Rangl, M., Nordlund, H. R., Määttä, J. A. E., et al. (2011) Modification of the loops in the ligand-binding site turns avidin into a steroid-binding protein, *BMC Biotechnol.*, **11**, 64, doi: 10.1186/1472-6750-11-64.
72. Hytönen, V. P. (2020) (Strept)avidin as a template for ligands other than biotin: An overview, *Methods Enzymol.*, **633**, 21-28, doi: 10.1016/bs.mie.2019.10.029.
73. Kiss, C., Fisher, H., Pesavento, E., Dai, M., Valero, R., et al. (2006) Antibody binding loop insertions as diversity elements, *Nucleic Acids Res.*, **34**, e132, doi: 10.1093/nar/gkl681.
74. Kadonosono, T., Yabe, E., Furuta, T., Yamano, A., Tsubaki, T., et al. (2014) A fluorescent protein scaffold for presenting structurally constrained peptides provides an effective screening system to identify high affinity target-binding peptides, *PLoS One*, **9**, e103397, doi: 10.1371/journal.pone.0103397.
75. Chee, S. M. Q., Wongsantichon, J., Yi, L. S., Sana, B., Frosi, Y., et al. (2021) Functional display of bioactive peptides on the vGFP scaffold, *Sci. Rep.*, **11**, 10127, doi: 10.1038/s41598-021-89421-y.
76. Rinne, S. S., Yin, W., Borrás, A. M., Abouzayed, A., Leitao, C. D., et al. (2022) Targeting tumor cells overexpressing the human epidermal growth factor receptor 3 with potent drug conjugates based on affibody molecules, *Biomedicines*, **10**, 1293, doi: 10.3390/biomedicines10061293.
77. Sokolova, E., Kutova, O., Grishina, A., Pospelov, A., Guryev, E., et al. (2019) Penetration efficiency of antitumor agents in ovarian cancer spheroids: the case of recombinant targeted toxin DARPIn-LoPE and the chemotherapy drug, doxorubicin, *Pharmaceutics*, **11**, 219, doi: 10.3390/pharmaceutics11050219.
78. Sachdev, S., Cabaltega, C. C., and Cheloha, R. W. (2021) Strategies for targeting cell surface proteins using multivalent conjugates and chemical biology, *Methods Cell Biol.*, **166**, 205-222, doi: 10.1016/bs.mcb.2021.06.004.
79. Шипунова В. О., Деев С. М. (2022) Распознающие скаффолдовые полипептиды как инструмент для адресной доставки наноструктур *in vitro* и *in vivo*, *Acta Naturae*, **14**, 54, doi: 10.32607/actanaturae.11545.
80. Deyev, S., Proshkina, G., Baryshnikova, O., Ryabova, A., Avishai, G., et al. (2018) Selective staining and eradication of cancer cells by protein-carrying DARPIn-functionalized liposomes, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **130**, 296-305, doi: 10.1016/j.ejpb.2018.06.026.
81. Nazari, M., Emamzadeh, R., Jahanpanah, M., Yazdani, E., and Radmanesh, R. (2022) A recombinant affitoxin derived from a HER3 affibody and diphtheria-toxin has potent and selective antitumor activity, *Int. J. Biol. Macromol.*, **219**, 1122-1134, doi: 10.1016/j.jbiomac.2022.08.150.
82. Lipovšek, D., Carvajal, I., Allentoff, A. J., Barros, A., Brailsford, J., et al. (2018) Adnectin-drug conjugates for Glypican-3-specific delivery of a cytotoxic payload to tumors, *Protein Eng. Des. Sel.*, **31**, 159-171, doi: 10.1093/protein/gzy013.
83. Karsten, L., Janson, N., Le Joncour, V., Alam, S., Müller, B., et al. (2022) Bivalent EGFR-targeting DARPIn-MMAE conjugates, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 2468, doi: 10.3390/ijms23052468.
84. Sharma, R., Suman, S. K., and Mukherjee, A. (2022) Antibody-based radiopharmaceuticals as theranostic agents: an overview, *Curr. Med. Chem.*, **29**, 5979, doi: 10.2174/0929867329666220607160559.

85. Luo, R., Liu, H., and Cheng, Z. (2022) Protein scaffolds: antibody alternatives for cancer diagnosis and therapy, *RSC Chem. Biol.*, **3**, 830-847, doi: 10.1039/d2cb00094f.
86. Klont, F., Hadderingh, M., Horvatovich, P., Ten Hacken, N. H. T., and Bischoff, R. (2018) Affimers as an alternative to antibodies in an affinity LC-MS assay for quantification of the soluble receptor of advanced glycation end-products (sRAGE) in human serum, *J. Proteome Res.*, **17**, 2892-2899, doi: 10.1021/acs.jproteome.8b00414.
87. Mayoral-Peña, K., González Peña, O. I., Orrantia Clark, A. M., Flores-Vallejo, R. D. C., Oza, G., et al. (2022) Biorecognition engineering technologies for cancer diagnosis: a systematic literature review of non-conventional and plausible sensor development methods, *Cancers (Basel)*, **14**, 1867, doi: 10.3390/cancers14081867.
88. Шилова О. Н., Деев С. М. (2019) Дарпины – перспективные адресные белки для тераностики, *Acta Naturae*, **11**, 42, doi: 10.32607/20758251-2019-11-4-42-53.
89. Shipunova, V. O., Kolesnikova, O. A., Kotelnikova, P. A., Soloviev, V. D., Попов, А. А., et al. (2021) Comparative evaluation of engineered polypeptide scaffolds in HER2-targeting magnetic nanocarrier delivery, *ACS Omega*, **6**, 16000, doi: 10.1021/acsomega.1c01811.
90. Mamluk, R., Carvajal, I. M., Morse, B. A., Wong, H., Abramowitz, J., et al. (2010) Anti-tumor effect of CT-322 as an adnectin inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor-2, *MAbs*, **2**, 199-208, doi: 10.4161/mabs.2.2.11304.
91. Tolmachev, V., and Orlova, A. (2020) Affibody molecules as targeting vectors for PET imaging, *Cancers (Basel)*, **12**, E651, doi: 10.3390/cancers12030651.
92. Deyev, S., Vorobyeva, A., Schulga, A., Proshkina, G., Güler, R., et al. (2019) Comparative evaluation of two DARPIn variants: effect of affinity, size, and label on tumor targeting properties, *Mol. Pharm.*, **16**, 995-1008, doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00922.
93. Wang, Y., Ballou, B., Schmidt, B. F., Andreko, S., St Croix, C. M., et al. (2017) Affibody-targeted fluorogen activating protein for *in vivo* tumor imaging, *Chem. Commun. (Camb.)*, **53**, 2001, doi: 10.1039/c6cc09137g.
94. Yun, M., Kim, D.-Y., Lee, J.-J., Kim, H.-S., Kim, H.-S., et al. (2017) A high-affinity rebody for molecular imaging of EGFR-expressing malignant tumors, *Theranostics*, **7**, 2620-2633, doi: 10.7150/thno.18096.
95. Mączyńska, J., Raes, F., Da Pieve, C., Turnock, S., Boulton, J. K. R., et al. (2022) Triggering anti-GBM immune response with EGFR-mediated photodynamic immunotherapy, *BMC Med.*, **20**, 16, doi: 10.1186/s12916-021-02213-z.
96. Lui, B. G., Salomon, N., Wüstehube-Lausch, J., Daneschdar, M., Schmoldt, H.-U., et al. (2020) Targeting the tumor vasculature with engineered cystine-knot miniproteins, *Nat. Commun.*, **11**, 295, doi: 10.1038/s41467-019-13948-y.
97. Балалаева И. В., Крылова Л. В., Карпова М. А., Шульга А. А., Коновалова Е. В. (2023) Синергический эффект комбинированного действия таргетной и фотодинамической терапии в отношении HER2-положительного рака молочной железы, *Докл. РАН. Науки Жизни*, **508**, 48, doi: 10.31857/S268673892270007X.
98. Proshkina, G. M., Shramova, E. I., Shilova, M. V., Zelepukin, I. V., Shipunova, V. O., et al. (2021) DARPIn_9-29-targeted gold nanorods selectively suppress HER2-positive tumor growth in mice, *Cancers (Basel)*, **13**, 5235, doi: 10.3390/cancers1320523.
99. Shramova, E., Proshkina, G., Shipunova, V., Ryabova, A., Kamyshinsky, R., et al. (2020) Dual targeting of cancer cells with DARPIn-based toxins for overcoming tumor escape, *Cancers (Basel)*, **12**, E3014, doi: 10.3390/cancers12103014.
100. Eijkenboom, L., Palacio-Castañeda, V., Groenman, F., Braat, D., Beerendonk, C., et al. (2021) Assessing the use of tumor-specific DARPIn-toxin fusion proteins for *ex vivo* purging of cancer metastases from human ovarian cortex before autotransplantation, *F. S. Sci.*, **2**, 330-344, doi: 10.1016/j.xfss.2021.09.004.
101. Xu, T., Schulga, A., Konovalova, E., Rinne, S. S., Zhang, H., et al. (2023) Feasibility of co-targeting HER3 and EpCAM using seribantumab and DARPIn-toxin fusion in a pancreatic cancer xenograft model, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 2838, doi: 10.3390/ijms24032838.
102. Hanauer, J. R. H., Koch, V., Lauer, U. M., and Mühlebach, M. D. (2019) High-affinity DARPIn allows targeting of MeV to glioblastoma multiforme in combination with protease targeting without loss of potency, *Mol. Ther. Oncolytics*, **15**, 186-200, doi: 10.1016/j.omto.2019.10.004.
103. Lal, S., and Raffel, C. (2017) Using cystine knot proteins as a novel approach to retarget oncolytic measles virus, *Mol. Ther. Oncolytics*, **7**, 57-66, doi: 10.1016/j.omto.2017.09.005.
104. Strecker, M. I., Wlotzka, K., Strassheimer, F., Roller, B., Ludmirski, G., et al. (2022) AAV-mediated gene transfer of a checkpoint inhibitor in combination with HER2-targeted CAR-NK cells as experimental therapy for glioblastoma, *Oncoimmunology*, **11**, 2127508, doi: 10.1080/2162402X.2022.2127508.
105. Zajc, C. U., Salzer, B., Taft, J. M., Reddy, S. T., Lehner, M., and Traxlmayr, M. W. (2021) Driving CARs with alternative navigation tools – the potential of engineered binding scaffolds, *FEBS J.*, **288**, 2103-2118, doi: 10.1111/febs.15523.
106. Stepanov, A. V., Kalinin, R. S., Shipunova, V. O., Zhang, D., Xie, J., et al. (2022) Switchable targeting of solid tumors by BsCAR T cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **119**, e2210562119, doi: 10.1073/pnas.2210562119.

107. Parfenyev, S., Singh, A., Fedorova, O., Daks, A., Kulshreshtha, R., and Barlev, N. A. (2021) Interplay between p53 and non-coding RNAs in the regulation of EMT in breast cancer, *Cell Death Dis.*, **12**, 17, doi: 10.1038/s41419-020-03327-7.
108. Lezina, L., Aksenova, V., Fedorova, O., Malikova, D., Shuvalov, O., Antonov, A. V., et al. (2015) KMT Set7/9 affects genotoxic stress response via the Mdm2 axis, *Oncotarget*, **6**, 25843-25855, doi: 10.18632/oncotarget.4584.
109. Davidovich, P., Aksenova, V., Petrova, V., Tentler, D., Orlova, D., et al. (2015) Discovery of novel isatin-based p53 inducers, *ACS Med. Chem. Lett.*, **6**, 856-860, doi: 10.1021/acsmchemlett.5b00011.
110. Bulatov, E., Sayarova, R., Mingaleeva, R., Miftakhova, R., Gomzikova, M., et al. (2018) Isatin-Schiff base-copper (II) complex induces cell death in p53-positive tumors, *Cell Death Discov.*, **4**, 103, doi: 10.1038/s41420-018-0120-z.
111. Lau, S.-Y., Siau, J. W., Sobota, R. M., Wang, C.-I., Zhong, P., et al. (2018) Synthetic 10FN3-based mono- and bivalent inhibitors of MDM2/X function, *Protein Eng. Des. Sel.*, **31**, 301-312, doi: 10.1093/protein/gzy018.
112. Spencer-Smith, R., Koide, A., Zhou, Y., Eguchi, R. R., Sha, F., et al. (2017) Inhibition of RAS function through targeting an allosteric regulatory site, *Nat. Chem. Biol.*, **13**, 62-68, doi: 10.1038/nchembio.2231.
113. Teng, K. W., Tsai, S. T., Hattori, T., Fedele, C., Koide, A., et al. (2021) Selective and noncovalent targeting of RAS mutants for inhibition and degradation, *Nat. Commun.*, **12**, 2656, doi: 10.1038/s41467-021-22969-5.
114. Khan, I., Koide, A., Zuberi, M., Ketavarapu, G., Denbaum, E., et al. (2022) Identification of the nucleotide-free state as a therapeutic vulnerability for inhibition of selected oncogenic RAS mutants, *Cell Rep.*, **38**, 110322, doi: 10.1016/j.celrep.2022.110322.
115. Wallon, L., Khan, I., Teng, K. W., Koide, A., Zuberi, M., et al. (2022) Inhibition of RAS-driven signaling and tumorigenesis with a pan-RAS monoclonal antibody targeting the Switch I/II pocket, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **119**, e2204481119, doi: 10.1073/pnas.2204481119.
116. Guillard, S., Kolasinska-Zwierz, P., Debreczeni, J., Breed, J., Zhang, J., et al. (2017) Structural and functional characterization of a DARPIn which inhibits Ras nucleotide exchange, *Nat. Commun.*, **8**, 16111, doi: 10.1038/ncomms16111.
117. Bery, N., Legg, S., Debreczeni, J., Breed, J., Embrey, K., et al. (2019) KRAS-specific inhibition using a DARPIn binding to a site in the allosteric lobe, *Nat. Commun.*, **10**, 2607, doi: 10.1038/s41467-019-10419-2.
118. McGee, J. H., Shim, S. Y., Lee, S.-J., Swanson, P. K., Jiang, S. Y., et al. (2018) Exceptionally high-affinity Ras binders that remodel its effector domain, *J. Biol. Chem.*, **293**, 3265-3280, doi: 10.1074/jbc.M117.816348.
119. Jung, Y. H., Choi, Y., Seo, H.-D., Seo, M.-H., and Kim, H.-S. (2023) A conformation-selective protein binder for a KRAS mutant inhibits the interaction between RAS and RAF, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **645**, 110-117, doi: 10.1016/j.bbrc.2023.01.019.
120. Schmit, N. E., Neopane, K., and Hantschel, O. (2019) Targeted protein degradation through cytosolic delivery of monoclonal antibody binders using bacterial toxins, *ACS Chem. Biol.*, **14**, 916-924, doi: 10.1021/acscchembio.9b00113.
121. Röth, S., Macartney, T. J., Konopacka, A., Chan, K.-H., Zhou, H., et al. (2020) Targeting endogenous K-RAS for degradation through the affinity-directed protein missile system, *Cell. Chem. Biol.*, **27**, 1151-1163.e6, doi: 10.1016/j.chembiol.2020.06.012.
122. Kim, J. W., Cochran, F. V., and Cochran, J. R. (2015) A chemically cross-linked knottin dimer binds integrins with picomolar affinity and inhibits tumor cell migration and proliferation, *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 6-9, doi: 10.1021/ja508416e.
123. Gad, S., and Ayakar, S. (2021) Protein scaffolds: A tool for multi-enzyme assembly, *Biotechnol. Rep. (Amst.)*, **32**, e00670, doi: 10.1016/j.btre.2021.e00670.
124. Islam, M., Kehoe, H. P., Lissos, J. B., Huang, M., Ghadban, C. E., et al. (2021) Chemical diversification of simple synthetic antibodies, *ACS Chem. Biol.*, **16**, 344-359, doi: 10.1021/acscchembio.0c00865.
125. Rabe von Pappenheim, F., Wensien, M., Ye, J., Uranga, J., Irisarri, I., et al. (2022) Widespread occurrence of covalent lysine-cysteine redox switches in proteins, *Nat. Chem. Biol.*, **18**, 368-375, doi: 10.1038/s41589-021-00966-5.
126. Maggi, M., Pessino, G., Guardamagna, I., Lonati, L., Pulimeno, C., and Scotti, C. (2021) A targeted catalytic nanobody (T-CAN) with asparaginolytic activity, *Cancers (Basel)*, **13**, 5637, doi: 10.3390/cancers13225637.
127. Fellouse, F. A., Barthelemy, P. A., Kelley, R. F., and Sidhu, S. S. (2006) Tyrosine plays a dominant functional role in the paratope of a synthetic antibody derived from a four amino acid code, *J. Mol. Biol.*, **357**, 100-114, doi: 10.1016/j.jmb.2005.11.092.
128. Birtalan, S., Zhang, Y., Fellouse, F. A., Shao, L., Schaefer, G., and Sidhu, S. S. (2008) The intrinsic contributions of tyrosine, serine, glycine and arginine to the affinity and specificity of antibodies, *J. Mol. Biol.*, **377**, 1518-1528, doi: 10.1016/j.jmb.2008.01.093.
129. Gilbreth, R. N., Esaki, K., Koide, A., Sidhu, S. S., and Koide, S. (2008) A dominant conformational role for amino acid diversity in minimalist protein-protein interfaces, *J. Mol. Biol.*, **381**, 407-418, doi: 10.1016/j.jmb.2008.06.014.
130. Bonvin, P., Venet, S., Fontaine, G., Ravn, U., Gueneau, F., Kosco-Vilbois, M., et al. (2015) *De novo* isolation of antibodies with pH-dependent binding properties, *MAbs*, **7**, 294-302, doi: 10.1080/19420862.2015.1006993.

131. Hackel, B. J., and Wittrup, K. D. (2010) The full amino acid repertoire is superior to serine/tyrosine for selection of high affinity immunoglobulin G binders from the fibronectin scaffold, *Protein Eng. Des. Sel.*, **23**, 211-219, doi: 10.1093/protein/gzp083.
132. Svilenov, H. L., Sacherl, J., Protzer, U., Zacharias, M., and Buchner, J. (2021) Mechanistic principles of an ultra-long bovine CDR reveal strategies for antibody design, *Nat. Commun.*, **12**, 6737, doi: 10.1038/s41467-021-27103-z.
133. Schilling, J., Schöppe, J., and Plückthun, A. (2014) From DARPins to LoopDARPins: novel LoopDARPin design allows the selection of low picomolar binders in a single round of ribosome display, *J. Mol. Biol.*, **426**, 691-721, doi: 10.1016/j.jmb.2013.10.026.

NON-IMMUNOGLOBULIN SYNTHETIC BINDING PROTEINS FOR ONCOLOGY

Review

T. I. David^{1,2}, N. B. Pestov^{1,3,4*}, T. V. Korneenko⁴, and N. A. Barlev^{1,3,5,6}

¹ Institute of Biomedical Chemistry, 119121 Moscow, Russia

² Laboratory of Molecular Oncology, Phystech School of Biological and Medical Physics, Moscow Institute of Physics and Technology, 141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia; e-mail: nayeoff@yahoo.com

³ Laboratory of Tick-Borne Encephalitis and Other Viral Encephalitides, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products, Russian Academy of Sciences, 108819 Moscow, Russia

⁴ Group of Cross-Linking Enzymes, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, 117997 Moscow, Russia

⁵ Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, 194064 St.-Petersburg, Russia

⁶ School of Medicine, Nazarbayev University, 010000 Astana, Kazakhstan

Extensive application of technologies like phage display in screening peptide and protein combinatorial libraries has not only facilitated creation of new recombinant antibodies but has also significantly enriched repertoire of the protein binders that have polypeptide scaffolds without homology to immunoglobulins. These innovative synthetic binding protein (SBP) platforms have grown in number and now encompass monobodies/adnectins, DARPins, lipocalins/anticalins, and a variety of miniproteins such as affibodies and knottins, among others. They serve as versatile modules for developing complex affinity tools that hold promise in both diagnostic and therapeutic settings. An optimal scaffold typically has low molecular weight, minimal immunogenicity, and demonstrates resistance against various challenging conditions, including proteolysis – making it potentially suitable for peroral administration. Retaining functionality under reducing intracellular milieu is also advantageous. However, paramount to its functionality is the scaffold's ability to tolerate mutations across numerous positions, allowing for the formation of a sufficiently large target binding region. This is achieved through the library construction, screening, and subsequent expression in an appropriate system. Scaffolds that exhibit high thermodynamic stability are especially coveted by the developers of new SBPs. These are steadily making their way into clinical settings, notably as antagonists of oncoproteins in signaling pathways. This review surveys the diverse landscape of SBPs, placing particular emphasis on the inhibitors targeting the oncoprotein KRAS, and highlights groundbreaking opportunities for SBPs in oncology.

Keywords: monobodies, adnectins, lipocalins, affibodies, DARPins, alternative scaffolds

ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В КАЧЕСТВЕ НОСИТЕЛЕЙ КОНЪЮГИРОВАННЫХ ВАКЦИН

Обзор

© 2023 Ю.А. Ходак

ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт биоинженерии,
117312 Москва, Россия; электронная почта: salix33@gmail.com

Поступила в редакцию 12.05.2023

После доработки 30.06.2023

Принята к публикации 25.07.2023

Использование белков-носителей, индуцирующих эффективный и долгосрочный иммунный ответ на слабые антигены, стало настоящим прорывом в вакцинопрофилактике, сделавшим её доступной для более широкого круга пациентов и позволившим получить надёжные препараты против множества возбудителей. В настоящее время продолжаются исследования как по выявлению новых пептидов, белков и их комплексов, потенциально пригодных для использования в качестве носителей, так и по разработке новых методов выделения, очистки и конъюгации уже известных и хорошо себя зарекомендовавших белков. Использование рекомбинантных белков имеет ряд преимуществ перед выделением из природных источников: более простое культивирование организма-хозяина, возможность модификации генетической конструкции, использование многочисленных вариантов промоторов, сигнальных последовательностей и прочих регуляторных элементов. Данный обзор посвящён способам получения как «традиционных», так и новых рекомбинантных белков и их производных, используемых или потенциально пригодных для использования в качестве белков-носителей конъюгированных вакцин.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гетерологичная экспрессия рекомбинантных белков, конъюгированные вакцины, белки-носители.

DOI: 10.31857/S0320972523090051, **EDN:** WTMAUF

ВВЕДЕНИЕ

При разработке современных вакцин для обеспечения сильного и длительного иммунного ответа при минимальном количестве побочных эффектов из массы отдельных антигенов инфекционных микроорганизмов отбирают те, которые обладают наибольшим протективным действием. Однако подобная процедура может привести к значительному снижению иммуногенности, поскольку наиболее доступные для взаимодействия с клетками иммунной системы молекулы зачастую сами по себе являются слабыми иммуногенами. Использование белков-носителей и

их производных в составе конъюгированных вакцин позволяет, с одной стороны, сохранить узкую, наиболее характерную антигенную специфичность патогена, а с другой стороны – обеспечивает достаточную иммуногенность для выработки сильного протективного иммунитета.

При производстве конъюгированных вакцин важным фактором является возможность широкомасштабного производства как антигенов, так и носителей. Следует отметить, что большинство используемых или потенциальных носителей удобнее получать с помощью генноинженерных технологий в виде рекомбинантных белков и производных, поскольку

Принятые сокращения: DT – дифтерийный токсин; CRM197 – нетоксичный мутант дифтерийного токсина; GMMA – модули мембранных антигенов; H1b – *Haemophilus influenza* типа b; OMPC – комплекс белков внешней мембраны; OMV – везикулы внешней мембраны; PD – белок D *Haemophilus influenza*; TT – столбнячный токсин; VLP – вирусоподобные частицы.

* Адресат для корреспонденции.

системы гетерологичной экспрессии позволяют получать большие или сопоставимые с природными продуцентами количества целевого продукта в нетоксичной форме из малопатогенных организмов, культивирование которых обходится дешевле. Так, в состав многих существующих вакцин входят химически инактивированные природные токсины (анатоксины). Их использование сопряжено с рядом неудобств, таких как необходимость культивирования опасных микроорганизмов, очистка и обработка полученных токсичных белков формальдегидом, опасность их недостаточной инактивации и денатурации, а также потенциальная гетерогенность партий и возможность нежелательных побочных модификаций. Получение мутантных нетоксичных производных, сохранивших антигенные эпитопы, но лишённых ферментативной активности, позволяет как избежать вышеперечисленных затруднений, так и организовать производство белков в менее опасных и более простых для культивирования микроорганизмах, что значительно снижает стоимость конечной продукции. Изменение белкового и липидного составов мембранных везикул для уменьшения их токсичности и повышения иммуногенности требует вмешательства в геном клеток-продуцентов, что также позволяет отнести такие носители к рекомбинантным. Не меньшего количества манипуляций требует и создание продуцентов биоконъюгатных вакцин, когда конъюгация носителя с антигеном осуществляется с помощью ферментативных реакций внутри клетки-хозяина, что также позволяет снизить стоимость производства конечного продукта. Таким образом, гетерологичная экспрессия является мощным инструментом, использование которого даёт возможность нарабатывать большие объёмы продукта быстрее, безопаснее и дешевле. Несмотря на значительное количество обзоров, посвящённых свойствам и многообразию существующих и разрабатываемых носителей, в них редко затрагиваются вопросы экспрессии рассматриваемых белков, в том числе в гетерологичных системах. При этом многие рассматриваемые белки являются довольно сложными объектами для гетерологичной экспрессии из-за сложностей с фолдингом, необходимости посттрансляционного процессинга, токсичности и цитотоксичности. Настоящий обзор призван дать представление о разнообразии приёмов, используемых при гетерологичной экспрессии белков и их производных, используемых в качестве носителей конъюгированных вакцин.

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ КОНЪЮГИРОВАННЫХ ВАКЦИН

Внешняя оболочка многих инфекционных агентов, таких как *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* и другие, покрыта полисахаридной капсулой, которая способствует их выживанию в кровотоке, придавая устойчивость к опосредованному комплементом уничтожению и фагоцитозу [1, 2]. Зачастую составляющие её полисахариды являются единственными поверхностными антигенами, непосредственно доступными для взаимодействия рецепторам клеток адаптивного иммунитета [3], что делает привлекательным их использование в качестве вакцин [4–6]. Однако полисахариды, за исключением цвиттер-ионных, обладают слабыми антигенными свойствами [6, 7].

Повторяющиеся звенья полисахаридных молекул напрямую взаимодействуют с рецепторами В-лимфоцитов, запуская процесс их дифференцировки в плазматические клетки. Активированные В-клетки синтезируют IgM — пентамерные антитела, обладающие большой авидностью, но низкой аффинностью. Таким образом, иммунный ответ на полисахариды идёт по Т-независимому пути, который не позволяет запускать механизм созревания В-клеток, сопровождающийся увеличением аффинности вырабатываемых антител. Кроме того, у детей первого года жизни данный механизм не сформирован, что делает невозможной вакцинопрофилактику полисахаридными вакцинами. Описанные ограничения можно преодолеть путём ковалентного присоединения полисахаридных антигенов к белкам, которые способны привлекать Т-лимфоциты и активировать Т-зависимый путь. В гликоконъюгированных вакцинах полисахаридная часть отвечает за привлечение специфических В-клеток, а белок-носитель предоставляет эпитопы для CD4⁺ Т-хелперов, способных запускать механизм созревания В-клеток, а также способствует переключению изотипов синтезируемых антител с IgM на IgG [6, 8].

Полисахаридная часть гликопротеина связывается с рецепторами В-клеток, а после интернализации антигена антиген-презентирующими клетками белковая часть подвергается процессингу, в результате которого пептиды презентуются в составе главного комплекса гистосовместимости (МНС II) хелперным Т-лимфоцитам. С помощью Т-лимфоцитов запускается процесс пролиферации и дифференциации В-клеток в плазматические клетки, синтезирующие большое количество высоко-

аффинных IgG, а также в клетки иммунологической памяти. Последние при повторном появлении антигена способны быстро пролиферировать и дифференцироваться в плазматические клетки, обеспечивающие высокий титр специфических антител. Кроме того, описан и второй механизм иммунного ответа на гликоконъюгаты – процессированный гликопептид удерживается на МНС II за пептидную часть, а его углеводная составляющая экспонируется и узнаётся рецепторами углеводоспецифических клонов Т-лимфоцитов, также способных к стимуляции В-клеток. Оба этих механизма запускают функционирующий с рождения Т-зависимый иммунный ответ, что позволяет осуществлять вакцинацию детей с самого раннего возраста [6, 8]. Таким образом, использование конъюгированных вакцин может значительно повысить эффективность и безопасность вакцинопрофилактики.

НОСИТЕЛИ «ТРАДИЦИОННЫЕ» И НОВЫЕ

Белки-носители должны соответствовать ряду требований, таких как безопасность для пациента, стабильность при хранении, способность вступать в реакции конъюгации, высокая иммуногенность конъюгата и возможность широкомасштабного производства. Токсичность белков-носителей устраняют химическим или генноинженерным способами. Кандидатный белок должен обладать достаточным количеством аминокислотных остатков с экспонированными боковыми цепями, способными вступать в реакции конъюгации с полисахаридом, обладать хорошей растворимостью в используемых буферах и быть стабильным в растворах с высокой концентрацией белка и полисахарида. Также немаловажными факторами являются стоимость культивирования и очистки. Данные процессы должны обладать высоким выходом и хорошей воспроизводимостью, соответствовать стандартам GMP, а конечный продукт – обладать высокой чистотой и быть стабильным при хранении [8].

Наиболее распространённые белки, на основе которых созданы используемые в настоящее время лицензированные вакцины, получили условное название «традиционные носители». Это пять препаратов: химически инактивированные столбнячный и дифтерийный токсины (TT и DT соответственно) [9, 10], нетоксичный мутант дифтерийного токсина CRM197 [11, 12], D-белок *Haemophilus influenzae* (PD или HiD) [13], а также комплексы бел-

ков внешней мембраны *Neisseria meningitidis* серогруппы В (outer membrane protein complex, ОМРС) [14, 15]. Известные специфические антигены для данных носителей – преимущественно капсульные полисахариды пневмококков, менингококков и *H. influenzae* типа b (Hib) [16]. Для создания конъюгатов с новыми антигенами производители вакцин в подавляющем большинстве случаев используют эти «традиционные» носители. Такой подход ограничен непредсказуемым изменением иммуногенности прототипов вакцин с одинаковым белком и полисахаридами разных типов [17, 18]. Были описаны случаи как усиления иммунного ответа при введении различных полисахаридных антигенов с одинаковым белком-носителем, так и его снижения по причине иммунной интерференции. Исследования новых белков и их производных на предмет возможности их использования в качестве носителей, а также разработка способов их очистки и конъюгации активно продолжаются.

Разработку новых носителей можно разделить на три направления. Первое – новые белки, чаще всего белки внешней поверхности бактерий или секретируемые токсины, которые соответствуют требованиям к белкам-носителям. Второе – мультимерные трансмембранные белковые комплексы на основе как везикул внешней мембраны (OMV, outer membrane vesicles) и модулей мембранных антигенов (GMMA, generalized modules for membrane antigens), так и вирусоподобных частиц (VLP, virus-like particles) и нанокapsул (nanocages) – вирусоподобных структур из невирусных белков. Третье – пептиды и слитные белки, представляющие собой отдельные эпитопы и их комбинации соответственно [6, 8, 16, 19]. Отдельно стоит отметить направление получения био-конъюгатов, синтезируемых внутри генетически модифицированных бактериальных клеток: внутриклеточные ферменты осуществляют перенос широкого спектра полисахаридных субстратов на белки-носители, обладающие коротким специфическим аминокислотным мотивом [20].

Далее будут более подробно рассмотрены способы получения как «традиционных», так и новых носителей.

ДИФТЕРИЙНЫЙ ТОКСИН И CRM197

Дифтерийный токсин – это секретируемый белок, синтезируемый микроорганизмом *Corynebacterium diphtheriae*, который можно условно разделить на два фрагмента.

N-Концевой фрагмент А отвечает за каталитическую активность. Фрагмент В содержит два домена, отвечающих за связывание с рецептором и рН-зависимое встраивание белка в мембрану и транслокацию внутри клетки-мишени. Токсин интернализуется в эндосомах и покидает их при закислении среды путём конформационной перестройки. В цитозоле DT блокирует синтез белка, воздействуя на эукариотический фактор элонгации EF-2 и таким образом убивает клетку. В молекуле DT две дисульфидные связи: Cys186–Cys201 соединяет фрагменты А и В, а Cys461–Cys471 расположена внутри фрагмента В [11, 21, 22]. Инактивированный обработкой формальдегидом анатоксин DT входит в состав вакцин с полисахаридами *H. influenzae* типа b (ProHIBIT), *N. meningitidis* (Menactra) и *Str. pneumoniae* (Synflorix). Также описана попытка получения фрагмента дифтерийного токсина в составе комплексного препарата против дифтерии, столбняка и коклюша из трансгенных растений табака с пониженным содержанием алкалоидов [23].

CRM197 – это нетоксичный мутант DT, полученный одной аминокислотной заменой G52E в активном центре фермента [11, 24–27]. Способность к химической конъюгации CRM197 несколько выше, чем у интактного DT, что может быть вызвано открытой конформацией белка и облегчением доступа к большому количеству остатков лизина [11, 18, 28]. В настоящее время CRM197 используется во многих широко применяющихся вакцинах, таких как Meningitec («Nuron Biotech», США), Menjugate («GSK Vaccines», Великобритания), Menveo («GSK Vaccines»), Prevnar 13 и Prevnar 20 («Pfizer», США), Vaxneuvance («Merck», Германия), а также и для разработки новых вакцин против различных патогенов [29].

Значительная часть производимого в мире CRM197 представляет собой продукт культивирования нетоксичного штамма *C. diphtheriae* C7(β197) [11]. Этим способом получает CRM197 компания «List Biological Labs» (США). Преимуществами данного способа являются правильная укладка целевого белка и его секреция в среду для культивирования, что облегчает дальнейшую очистку продукта. В настоящее время продолжают исследования по повышению продуктивности *C. diphtheriae* C7(β197) с помощью подбора состава сред и режимов культивирования [30–32]. Гомологичная экспрессия обладает рядом недостатков, таких как сравнительно невысокая продуктивность коринебактерий (в среднем 175–250 мг/литр [33]), низкая скорость роста *C. diphtheriae*, риск об-

ратной мутации в токсичный вариант и необходимость соблюдать повышенные требования безопасности при культивации патогенных микроорганизмов. Поэтому предпринимались многочисленные попытки экспрессии CRM197 в иных организмах (табл. 1).

Наличие внутри CRM197 двух дисульфидных связей является основной проблемой, затрудняющей его гетерологичную экспрессию. Не все организмы способны осуществлять правильную укладку таких белков, из-за чего некорректно свёрнутый продукт становится нерастворимым и формирует тельца включения. В этом случае для получения растворимого препарата требуется процедура рефолдинга. Кроме того, в исходной последовательности белка присутствует лидерный пептид, позволяющий *C. diphtheriae* осуществлять секрецию синтезированного токсина во внешнюю среду. В зависимости от продуцента данную последовательность либо заменяют на более эффективную, либо удаляют.

Было разработано несколько бактериальных систем для гетерологичной экспрессии CRM197. Грамположительные бактерии *Bacillus subtilis* [34], несущие плазмиду, кодирующую ген *crm197*, слитый с сигнальной последовательностью субтилизина, давали максимальное содержание растворимого секретиремого CRM197 в среде ~7,1 мг/литр. Также в качестве организма-хозяина использовали штамм грамотрицательной бактерии *Pseudomonas fluorescens* (WO 2011123139 A1 [46]), дефектный по генам протеаз (*hslU*, *hslV*, *prcl*, *degP1*, *degP2*, *dprA*) и сerratилизина, и сверхэкспрессирующий дисульфидизомеразы DsbA, DsbB, DsbC и DsbD. Последовательность гена оптимизировали под экспрессию в *Pseudomonas* и сливали с сигнальными последовательностями, направляющими синтезируемый белок в периплазму, где происходила правильная укладка продукта. Для по крайней мере трёх вариантов сигнального пептида выход правильно сложенного CRM197 составил более 1 г/литр. Менее удачный опыт был описан при попытке получения назальной формы вакцины против дифтерии с использованием ослабленного штамма *S. enterica* серовар Typhi CVD 908-htrA, поскольку большая часть целевого продукта синтезировалась в нерастворимой форме и находилась в тельцах включения. Также неудачей окончилась попытка получения в данном продуценте секретиремого CRM197 путём экспрессии белка, слитого с укороченной версией гемолизина А *Escherichia coli* [35]. Обычно гетерологичную экспрессию рекомбинантного CRM197 проводят в раз-

Таблица 1. Экспрессия рекомбинантных производных дифтерийного токсина

Продуцент	Последовательность гена	Рекомбинантный белок	Плазмида	Промотор	Свойства/продуктивность	Особенности	Ссылка
<i>Bacillus subtilis</i> штаммы SMS118 и SMS300	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> C7 (β197)	CRM197, DT-del (148) и DT (E148S, K516A, F530A)	pSM604	промотор протеиназы <i>B. subtilis</i>	растворимый секретуемый/ 2,3 мг/литр в SMS118 и 7,1 мг/литр в SMS300	сигнальная последовательность субтилилина	[34]
<i>Salmonella enterica</i> серovar Typhi CVD 908-htrA	фаг β197	CRM197 и его фрагменты	производная pBR322, pMOhly	Pnir15	нерастворимые/низкая во всех случаях		[35]
<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>C. diphtheriae</i>	фрагмент DT	pBIV-1.3Tag	RbcSI	растворимый/примерно 0,4 мг/кг биомассы	модуль для аффинного выделения	[23]
<i>Escherichia coli</i> BL21AI	синтетическая последовательность с оптимизированными кодонами	CRM197	pET9a	T7	нерастворимый/ 250 ± 50 мг/литр для CRM197 с His6-модулем	модуль для аффинного выделения и без него	[36]
<i>E. coli</i> Origami B(DE3), Origami 2(DE3) и Rosetta-gami B(DE3) pLysS	синтетическая последовательность с оптимизированными кодонами	CRM197	производная pET32a	T7	растворимый/ 150,69 ± 8,95 мг/литр	различные модули для аффинного выделения	[37]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	синтетическая последовательность с оптимизированными кодонами	CRM197	pET28a	T7	нерастворимый/ 250 ± 30 мг/литр		[38]
<i>E. coli</i> B834(DE3), LR(DE3) и HMS174(DE3)	синтетическая последовательность с оптимизированными кодонами	CRM197	производная pET26b, pRIT16681	T7	периплазматический растворимый/ более 3 г/литр	исследовали различные сигнальные последовательности	[39]
<i>E. coli</i> BL21(DE3) и Rosetta-gami 2(DE3)	синтетическая последовательность с оптимизированными кодонами	CRM197	pET-28a	T7	растворимый/ 110,5 ± 7,5 мг/литр	в том числе с модулем для аффинного выделения	[40]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	синтетическая последовательность с оптимизированными кодонами	CRM197	pTWIN 1	T7	нерастворимый		[41]
<i>E. coli</i> ClearColi BL21(DE3)	синтетическая последовательность с оптимизированными кодонами	CRM197	pET28a(+)	T7	нерастворимый/ 125 мг/г биомассы	слитый с модулем для аффинного выделения	[42]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	синтетическая последовательность с оптимизированными кодонами	CRM197	pET32a(+)	T7	растворимый		[43]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	синтетическая последовательность с оптимизированными кодонами	CRM197	pET26b(+)	T7	нерастворимый/ 7,88 г/литр		[44]
<i>E. coli</i> SHuffle® T7	синтетическая последовательность с оптимизированными кодонами	CRM197	производная pET28a	T7	растворимый/ 150–270 мг/литр (1,1–2,0 мг/г биомассы)		[45]

личных штаммах *E. coli*, и основной проблемой получения растворимого CRM197 остаётся правильная укладка полипептидной цепи, поскольку окислительно-восстановительный потенциал цитоплазмы *E. coli* не позволяет формировать дисульфидные связи. Корректно свёрнутый рекомбинантный CRM197 может быть получен путём ренатурации телец включения. Варианты рефолдинга описаны в многочисленных публикациях [36, 38, 41, 42, 47, 48] и патентах WO 2010150230 A1 [49], WO 2019151601 A1 [50], WO 2016079755 A1 [51], CN 100999548 A [52], CN 101265288 B [53], CN 103266125 A [54], CN 104140972 B [55]; однако в большинстве случаев данный процесс требует существенного разбавления целевого белка и занимает несколько суток. Вариант рефолдинга с щелочной денатурацией CRM197 и последующей нейтрализацией путём быстрого смешивания полученного раствора с кислотой также даёт низкий (не более 20%) выход (WO 2017081700 A1 [56]). По-видимому, процесс рефолдинга позволяет получать CRM197 с правильно свёрнутым гидрофобным ядром [41], но не обеспечивает корректную пространственную структуру всей белковой глобулы CRM197, что подтверждается нестабильностью рефолдированного продукта при хранении [42].

В литературе описаны две основные группы методов получения правильно свёрнутого растворимого CRM197. Первая из них — экспрессия целевого белка, сопряжённая с его секрецией в периплазматическое пространство. Она имеет ряд преимуществ, таких как корректное отщепление лидерного пептида, а также меньшее содержание в периплазматической фракции примесных белков и протеаз, что облегчает дальнейшую очистку ([39], а также патенты WO 2015134402 A1 [57], WO 2011042516 A2 [58], WO 2014102265 A1 [59], US 20150184215 A1 [60], WO 2019035058 A1 [61]). Основными преимуществами данного способа являются окислительный потенциал периплазмы, благоприятный для правильного сворачивания CRM197, и наличие там дисульфидизомераз DsbA и DsbC [62]. Однако ряд недостатков снижает привлекательность данного способа. Малый объём периплазмы (не более 15% относительно объёма клетки [63]) снижает конечный выход белка в расчёте на полученную биомассу. Но основной сложностью при использовании периплазматической экспрессии является обеспечение её согласованности с процессом секреции во избежание накопления в цитоплазме избытка непротессированного нерастворимого продукта ([39], WO 2019035058 A1 [61]), а также сложности

в отделении примеси непротессированного (несущего лидерный пептид) белка, неизбежно появляющейся при механическом повреждении клеток в процессе обработки большой биомассы методом осмотического шока. Невозможность заморозки и необходимость неотложной обработки биомассы также значительно усложняют масштабирование производства.

Таким образом, цитоплазматическая экспрессия CRM197 представляется более многообещающим методом. Однако, как упомянуто выше, восстановительный потенциал цитоплазмы существенно затрудняет формирование правильно свёрнутых молекул CRM197. Данные сложности можно преодолеть путём совместной экспрессии целевого белка с шаперонами или дисульфидизомеразами и экспрессией в коммерчески доступных штаммах *E. coli* с изменённым окислительно-восстановительным потенциалом цитоплазмы — например, Origami™ («EMD Millipore», США) или SHuffle™ («New England Biolabs», США), а также комбинации этих методов. Штамм SHuffle™ конститутивно экспрессирует в цитоплазме дисульфидизомеразу DsbC, выполняющую также функции шаперона, и дефектен по генам тиоредоксинредуктазы (*trxB*) и глутатионредуктазы (*gor*), благодаря чему окислительно-восстановительный потенциал цитоплазмы изменяется, что позволяет обеспечить суперэкспрессию растворимого CRM197 ([45], WO 2015117093 A1 [64]). Следует отметить, что индукция при пониженной температуре увеличивает выход корректно свёрнутого CRM197, тормозя скорость синтеза белка и обеспечивая дополнительное время для правильного сворачивания. Совместная экспрессия шаперонов с целевым белком в штамме Origami B(DE3), результатом которой является синтез растворимого CRM197, описана в работе Mahamad et al. [37]. Использование штамма Rosetta-gami 2(DE3) с изменённым окислительно-восстановительным потенциалом цитоплазмы не помогло получить растворимый CRM197. Однако в клетках *E. coli* BL21(DE3) удалось добиться приемлемого ($110,5 \pm 7,5$ мг/литр) уровня синтеза растворимого целевого белка за счёт экспрессии с отдельной плазмиды дополнительных шаперонов в виде сульфгидрилоксидазы из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (Erv1p) и дисульфидизомеразы (PDI) из клеток человека [40].

Из рассмотренного разнообразия методов можно сделать вывод, что поскольку рефолдинг нерастворимого CRM197 идёт неэффективно, основной задачей при разработке

систем гетерологичной экспрессии является обеспечение его правильной укладки. Наиболее привлекательным с точки зрения очистки способом получения белков является выделение из культуральной жидкости. Однако создать гетерологичную систему, уровень экспрессии секретируемого белка в которой сопоставим или превышает таковой в организме-хозяине, не удалось. Периплазматическая экспрессия позволяет получать растворимый CRM197, однако малый объём периплазмы, а вследствие этого невысокий выход, необходимость немедленной переработки клеточной массы и дополнительная задача отделения примеси белков с неудалённым лидерным пептидом делают данный способ малопривлекательным. К преимуществам цитоплазматической экспрессии можно отнести возможность накопления большого количества белка и отсутствие дополнительных последовательностей (лидерного пептида), неэффективный процессинг которых может усложнить очистку. Дополнительным аргументом в пользу цитоплазматической экспрессии CRM197 является возможность получения растворимого целевого белка в коммерчески доступных штаммах одного из самых распространённых организмов-продуцентов, *E. coli*, без необходимости серьёзного вмешательства в его геном, что ускоряет и удешевляет получение новых штаммов-продуцентов. Однако значительное повышение уровня синтеза цитоплазматического белка может привести к его накоплению в нерастворимой форме в тельцах включения. Таким образом, разработка новых и оптимизация уже существующих систем цитоплазматической экспрессии CRM197 остаётся актуальной задачей.

СТОЛБНЯЧНЫЙ ТОКСИН (ТТ)

Столбнячный токсин (tetanus toxin) синтезируют анаэробные бактерии *Clostridium tetani* в виде белка-предшественника, который затем превращается в активный токсин путём протеолиза: *N*-концевая часть становится каталитически активной лёгкой цепью (LC или фрагмент А), а соединённая с нею дисульфидной связью *C*-концевая часть становится тяжёлой цепью (HC) токсина. Тяжёлая цепь, в свою очередь, состоит из транслокационного (HCN или фрагмент В) и рецептор-связывающего (HSC или фрагмент С) доменов [65]. Проникая в нейроны, ТТ блокирует экзоцитоз нейромедиаторов, предотвращая высвобождение ингибиторов нервно-мышечных синапсов, что

приводит к продолжительной нервно-мышечной активации и спастическому параличу [66].

В настоящее время наиболее распространённым способом получения ТТ является его выделение из среды для культивирования Гарвардского штамма («Harvard strain») *C. tetani*, полученного в США в 1920-х гг. и постепенно распространившегося в качестве основного продуцента в научных лабораториях и на производстве вакцин [67]. Бактериальный токсин очищают от клеток и компонентов среды методом фильтрации и далее инактивируют формальдегидом, получая каталитически неактивный столбнячный анатоксин (catalytically inactive tetanus toxoid, СИТТ) [68, 69]. Полученные препараты иммунологически эффективны, но содержат значительные примеси белков штамма-продуцента. Кроме того, содержание ТТ колеблется от партии к партии. Данные обстоятельства приводят к довольно частым побочным эффектам после введения вакцины [9].

Получение рекомбинантного столбнячного анатоксина сопряжено с рядом трудностей. Поскольку для поддержания структуры ТТ необходимы две правильно сформированные дисульфидные связи, проблемы гетерологичной экспрессии данного белка весьма сходны с описанными выше для CRM197. Дополнительным фактором, усложняющим получение продукта, является протеолиз, необходимый для переноса синтезированного полипептида в зрелую форму. Кроме того, в последовательность ТТ необходимо внести изменения, блокирующие токсическую активность, но не влияющие на его иммунные свойства.

Одним из способов обойти указанные препятствия является использование отдельных функциональных фрагментов столбнячного токсина, несущих сохранённые эпитопы, но не обладающих токсической активностью и не требующих для своего функционирования формирования дисульфидных связей и расщепления протеазой. С иммунологической точки зрения, столбнячный токсин интересен своими многочисленными эпитопами для взаимодействия с Т-клетками [70]. Например, последовательность P2 (а.о. 830–844) является универсальным CD4⁺ Т-клеточным эпитопом. Его последовательность в составе слитных белков и пептидов значительно повышает эффективность вакцинных препаратов против малярии [71], ротавируса [72] и коронавируса [73]. Рецептор-связывающий *C*-фрагмент тяжёлой цепи столбнячного токсина востребован не только в качестве антигена противостолбнячных вакцин, но и в фундаментальных исследованиях физиологии нейронов и нервной системы.

Также С-фрагмент используют в качестве носителя для создания широкого спектра противоопухолевых препаратов и гликоконъюгатов, поэтому разработано и запатентовано огромное количество систем для его гетерологичной экспрессии, включая экспрессию в *E. coli* и других бактериях, а также в дрожжах и клетках насекомых [10].

Полноразмерный токсин получали реконструкцией отдельно экспрессированных цепей в 2 М мочеvine в присутствии дитиотреитола [74, 75]. Было отмечено, что полученный белок примерно в 40 раз менее токсичен, чем его природный аналог. В то же время инъекции смеси не подвергнутых реконструкции цепей показали отсутствие токсичности даже в больших дозах. Однако больший практический интерес представляет получение генетически инактивированного анатоксина, что, учитывая крайне высокую степень токсичности ТТ, является нетривиальной задачей. В отличие от CRM197, исследователям не удалось найти единственную аминокислотную замену, кардинально снижающую токсичность до приемлемого уровня.

Протеазную активность ТТ пытались подавить путём ввода в каталитический домен замены E234A. Поскольку *E. coli*, в которой осуществляли гетерологичную экспрессию мутантного токсина, неспособна к правильному процессингу синтезируемого полипептида, его расщепление осуществляли с помощью энтерокиназы, сайт узнавания которой вводили в дополнительную линкерную последовательность между лёгкой и тяжёлой цепями. Полученный мутантный белок блокировал нейрорепаралитическое действие столбнячного токсина *in vitro* с той же эффективностью, как тяжёлая цепь токсина, однако оказался более чем в 30 раз эффективнее в опытах *in vivo*, предотвращая развитие столбняка у мышей, а его токсичность была значительно снижена [76]. Замены R372A и Y375F в том же каталитическом домене позволили получить мутантный вариант TeNT(RY), который сохранил способность связываться с ганглиозидами с той же аффинностью и специфичностью, что и исходный белок, однако его токсичность оказалась в 125 000 раз ниже. Данный белок, слитый с модулями, позволяющими осуществлять его аффинное выделение и мечение, использовали для исследований взаимодействия токсина с культурами клеток, поскольку остаточная токсичность его была всё ещё неприемлема для использования в составе вакцинных препаратов [77]. Приемлемый уровень токсичности производного ТТ был достигнут при

внесении изменений во все три домена токсина. Полученный белок, названный 8МТТ, содержит пять замен в лёгкой цепи (Y26A, L230K, E234Q, R372A, Y375F), которые нарушают каталитическую функцию и взаимодействие с белками-мишенями. Кроме того, были внесены мутации, нарушающие функционирование транслокационного (K768A) и рецептор-связывающего (R1226L и W1289A) доменов. Токсичность 8МТТ снижена более чем в 50 млн раз относительно исходного столбнячного токсина, что делает его хорошим кандидатом для использования в качестве компонента вакцинных препаратов [78]. Повысить эффективность гетерологичной экспрессии 8МТТ удалось благодаря использованию в качестве продуцента штамма Gor/MetTM *E. coli* [79] с удалённым геном глутатионредуктазы (*gor*), благодаря чему его цитоплазма имеет окислительный потенциал, позволяющий получить растворимые белки с правильно сформированными дисульфидными связями. Кроме того, в данном штамме *gor*-локус заменён на ген метионинаминопептидазы под контролем *tac*-промотора. Таким образом, при добавлении индуктора целевой ген, находящийся в плазмиде под контролем того же промотора, начинает экспрессировать продукт одновременно с экспрессией аминокислотидазы, отщепляющей с N-конца синтезируемого белка стартовый остаток метионина. Поскольку во всех вышеперечисленных случаях мутантные формы ТТ нарабатывали в *E. coli*, не способной осуществлять процессинг синтезируемого полипептида, для получения зрелого анатоксина очищенный продукт расщепляли трипсином (табл. 2).

Гетерологичная экспрессия полноразмерного столбнячного анатоксина представляет собой довольно сложную задачу. Помимо необходимости обеспечить правильный фолдинг и процессинг белка, множество усилий было направлено на получение генетически инактивированного ТТ. В 2021 г. компанией «Fina Biosolutions» (США) была подана патентная заявка WO 2021188379 A2 [80] на получение нетоксичного варианта столбнячного токсина 8МТТ, который до этого был протестирован в качестве носителя в гликоконъюгате с капсульными полисахаридами *H. influenzae* типа b и показал сходную со столбнячным анатоксином эффективность [79]. Таким образом, можно надеяться, что после прохождения всех необходимых клинических испытаний на рынке появятся вакцины с использованием в качестве носителя генетически инактивированного столбнячного токсина.

Таблица 2. Получение рекомбинантного столбнячного токсина

Рекомбинантный белок	Продуцент	Плазмида/ промотор	Способ получения двухсубъединичной формы	Растворимость/ продуктивность	Модули для аффинной очистки	Ссылка
Природная и мутантная (H233A, E234A, H237A) формы LC	<i>Escherichia coli</i> JM109	производная pMAL-c2/Tac	реконструкция из отдельно экспрес- сированных LC фрагментов и HC, полученной расщеплением природного токсина	растворимые	мальтоза- связывающий белок MBP	[74]
LC и HC	<i>E. coli</i> JM109	производная pMAL-c2/Tac	реконструкция из отдельно экспрес- сированных фрагментов LC и HC	растворимые	мальтоза- связывающий белок MBP	[75]
Слитный белок из фрагментов LC и HC, разделённых линкером с сайтом энтерокиназы, природная и мутантная (E234A) формы	<i>E. coli</i> JM109	производная pTrcHisA/Lac	расщепление слитного белка энтерокиназой	растворимый/ 9 мг/литр	His6	[76]
Полноразмерный мутантный (R372A и Y375F) белок	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pET28a/T7	расщепление очищенного продукта трипсином	растворимый/ 2–8 мг/литр	His6 и три FLAG эпитопа – на N-конце, эпитопы HA и Strep – на C-конце	[77]
Полноразмерный мутантный (Y26A, L230K, E234Q, R372A, Y375F, K768A, R1226L, W1289A) белок (8MTT)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pET28a/T7	расщепление очищенного продукта трипсином	растворимый/ 5 мг очищенного белка на 1 литр культуры	His6	[78]
Полноразмерный мутантный (Y26A, L230K, E234Q, R372A, Y375F, K768A, R1226L, W1289A) белок (8MTT)	<i>E. coli</i> Gor/Met TM	производная pET24/Tac	расщепление очищенного продукта трипсином	растворимый/ 1 г/литр культуры (ферментёр)	нет	[79]

Примечание. LC – каталитически активная лёгкая цепь столбнячного токсина из анаэробных бактерий *Clostridium tetani*; HC – тяжёлая цепь столбнячного токсина из анаэробных бактерий *Clostridium tetani*.

БЕЛОК D БАКТЕРИИ *Haemophilus influenzae*

Белок D – высококонсервативный поверхностный липопротеин бактерии *H. influenzae*, расположенный на внешней мембране как инкапсулированных, так и лишённых капсулы (а значит, нетипируемых) штаммов. Природный белок несёт на N-конце консенсусную последовательность, узнаваемую сигнальной пептидазой II, которая отщепляет указанный пептид с образованием процессированного

продукта размером 42 кДа [81]. Последовательность гена и ферментативная активность белка имеют значительное сходство с таковыми у гликофосфодиэстеразы GlpQ из *E. coli* [82]. Несмотря на общую гидрофильность молекулы и отсутствие выраженных гидрофобных мотивов, белок D является мембранным. Заякоривание в мембране происходит путём присоединения жирных кислот к остатку цистеина-19. При удалении данного аминокислотного остатка молекула становится

Таблица 3. Получение рекомбинантного белка D

Рекомбинантный белок	Продуцент	Плазмида/промотор	Локализация	Ссылка
Природный PD	<i>Escherichia coli</i> JM83	pUC18/эндогенный промотор	внешняя мембрана	[81]
PD (C19G)	<i>E. coli</i> JM83	pUC18/эндогенный промотор	периплазма	[83]
PD (C19G)	<i>E. coli</i> JM83	pUC19	периплазма	[84]
усечённый PD (а.о. 192–299)	<i>E. coli</i> TOP10	pBAD/ <i>araBAD</i>	периплазма	[85]

полностью гидрофильной и секретируется в периплазматическое пространство [83]. Свойства PD, такие как поверхностная локализация, высокая степень консервативности и широкая распространённость у разных штаммов, делают его хорошим кандидатом на роль носителя для конъюгированных вакцин.

В геноме *H. influenzae* ген белка D (*hpd*) находится под контролем слабого промотора. При гетерологичной экспрессии природного PD в *E. coli* было отмечено, что усиление экспрессии, вызванное tandemным расположением эндогенного промотора и *lac*-промотора плазмиды pUC18, приводит к угнетению роста и автолизу клеток, что свидетельствует о токсическом эффекте высокой концентрации белка D [81]. Рекомбинантный природный PD локализован на поверхности клеток *E. coli*, в то время как мутантная неацилированная форма PD, получаемая при замене C19G, присутствует преимущественно в периплазматической фракции [83]. Перенос экспрессионной кассеты в плазмиду pUC19 позволил на порядок повысить уровень синтеза неацилированного PD, при этом эффектов его токсического воздействия на клетки не было обнаружено, а периплазма содержала преимущественно рекомбинантный белок [84]. Анализ иммуногенных эпитопов PD из различных штаммов *H. influenzae* позволил выбрать высококонсервативный участок PD (а.о. 192–299) в качестве кандидатного антигена для производства вакцин. Усечённый ген клонировали в плазмиду pBAD под контролем сильного промотора *araBAD*, что позволило повысить выход целевого белка до 4 мг/литр культуры [85] (табл. 3).

Исследования показали, что несмотря на некоторое снижение иммунного ответа на растворимую форму PD по сравнению с ацилированной, его достаточно для достижения протективного эффекта [84, 86], поэтому именно неацилированная форма используется при производстве конъюгированных вакцин, например Synflorix от «GlaxoSmithKline» (Велико-

британия) [87]. Вакцина, в состав которой входят капсульные полисахариды стрептококка и белок D, показала высокую эффективность против обоих возбудителей, значительно снижая количество острых отитов, вызванных нетипируемыми штаммами *H. influenzae* [88–90].

КОМПЛЕКСЫ БЕЛКОВ ВНЕШНЕЙ МЕМБРАНЫ (ОМРС), ВЕЗИКУЛЫ ВНЕШНЕЙ МЕМБРАНЫ (ОМВ) И МОДУЛИ МЕМБРАННЫХ АНТИГЕНОВ (ГММА)

Процесс роста грамотрицательных бактерий часто сопровождается высвобождением небольших (25–200 нм) везикул, получивших общее название ОМВ. Присутствие в их составе множества бактериальных антигенов, таких как липополисахариды и мембранные белки, а также размер и гидрофобность делают их сильными иммуногенами и привлекательным объектом для использования в производстве вакцинных препаратов [15].

Везикулы, содержащие комплексы белков внешней мембраны *N. meningitidis* серогруппы В, используют как в качестве сырья для производства противоменингококковых вакцин, так и в качестве носителей в составе Hib-конъюгатов. Данные препараты демонстрируют большую иммуногенность по сравнению с Hib-конъюгатами на основе дифтерийного и столбнячного анатоксинов и CRM197, причём разница особенно заметна при первичной иммунизации [91, 92]. Стимулирующий эффект предположительно достигается не столько активацией В-клеток входящими в состав везикул липополисахаридами, сколько митогенным воздействием на лимфоциты поринов PrgA2 и других мембранных белков [93, 94].

Большинство природных штаммов высвобождает небольшое количество везикул, поэтому для производства ОМРС используют метод экстракции мембранных комплексов из биомассы с помощью детергентов. Эти везикулы,

Таблица 4. Получение рекомбинантных OMV

Организм/Штамм	Внесённые изменения	Эффект	Ссылка
<i>Escherichia coli</i> IHNE3034	делеция <i>tolR</i>	сверхпродукция везикул	[101]
<i>Neisseria meningitidis</i> H44/76	делеции <i>rmpM</i> , <i>lpxL1</i> , <i>porB</i> ; усечённый <i>galE</i> ; три варианта гена белка PorA	сверхпродукция везикул, снижение токсичности, расширение спектра антигенов	[102]
<i>N. meningitidis</i> 8570	делеции <i>lpxL1</i> , <i>synX</i> ; усиление экспрессии белков fHbp и OpcA; дополнительный вариант PorA	снижение токсичности, нарушение формирования капсулы, расширение спектра антигенов, усиление иммуногенности	[103]
<i>Shigella sonnei</i> 53G	делеции <i>tolR</i> , <i>galU</i> , <i>msbB1</i>	сверхпродукция везикул, снижение токсичности	[104]
<i>Sh. sonnei</i> 53G, <i>Shigella flexneri</i> 2a 2457T	делеции <i>msbB1</i> , <i>htrB</i> , <i>rfbG</i>	снижение токсичности	[100]
<i>N. meningitidis</i> 1630	делеции <i>synX</i> , <i>ctrA</i> , <i>pxL1</i> , <i>gna33</i> оверэкспрессия белка fHbp	сверхпродукция везикул, нарушение формирования капсулы, снижение токсичности, усиление иммуногенности	[105]
<i>Sh. sonnei</i> 53G	хромосомные делеции <i>tolR</i> , <i>htrB</i> , замена в вирулентной плазмиде pSS гена <i>virG</i> на <i>nadAB</i>	сверхпродукция везикул, снижение токсичности, усиление иммуногенности	[99]
<i>Salmonella enterica</i> серовар Typhimurium изолят 1418	делеции <i>tolR</i> , <i>msbB</i> , <i>pagP</i>	сверхпродукция везикул, снижение токсичности	[106]

наряду с хорошо известными мембранными белками, такими как порины PorA и PorB, RmpM (reduction modifiable protein) и инвазин OpcA [95, 96], содержат различные периплазматические и цитоплазматические белки, а также белки внутренней мембраны, которые могут составлять до 60% от общего содержания белков [17, 95, 97]. В то же время OMV, полученные из штаммов, склонных к спонтанному высвобождению везикул, содержат преимущественно белки внешней мембраны, и присутствие «мусорных» белков в них незначительно. Было продемонстрировано, что введение мышам препарата на основе везикул, полученных из штамма *N. meningitidis* серогруппы В с мутацией *Dgna33*, провоцирующей усиленное везикулообразование, вызывало образование антител с бактерицидной активностью и обеспечивало больший протективный эффект против более широкой панели штаммов, чем везикулы из клеток дикого типа [98]. Также было отмечено, что использование дезоксихолата натрия или других детергентов приводит к потере слабоассоциированных мембранных липопротеинов, которые важны для образования нейтрализующих антител [14].

Данные наблюдения положили начало разработке генноинженерных штаммов, отличающихся высокой частотой формирования везикул. Дальнейшие усилия были сосредоточены в двух направлениях: уменьшение токсичности везикул и повышение их иммуногенности за счёт увеличения количества и разнообразия экспонированных мембранных белков (табл. 4). Уменьшение токсичности спонтанно высвобождаемых везикул крайне важно для начала клинических исследований на людях, поскольку при производстве ОМРС большая часть эндотоксинов инактивировалась используемыми при экстракции детергентами. Делеции генов, вовлечённых в ацилирование мембранного липида А, позволяют получать везикулы с пентаацилированными производными, которые, в отличие от гексаацилированных форм, обладают меньшей токсичностью и позволяют снизить выраженность и число побочных эффектов в сотни и даже десятки тысяч раз в зависимости от метода оценки [15, 99, 100]. Повышение иммуногенности достигается как за счёт суперэкспрессии отдельных поверхностных белков, так и за счёт помещения в геном различных вариантов

их генов, что позволяет обеспечить иммунный ответ против большего спектра штаммов возбудителя. Такие везикулы получили название ГММА.

Антигенный спектр на поверхности везикул можно дополнительно расширить путём трансформации штаммов-продуцентов плазмидами, несущими слитные гены белков, содержащих целевые эпитопы. Для этих целей часто используют систему на основе трансмембранного белка цитолизина А (ClyA), слитые с С-концом которого эпитопы экспонируются на поверхности везикулы. Таким образом, были получены ОМВ модифицированного штамма *E. coli* с экспонированным GFP [107], эпитопом белка М2 вируса гриппа [108] и последовательностью узнавания рецептора HER2 для создания противоопухолевых вакцин [109]. С той же целью разработаны системы на основе модифицированной протеазы (Hbp), с помощью которых удалось получить ОМВ, несущие антигены *Mycobacterium tuberculosis* и *Chlamydia trachomatis* [110], а также других возбудителей инфекционных заболеваний [111].

Полученные рекомбинантные везикулы используют для создания конъюгированных вакцин как с белковыми [112–114], так и с полисахаридными [112, 115] антигенами. Так, в работе Micoli et al. [112] ГММА, полученные из *ΔtolR* мутантного штамма *S. enterica* серовар Typhimurium, использовали для получения Hib-конъюгатов и конъюгатов с олигосахаридами *N. meningitidis* серогрупп А и С (MenA и MenC). Иммунизация животных полученными препаратами привела к более высокому титру антител по сравнению с аналогичными конъюгатами на основе CRM197. Подобные ГММА, дополнительно дефектные по О-антигенам, использовали для получения конъюгатов с углеводами группы А клеточной стенки стрептококков (GAC) [115]. Полученный препарат обладает сходной иммуногенностью по отношению к конъюгату на основе CRM197, однако экономически более выгоден благодаря повышенной продуктивности. Исследование конъюгатов ГММА, полученных из модифицированных штаммов *S. enterica* серовар Typhimurium и *N. meningitidis*, с полноразмерными и расщеплёнными углеводами Hib, MenA, MenC, Vi и GAC показало, что иммунный ответ на полисахариды не зависит от их молярного соотношения с ГММА, однако избыток полисахаридных цепей ухудшает антигенные свойства носителя. В то же время оптимальная длина конъюгируемых антигенов и сила Т-опосредованного гуморального иммунного ответа строго зависят от природы полисахаридов [116].

ДРУГИЕ НОСИТЕЛИ ДЛЯ КОНЪЮГИРОВАННЫХ ВАКЦИН

Как уже было упомянуто выше, эффективность конъюгированных вакцин при иммунизации препаратами, содержащими одинаковые белки-носители и разные полисахариды, меняется непредсказуемым образом. Кроме того, расширение спектра белков-носителей позволяет получать большее разнообразие защитных антител, в том числе против новых патогенов. Поэтому исследования новых белков, отвечающих требованиям к белкам-носителям, и разработка систем их экспрессии ведутся крайне активно. И хотя клинические испытания большинства прототипов новых вакцин ещё не проводились либо находятся на ранних стадиях, полученные на животных моделях данные позволяют надеяться, что появление новых препаратов на рынке — дело времени.

«Нетрадиционные» носители используют как для создания моновалентных вакцин, когда антигены и носитель принадлежат одному организму (например, конъюгаты мутантного варианта экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa* (ЕРА) с полисахаридами того же организма), или гетеровалентных, когда носитель конъюгируют с антигенами других патогенов (например, конъюгаты ЕРА с О-антигенами *Shigella*, капсулярными полисахаридами *Staphylococcus aureus*, Vi-антигеном *S. enterica* серовар Typhi) [8, 16, 19].

Получение новых рекомбинантных белков для использования в конъюгированных вакцинах можно свести к закономерностям, подробно описанным выше для CRM197, ТТ и белка D. Для снижения стоимости культивирования и требований к биологической безопасности гетерологичную экспрессию стараются осуществлять в широко распространённых продуцентах, таких как штаммы *E. coli* либо дрожжи.

Токсичные белки часто рассматривают в качестве носителей благодаря их высокой иммуногенности. Чтобы избежать процедуры химической инактивации, их токсичность снижают с помощью получения мутантных нетоксичных форм (табл. 5). Так, из экзотоксина А *P. aeruginosa* путём одной замены (E553C) или делеции (Δ E553) в каталитическом домене получали нетоксичный мутантный вариант, названный ExoProtein A (ЕРА), получивший особенно широкое распространение при создании биоконъюгированных вакцин. Второй вариант снижения токсичности — использование фрагментов белков, сохранивших часть антигенных эпитопов, но лишённых отвечающего

Таблица 5. Получение рекомбинантных белков-носителей

Белок/организм	Продуцент	Плазида	Ссылка
ЕРА (ΔЕ553) – нетоксичный мутант экзотоксина А <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i> JM103	pCDptac2	[118]
ЕРА (Е553С)	<i>E. coli</i> JM103	pBR322	[119]
ЕРА (ΔЕ553)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pET-24a	[120]
гARU – усечённый вариант токсина А <i>Clostridium difficile</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pRSET	[117]
Белки пилей <i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pET24b	[121]
Усечённый шиповидный белок ротавируса ΔVP8*	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pET28a	[122]
PspA – фрагмент поверхностного белка А <i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pET37b+	[123]
PhtD и PhtE – адгезины <i>Str. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pDUMP	[124]
Слитные белки, несущие эпитопы Ply, PspA и PsaA <i>Str. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pGEX-6p-3	[125]
SLO(ΔC101) (79–470) – фрагмент стрептолизина О стрептококков группы А	бесклеточная система синтеза Xpress cell-free protein synthesis (CFPS)	проприетарный	[126]
HBsAg – поверхностный антиген гепатита В	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Meyen ex E.C. Hansen	pRMHP1.0	[127]
Pfs25 из <i>Plasmodium falciparum</i>	<i>Pichia pastoris</i>	pPICZA	[128]

за токсичность каталитического домена, что аналогично использованию С-фрагмента столбнячного токсина. В качестве примера можно привести усечённую форму токсина А *Clostridium difficile* (гARU) [117]. Другими сильными иммуногенами являются поверхностные белки бактерий, в том числе белки пилей и порины.

Использование новых носителей позволяет не только снизить вероятность иммунной интерференции и усилить иммунный ответ на слабый антиген по сравнению с конъюгатами на основе «традиционных» носителей, но и получить антитела, обладающие новыми свойствами. Например, использование гетерологично экспрессированного в *E. coli* менингококкового порина гPorB [94] в составе Нib-конъюгата приводило к индукции у крыс на два порядка более высокого титра антител после второго введения вакцины по сравнению с конъюгатом на основе столбнячного анатоксина [95]. Моновалентная вакцина конъюгата гPorB с полисиаловой кислотой капсулы менингококков группы В в экспериментах на животных вызывала образование высокого титра антител, обладающих прямой

бактерицидной активностью, а контрольный конъюгат на основе столбнячного анатоксина давал меньший титр антител к полисахариду и не давал антител с антибактериальной активностью [96].

В последнее время большое внимание уделяется использованию в качестве носителей вирусоподобных частиц (VLP) и наночастиц из невирусных белков, иммунные свойства которых во многом аналогичны OMV. Эти носители в большей мере используются для конъюгации с белками и пептидами. Однако можно привести примеры конъюгации VLP с полисахаридами и олигосахаридами, которые являются антигенами как возбудителей заболеваний [129, 130], так и опухолевых клеток, поскольку для поверхности клеток, подвергшихся злокачественному перерождению, характерно присутствие данных антигенов в количествах, значительно превышающих таковые у здоровых клеток [131, 132]. Гетерологичную экспрессию VLP в основном осуществляют в *E. coli* [131, 133–135] и бакуловирусных системах [129, 136], аналогично другим рекомбинантным белкам.

БИОКОНЪЮГИРОВАННЫЕ ВАКЦИНЫ

Главной целью создания метода биоконъюгации PGCT (Protein Glycan Coupling Technology) было получение продуцентов, в которых оба компонента гликоконъюгата синтезируются внутри одной клетки-хозяина, а присоединение углеводной составляющей к белку-носителю осуществляется с помощью клеточной машинерии, что должно значительно облегчить и удешевить процесс получения вакцин.

В процессе получения биоконъюгатов можно выделить три этапа. На первом этапе клетки продуцента, в качестве которого чаще всего выступает *E. coli*, трансфицируют плазмидой, несущей локус, гены которого обеспечивают синтез целевого гликана, закрепляемого на мембране с помощью липидного якоря. На втором этапе клетки, экспрессирующие эпитопы, узнаваемые антителами против целевого гликана, трансфицируют плазмидой, экспрессирующей белок-носитель, в последовательность которого добавлен участок узнавания олигосахарилтрансферазы. Наконец, клетки-продуценты трансфицируют плазмидой, экспрессирующей ген олигосахарилтрансферазы, узнающей заякоренный на мембране гликан и переносимой углеводную цепь на специфическую последовательность белка-носителя. В качестве олигосахарилтрансферазы чаще всего используют белок PglB из бактерии *Campylobacter jejuni*, а в качестве белка-носителя в подавляющем большинстве случаев выступает экзопротеин А *P. aeruginosa* – ЕРА. Углеводная часть может быть представлена как О-антигенами, так и компонентами клеточной стенки болезнетворных микроорганизмов [19, 20, 137]. Модификация данного метода позволяет получать биоконъюгаты на основе ОМV, для чего достаточно поместить в продуцирующей везикулы штамм *E. coli* локус биосинтеза целевого гликана.

В настоящее время известно как минимум о двух биоконъюгатных вакцинах, находящихся на второй стадии клинических испытаний: Flexun2a против *Shigella flexneri* [138] и ExPEC4V против патогенной внекишечной *E. coli* [139]. Ещё большее количество биоконъюгатов находятся на более ранних этапах испытаний или в стадии разработки [19, 20, 137].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одним из важных требований к белкам и их производным, которые предполагается

использовать в качестве носителей в составе конъюгированных вакцин, является возможность нарабатывать целевые белки в больших количествах, причём процесс производства должен быть максимально воспроизводим и экономически обоснован. Гетерологичная экспрессия позволяет снизить издержки производства белков несколькими путями. Во-первых, выход продукта можно повысить путём оптимизации последовательности гена целевого белка, использования сильных промоторов, более эффективных лидерных последовательностей и других вспомогательных генетических элементов. Снижение стоимости производства также возможно за счёт большей унификации при использовании в качестве продуцентов распространённых малопатогенных организмов, культивирование которых не представляет сложностей с точки зрения требований к безопасности, доступности сред и наличия большого опыта по оптимизации протоколов выращивания. Поскольку в подавляющем большинстве случаев в качестве носителей в конъюгированных вакцинах используют бактериальные (реже вирусные) белки, не требующие сложных посттрансляционных модификаций в виде определённого паттерна гликозилирования, гетерологичную экспрессию этих белков чаще всего осуществляют в самом распространённом лабораторном продуценте бактериальных белков – *E. coli*. К его достоинствам, помимо упомянутых выше, также относится наличие широкого спектра коммерчески доступных штаммов, свойства которых позволяют осуществлять суперэкспрессию с сильных гетерологичных промоторов, а также получать белки, фолдинг которых требует специальных условий. Кроме того, среди имеющихся штаммов *E. coli* есть продуценты с пониженным содержанием эндотоксинов (ClearColi), что также существенно облегчает процедуру очистки целевого белка. Коэкспрессия нескольких гетерологичных генов также позволяет удешевить производство, как например, в случае биоконъюгированных вакцин или GMMA, одновременно несущих белки нескольких патогенных организмов или их штаммов.

На примере «традиционных» носителей можно ознакомиться со способами преодоления широкого спектра проблем, возникающих в процессе гетерологичной экспрессии. Например, в случае изначально секретлируемого белка CRM197 не удалось разработать гетерологичную систему, осуществляющую секрецию целевого продукта в культивационную среду, однако наработка CRM197 в периплазме

и цитоплазме также может оказаться оправданной с точки зрения производства. В случае цитоплазматической экспрессии проблему правильного формирования дисульфидных связей удалось преодолеть с помощью использования продуцентов с изменённым окислительно-восстановительным потенциалом цитоплазмы и/или дополнительной экспрессией шаперонов. В случае ТТ, помимо проблемы получения нетоксичной формы, дополнительной трудностью являлась необходимость посттрансляционного расщепления белка-предшественника. В настоящее время данную операцию осуществляют с помощью обработки очищенного белка трипсином, но можно предположить, что дальнейшим направлением работы может быть создание штамма *E. coli*, способного осуществлять требуемый тип посттрансляционной модификации. В случае белка D удобство производства его неацилированной формы перевесило минусы в виде некоторого снижения его иммунных свойств, поскольку было показано, что использование модифицированного белка также обеспечивает необходимый протективный эффект. Для получения модифицированных ОМV чаще всего недостаточно ограничиться экспрессией с плазмид дополнительных белков, расширяющих антигенное разнообразие на поверхности везикул. Для получения эффективного продуцента необходимо вмешательство в геном, позволяющее снизить токсичность входящих в состав везикул липополисахаридов, а также повысить частоту спонтанного образования везикул. Специально разработанные штаммы *E. coli*, способные к сверхпродукции везикул, потенциально могут прийти на смену модифицированным штаммам патогенов, что позволит снизить класс биологической опасности при производстве ОМV.

Использование новых белков-носителей призвано как повысить эффективность уже имеющихся вакцин, так и расширить спектр поддающихся вакцинопрофилактике заболеваний. Тем не менее вывод на рынок новых

вакцин – крайне длительный процесс. В данный момент входящие в состав вакцинных препаратов рекомбинантные белки представлены только CRM197 и неацилированным белком D. В качестве примера длинного пути от разработки к производству можно привести историю появления на рынке препаратов на основе везикул грамотрицательных бактерий. Первые неконъюгированные вакцины с использованием ОМV были одобрены к применению в конце 1980-х гг. Однако вакцины на основе модифицированных штаммов, содержащих ОМV с несколькими видами поринов (MonoMen®, HexaMen®, NonaMen®; Netherlands Vaccine Institute) не одобрены до сих пор, хотя и показали свою эффективность в исследованиях на животных [140]. Вакцина Bexsero («GlaxoSmithKline»), содержащая ОМV с несколькими рекомбинантными белками, была одобрена в 2013 г. после двадцатилетней разработки [141]. Вакцины на основе GМMA пока ещё находятся на стадии разработки [142] и, скорее всего, ожидать их появления на рынке можно в течение двух ближайших десятилетий. Возможно, что сокращению сроков лицензирования вакцин будет способствовать опыт ускоренного проведения клинических исследований и вывода на рынок противокоронавирусных вакцин во время пандемии COVID-19. Можно предположить, что со временем разнообразие рекомбинантных белков в составе вакцин будет увеличиваться, что, в свою очередь, приведёт к разработке новых систем их гетерологичной экспрессии и новым оригинальным решениям в преодолении сложностей, возникающих в этом процессе.

Благодарности. И.И. Воробьёву, А.Ю. Рязановой (ФИЦ Биотехнологии РАН).

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья является обзором, написанным по результатам статей, соблюдение этических норм в каждой из которых указано в их тексте.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Weller, P. F., Smith, A. L., Smith, D. H., and Anderson, P. (1978) Role of immunity in the clearance of bacteremia due to *Haemophilus influenzae*, *J. Infect. Diseases*, **138**, 427-436, doi: 10.1093/infdis/138.4.427.
2. Finlay, B. B., and Falkow, S. (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, 136-169, doi: 10.1128/mmbr.61.2.136-169.1997.
3. Kasper, D. L. (1986) Bacterial capsule – old dogmas and new tricks, *J. Infect. Diseases*, **153**, 407-415, doi: 10.1093/infdis/153.3.407.
4. Zimmermann, S., and Lepenies, B. (2015) Glycans as vaccine antigens and adjuvants: immunological

- considerations, *Methods Mol. Biol.*, **1331**, 11-26, doi: 10.1007/978-1-4939-2874-3_2.
5. Hütter, J., and Lepenies, B. (2015) Carbohydrate-based vaccines: an overview, *Methods Mol. Biol.*, **1331**, 1-10, doi: 10.1007/978-1-4939-2874-3_1.
 6. MacCalman, T. E., Phillips-Jones, M. K., and Harding, S. E. (2019) Glycoconjugate vaccines: some observations on carrier and production methods, *Biotechnol. Genet. Engin. Rev.*, **35**, 93-125, doi: 10.1080/02648725.2019.1703614.
 7. Avci, F. Y., and Kasper, D. L. (2010) How bacterial carbohydrates influence the adaptive immune system, *Annu. Rev. Immunol.*, **28**, 107-130, doi: 10.1146/annurev-immunol-030409-101159.
 8. Micoli, F., Adamo, R., and Costantino, P. (2018) Protein carriers for glycoconjugate vaccines: history, selection criteria, characterization and new trends, *Molecules*, **23**, 1451, doi: 10.3390/molecules23061451.
 9. Möller, J., Kraner, M. E., and Burkovski, A. (2019) More than a toxin: protein inventory of clostridium tetani toxoid vaccines, *Proteomes*, **7**, 15, doi: 10.3390/proteomes7020015.
 10. Bayart, C., Mularoni, A., Hemmani, N., Kerachni, S., Jose, J., Gouet, P., Paladino, J., and Le Borgne, M. (2022) Tetanus toxin fragment C: structure, drug discovery research and production, *Pharmaceuticals*, **15**, 756, doi: 10.3390/ph15060756.
 11. Bröker, M., Costantino, P., DeTora, L., McIntosh, E. D., and Rappuoli, R. (2011) Biochemical and biological characteristics of cross-reacting material 197 CRM197, a non-toxic mutant of diphtheria toxin: use as a conjugation protein in vaccines and other potential clinical applications, *Biologicals*, **39**, 195-204, doi: 10.1016/j.biologicals.2011.05.004.
 12. Shinefield, H. R. (2010) Overview of the development and current use of CRM(197) conjugate vaccines for pediatric use, *Vaccine*, **28**, 4335-4339, doi: 10.1016/j.vaccine.2010.04.072.
 13. Forsgren, A., Riesbeck, K., and Janson, H. (2008) Protein D of *Haemophilus influenzae*: a protective nontypeable *H. influenzae* antigen and a carrier for pneumococcal conjugate vaccines, *Clin. Infect. Dis.*, **46**, 726-731, doi: 10.1086/527396.
 14. Holst, J., Martin, D., Arnold, R., Huergo, C. C., Oster, P., O'Hallahan, J., and Rosenqvist, E. (2009) Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*, *Vaccine*, **27 Suppl 2**, B3-B12, doi: 10.1016/j.vaccine.2009.04.071.
 15. Rossi, O., Citiulo, F., and Mancini, F. (2021) Outer membrane vesicles: moving within the intricate labyrinth of assays that can predict risks of reactogenicity in humans, *Human Vaccines Immunother.*, **17**, 601-613, doi: 10.1080/21645515.2020.1780092.
 16. Bröker, M., Berti, F., Schneider, J., and Vojtek, I. (2017) Polysaccharide conjugate vaccine protein carriers as a “neglected valency” – potential and limitations, *Vaccine*, **35**, 3286-3294, doi: 10.1016/j.vaccine.2017.04.078.
 17. Dagan, R., Poolman, J., and Siegrist, C. A. (2010) Glycoconjugate vaccines and immune interference: a review, *Vaccine*, **28**, 5513-5523, doi: 10.1016/j.vaccine.2010.06.026.
 18. Pichichero, M. E. (2013) Protein carriers of conjugate vaccines: characteristics, development, and clinical trials, *Human Vaccines Immunother.*, **9**, 2505-2523, doi: 10.4161/hv.26109.
 19. Van der Put, R. M. F., Metz, B., and Pieters, R. J. (2023) Carriers and antigens: new developments in glycoconjugate vaccines, *Vaccines*, **11**, 219, doi: 10.3390/vaccines11020219.
 20. Kay, E., Cuccui, J., and Wren, B. W. (2019) Recent advances in the production of recombinant glycoconjugate vaccines, *NPJ Vaccines*, **4**, 16, doi: 10.1038/s41541-019-0110-z.
 21. Choe, S., Bennett, M. J., Fujii, G., Curmi, P. M., Kantardjieff, K. A., Collier, R. J., and Eisenberg, D. (1992) The crystal structure of diphtheria toxin, *Nature*, **357**, 216-222, doi: 10.1038/357216a0.
 22. Rappuoli, R. (1990) *New and Improved Vaccines against Diphtheria and Tetanus*, 2nd Edn., Marcel Dekker, New York.
 23. Brodzik, R., Spitsin, S., Pogrebnyak, N., Bandurska, K., Portocarrero, C., Andryszak, K., Koprowski, H., and Golovkin, M. (2009) Generation of plant-derived recombinant DTP subunit vaccine, *Vaccine*, **27**, 3730-3734, doi: 10.1016/j.vaccine.2009.03.084.
 24. Greenfield, L., Bjorn, M. J., Horn, G., Fong, D., Buck, G. A., Collier, R. J., and Kaplan, D. A. (1983) Nucleotide sequence of the structural gene for diphtheria toxin carried by corynebacteriophage beta, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 6853-6857, doi: 10.1073/pnas.80.22.6853.
 25. 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., and Spraggon, G. (2012) Structural basis for lack of toxicity of the diphtheria toxin mutant CRM197, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 5229-5234, doi: 10.1073/pnas.1201964109.
 26. Ratti, G., Rappuoli, R., and Giannini, G. (1983) The complete nucleotide sequence of the gene coding for diphtheria toxin in the corynebacteriophage omega (tox+) genome, *Nucleic Acids Res.*, **11**, 6589-6595, doi: 10.1093/nar/11.19.6589.
 27. Uchida, T., Pappenheimer, A. M., Jr., and Greany, R. (1973) Diphtheria toxin and related proteins. I. Isolation and properties of mutant proteins serologically related to diphtheria toxin, *J. Biol. Chem.*, **248**, 3838-3844, doi: 10.1016/S0021-9258(19)43810-6.
 28. Hu, V. W., and Holmes, R. K. (1987) Single mutation in the A domain of diphtheria toxin results in a protein with altered membrane insertion behavior,

- Biochim. Biophys. Acta*, **902**, 24-30, doi: 10.1016/0005-2736(87)90132-5.
29. Khatuntseva, E. A., and Nifantiev, N. E. (2022) Cross reacting material (CRM197) as a carrier protein for carbohydrate conjugate vaccines targeted at bacterial and fungal pathogens, *Int. J. Biol. Macromol.*, **218**, 775-798, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.07.137.
 30. Sundaran, B., Rao, Y. U., and Boopathy, R. (2001) Process optimization for enhanced production of diphtheria toxin by submerged cultivation, *J. Biosci. Bioengin.*, **91**, 123-128, doi: 10.1263/jbb.91.123.
 31. Suwanpatcharakul, M., Pakdeecharoen, C., Visuttitewin, S., Pesirikan, N., Chauvatcharin, S., and Pongtharangkul, T. (2016) Process optimization for an industrial-scale production of Diphtheria toxin by *Corynebacterium diphtheriae* PW8, *Biologicals*, **44**, 534-539, doi: 10.1016/j.biologicals.2016.08.002.
 32. Tchorbanov, A. I., Dimitrov, J. D., and Vassilev, T. L. (2004) Optimization of casein-based semisynthetic medium for growing of toxigenic *Corinebacterium diphtheriae* in a fermenter, *Can. J. Microbiol.*, **50**, 821-826, doi: 10.1139/w04-061.
 33. Rappuoli, R., Perugini, M., Marsili, I., and Fabbiani, S. (1983) Rapid purification of diphtheria toxin by phenyl sepharose and DEAE-cellulose chromatography, *J. Chromatogr.*, **268**, 543-548, doi: 10.1016/S0021-9673(01)95457-3.
 34. Zhou, J., and Petracca, R. (1999) Secretory expression of recombinant diphtheria toxin mutants in *B. subtilis*, *J. Tongji Med. Univ.*, **19**, 253-256, doi: 10.1007/bf02886955.
 35. Orr, N., Galen, J. E., and Levine, M. M. (1999) Expression and immunogenicity of a mutant diphtheria toxin molecule, CRM(197), and its fragments in *Salmonella typhi* vaccine strain CVD 908-htrA, *Infect. Immun.*, **67**, 4290-4294, doi: 10.1128/iai.67.8.4290-4294.1999.
 36. Stefan, A., Conti, M., Rubboli, D., Ravagli, L., Presta, E., and Hochkoeppler, A. (2011) Overexpression and purification of the recombinant diphtheria toxin variant CRM197 in *Escherichia coli*, *J. Biotechnol.*, **156**, 245-252, doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.08.024.
 37. Mahamad, P., Boonchird, C., and Panbangred, W. (2016) High level accumulation of soluble diphtheria toxin mutant (CRM197) with co-expression of chaperones in recombinant *Escherichia coli*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **100**, 6319-6330, doi: 10.1007/s00253-016-7453-4.
 38. Xu, L., Zhang, J., Yu, R., and Su, Z. (2017) Expression of CRM197 in *E. coli* system and its application in universal influenza vaccine, *Chin. J. Process Eng.*, **17**, 1054-1058.
 39. Goffin, P., Dewerchin, M., De Rop, P., Blais, N., and Dehottay, P. (2017) High-yield production of recombinant CRM197, a non-toxic mutant of diphtheria toxin, in the periplasm of *Escherichia coli*, *Biotechnol. J.*, **12**, 1700168, doi: 10.1002/biot.201700168.
 40. Roth, R., van Zyl, P., Tsekoa, T., Stoychev, S., Mamputha, S., Buthelezi, S., and Crampton, M. (2017) Co-expression of sulphhydryl oxidase and protein disulphide isomerase in *Escherichia coli* allows for production of soluble CRM(197), *J. Appl. Microbiol.*, **122**, 1402-1411, doi: 10.1111/jam.13441.
 41. Mishra, R. P. N., Yadav, R. S. P., Jones, C., Nocadello, S., Minasov, G., Shuvalova, L. A., Anderson, W. F., and Goel, A. (2018) Structural and immunological characterization of *E. coli* derived recombinant CRM(197) protein used as carrier in conjugate vaccines, *Biosci. Rep.*, **38**, BSR20180238, doi: 10.1042/bsr20180238.
 42. Park, A. R., Jang, S. W., Kim, J. S., Park, Y. G., Koo, B. S., and Lee, H. C. (2018) Efficient recovery of recombinant CRM197 expressed as inclusion bodies in *E. coli*, *PLoS One*, **13**, e0201060, doi: 10.1371/journal.pone.0201060.
 43. Fang, T., Tao, Z., Liu, Y., Yu, C., Zhi, R., and Yu, R. (2018) Expression, purification and characterization of diphtheria toxin mutant CRM197 in *Escherichia coli*, *Chinese J. Biotechnol.*, **34**, 561-568, doi: 10.13345/j.cjb.170333.
 44. Chai, P., Pu, X., Ge, J., Ren, S., Xia, X., Luo, A., Wang, S., Wang, X., and Li, J. (2021) The recombinant protein combined vaccine based on the fragment C of tetanus toxin and the cross-reacting material 197, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **105**, 1683-1692, doi: 10.1007/s00253-021-11139-8.
 45. Khodak, Y. A., Ryazanova, A. Y., Vorobiev, I. I., Kovalchuk, A. L., Ovechko, N. N., and Aparin, P. G. (2023) High-level production of soluble cross-reacting material 197 in *Escherichia coli* cytoplasm due to fine tuning of the target gene's mRNA structure, *Biotech*, **12**, 9, doi: 10.3390/biotech12010009.
 46. Retallack, D.M., Chew, L., Jin, H. (2010) *High Level Expression of Recombinant CRM197*. Patent No. WO 2011/123139 A1.
 47. Духовлинов И. В., Богомолова Е. Г., Добровольская О. А., Ищук С. А., Федорова Е. А., Климов Н. А., Симбирцев А. С. (2018) Изучение продукции нетоксичного варианта дифтерийного токсина CRM197 в клетках *Escherichia coli*, *Медицинский академический журнал*, **18**, 64-70.
 48. Духовлинов И. В., Федорова Е. А., Богомолова Е. Г., Добровольская О. А., Черняева Е. Н., Аль-Шехадат Р. И., Симбирцев А. С. (2015) Получение рекомбинантного белка CRM197 в клетках *E. coli*, *Инфекция и иммунитет*, **5**, 37-44.
 49. Baglioni, P., Hochkoeppler, A., and Stefan, A. (2010) *Bacterial expression of an artificial gene for the production of CRM197 and its derivatives*. Patent No. WO 2010/150230 A1.
 50. Lee, H. C., Koo, B. S., Seo, H. J., Kim, J. S., Park, A. R., and Jang, S. W. (2019) *Method for Efficiently Recovering and Purifying Active CRM197 from*

- Insoluble CRM197 Protein Expressed in Inclusion Body*. Patent No. WO 2019/151601 A1.
51. Akshay, G., Ravi, P. N. M., Narender, D. M., and Mahima, D. (2016) *Codon optimized polynucleotide for high level expression of CRM197*. Patent No. WO 2016/079755 A1.
 52. Moxiao, L., Xue, Z., Donghai, W., Yingxia, S., Junxian, G., Jingyi, W., and Qingmin, W. (2010) *Diphtheria Toxin Muton CRM197 and Its Preparation Process*. Patent No. CN 100999548 A.
 53. Jingyi, W., Lixia, S., Tongwen, X., Ting, D., Xue, Z., and Kebo, W. (2012) *Method for Purifying CRM197 Mutant*. Patent No. CN 101265288 B.
 54. Lin, F., Xiao, J., and Wei, W. (2013) *Preparation Method of Diphtheria Toxin Mutant CRM197*. Patent No. CN 103266125 A.
 55. Mao, H. (2018) *The Preparation Method of Diphtheria Toxin Muton CRM 197* Patent No. CN 104140972 B.
 56. Akshay, G., Tushar, J., Krishnanad, T., Yogesh, M., Narender, D. M., and Mahima, D. (2017) *Industrially Scalable process for Recovering Biologically Active Recombinant Carrier Proteins*. Patent No. WO 2017/081700 A1.
 57. Blattner, C. R., Frisch, D. A., Novy, R. E., Henker, T. M., Steffen, E. A., Blattner, F. R., Choi, H., Posfai, G., and Landry, C. F. (2015) *Enhanced Production of Recombinant CRM197 in E. coli*. Patent No. WO 2015/134402 A1.
 58. Blais, N., Dehottay, P. M. H., Dewerchin, M., Goffin, P., and Martin, D. (2011) *Expression System*. Patent No. WO 2011/042516 A2.
 59. Ihssen, J., Kowarik, M., and Thony-Meyer, L.C. (2014) *Methods and Compositions Relating to CRM197*. Patent No. WO 2014/102265 A1.
 60. Hsu, Y., Sheu, S., Lei, B., and Wu, T. (2015) *Development of the Soluble Recombinant CRM197 Production by E. coli*. Patent No. US 2015/0184215 A1.
 61. Masson, L., Arbour, M., and Gauriat, M. (2019) *Systems and Methods for the Production of Diphtheria Toxin Polypeptides*. Patent No. WO 2019/035058 A1.
 62. Boock, J. T., Waraho-Zhmayev, D., Mizrachi, D., and DeLisa, M. P. (2015) Beyond the cytoplasm of *Escherichia coli*: localizing recombinant proteins where you want them, *Methods Mol. Biol.*, **1258**, 79-97, doi: 10.1007/978-1-4939-2205-5_5.
 63. Graham, L. L., Beveridge, T. J., and Nanninga, N. (1991) Periplasmic space and the concept of the periplasm, *Trends Biochem. Sci.*, **16**, 328-329, doi: 10.1016/0968-0004(91)90135-i.
 64. Oganessian, N., and Lees, A. (2015) *Expression and Purification of CRM197 and Related Proteins*. Patent No. WO 2015/117093 A1.
 65. Goretzki, K., and Habermann, E. (1985) Enzymatic hydrolysis of tetanus toxin by intrinsic and extrinsic proteases. Characterization of the fragments by monoclonal antibodies, *Med. Microbiol. Immunol.*, **174**, 139-150, doi: 10.1007/bf02298124.
 66. Bagetta, G., and Nisticò, G. (1994) Tetanus toxin as a neurobiological tool to study mechanisms of neuronal cell death in the mammalian brain, *Pharmacol. Ther.*, **62**, 29-39, doi: 10.1016/0163-7258(94)90003-5.
 67. Cohen, J. E., Wang, R., Shen, R. F., Wu, W. W., and Keller, J. E. (2017) Comparative pathogenomics of *Clostridium tetani*, *PLoS One*, **12**, e0182909, doi: 10.1371/journal.pone.0182909.
 68. Roper, M. H., Wassilak, S. G. F., Tiwari, T. S. P., and Orenstein, W. A. (2017) *Tetanus Toxoid*, 7th Edn., Elsevier, Philadelphia, PA, USA.
 69. Bayart, C., Peronin, S., Jean, E., Paladino, J., Talaga, P., and Borgne, M. L. (2017) The combined use of analytical tools for exploring tetanus toxin and tetanus toxoid structures, *J. Chromatogr.*, **1054**, 80-92, doi: 10.1016/j.jchromb.2017.04.009.
 70. Kaumaya, P. T., Kobs-Conrad, S., Seo, Y. H., Lee, H., VanBuskirk, A. M., Feng, N., Sheridan, J. F., and Stevens, V. (1993) Peptide vaccines incorporating a "promiscuous" T-cell epitope bypass certain haplotype restricted immune responses and provide broad spectrum immunogenicity, *J. Mol. Recognit.*, **6**, 81-94, doi: 10.1002/jmr.300060206.
 71. Franke, E. D., Corradin, G., and Hoffman, S. L. (1997) Induction of protective CTL responses against the *Plasmodium yoelii* circumsporozoite protein by immunization with peptides, *J. Immunol.*, **159**, 3424-3433, doi: 10.4049/jimmunol.159.7.3424.
 72. Wen, X., Wen, K., Cao, D., Li, G., Jones, R. W., Li, J., Szu, S., Hoshino, Y., and Yuan, L. (2014) Inclusion of a universal tetanus toxoid CD4⁺ T cell epitope P2 significantly enhanced the immunogenicity of recombinant rotavirus ΔVP8* subunit parenteral vaccines, *Vaccine*, **32**, 4420-4427, doi: 10.1016/j.vaccine.2014.06.060.
 73. Su, Q. D., Zou, Y. N., Yi, Y., Shen, L. P., Ye, X. Z., Zhang, Y., Wang, H., Ke, H., Song, J. D., Hu, K. P., Cheng, B. L., Qiu, F., Yu, P. C., Zhou, W. T., Zhao, R., Cao, L., Dong, G. F., Bi, S. L., Wu, G. Z., Gao, G. F., et al. (2021) Recombinant SARS-CoV-2 RBD with a built in T helper epitope induces strong neutralization antibody response, *Vaccine*, **39**, 1241-1247, doi: 10.1016/j.vaccine.2021.01.044.
 74. Ashton, A. C., Li, Y., Doussau, F., Weller, U., Dougan, G., Poulain, B., and Dolly, J. O. (1995) Tetanus toxin inhibits neuroexocytosis even when its Zn²⁺-dependent protease activity is removed, *J. Biol. Chem.*, **270**, 31386-31390, doi: 10.1074/jbc.270.52.31386.
 75. Li, Y., Aoki, R., and Dolly, J. O. (1999) Expression and characterisation of the heavy chain of tetanus toxin: reconstitution of the fully-recombinant dichain protein in active form, *J. Biochem.*, **125**, 1200-1208, doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022404.
 76. Li, Y., Foran, P., Lawrence, G., Mohammed, N., Chan-Kwo-Chion, C. K., Lisk, G., Aoki, R., and Dolly, O. (2001) Recombinant forms of tetanus toxin engineered for examining and exploiting neuronal

- trafficking pathways, *J. Biol. Chem.*, **276**, 31394-31401, doi: 10.1074/jbc.M103517200.
77. Blum, F. C., Przedpelski, A., Tepp, W. H., Johnson, E. A., and Barbieri, J. T. (2014) Entry of a recombinant, full-length, atoxic tetanus neurotoxin into Neuro-2a cells, *Infect. Immun.*, **82**, 873-881, doi: 10.1128/iai.01539-13.
 78. Przedpelski, A., Tepp, W. H., Pellett, S., Johnson, E. A., and Barbieri, J. T. (2020) A novel high-potency tetanus vaccine, *mBio*, **11**, doi: 10.1128/mBio.01668-20.
 79. Chang, M. J., Ollivault-Shiflett, M., Schuman, R., Ngoc Nguyen, S., Kaltashov, I. A., Bobst, C., Rajagopal, S. P., Przedpelski, A., Barbieri, J. T., and Lees, A. (2022) Genetically detoxified tetanus toxin as a vaccine and conjugate carrier protein, *Vaccine*, **40**, 5103-5113, doi: 10.1016/j.vaccine.2022.07.011.
 80. Chang, M., Oganessian, N., and Lees, A. (2021) *Production of Soluble Recombinant Protein*. Patent No. WO 2021/188379 A2.
 81. Janson, H., Hedén, L. O., Grubb, A., Ruan, M. R., and Forsgren, A. (1991) Protein D, an immunoglobulin D-binding protein of *Haemophilus influenzae*: cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli*, *Infect. Immun.*, **59**, 119-125, doi: 10.1128/iai.59.1.119-125.1991.
 82. Munson, R. S., Jr., and Sasaki, K. (1993) Protein D, a putative immunoglobulin D-binding protein produced by *Haemophilus influenzae*, is glycerophosphodiester phosphodiesterase, *J. Bacteriol.*, **175**, 4569-4571, doi: 10.1128/jb.175.14.4569-4571.1993.
 83. Janson, H., Hedén, L. O., and Forsgren, A. (1992) Protein D, the immunoglobulin D-binding protein of *Haemophilus influenzae*, is a lipoprotein, *Infect. Immun.*, **60**, 1336-1342, doi: 10.1128/iai.60.4.1336-1342.1992.
 84. Akkoyunlu, M., Janson, H., Ruan, M., and Forsgren, A. (1996) Biological activity of serum antibodies to a nonacylated form of lipoprotein D of *Haemophilus influenzae*, *Infect. Immun.*, **64**, 4586-4592, doi: 10.1128/iai.64.11.4586-4592.1996.
 85. Behrouzi, A., Bouzari, S., Siadat, S. D., Jafari, A., and Irani, S. (2015) Molecular cloning, expression and purification of truncated hpd fragment of *Haemophilus influenzae* in *Escherichia coli*, *Jundishapur J. Microbiol.*, **8**, e23218, doi: 10.5812/jjm.23218.
 86. Akkoyunlu, M., Melhus, A., Capiou, C., van Opstal, O., and Forsgren, A. (1997) The acylated form of protein D of *Haemophilus influenzae* is more immunogenic than the nonacylated form and elicits an adjuvant effect when it is used as a carrier conjugated to polyribosyl ribitol phosphate, *Infect. Immun.*, **65**, 5010-5016, doi: 10.1128/iai.65.12.5010-5016.1997.
 87. Croxtall, J. D., and Keating, G. M. (2009) Pneumococcal polysaccharide protein D-conjugate vaccine (Synflorix; PHiD-CV), *Paediatric Drugs*, **11**, 349-357, doi: 10.2165/11202760-000000000-00000.
 88. Novotny, L. A., Jurcisek, J. A., Godfroid, F., Poolman, J. T., Denoël, P. A., and Bakaletz, L. O. (2006) Passive immunization with human anti-protein D antibodies induced by polysaccharide protein D conjugates protects chinchillas against otitis media after intranasal challenge with *Haemophilus influenzae*, *Vaccine*, **24**, 4804-4811, doi: 10.1016/j.vaccine.2006.03.021.
 89. Nurkka, A., Joensuu, J., Henckaerts, I., Peeters, P., Poolman, J., Kilpi, T., and Käyhty, H. (2004) Immunogenicity and safety of the eleven valent pneumococcal polysaccharide-protein D conjugate vaccine in infants, *Pediatric Infect. Dis. J.*, **23**, 1008-1014, doi: 10.1097/01.inf.0000143640.03214.18.
 90. Prymula, R., Peeters, P., Chrobok, V., Kriz, P., Novakova, E., Kaliskova, E., Kohl, I., Lommel, P., Poolman, J., Prieels, J. P., and Schuerman, L. (2006) Pneumococcal capsular polysaccharides conjugated to protein D for prevention of acute otitis media caused by both *Streptococcus pneumoniae* and non-typable *Haemophilus influenzae*: a randomised double-blind efficacy study, *Lancet*, **367**, 740-748, doi: 10.1016/s0140-6736(06)68304-9.
 91. Einhorn, M. S., Weinberg, G. A., Anderson, E. L., Granoff, P. D., and Granoff, D. M. (1986) Immunogenicity in infants of *Haemophilus influenzae* type B polysaccharide in a conjugate vaccine with *Neisseria meningitidis* outer-membrane protein, *Lancet*, **2**, 299-302, doi: 10.1016/s0140-6736(86)90001-2.
 92. Granoff, D. M., Anderson, E. L., Osterholm, M. T., Holmes, S. J., McHugh, J. E., Belshe, R. B., Medley, F., and Murphy, T. V. (1992) Differences in the immunogenicity of three *Haemophilus influenzae* type B conjugate vaccines in infants, *J. Pediatrics*, **121**, 187-194, doi: 10.1016/s0022-3476(05)81186-2.
 93. Liu, M. A., Friedman, A., Oliff, A. I., Tai, J., Martinez, D., Deck, R. R., Shieh, J. T., Jenkins, T. D., Donnelly, J. J., and Hawe, L. A. (1992) A vaccine carrier derived from *Neisseria meningitidis* with mitogenic activity for lymphocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 4633-4637, doi: 10.1073/pnas.89.10.4633.
 94. Qi, H. L., Tai, J. Y., and Blake, M. S. (1994) Expression of large amounts of neisserial porin proteins in *Escherichia coli* and refolding of the proteins into native trimers, *Infect. Immun.*, **62**, 2432-2439, doi: 10.1128/iai.62.6.2432-2439.1994.
 95. Fusco, P. C., Michon, F., Laude-Sharp, M., Minetti, C. A., Huang, C. H., Heron, I., and Blake, M. S. (1998) Preclinical studies on a recombinant group B meningococcal porin as a carrier for a novel *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine, *Vaccine*, **16**, 1842-1849, doi: 10.1016/s0264-410x(98)00174-1.
 96. Fusco, P. C., Michon, F., Tai, J. Y., and Blake, M. S. (1997) Preclinical evaluation of a novel group B meningococcal conjugate vaccine that elicits bactericidal activity in both mice and nonhuman primates, *J. Infect. Dis.*, **175**, 364-372, doi: 10.1093/infdis/175.2.364.

97. Xia, M., Wei, C., Wang, L., Cao, D., Meng, X. J., Jiang, X., and Tan, M. (2016) Development and evaluation of two subunit vaccine candidates containing antigens of hepatitis E virus, rotavirus, and astrovirus, *Sci. Rep.*, **6**, 25735, doi: 10.1038/srep25735.
98. Ferrari, G., Garaguso, I., Adu-Bobie, J., Doro, F., Taddei, A. R., Biolchi, A., Brunelli, B., Giuliani, M. M., Pizza, M., Norais, N., and Grandi, G. (2006) Outer membrane vesicles from group B *Neisseria meningitidis* delta gna33 mutant: proteomic and immunological comparison with detergent-derived outer membrane vesicles, *Proteomics*, **6**, 1856-1866, doi: 10.1002/pmic.200500164.
99. Gerke, C., Colucci, A. M., Giannelli, C., Sanzone, S., Vitali, C. G., Sollai, L., Rossi, O., Martin, L. B., Auerbach, J., Di Cioccio, V., and Saul, A. (2015) Production of a *Shigella sonnei* vaccine based on generalized modules for membrane antigens (GMMA), 1790GAHB, *PLoS One*, **10**, e0134478, doi: 10.1371/journal.pone.0134478.
100. Rossi, O., Pesce, I., Giannelli, C., Aprea, S., Caboni, M., Citiulo, F., Valentini, S., Ferlenghi, I., MacLennan, C. A., D'Oro, U., Saul, A., and Gerke, C. (2014) Modulation of endotoxicity of *Shigella* generalized modules for membrane antigens (GMMA) by genetic lipid A modifications: relative activation of TLR4 and TLR2 pathways in different mutants, *J. Biol. Chem.*, **289**, 24922-24935, doi: 10.1074/jbc.M114.566570.
101. Berlanda Scorza, F., Doro, F., Rodríguez-Ortega, M. J., Stella, M., Liberatori, S., Taddei, A. R., Serino, L., Gomes Moriel, D., Nesta, B., Fontana, M. R., Spagnuolo, A., Pizza, M., Norais, N., and Grandi, G. (2008) Proteomics characterization of outer membrane vesicles from the extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* DeltatolR IHE3034 mutant, *Mol. Cell. Proteomics*, **7**, 473-485, doi: 10.1074/mcp.M700295-MCP200.
102. Van de Waterbeemd, B., Streefland, M., van der Ley, P., Zomer, B., van Dijken, H., Martens, D., Wijffels, R., and van der Pol, L. (2010) Improved OMV vaccine against *Neisseria meningitidis* using genetically engineered strains and a detergent-free purification process, *Vaccine*, **28**, 4810-4816, doi: 10.1016/j.vaccine.2010.04.082.
103. Keiser, P. B., Biggs-Cicatelli, S., Moran, E. E., Schmiel, D. H., Pinto, V. B., Burden, R. E., Miller, L. B., Moon, J. E., Bowden, R. A., Cummings, J. F., and Zollinger, W. D. (2011) A phase I study of a meningococcal native outer membrane vesicle vaccine made from a group B strain with deleted lpxL1 and synX, over-expressed factor H binding protein, two PorAs and stabilized OpcA expression, *Vaccine*, **29**, 1413-1420, doi: 10.1016/j.vaccine.2010.12.039.
104. Berlanda Scorza, F., Colucci, A. M., Maggiore, L., Sanzone, S., Rossi, O., Ferlenghi, I., Pesce, I., Caboni, M., Norais, N., Di Cioccio, V., Saul, A., and Gerke, C. (2012) High yield production process for *Shigella* outer membrane particles, *PLoS One*, **7**, e35616, doi: 10.1371/journal.pone.0035616.
105. Koeberling, O., Ispasanie, E., Hauser, J., Rossi, O., Pluschke, G., Caugant, D. A., Saul, A., and MacLennan, C. A. (2014) A broadly-protective vaccine against meningococcal disease in sub-Saharan Africa based on generalized modules for membrane antigens (GMMA), *Vaccine*, **32**, 2688-2695, doi: 10.1016/j.vaccine.2014.03.068.
106. Rossi, O., Caboni, M., Negrea, A., Necchi, F., Alfini, R., Micoli, F., Saul, A., MacLennan, C. A., Rondini, S., and Gerke, C. (2016) Toll-like receptor activation by generalized modules for membrane antigens from lipid A mutants of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis, *Clin. Vaccine Immunol.*, **23**, 304-314, doi: 10.1128/cvi.00023-16.
107. Rosenthal, J. A., Huang, C. J., Doody, A. M., Leung, T., Mineta, K., Feng, D. D., Wayne, E. C., Nishimura, N., Leifer, C., DeLisa, M. P., Mendez, S., and Putnam, D. (2014) Mechanistic insight into the TH1-biased immune response to recombinant subunit vaccines delivered by probiotic bacteria-derived outer membrane vesicles, *PLoS One*, **9**, e112802, doi: 10.1371/journal.pone.0112802.
108. Rappazzo, C. G., Watkins, H. C., Guarino, C. M., Chau, A., Lopez, J. L., DeLisa, M. P., Leifer, C. A., Whittaker, G. R., and Putnam, D. (2016) Recombinant M2e outer membrane vesicle vaccines protect against lethal influenza A challenge in BALB/c mice, *Vaccine*, **34**, 1252-1258, doi: 10.1016/j.vaccine.2016.01.028.
109. Gujrati, V., Kim, S., Kim, S. H., Min, J. J., Choy, H. E., Kim, S. C., and Jon, S. (2014) Bioengineered bacterial outer membrane vesicles as cell-specific drug-delivery vehicles for cancer therapy, *ACS Nano*, **8**, 1525-1537, doi: 10.1021/nn405724x.
110. Daleke-Schermerhorn, M. H., Felix, T., Soprova, Z., Ten Hagen-Jongman, C. M., Vikström, D., Majlessi, L., Beskers, J., Follmann, F., de Punder, K., van der Wel, N. N., Baumgarten, T., Pham, T. V., Piersma, S. R., Jiménez, C. R., van Ulsen, P., de Gier, J. W., Leclerc, C., Jong, W. S., and Luirink, J. (2014) Decoration of outer membrane vesicles with multiple antigens by using an autotransporter approach, *Appl. Environ. Microbiol.*, **80**, 5854-5865, doi: 10.1128/aem.01941-14.
111. Gnopo, Y. M. D., Watkins, H. C., Stevenson, T. C., DeLisa, M. P., and Putnam, D. (2017) Designer outer membrane vesicles as immunomodulatory systems – reprogramming bacteria for vaccine delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **114**, 132-142, doi: 10.1016/j.addr.2017.05.003.
112. Micoli, F., Alfini, R., Di Benedetto, R., Necchi, F., Schiavo, F., Mancini, F., Carducci, M., Palmieri, E., Balocchi, C., Gasperini, G., Brunelli, B., Costantino, P., Adamo, R., Piccioli, D., and Saul, A. (2020)

- GMMA is a versatile platform to design effective multivalent combination vaccines, *Vaccines*, **8**, 540, doi: 10.3390/vaccines8030540.
113. Jiang, L., Driedonks, T. A. P., Jong, W. S. P., Dhakal, S., Bart van den Berg van Saparoea, H., Sitaras, I., Zhou, R., Caputo, C., Littlefield, K., Lowman, M., Chen, M., Lima, G., Gololobova, O., Smith, B., Mahairaki, V., Riley Richardson, M., Mulka, K. R., Lane, A. P., Klein, S. L., Pekosz, A., et al. (2022) A bacterial extracellular vesicle-based intranasal vaccine against SARS-CoV-2 protects against disease and elicits neutralizing antibodies to wild-type and Delta variants, *J. Extracell. Vesicles*, **11**, e12192, doi: 10.1002/jev2.12192.
 114. Scaria, P. V., Rowe, C. G., Chen, B. B., Muratova, O. V., Fischer, E. R., Barnafo, E. K., Anderson, C. F., Zaidi, I. U., Lambert, L. E., Lucas, B. J., Nahas, D. D., Narum, D. L., and Duffy, P. E. (2019) Outer membrane protein complex as a carrier for malaria transmission blocking antigen Pfs230, *NPJ Vaccines*, **4**, 24, doi: 10.1038/s41541-019-0121-9.
 115. Palmieri, E., Kis, Z., Ozanne, J., Di Benedetto, R., Ricchetti, B., Massai, L., Carducci, M., Oldrini, D., Gasperini, G., Aruta, M. G., Rossi, O., Kontoravdi, C., Shah, N., Mawas, F., and Micoli, F. (2022) GMMA as an alternative carrier for a glycoconjugate vaccine against group A streptococcus, *Vaccines*, **10**, 1034, doi: 10.3390/vaccines10071034.
 116. Micoli, F., Alfini, R., Di Benedetto, R., Necchi, F., Schiavo, F., Mancini, F., Carducci, M., Oldrini, D., Pitirollo, O., Gasperini, G., Balocchi, C., Bechi, N., Brunelli, B., Piccioli, D., and Adamo, R. (2021) Generalized modules for membrane antigens as carrier for polysaccharides: impact of sugar length, density, and attachment site on the immune response elicited in animal models, *Front. Immunol.*, **12**, 719315, doi: 10.3389/fimmu.2021.719315.
 117. Pavliakova, D., Moncrief, J. S., Lyerly, D. M., Schiffman, G., Bryla, D. A., Robbins, J. B., and Schneerson, R. (2000) *Clostridium difficile* recombinant toxin A repeating units as a carrier protein for conjugate vaccines: studies of pneumococcal type 14, *Escherichia coli* K1, and *Shigella flexneri* type 2a polysaccharides in mice, *Infect. Immun.*, **68**, 2161-2166, doi: 10.1128/iai.68.4.2161-2166.2000.
 118. Lukac, M., Pier, G. B., and Collier, R. J. (1988) Toxoid of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A generated by deletion of an active-site residue, *Infect. Immun.*, **56**, 3095-3098, doi: 10.1128/iai.56.12.3095-3098.1988.
 119. Lukac, M., and Collier, R. J. (1988) Restoration of enzymic activity and cytotoxicity of mutant, E553C, *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A by reaction with iodoacetic acid, *J. Biol. Chem.*, **263**, 6146-6149, doi: 10.1016/S0021-9258(18)68762-9.
 120. Burkhardt, M., Reiter, K., Nguyen, V., Suzuki, M., Herrera, R., Duffy, P. E., Shimp, R., Jr., MacDonald, N. J., Olano, L. R., and Narum, D. L. (2019) Assessment of the impact of manufacturing changes on the physicochemical properties of the recombinant vaccine carrier ExoProtein A, *Vaccine*, **37**, 5762-5769, doi: 10.1016/j.vaccine.2018.09.037.
 121. Margarit, I., Rinaudo, C. D., Galeotti, C. L., Maione, D., Ghezzi, C., Buttazzoni, E., Rosini, R., Runci, Y., Mora, M., Buccato, S., Pagani, M., Tresoldi, E., Berardi, A., Creti, R., Baker, C. J., Telford, J. L., and Grandi, G. (2009) Preventing bacterial infections with pilus-based vaccines: the group B streptococcus paradigm, *J. Infect. Dis.*, **199**, 108-115, doi: 10.1086/595564.
 122. Park, W. J., Yoon, Y. K., Park, J. S., Pansuriya, R., Seok, Y. J., and Ganapathy, R. (2021) Rotavirus spike protein Δ VP8* as a novel carrier protein for conjugate vaccine platform with demonstrated antigenic potential for use as bivalent vaccine, *Sci. Rep.*, **11**, 22037, doi: 10.1038/s41598-021-01549-z.
 123. Carvalho, R. J., Cabrera-Crespo, J., Tanizaki, M. M., and Gonçalves, V. M. (2012) Development of production and purification processes of recombinant fragment of pneumococcal surface protein A in *Escherichia coli* using different carbon sources and chromatography sequences, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **94**, 683-694, doi: 10.1007/s00253-011-3649-9.
 124. Khan, M. N., and Pichichero, M. E. (2012) Vaccine candidates PhtD and PhtE of *Streptococcus pneumoniae* are adhesins that elicit functional antibodies in humans, *Vaccine*, **30**, 2900-2907, doi: 10.1016/j.vaccine.2012.02.023.
 125. Feng, S., Xiong, C., Wang, G., Wang, S., Jin, G., and Gu, G. (2020) Exploration of recombinant fusion proteins YAPO and YAPL as carrier proteins for glycoconjugate vaccine design against *Streptococcus pneumoniae* infection, *ACS Infect. Dis.*, **6**, 2181-2191, doi: 10.1021/acsinfectdis.0c00260.
 126. Kapoor, N., Uchiyama, S., Pill, L., Bautista, L., Sedra, A., Yin, L., Regan, M., Chu, E., Rabara, T., Wong, M., Davey, P., Fairman, J., and Nizet, V. (2022) Non-native amino acid click chemistry-based technology for site-specific polysaccharide conjugation to a bacterial protein serving as both carrier and vaccine antigen, *ACS Omega*, **7**, 24111-24120, doi: 10.1021/acsomega.1c07360.
 127. Qian, W., Huang, Z., Chen, Y., Yang, J., Wang, L., Wu, K., Chen, M., Chen, N., Duan, Y., Shi, J., Zhang, Y., and Li, Q. (2020) Elicitation of integrated immunity in mice by a novel pneumococcal polysaccharide vaccine conjugated with HBV surface antigen, *Sci. Rep.*, **10**, 6470, doi: 10.1038/s41598-020-62185-7.
 128. Tsai, C. W., Duggan, P. F., Shimp, R. L., Jr., Miller, L. H., and Narum, D. L. (2006) Overproduction of *Pichia pastoris* or *Plasmodium falciparum* protein disulfide isomerase affects expression, folding and O-linked glycosylation of a malaria vaccine candidate

- expressed in *P. pastoris*, *J. Biotechnol.*, **121**, 458-470, doi: 10.1016/j.jbiotec.2005.08.025.
129. Prasanna, M., Podsiadla-Bialoskorska, M., Milecki, D., Ruffier, N., Fateh, A., Lambert, A., Fanuel, M., Camberlein, E., Szolajska, E., and Grandjean, C. (2021) On the use of adenovirus dodecahedron as a carrier for glycoconjugate vaccines, *Glycoconjugate J.*, **38**, 437-446, doi: 10.1007/s10719-021-09999-3.
 130. Astronomo, R. D., Kaltgrad, E., Udit, A. K., Wang, S. K., Doores, K. J., Huang, C. Y., Pantophlet, R., Paulson, J. C., Wong, C. H., Finn, M. G., and Burton, D. R. (2010) Defining criteria for oligomannose immunogens for HIV using icosahedral virus capsid scaffolds, *Chem. Biol.*, **17**, 357-370, doi: 10.1016/j.chembiol.2010.03.012.
 131. Sungsuwan, S., Wu, X., and Huang, X. (2017) Evaluation of virus-like particle-based tumor-associated carbohydrate immunogen in a mouse tumor model, *Methods Enzymol.*, **597**, 359-376, doi: 10.1016/bs.mie.2017.06.030.
 132. Yin, Z., and Huang, X. (2012) Recent development in carbohydrate based anti-cancer vaccines, *J. Carbohydr. Chem.*, **31**, 143-186, doi: 10.1080/07328303.2012.659364.
 133. Li, M., Cripe, T. P., Estes, P. A., Lyon, M. K., Rose, R. C., and Garcea, R. L. (1997) Expression of the human papillomavirus type 11 L1 capsid protein in *Escherichia coli*: characterization of protein domains involved in DNA binding and capsid assembly, *J. Virol.*, **71**, 2988-2995, doi: 10.1128/jvi.71.4.2988-2995.1997.
 134. Edman, J. C., Hallewell, R. A., Valenzuela, P., Goodman, H. M., and Rutter, W. J. (1981) Synthesis of hepatitis B surface and core antigens in *E. coli*, *Nature*, **291**, 503-506, doi: 10.1038/291503a0.
 135. Chen, X., Zhou, W., He, Q., Su, B., Zou, Y. (2021) Preparation, purification and identification of bacteriophage Q β virus-like particles, *China Biotechnol.*, **41**, 42-49, doi: 10.13523/j.cb.2103034.
 136. Kirnbauer, R., Booy, F., Cheng, N., Lowy, D. R., and Schiller, J. T. (1992) Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 12180-12184, doi: 10.1073/pnas.89.24.12180.
 137. Harding, C. M., and Feldman, M. F. (2019) Glycoengineering bioconjugate vaccines, therapeutics, and diagnostics in *E. coli*, *Glycobiology*, **29**, 519-529, doi: 10.1093/glycob/cwz031.
 138. Riddle, M. S., Kaminski, R. W., Di Paolo, C., Porter, C. K., Gutierrez, R. L., Clarkson, K. A., Weerts, H. E., Duplessis, C., Castellano, A., Alaimo, C., Paolino, K., Gormley, R., and Gambillara Fonck, V. (2016) Safety and immunogenicity of a candidate bioconjugate vaccine against *Shigella flexneri* 2a administered to healthy adults: a single-blind, randomized phase I study, *Clin. Vaccine Immunol.*, **23**, 908-917, doi: 10.1128/cvi.00224-16.
 139. Huttner, A., Hatz, C., van den Dobbelen, G., Abbanat, D., Hornacek, A., Frölich, R., Dreyer, A. M., Martin, P., Davies, T., Fae, K., van den Nieuwenhof, I., Thoelen, S., de Vallière, S., Kuhn, A., Bernasconi, E., Viereck, V., Kavvadias, T., Kling, K., Ryu, G., Hülder, T., et al. (2017) Safety, immunogenicity, and preliminary clinical efficacy of a vaccine against extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in women with a history of recurrent urinary tract infection: a randomised, single-blind, placebo-controlled phase 1b trial, *Lancet*, **17**, 528-537, doi: 10.1016/s1473-3099(17)30108-1.
 140. Kaaijk, P., van Straaten, I., van de Waterbeemd, B., Boot, E. P., Levels, L. M., van Dijken, H. H., and van den Dobbelen, G. P. (2013) Preclinical safety and immunogenicity evaluation of a nonavalent PorA native outer membrane vesicle vaccine against serogroup B meningococcal disease, *Vaccine*, **31**, 1065-1071, doi: 10.1016/j.vaccine.2012.12.031.
 141. Королева И. С., Королева М. А. (2021) Мировой опыт применения менингококковых вакцин серогруппы В, *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*, **20**, 100-107, doi: 10.31631/2073-3046-2021-20-6-100-107.
 142. Pizza, M., Bekkat-Berkani, R., and Rappuoli, R. (2020) Vaccines against meningococcal diseases, *Microorganisms*, **8**, 1521, doi: 10.3390/microorganisms8101521.

HETEROLOGOUS EXPRESSION OF RECOMBINANT PROTEINS AND THEIR DERIVATIVES USED AS CARRIERS FOR CONJUGATE VACCINES

Review

Yu. A. Khodak

*Institute of Bioengineering, FRC Biotechnology, Russian Academy of Sciences,
117312 Moscow, Russia; e-mail: salix33@gmail.com*

The carrier proteins that provide an effective and long-term immune response to weak antigens has become a real breakthrough in disease prevention, making it available to a wider range of patients and making it possible to obtain reliable vaccines against a variety of pathogens. Currently, research is continuing both to identify new peptides, proteins, and their complexes potentially suitable for use as carriers, and to develop new methods for isolation, purification and conjugation of already known and well-proven proteins. The use of recombinant proteins has a number of advantages over isolation from natural sources, such as simpler cultivation of the host organism, the possibility of modifying the genetic construction, the use of numerous promoter variants, signal sequences, and other regulatory elements. This review is devoted to the methods of obtaining both traditional and new recombinant proteins and their derivatives being used or potentially suitable for use as carrier proteins for conjugate vaccines.

Keywords: heterologous expression of recombinant proteins, conjugate vaccines, carrier proteins

СОЗДАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ, СЕЛЕКТИВНО ПРОДУЦИРУЮЩЕЙ ФУНКЦИОНАЛЬНО АКТИВНЫЙ ТРАНСПОРТЁР OATP1B1

© 2023 М.С. Котлярова¹, А.В. Шулькин², П.Д. Ерохина², П.Ю. Мыльников²,
Е.Н. Якушева², Н.И. Надолинская¹, М.В. Замахеев¹, А.В. Гончаренко^{1*}

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт биохимии им. А.Н. Баха,
119071 Москва, Россия; электронная почта: pylaevanna@gmail.com

² Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова
Минздрава России, 390026 Рязань, Россия

Поступила в редакцию 25.05.2023

После доработки 30.06.2023

Принята к публикации 23.08.2023

Полипептид, транспортирующий органические анионы, OATP1B1 – один из важнейших белков-транспортёров, опосредующий проникновение многих эндогенных веществ и ксенобиотиков в гепатоциты. Для оценки взаимодействия OATP1B1 с различными веществами необходима модельная система, обеспечивающая экспрессию функционального белка. На основе клеток НЕК293 была получена линия НЕК293-OATP1B1, стабильно экспрессирующая ген *SLCO1B1*, кодирующий транспортёр OATP1B1. Экспрессия гена *SLCO1B1* была подтверждена с помощью ПЦР-анализа в реальном времени, а наличие белка – иммунохимически. Функциональность транспортёра была оценена по транспорту аторвастатина, являющегося субстратом OATP1B1. Полученная клеточная линия, селективно продуцирующая функционально активный рекомбинантный транспортёр OATP1B1, может быть использована для его изучения, а также для тестирования лекарственных веществ на принадлежность к субстратам, индукторам и ингибиторам OATP1B1 и оценки рисков межлекарственных взаимодействий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: белки-транспортёры, *SLCO1B1*, OATP1B1, НЕК293, трансфекция, плаزمид, межлекарственные взаимодействия.

DOI: 10.31857/S0320972523090063, **EDN:** WTOBVY

ВВЕДЕНИЕ

Мембранные белки, осуществляющие перенос молекул через клеточные мембраны, могут быть разделены на 4 типа: ионные каналы, транспортёры растворённых веществ (SLC, solute carrier family), аквапорины и АТФ-зависимые насосы. Мембранные транспортные белки присутствуют практически во всех типах эукариотических клеток и участвуют в переносе ионов, сахаров, аминокислот и других молекул через цитоплазматические мембраны, а также мембраны органелл: митохондрий, эндоплазматического ретикулума, аппарата Гольджи, везикул [1].

Все SLC-белки используют для переноса своих субстратов разность электрохимических

потенциалов или ионный градиент. Именно поэтому они относятся ко вторично-активным транспортёрам.

Среди SLC-переносчиков выделяют следующие надсемейства: SLCO (SLC21)-надсемейство (organic anion-transporting polypeptides, OATP), SLC22A-надсемейство (organic anion transporters, OAT; organic cation transporters, OCT; organic cation/carnitine transporters, OCTN), SLC15A-надсемейство (peptide transporters, PEPT) и SLC47A-надсемейство (multidrug and toxin extrusion, MATE). Члены данных надсемейств опосредуют транспорт широкого спектра соединений: OCT переносит катионы, OATP – большие и гидрофобные органические анионы, а OAT – более мелкие и более гидрофильные органические

Принятые сокращения: EGFP – улучшенный зелёный флуоресцентный белок; клетки линии НЕК293 – клетки, полученные из эмбриональных почек человека; OATP – белки-транспортёры органических анионов; OCT – белки-транспортёры органических катионов; SLC – белки-транспортёры растворённых веществ.

* Адресат для корреспонденции.

анионы, ПЕРТ отвечают в основном за транспорт ди- и трипептидов [2, 3].

Одним из наиболее клинически значимых представителей ОАТР является ОАТР1В1 (ОАТР2).

ОАТР1В1 (organic anion transporting polypeptide 1В1) экспрессируется на базолатеральной мембране гепатоцитов, где этот транспортёр опосредует поглощение ряда амфипатических соединений из портальной крови [4].

ОАТР1В1 является основным базолатеральным переносчиком, обеспечивающим проникновение внутрь гепатоцитов желчных солей, а также транспорт билирубина, гормонов, циклических и линейных пептидов. Мутации в гене *SLCO1B1* (solute carrier organic anion transporter family member 1В1), кодирующем ОАТР1В1, являются причиной синдрома Ротора — наследственного заболевания, проявляющегося гипербилирубинемией [5].

Кроме того, ОАТР1В1 участвует в транспорте ряда токсинов и лекарственных веществ, в частности антибиотиков, статинов и противораковых препаратов.

Известно, что активность ОАТР1В1 изменяется под воздействием ряда факторов и веществ. Индинавир, саквинавир, ритонавир, рифампицин и циклоспорин А ингибируют ОАТР1В1 и могут вызывать лекарственно-индуцированную гипербилирубинемия [6] или аторвастатин-индуцированный рабдомиолиз [7].

Очевидна необходимость тестирования новых лекарственных препаратов на принадлежность к субстратам, индукторам и ингибиторам ОАТР1В1. В качестве модели *in vivo* были предложены мыши с нокаутом по гену *Oatp1b2*, имеющему сходство с *SLCO1B1* и *SLCO1B3*. Степень гомологии продукта гена с ОАТР1В1 составляет 65%, и модель хорошо себя показала при исследованиях поглощения известных субстратов ОАТР1В1. Однако возможны и межвидовые отличия, например нокаут гена не влиял на соотношение концентраций церивастатина и симвастатиновой кислоты в печени и плазме животных, что может указывать на разницу в субстратной специфичности и требует дальнейшего изучения [8]. Кроме того, на уровне целого организма сложнее оценить вклад взаимодействия препарата с конкретным транспортёром из-за большого числа других факторов, и, как правило, модели *in vivo* и *in vitro* дополняют друг друга. Согласно международным рекомендациям управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (The U.S. Food and Drug Administration, FDA), Европейского агентства по лекарственным средствам

(European Medicines Agency, ЕМА) и Международного консорциума по транспортёрам (The International Transporter Consortium, ITC), данные исследования проводят на первичных гепатоцитах или клеточных линиях, которые стабильно и селективно синтезируют рекомбинантный ОАТР1В1. Последние удобнее для выявления взаимодействия с конкретным белком, поскольку клеточные линии гепатоцитарного происхождения обычно экспрессируют сразу несколько транспортёров, что затрудняет проведение анализа [9, 10, 11].

На сегодняшний день в России отсутствуют подобные клеточные линии и их приобретение невозможно, поэтому актуальна задача получения отечественных клеточных линий, экспрессирующих клинически значимые белки-транспортёры. Целью настоящей работы явилось создание клеточной линии, селективно гиперэкспрессирующей человеческий транспортёр ОАТР1В1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культура клеток. Клетки линии НЕК293 (ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных», Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; https://incras-ckp.ru/catalog/293-hek-293/?PROP_25=1) и полученные рекомбинантные клетки НЕК293-ОАТР1В1 культивировали в Дульбекко-модифицированной среде Игла («ПанЭко», Россия) с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/литр) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки («Sigma-Aldrich», Германия) и 2 мМ L-глутамин («Sigma-Aldrich», Германия) при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в инкубаторе WS-189С («World Science», Южная Корея). Каждый эксперимент выполнялся в трёх повторах.

Получение плазмиды pEGFP-SLCO1B1. Ген *SLCO1B1* (Gene ID:10599, NCBI Reference Sequence: NM_006446.5) был получен путём синтеза («Atagenix», Китай) и клонирован в линейризованный по сайтам XhoI и HindIII вектор pEGFP-N1 путём безлигазного клонирования с T4 ДНК-полимеразой, в результате чего была получена плазида pEGFP-SLCO1B1 (рис. 1П в Приложении). Соответствие последовательности клонированного гена *SLCO1B1* проверяли секвенированием. Целевой ген клонирован в вектор pEGFP-N1 в одной рамке считывания с геном, кодирующим улучшенный зелёный флуоресцентный белок EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) на C-конце (рис. 1). Поскольку ген *EGFP* находится в той же рамке считывания, что и целевой ген *SLCO1B1*,



Рис. 1. Фрагмент экспрессионного вектора pEGFP-SLCO1B1

флуоресценция в трансфицированной клетке должна была указывать на экспрессию *SLCO1B1*.

Трансфекция. Клетки линии НЕК293 (пассаж 49) высевали в 96-луночный планшет («NEST», Китай) в количестве 10^4 клеток на лунку. По достижении 70% конфлюэнтности клетки подвергали трансфекции плазмидой pEGFP-SLCO1B1 методом липофекции с использованием реагента Lipofectamine 3000 Reagent («Invitrogen», США). Все манипуляции производили в соответствии с инструкцией производителя. Через 48 ч экспрессию EGFP оценивали с помощью флуоресцентного микроскопа Olympus SKX53 («Olympus», Япония). Для получения стабильных клонов НЕК293-ОАТР1В1, экспрессирующих *SLCO1B1*, проводили селекцию с использованием антибиотика G-418 («Promega», США) в концентрации 500 мкг/мл. Было отобрано четыре стабильных клона, которые, в свою очередь, подвергли клональной селекции методом предельных разведений. Через 2 недели культивирования клоны с сохранённой флуоресценцией перестали получать антибиотики и подверглись вторичному клонированию. Целевые клоны отбирали по интенсивности флуоресценции, размножали и использовали для дальнейшей работы. Стабильность экспрессии рекомбинантного белка клетками линии НЕК293-ОАТР1В1 оценивали после 10 последовательных пассажей.

ПЦР в реальном времени. Экспрессия гена *SLCO1B1* в полученной клеточной линии НЕК293-ОАТР1В1 была подтверждена методом ПЦР в реальном времени. Для этого клетки культивировали в 6-луночных планшетах («Corning», США; 351146). После образования монослоя их механически (с помощью скребка) снимали с лунок. Суммарную РНК выделяли с помощью набора RNeasy Mini Kit («QIAGEN», Германия), согласно инструкции производителя. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрическим способом с помощью NanoPhotometr NP80-Touch («Implen», Германия). Реакцию ОТ-ПЦР проводили одношаговым методом с помощью набора «Био-Мастер ОТ-ПЦР SYBR Blue» («Биолабмикс», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Условия обратной транскрипции: температура – 45 °С, время – инкубации 10 мин, количество циклов – 1.

Последовательности праймеров были подобраны с помощью программы DNASTAR Lasregene, PrimerSelect. Для оценки экспрессии гена *SLCO1B1* использовали следующие праймеры: 5'-GGTGAATGCCCAAGAGATGAG-3' (прямой) и 5'-TGGAAACCCAGTGC AAGTGATT-3' (обратный) («Евроген», Россия). В качестве референсного гена, относительно экспрессии которого вычислялась экспрессия *SLCO1B1*, был выбран ген, кодирующий глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (GAPDH), и следующие праймеры: 5'-GTCCCTCTGACTTCAACAGCG-3' (прямой) и 5'-AC CACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3' (обратный) («Евроген»). Анализ проводили при следующих условиях температурных циклов: денатурация – нагрев реакционной смеси до 95 °С в течение 10 с, затем охлаждение – 10 с при 53 °С и элонгация – 72 °С при 30 с. Число циклов – 40. Для работы использовались пробирки объёмом 0,2 мл в стрипах по 8 штук («Axugen», США). Анализ проводился на амплификаторе нуклеиновых кислот Applied Biosystems Quant Studio 5 с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени («Life Technologies Holdings Pte. Ltd.», Сингапур) с программным обеспечением QuantStudio Design and Analysis. Расчёт уровня экспрессии *SLCO1B1* относительно референсного гена был осуществлён с помощью программного обеспечения LinRegPCR v.11.0 (Heart failure research center, Нидерланды).

Вестерн-блоттинг. Синтез белка ОАТР1В1 в полученной клеточной линии НЕК293-ОАТР1В1 был подтверждён методом вестерн-блоттинга. Клетки культивировали в 6-луночных планшетах («Corning»). После образования монослоя их снимали с лунок раствором трипсин-ЭДТА (0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА; «Sigma-Aldrich», США). Полученные клетки лизировали при помощи буфера NP40 («Thermo Fisher Scientific», США) с ингибиторами протеаз («Sigma Aldrich», США; S8820-2ТАВ) из расчёта 100 мкл буфера на 10^7 клеток в течение 30 мин при 4 °С. Каждые 10 мин образцы перемешивали на встряхивателе Vortex («Heidolph», Германия). Концентрацию белка в пробах определяли по методу Бредфорда [12]. Интенсивность окраски оценивали на спектрофотометре «SmartSpec Plus»

(«Bio-Rad», США) при длине волны 595 нм. Далее, по 20 мкг каждого образца подвергали электрофорезу в 10%-ном полиакриламидном геле с использованием TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit («Bio-Rad») в буферной системе Laemmli («Bio-Rad») и переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad») с размером пор 0,2 мкм методом полусухого переноса при помощи прибора Transblot («Bio-Rad»). Затем мембраны на 1 ч помещали в раствор казеина («Bio-Rad»), после чего инкубировали с первичными поликлональными кроличьими антителами ОАТР2 Polyclonal Antibody («Invitrogen»; PA5-113548; разведение 1 : 2000) в течение ночи при 4 °С. После инкубации с первичными антителами мембрану промывали Tris-солевым буферным раствором («Bio-Rad»), после чего инкубировали 1 ч при комнатной температуре с вторичными антителами Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP («Invitrogen»; 31462; разведение 1 : 4000). Белки визуализировали с помощью системы Chemi Doc XRS+ («Bio-Rad»). Количество ОАТР1В1 оценивали относительно содержания глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы GAPDH (первичные антитела GAPDH Loading Control Monoclonal Antibody (GA1R), («Invitrogen»; MA5-15738; разведение 1 : 1000)); вторичные антитела – Rabbit anti-Mouse IgG (H + L) Secondary Antibody, HRP («Invitrogen»; 31450; разведение 1 : 4000). Интенсивность окраски полос оценивали денситометрически с использованием программного обеспечения ImageLab («Bio-Rad»).

Конфокальная микроскопия. Мембранная локализация ОАТР1В1 была подтверждена конфокальной микроскопией. По 10^5 клеток линии НЕК293-ОАТР1В1 высевали на 35-мм чашку со стеклянным дном, на следующие сутки изучали клетки с использованием микроскопа Nikon TE2000-U, оснащенного конфокальной сканирующей системой DCS-120 с детектором РМС-100 («Becker&Nickl», Германия). Получали серии оптических срезов с шагом в 1 мкм.

Транспортные эксперименты. Активность ОАТР1В1 в трансфицированных клетках НЕК293-ОАТР1В1 оценивали по проникновению внутрь клеток субстрата транспортёра аторвастатина («Sigma-Aldrich», Германия). Аторвастатин (3,1 мг) растворяли в 600 мкл диметилсульфоксида (ДМСО; «ПанЭко», Россия) и доводили объём до 2,5 мл транспортной средой (сбалансированный солевой раствор Хэнкса («Sigma-Aldrich», Германия), содержащий 25 мМ Hepes (рН 7,4) и 1% диметилсульфоксида). Полученный раствор последовательно разводили транспортной средой до

концентрации 1 мкМ. В качестве контроля использовали интактные клетки НЕК293. Непосредственно перед проведением транспортного эксперимента клетки однократно промывали нагретой до 37 °С транспортной средой. Затем к клеткам добавляли транспортную среду, содержащую аторвастатин в конечной концентрации 1 мкМ. Для ингибирования функциональной активности ОАТР1В1 перед проведением транспортного эксперимента клетки НЕК293-ОАТР1В1 преинкубировали со 100 мкМ рифампицина («Spectrum Chemical Mfg. Corp.», США), являющегося ингибитором транспортёра, в течение 15 мин при 37 °С, после чего рифампицин удаляли из лунки и добавляли смесь рифампицина (100 мкМ) и аторвастатина (1 мкМ). Клетки инкубировали в течение 5, 15, 30, 45 и 60 мин. Реакцию останавливали удалением транспортной среды, содержащей тестируемое вещество, и немедленной промывкой клеток 500 мкл охлаждённой транспортной среды.

Для описания кинетики активности ОАТР1В1 и выбора оптимальной концентрации в созданной клеточной линии выполняли эксперименты с разными концентрациями аторвастатина (0,1; 1; 10 и 50 мкМ).

После остановки транспорта клетки трижды промывали 500 мкл холодного фосфатного буфера («ПанЭко», Россия). Лизис клеток осуществляли 3-кратным циклом замораживания-размораживания (клетки замораживали при –80 °С, затем размораживали при комнатной температуре). Концентрацию общего белка в пробах анализировали по методу Бредфорда [12] с помощью коммерческого набора Pierce Coomassie Plus Bradford Assay Kit («ThermoFisher», США). Интенсивность окраски оценивали на спектрофотометре «SmartSpec Plus» («Bio-Rad») при длине волны 595 нм.

Высокоэффективная жидкостная хроматография и тандемная масс-спектрометрия (ВЭЖХ-МС/МС). Концентрацию аторвастатина в лизате клеток определяли методом ВЭЖХ-МС/МС по ранее описанному и валидированному методу [13] на высокоэффективном жидкостном хроматографе Ultimate 3000 («ThermoFisher») с тандемным масс-селективным детектором TSQ Fortis («ThermoFisher»), градиентным насосом, дегазатором и автосемплером. Полученные результаты обрабатывались с помощью программного обеспечения «Thermo Scientific Xcalibur» (ver. 4.2.47). Нижний предел количественного определения для аторвастатина составил 0,5 нмоль/литр. Линейность метода была подтверждена в диапазоне 0,5–200 нмоль/литр.

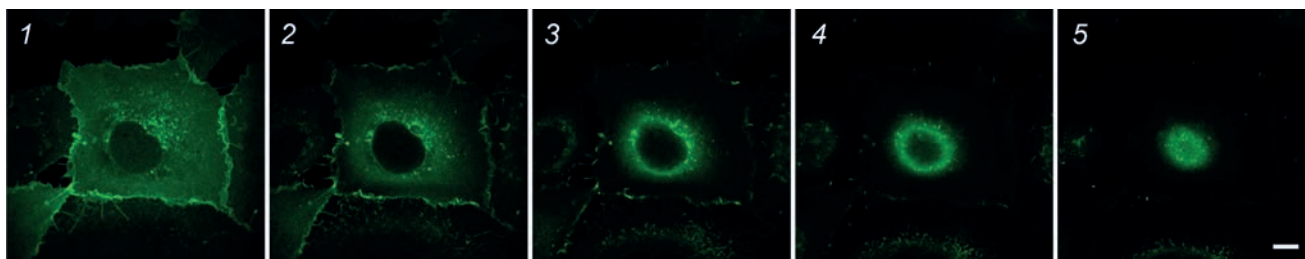


Рис. 2. Флуоресценция HEK293-OATP1B1. На рисунке приведена серия оптических срезов с шагом 1 мкм. Цифрами обозначены номера срезов. Локализация EGFP преимущественно в перинуклеарной области и на клеточной мембране, что соответствует синтезу и встраиванию в мембрану клетки химерного белка OATP1B1–EGFP. Масштабный отрезок – 20 мкм

Статистический анализ полученных результатов. Статистический анализ проводился с использованием программы GraphPad Prism версии 8.1.2. («GraphPad Software», США). Полученные данные представлены как среднее арифметическое \pm стандартное отклонение. Различия между группами определяли с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим применением теста Даннетта при сравнении более чем двух групп и непарного *t*-критерия Стьюдента – при сравнении двух групп. Значения $p < 0,05$ считались статистически значимыми. Кинетические параметры K_m (константа Михаэлиса) и V_{max} (максимальная скорость поглощения) рассчитывали с использованием уравнения конкурентного ингибирования.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Клетки линии HEK293 трансфицировали плазмидой pEGFP-N1-SLCO1B1. Целевой белок экспрессировался в виде полипептида слияния с EGFP на C-конце.

Через 48 ч после выполнения трансфекции оценивали ее эффективность с использованием флуоресцентного микроскопа. В среднем ~70% клеток экспрессировали EGFP. Для получения стабильной клеточной линии производили селекцию с использованием G-418 в концентрации 500 мкг/мл.

Трансфицированные EGFP-экспрессирующие клетки отбирали методом предельных разведений. Выбранный клеточный клон HEK293-OATP1B1 в течение месяца наблюдения сохранял флуоресценцию, что свидетельствовало об интеграции плазмиды в геном. На рис. 2 приведена серия оптических срезов клеток HEK293-OATP1B1, полученная методом конфокальной микроскопии. Отмечалась преимущественно мембранная локализация EGFP, что указывает на встраивание транспортера OATP1B1 в клеточную мембрану.

Также накопление флуорохрома наблюдалось вблизи ядра, предположительно, в области эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи, что, вероятно, связано с синтезом и транслокацией белка. Менее интенсивная флуоресценция выявлялась в цитоплазме клетки, что может указывать на расщепление слитого полипептида. При оценке стабильности полученной клеточной линии было показано, что HEK293-OATP1B1 стабильно экспрессирует функционально активный OATP1B1 в течение 10 пассажей. Клон был размножен и использован для дальнейшей характеристики.

На следующем этапе исследования была оценена экспрессия гена *SLCO1B1* в полученной клеточной линии. Было показано, что экспрессия мРНК *SLCO1B1* в созданной клеточной линии HEK293-OATP1B1 существенно превышает данный показатель в нативных клетках HEK293, что подтверждает экспрессию рекомбинантного гена (рис. 3).

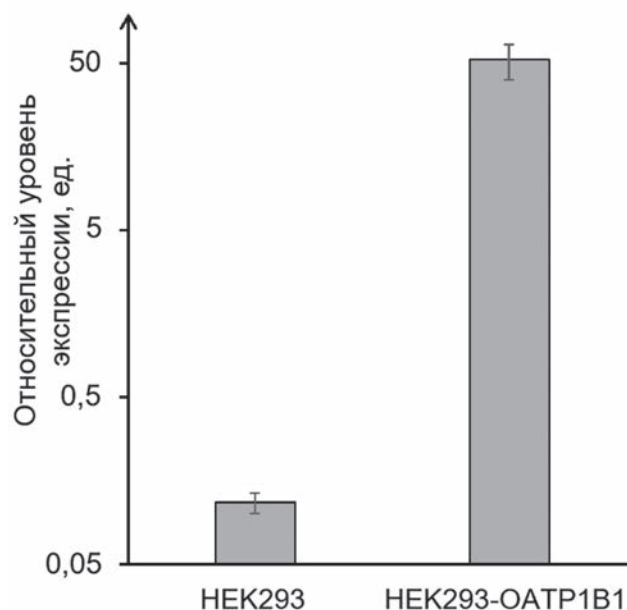


Рис. 3. Относительная представленность ампликонов гена *SLCO1B1* в клетках линий HEK293 и HEK293-OATP1B1 по результатам количественного ОТ-ПЦР-анализа в реальном времени

Относительное количество ОАТР1В1 в лизатах клеток оценивали методом вестерн-блот-анализа. Интактные клетки линии НЕК293 не содержали ОАТР1В1 (отсутствовали специфические полосы на мембране), в отличие от образцов клеток линии НЕК293-ОАТР1В1.

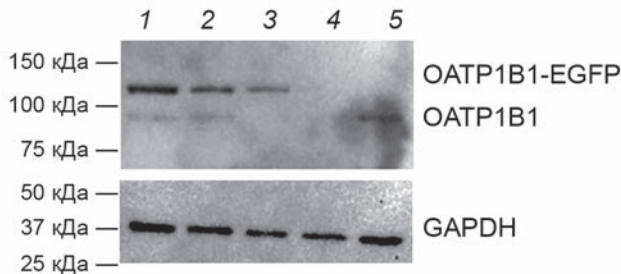


Рис. 4. Относительное содержание ОАТР1В1 в образцах лизатов клеток НЕК293-ОАТР1В1, НЕК293 и НерG2 по результатам вестерн-блот-анализа. Цифрами обозначены номера дорожек: 1 – НЕК293-ОАТР1В1 (20 мкг белка в лизате клеток), 2 – НЕК293-ОАТР1В1 (10 мкг), 3 – НЕК293-ОАТР1В1 (5 мкг), 4 – НЕК293 (20 мкг), 5 – НерG2 (20 мкг)

Полоса образцов из НЕК293-ОАТР1В1 располагалась на 30 кДа выше, чем полоса образцов клеток линии НерG2 (гепатоцеллюлярная карцинома), которые были использованы в качестве позитивного контроля, что свидетельствует о том, что ОАТР1В1 синтезировался в виде слитого с EGFP полипептида (рис. 4).

Стоит отметить, что, по данным вестерн-блоттинга, в клетках НЕК293-ОАТР1В1 наблюдается незначительное расщепление слитного белка до исходного ОАТР1В1 (рис. 4). Данный факт может объяснять попадание EGFP во внутренние компартменты клетки.

На заключительном этапе исследования была оценена специфическая активность ОАТР1В1 в клетках линии НЕК293-ОАТР1В1. В качестве субстрата ОАТР1В1 использовался аторвастатин в концентрации 1 мкМ. Проникновение аторвастатина внутрь клеток НЕК293-ОАТР1В1 на всех временных точках эксперимента (5, 15 и 30 мин) достоверно превышало проникновение субстрата в интактные клетки НЕК293 (рис. 5, а). Обработка клеток ингибитором ОАТР1В1 рифампицином в концентрации 100 мкМ приводила к снижению транспорта аторвастатина в клетки НЕК293-ОАТР1В1 до уровня интактных НЕК293 на всех временных точках эксперимента (рис. 5, б).

Полученные данные свидетельствуют о том, что ОАТР1В1 в созданной клеточной линии НЕК293-ОАТР1В1 является функционально активным. При этом максимальная скорость транспорта аторвастатина наблюдалась через 5 мин и затем постепенно снижалась. Поэтому для дальнейших исследований использовали время инкубации 5 мин. Для описания кинетики активности ОАТР1В1 в созданной клеточной линии выполняли эксперименты с разными концентрациями аторвастатина (0,1;

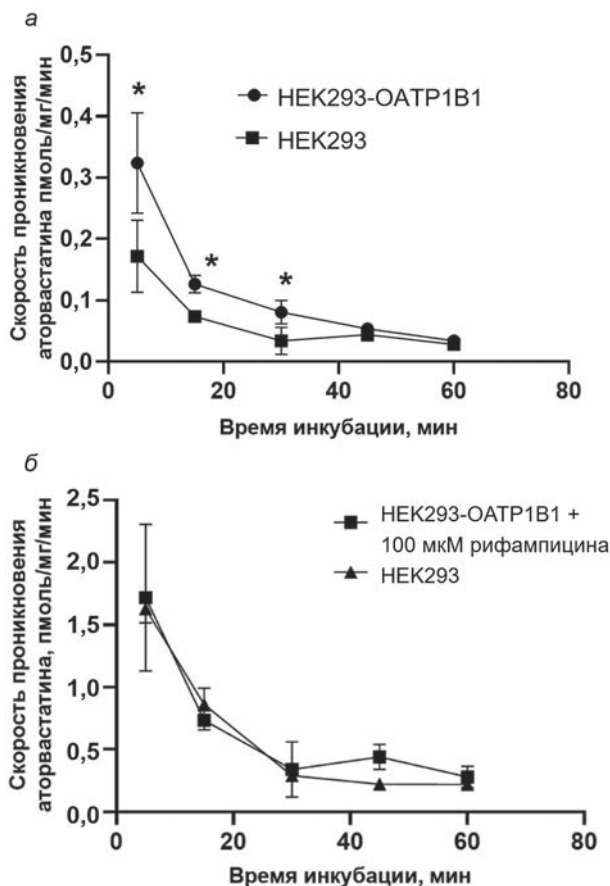


Рис. 5. Специфическая активность ОАТР1В1 в клетках линии НЕК293-ОАТР1В1. а – Проникновение аторвастатина (1 мкМ) в клетки НЕК293 и НЕК293-ОАТР1В1; б – проникновение аторвастатина в клетки НЕК293 и в клетки НЕК293-ОАТР1В1 в присутствии 100 мкМ рифампицина. * $p < 0,05$ – статистически значимые отличия по сравнению с показателями клеток НЕК293

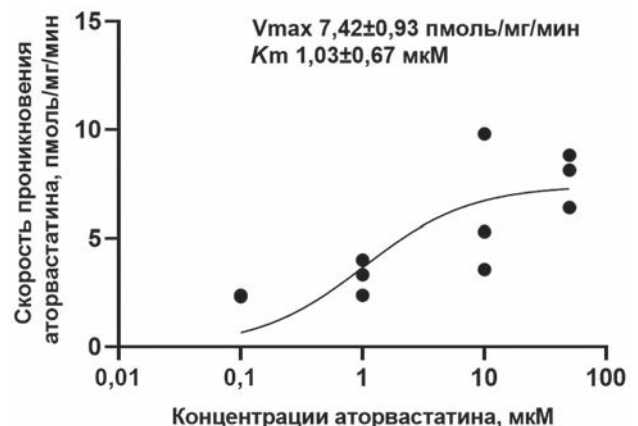


Рис. 6. Зависимость проникновения аторвастатина внутрь клеток от его концентрации

1; 10 и 50 мкМ). При расчёте константы Михаэлиса (K_m) и скорости реакции при насыщении фермента субстратом (V_{max}) были получены следующие результаты: $K_m = 1,03 \pm 0,67$ мкМ; $V_{max} = 7,42 \pm 0,93$ пмоль \cdot мг $^{-1}$ \cdot мин $^{-1}$ (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Создание клеточной линии, селективно экспрессирующей важнейший транспортный белок OATP1B1, позволит решить ряд задач по изучению механизмов его работы и оценке его роли в транспорте эндогенных молекул, а также тестировать лекарственные вещества на принадлежность к его субстратам, индукторам и ингибиторам *in vitro*, что необходимо для прогнозирования развития межлекарственных взаимодействий с участием OATP1B1.

Клетки НЕК293 характеризуются низкой эндогенной экспрессией транспортёров, в том числе OATP1B1, что позволяет рассматривать их как оптимальную культуру для получения модельной линии для гиперэкспрессии целевого гена [14]. Также преимуществами клеток НЕК293 являются высокая эффективность трансфекции, быстрая скорость роста и простота поддержания культуры, а также и способность осуществлять правильный фолдинг целевого белка [15].

Целевой ген был введён в клетки НЕК293 в составе плазмиды pEGFP-N1-SLCO1B1, обеспечивающей экспрессию OATP1B1, слитого с EGFP на C-конце. Затем была проведена селекция с использованием G-418 и отбор клонов с интегрированной в геном генетической конструкцией методом предельных разведений. При нелегитимной рекомбинации экспрессионный вектор встраивается в случайное место в геноме. В результате этого большинство клонов, экспрессирующих целевой продукт, могут быть нестабильны или обеспечивать низкий выход белка. Выделение стабильных клонов клеток, экспрессирующих рекомбинантный белок с высоким выходом, является ключевой задачей в разработке стабильной клеточной линии.

В данной работе значительная часть клонов выживала в среде с антибиотиком, однако не обладала способностью к флуоресценции. Вероятно, в таких клонах интеграция плазмиды произошла с нарушением структуры гена слитого белка. Так как ген EGFP находится после SLCO1B1 в той же рамке считывания, появление зелёной флуоресценции указывает на экспрессию целевого гена. Использование флуоресцентной метки облегчает селекцию,

что позволило нам получить стабильно экспрессирующие белок клоны даже при трансфекции небольшой исходной популяции (10^4 клеток).

Ранее в работе, где была получена линия НЕК293, транзистентно экспрессирующая SLCO1B1, было показано, что использование EGFP в качестве C-концевой метки не препятствует функциональности белка. Так, установлено, что при временной экспрессии такого химерного белка в клетках НЕК293 поглощение эстрон-3-сульфата возросло более, чем в 6 раз по сравнению с нативными клетками [16].

В полученной клеточной линии флуоресцентная метка была локализована преимущественно на клеточной мембране, а рекомбинантный OATP1B1 обладал функциональной активностью. В исследовании поглощения аторвастатина были получены следующие значения константы Михаэлиса и скорости реакции: $K_m = 1,03 \pm 0,67$ мкМ; $V_{max} = 7,42 \pm 0,93$ пмоль \cdot мг $^{-1}$ \cdot мин $^{-1}$. Полученные значения активности OATP1B1 в созданной клеточной линии соответствуют показателям, полученным другими авторами: в работе Karlgren et al. [17] значение K_m составляло $0,77 \pm 0,24$ мкМ, а $V_{max} = 6,61 \pm 1,24$ пмоль \cdot мг $^{-1}$ \cdot мин $^{-1}$; в работе Amundsen et al. [18] были получены значения $K_m = 0,93 \pm 0,23$ мкМ и $V_{max} = 3,84 \pm 0,27$ пмоль \cdot мг $^{-1}$ \cdot мин $^{-1}$.

Таким образом, функционально активный транспортёр OATP1B1 стабильно экспрессируется в созданной клеточной линии. Эта система экспрессии может быть использована для изучения работы OATP1B1 и в качестве модели для тестирования лекарственных веществ и оценки возможности межлекарственных взаимодействий, осуществляющихся через данный транспортёр. Полученная линия доступна для исследований по запросу. Также представляет интерес возможность введения мутаций в ген SLCO1B1 вектора pEGFP-SLCO1B1. Полученная таким путём транзистентная или постоянная клеточная линия может использоваться для изучения полиморфизмов SLCO1B1, для оценки их влияния на эффективность и возможные побочные эффекты приёма лекарственных препаратов, что является шагом к разработке персонализированной медицины.

Вклад авторов. А.В. Гончаренко, А.В. Шулькин – концепция и руководство исследованием; М.С. Котлярова, П.Д. Ерохина, П.Ю. Мыльников, А.В. Шулькин, Е.Н. Якушева, М.В. Замахаев, Н.И. Надолинская – проведение экспериментов; П.Д. Ерохина, П.Ю., Мыльников,

А.В. Шулькин, Е.Н. Якушева, М.С. Котлярова, А.В. Гончаренко – написание текста статьи; М.В. Замахаев – редактирование текста статьи.

Благодарности. Авторы благодарят за помощь ЦКП «Индустриальная Биотехнология» ФИЦ Биотехнологии РАН и И.Д. Соловьева за помощь в проведении конфокальной микроскопии.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Vasiliou, V., Vasiliou, K., and Nebert, D. W. (2009) Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family, *Hum. Genomics*, **3**, 281-290, doi: 10.1186/1479-7364-3-3-281.
- Roth, M., Obaidat, A., and Hagenbuch, B. (2012) OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies, *Br. J. Pharmacol.*, **165**, 1260-1287, doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01724.x.
- Liu, X. (2019) SLC family transporters, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1141**, 101-202, doi: 10.1007/978-981-13-7647-4_3.
- Hsiang, B., Zhu, Y., Wang, Z., Wu, Y., Sasseville, V., Yang, W. P., and Kirchgessner, T. G. (1999) A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP2). Identification of a liver-specific human organic anion transporting polypeptide and identification of rat and human hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor transporters, *J. Biol. Chem.*, **274**, 37161-37168, doi: 10.1074/jbc.274.52.37161.
- Van de Steeg, E., Stranecky, V., Hartmannova, H., Noskova, L., Hrebicek, M., Wagenaar, E., van Esch, A., de Waart, D. R., Oude Elferink R. P., Kenworthy, K. E., Sticova, E., al-Edreesi, M., Knisely, A. S., Kmoch, S., Jirsa, M., and Schinkel, A. H. (2012) Complete OA TPIB1 and OA TPIB3 deficiency causes human Rotor syndrome by interrupting conjugated bilirubin reuptake into the liver, *J. Clin. Invest.*, **122**, 519-528, doi: 10.1172/JCI59526.
- Campbell, S. D., de Morais, S. M., and Xu, J. J. (2004) Inhibition of human organic anion transporting polypeptide OATP1B1 as a mechanism of drug-induced hyperbilirubinemia, *Chem. Biol. Interact.*, **150**, 179-187, doi: 10.1016/j.cbi.2004.08.008.
- Neuvonen, P., Niemi, M., and Backman, J. (2006) Drug interactions with lipid-lowering drugs: Mechanisms and clinical relevance, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **80**, 565-581, doi: 10.1016/j.clpt.2006.09.003.
- Chen, C., Stock, J. L., Liu, X., Shi, J., Van Deusen, J. W., DiMattia, D. A., Dullea, R. G., and de Morais, S. M. (2008) Utility of a novel Oatplb2 knockout mouse model for evaluating the role of Oatplb2 in the hepatic uptake of model compounds, *Drug Metab. Dispos.*, **36**, 1840-1845, doi: 10.1124/dmd.108.020594.
- Hirano, M., Maeda, K., Shitara, Y., and Sugiyama, Y. (2004) Contribution of OATP2 (OATP1B1) and OATP8 (OATP1B3) to the hepatic uptake of pitavastatin in humans, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **311**, 139-146, doi: 10.1124/jpet.104.068056.
- Sudsakorn, S., Bahadduri, P., Fretland, J., and Lu, C. (2020) 2020 FDA drug-drug interaction guidance: a comparison analysis and action plan by pharmaceutical industrial scientists, *Curr. Drug Metab.*, **6**, 403-426, doi: 10.2174/1389200221666200620210522.
- Drug interaction studies (2022) URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-ich-guideline-m12-drug-interaction-studies-step-2b_en.pdf.
- 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.*, **7**, 248-254, doi: 10.1006/abio.1976.9999.
- Erokhina, P. D., Myl'nikov, P. Y., Ganina, S. O., Konyakhin, E. A., Shchul'kin, A. V., Slepnev, A. A., and Yakusheva, E. N. (2022) Development and validation of the quantitative determination of atorvastatin in HepG2 cell line using high-performance liquid chromatography with mass-spectrometric detection, *I. P. Pavlov Russ. Med. Biol. Herald*, **30**, 149-158, doi: 10.17816/PAVLOVJ100986.
- Ahlin, G., Hilgendorf, C., Karlsson, J., Szigyarto, C. A. K., Uhlén, M., and Artursson, P. (2009) Endogenous gene and protein expression of drug-transporting proteins in cell lines routinely used in drug discovery programs, *Drug Metab. Dispos.*, **37**, 2275-2283, doi: 10.1124/dmd.109.028654.
- Ooi, A., Wong, A., Esau, L., Lemtiri-Chlieh, F., and Gehring, C. (2016) A guide to transient expression of membrane proteins in HEK-293 cells for functional characterization, *Front. Physiol.*, **7**, 300, doi: 10.3389/fphys.2016.00300.
- Sun, A. Q., Ponamgi, V. M., Boyer, J. L., and Suchy, F. J. (2008) Membrane trafficking of the human organic anion-transporting polypeptide C (hOATPC), *Pharm. Res.*, **25**, 463-474, doi: 10.1007/s11095-007-9399-9.
- Karlgren, M., Ahlin, G., Bergström, C. A., Svensson, R., Palm, J., and Artursson, P. (2012) *In vitro* and *in silico* strategies to identify OATP1B1 inhibitors and

- predict clinical drug-drug interactions, *Pharm. Res.*, **29**, 411-426, doi: 10.1007/s11095-011-0564-9.
18. Amundsen, R., Christensen, H., Zabihyan, B., and Asberg, A. (2010) Cyclosporine A, but not tacrolimus, shows relevant inhibition of organic anion-transporting protein 1B1-mediated transport of atorvastatin, *Drug Metab. Dispos.*, **38**, 1499-1504, doi: 10.1124/dmd.110.032268.

GENERATION OF A CELL LINE SELECTIVELY PRODUCING THE FUNCTIONALLY ACTIVE OATP1B1 TRANSPORTER

M. S. Kotliarova¹, A. V. Shchulkin², P. D. Erokhina², P. Y. Mylnikov², E. N. Yakusheva², N. I. Nadolinskaia¹, M. V. Zamakhaev¹, and A. V. Goncharenko^{1*}

¹ *Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology", Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia; e-mail: pylaevanna@gmail.com*

² *Ryazan State Medical University named after Academician I. P. Pavlov, 390026 Ryazan, Russia*

The solute carrier organic anion transporter family member OATP1B1 is one of the most important transporter proteins which mediate the penetration of many endogenous substances and xenobiotics into hepatocytes. A model system providing the expression of the functional protein is needed to assess the interaction of OATP1B1 with various substances. Based on HEK293 cells, we obtained the HEK293-OATP1B1 cell line, permanently expressing the *SLCO1B1* gene encoding the OATP1B1 transporter. Expression of the *SLCO1B1* gene was confirmed by real-time PCR analysis and immunochemically. The functionality of the transporter was assessed by the transport of atorvastatin, which is a substrate of OATP1B1. Cells of the resulting cell line, which selectively express the functionally active recombinant OATP1B1 transporter, can be used to study its function and to test drugs for belonging to substrates, inducers, and inhibitors of OATP1B1 to assess the risks of drug-drug interactions.

Keywords: transporter proteins, *SLCO1B1*, OATP1B1, HEK293, transfection, plasmid, drug-drug interactions

УДК 577.22

ДИМЕРНЫЙ ACE2-FC ЭКВИВАЛЕНТЕН МОНОМЕРНОМУ ACE2 В СУРРОГАТНОМ ТЕСТЕ ВИРУС-НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ АНТИТЕЛ

© 2023 Д.Э. Колесов, Е.А. Гаямова, Н.А. Орлова, И.И. Воробьев*

ФИЦ Биотехнологии РАН, 119071 Москва, Россия; электронная почта: ritchman@gmail.com

Поступила в редакцию 13.05.2023

После доработки 14.06.2023

Принята к публикации 16.06.2023

Ангиотензин-превращающий фермент 2 (ACE2) является основным клеточным рецептором для опасных сарбековиром SARS-CoV и SARS-CoV-2. Его рекомбинантный внеклеточный домен используется для мониторинга уровня протективного гуморального иммунного ответа на вирусную инфекцию или вакцину методом суррогатного вирус-нейтрализующего теста (сВНТ). Растворимый ACE2 также рассматривается как вариант антивирусной терапии, потенциально нечувствительной к изменениям шиповидного белка SARS-CoV-2. Для широкого тестирования методом сВНТ необходимо использовать препараты ACE2 или его конъюгатов с постоянными свойствами. Ранее нами была получена клеточная линия – продуцент растворимого мономерного ACE2, и было показано, что такой вариант ACE2 может быть использован в сВНТ, предпочтительно в форме конъюгата с пероксидазой хрена (HRP). Для получения стабильной и универсально применимой формы растворимого ACE2 была получена клеточная линия – продуцент слитного белка ACE2-Fc с высокой продуктивностью, более 150 мг/л целевого белка при культивировании в перемешиваемой колбе. Аффинно очищенный ACE2-Fc представляет собой смесь димерной и тетрамерной форм, но позволяет получать линейные кривые ингибирования антителами комплексообразования с рецептор-связывающим доменом шиповидного белка SARS-CoV-2. Система тестирования сВНТ на основе ACE2-Fc-HRP может быть использована для практического измерения уровней вирус-нейтрализующих антител в отношении различных циркулирующих вариантов вируса SARS-CoV-2.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ангиотензин-превращающий фермент 2, SARS-CoV-2, сВНТ, вирус-нейтрализация, протективный иммунитет.

DOI: 10.31857/S0320972523090075, EDN: WTUYAA

ВВЕДЕНИЕ

Ангиотензин-превращающий фермент 2 человека (АПФ2, ACE2, EC 3.4.17.23) – это трансмембранный белок с коротким внутриклеточным доменом, обладающий свойствами цинк-зависимой металлопротеазы и экспрессирующийся на поверхности клеток многих тканей, в том числе и эпителия дыхательных путей. Мембранно-связанная форма ACE2 под действием протеазы ADAM17 (дезинтегрин и металлопротеиназный домен 17) превращается в растворимый ACE2 [1], который активно

расщепляет сосудосуживающий пептид ангиотензин II до сосудорасширяющего пептида ангиотензин 1–7 и быстро покидает кровоток с периодом полувыведения около 3 ч [1]. Мембранно-связанный ACE2 является основным клеточным рецептором для опасных сарбековиром SARS-CoV (коронавирус, вызывающий тяжёлый острый респираторный синдром) и SARS-CoV-2, а также для альфакоронавируса HCoV-NL63, вызывающего сезонные инфекции дыхательных путей [2].

Достигнутый коллективный защитный иммунитет к пандемическому вирусу SARS-CoV-2

Принятые сокращения: ВНА – вирус-нейтрализующие антитела; ВНТ – вирус-нейтрализующий тест; мкАт – моноклональное антитело; сВНТ – суррогатный вирус-нейтрализующий тест; ACE2 – ангиотензин-превращающий фермент 2; СНО – линия клеток яичника китайского хомячка; Fc – кристаллизуемый фрагмент иммуноглобулина; HRP – пероксидаза хрена; IC₅₀ – концентрация, вызывающая ингибирование на 50%; MALS – многоугольная детекция рассеяния света; МТХ – метотрексат; PBS – фосфатно-буферизованный раствор; RBD – рецептор-связывающий домен; SARS-CoV-2 – коронавирус 2, вызывающий тяжёлый острый респираторный синдром.

* Адресат для корреспонденции.

основан на возникновении у вакцинированных или переболевших вирус-нейтрализующих антител (ВНА), которые в основном состоят из антител к рецептор-связывающему домену (RBD) шиповидного (S) белка вируса, препятствующих его связыванию с ACE2. Уровень ВНА ограниченно коррелирует с уровнем сывороточного иммуноглобулина G (IgG) к RBD или S-белку; из общего титра IgG, определяемого по ИФА (иммуноферментному анализу), нельзя предсказать уровень ВНА [3].

Поскольку уровень антител к S-белку и уровень ВНА после вакцинации или инфекции постепенно снижаются, в будущем возможно повторное распространение новых вариантов SARS-CoV-2, что может иметь эпидемиологические последствия. Регулярное измерение уровней ВНА при помощи вирус-нейтрализующих тестов (ВНТ) позволит своевременно выявлять потерю ВНА в общей популяции либо выборках вакцинированных или переболевших лиц, при этом тестирование может проводиться против текущих циркулирующих вариантов вируса, всё более отличающихся от исходного варианта 2019 г.

Золотым стандартом ВНТ считается тест на нейтрализацию бляшкообразования (PRNT): культуру лабораторно адаптированного изучаемого вируса добавляют к чувствительным клеткам и затем подсчитывают число вирус-индуцированных бляшек в монослое. Уровнем ВНА назначают максимальное разведение тестируемой сыворотки крови, для которого снижение числа бляшек составило более 50%. Тест PRNT, таким образом, является полуколичественным. Исследования патогенных для человека вирусов в таком формате крайне сложны и требуют применения мер обеспечения биобезопасности высокого уровня [4]. Живой вирус может быть заменён псевдотипированным с репортёрным геном, такой тест (пВНТ) уже может проводиться в условиях BSL-2 [5], но его трудоёмкость всё ещё очень высока, и он не может проводиться как рутинный в клинических и диагностических лабораториях.

Суррогатный ВНТ (сВНТ) обычно проводится как конкурентный ИФА с детекцией количества комплекса RBD:ACE2, уровнем ВНА считают разведение сыворотки, при котором взаимодействие RBD с ACE2 падает вдвое (ID_{50}). Один из наиболее распространённых наборов для сВНТ, сPass [6] производства компании «Genscript» (США), использует мономерный ACE2 в качестве первого слоя и конъюгат RBD с пероксидазой хрена (HRP) в качестве верхнего слоя. Другие варианты сВНТ используют RBD как первый слой и

биотинилированный ACE2 как верхний слой ИФА. Ранее нами было предложено проводить сВНТ при использовании RBD для первого слоя и конъюгата ACE2-HRP для верхнего слоя [7]. Такой вариант сВНТ был пригоден для построения линейной зависимости уровня ингибирования взаимодействия RBD:ACE2 от концентрации исследуемой сыворотки, что существенно уменьшает необходимое число разведений тестируемых образцов для определения уровня ВНА и упрощает расчёт концентрации, вызывающей ингибирование на 50% (IC_{50}).

Мономерный ACE2, изготавливаемый для использования в качестве диагностического реагента, обычно содержит на C-конце белка гексагистидиновый кластер; такой реагент не может участвовать в образовании мультимерных комплексов, но может быть менее стабилен при хранении, чем димерный ACE2-Fc (слитный белок внеклеточного домена ACE2 и кристаллизуемого фрагмента IgG).

Для сВНТ, построенного на ингибировании образования комплексов ACE2:RBD на поверхности микрочастиц и детекции трёхслойных комплексов проточной цитометрией, было показано, что димерный ACE2-Fc практически непригоден для получения кривых ингибирования комплексообразования ACE2 и RBD вирус-нейтрализующими моноклональными антителами (мкАт) или антителами из сывороток крови. Мы предположили, что в случае обычного формата сВНТ в форме конкурентного ИФА конъюгат димерного ACE2-Fc с HRP будет эквивалентен конъюгату мономерного ACE2. Димерный ACE2-Fc, как и другие слитные с Fc рекомбинантные белки, потенциально может быть получен в больших количествах в стабильно трансфицированных клетках CHO (линия клеток яичника китайского хомячка) и использован для изготовления реактива для сВНТ с постоянными свойствами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Молекулярное клонирование. Ген, кодирующий слитный полипептид ACE2-Fc, содержащий внеклеточный домен ACE2 (аминокислотные остатки 319–541) с природным сигнальным пептидом (а.о. 1–14) и кристаллизуемый фрагмент (Fc) человеческого IgG1, собирали на основе плазмиды pTF-ACE2s [7], которая кодирует растворимый ACE2 и депонирована нами в репозиторий Addgene (plasmid #162786, рис. 1).

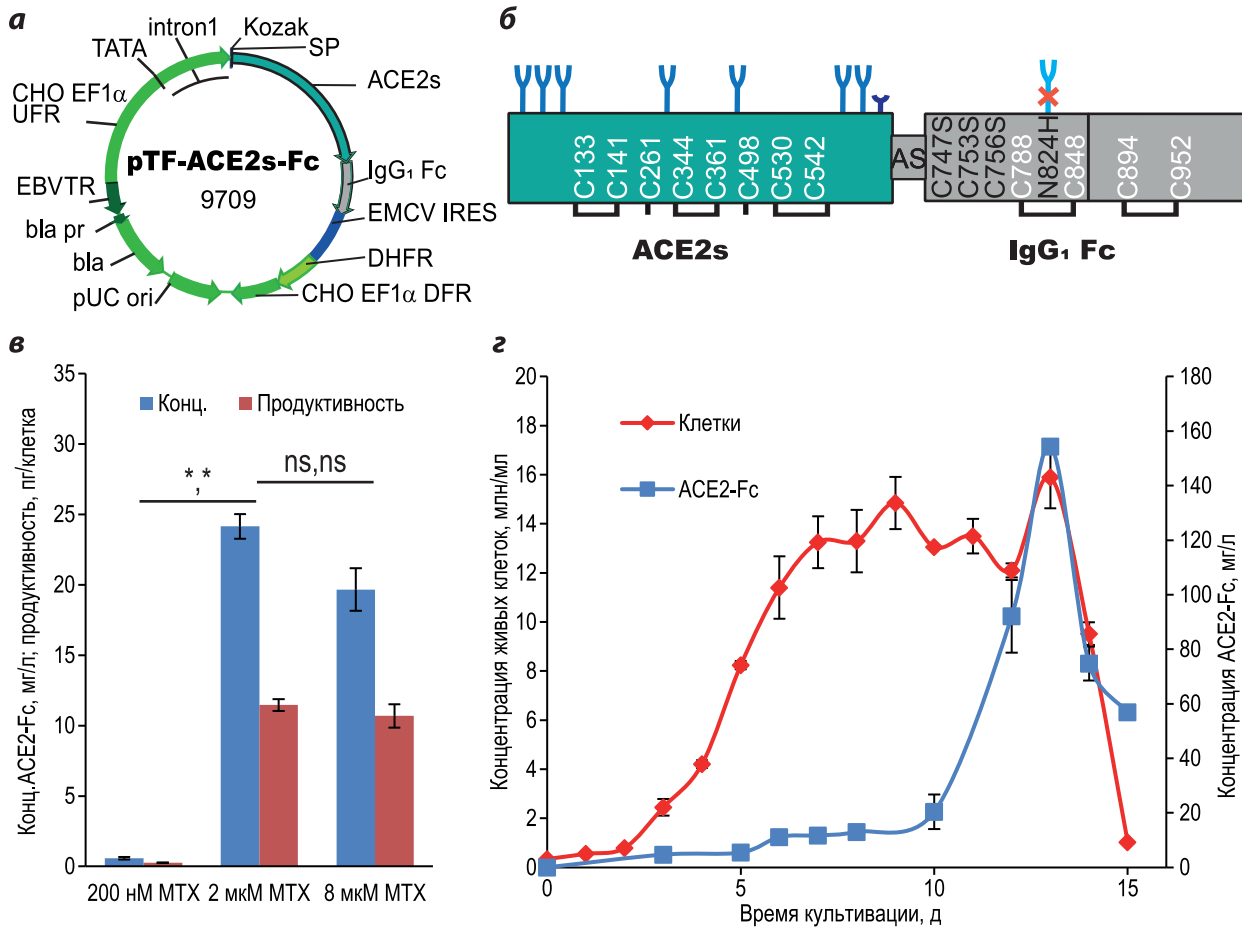


Рис. 1. Схема экспрессионной конструкции pTF-ACE2s-Fc (а), схема экспрессируемого слитного белка (б), динамика удельной продуктивности клеток после проведения селекции и при амплификации трансгена под действием метотрексата (MTX) (в), кривая накопления ACE2-Fc при длительном культивировании (г). Обозначения: pUC ori – область начала репликации плазмиды pUC; bla – открытая рамка считывания бета-лактамазы; bla pr – промотор гена bla; EBVTR – фрагмент конкатемера терминальных повторов вируса Эпштейна–Барр человека; CHO EF1α UFR – область, фланкирующая ген фактора элонгации трансляции 1 альфа китайского хомячка «выше по течению»; TATA – TATA-бокс; intron 1 – интрон 1 гена фактора элонгации трансляции 1 альфа китайского хомячка; Kozak – синтетическая консенсусная последовательность Козак; SP – область, кодирующая сигнальный пептид гена ACE2; ACE2s – открытая рамка считывания внеклеточного домена ACE2; EMCV IRES – внутренний сайт связывания рибосом вируса энцефаломиокардита лошадей; DHFR – открытая рамка считывания дигидрофолатредуктазы мыши; CHO EF1α DFR – область, фланкирующая ген фактора элонгации трансляции 1 альфа китайского хомячка «ниже по течению», включающая терминатор, сигнал полиаденилирования и 3'-нетранслируемую область этого гена. Стрелками указаны направления транскрипции генов. На панели (б) существующие остатки Cys обозначены белым шрифтом, замены – чёрным шрифтом. Синие фрагменты – известные сайты N-гликозилирования, тёмно-синий фрагмент – сайт O-гликозилирования. AS – линкерный дипептид, связывающий ACE2 и Fc-фрагмент. Планки погрешностей здесь и далее соответствуют стандартному отклонению, статистические различия по критерию Стьюдента, $n = 2$, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ns: $p > 0,05$

Последовательность, кодирующую фрагмент Fc IgG1 человека с аминокислотными заменами C220S, C226S, C229S, N297H (нумерация по Каббату), получали методом ПЦР с использованием смеси полимераз Encyclo («Евроген», Россия), плазмиды p1.1-Tr2-V-RBDv2-Fc [8] в качестве матрицы, праймеров AD-FcNheF (5'-AGCTAGCGAGCCCAAGAGCAGCGAT-3') и AD-FcNheR (5'-CGCTAGCTACTTACCAGGACTAAGAG-3'), содержащих добавленные последовательности для узнавания эндонуклеазой NheI. Продукт ПЦР

размером 712 п.н. выделяли из 1%-ного агарозного геля набором PCR Clean-Up System («Евроген»), клонировали в вектор pAL2-T («Евроген») с образованием плазмиды pAL2-Fc, верифицировали нуклеотидную последовательность методом секвенирования, вырезали фрагмент NheI-NheI размером 704 п.н. и лигировали с плазмидой pTF-ACE2s, рестрицированной той же эндонуклеазой. Поскольку открытая рамка считывания (ОРС) фрагмента Fc включала стоп-кодон, С-концевые тэги вектора pTF не транслировались.

Ориентацию вставки определяли методом ПЦР с колоний с использованием праймера к pTF-sACE2s SQ-ACE1512-F [7] и AD-FcNheR. Полученные плазмиды pTF-sACE2-Fc секвенировали с тех же праймеров и использовали для трансфекции клеток CHO. Для выделения плазмид использовали наборы Plasmid Miniprep и Plasmid Midiprep 2.0 («Евроген»).

Получение поликлональных линий-продуктов. Клетки линии CHO 4BGD [9] вели в культуральной среде ProCHO5 («Lonza», Швейцария) с добавлением 8 мМ глутамин в виде смеси добавок глутамин и аланилглутамин («ПанЭко», Россия). Проводили трансфекцию методом электропорации на аппарате Neon («Invitrogen», США) в режиме 1700 В, 10 мс, в соотношении 60 мкг ДНК/10 млн клеток. Получали стабильную линию в присутствии селекционного агента MTX в концентрации 200 нМ с пассированием каждые 3–7 дней до восстановления жизнеспособности клеток более 90%, после этого увеличивали концентрацию MTX до 2 мкМ и вели пассирование до восстановления жизнеспособности выше 85%, затем повторяли амплификацию при концентрации MTX 8 мкМ. Измерение концентрации ACE2-Fc в культуральной среде проводили при помощи ИФА с антителом и конъюгатом антитела к Fc-фрагменту IgG1 человека («ХЕМА», Россия). В качестве калибратора концентрации использовали мкАт IgG1 человека, затем – очищенный ACE2-Fc. Все количественные данные в статье приведены для калибратора ACE2-Fc.

Культивация линии для препаративной наработки белка проводилась в 30 мл среды ActiPro Medium («Cytiva», США) с добавлением 6 мМ аланилглутамин, помещённых в перемешиваемые колбы Эрленмейера на 125 мл, при 37 °С, 5% CO₂, 155 об./мин и при амплитуде качалки 12 мм. Поддерживали концентрацию глюкозы в среде в районе 22 мМ, при падении pH ниже 7,00 добавляли 5 М NaOH.

Очистка белка. ACE2-Fc выделяли из 30–60 мл кондиционированной среды методом аффинной хроматографии на 1-мл колонке, содержащей сорбент MabSelect SuRe («Cytiva»), подвижная фаза – 20 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 150 мМ NaCl, скорость нанесения 0,5 мл/мин, объём промывки 20 мл после стабилизации базовой линии. Элюцию проводили раствором 50 мМ цитрата натрия, pH 3,2. Собраный элюат целевого белка немедленно нейтрализовали раствором Tris-основания до pH 7,0. Нейтрализованный элюат разбавляли 5 объёмами деионизованной воды и наносили на 1-мл анионообменную колонку HiTrap

Capto Q («Cytiva») на скорости 1 мл/мин. Колонку промывали раствором 20 мМ фосфата натрия, pH 7,4; целевой белок элюировали градиентом концентрации NaCl от 0 до 0,5 М в 10 объёмах колонки. Концентрацию очищенного ACE2-Fc определяли при помощи УФ-спектрофотометрии, используя раствор фильтрата, возникающего при ультрафильтрации очищенного белка, в качестве раствора сравнения. Коэффициент поглощения при $\lambda = 280$ нм для ACE2-Fc был определён по аминокислотной последовательности слитного белка и составил 1,78 ОЕ·мл/мг. Раствор элюированного ACE2-Fc концентрировали до 1–2 мг/мл с помощью центрифужных концентраторов Vivaspin 30 000 MWCO («Sartorius», Германия) и хранили при –70 °С. Конъюгирование ACE2-Fc с HRP проводили периодатным методом.

Аналитическая гель-фильтрация ACE2-Fc. Олигомерное состояние полученного препарата ACE2-Fc оценивали методом аналитической гель-фильтрации на колонке Superdex 200 10/300 GL («GE Healthcare», США), подвижная фаза – фосфатно-буферизованный раствор (PBS), скорость потока 0,5 мл/мин. В качестве стандартов молекулярной массы использовали набор белков производства «GE Healthcare».

ДСН-ПААГ-Электрофорез. Разделение вели при концентрации акриламида в разделяющем геле 12,5%, окрашивание проводили при помощи коллоидного раствора Кумасси синего. Восстановленный образец получали при добавлении дитиотреитола до 20 мМ и прогревании 5 мин при 95 °С непосредственно перед электрофорезом.

Определение олигомерного состояния ACE2-Fc при помощи детекции многоугольного рассеяния (MALS). Разделение форм ACE2-Fc вели на колонке Superdex 200 Increase 5/150 GL («Cytiva»), подвижная фаза – 20 мМ фосфата натрия, pH 7,4, 100 мМ NaCl. Детекцию вели при помощи УФ-детектора на 280 нм и MALS-детектора miniDAWN («Wyatt Technology», США). Расчёт молекулярной массы вели при помощи штатного программного обеспечения детектора.

Измерение кинетических и равновесных констант взаимодействия проводили методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) на биосенсоре iMSPR-Pro («Icluebio», Республика Корея). Поверхность сенсорного чипа NTA («Icluebio») насыщали раствором NiCl₂ (0,5 мМ, 150 мкл, 30 мкл/мин), проводили иммобилизацию RBD Wuhan (дикий тип) или RBD beta (B.1.351) (25 мкг/мл, 150 мкл, 10 мкл/мин в обоих случаях), оба варианта RBD содержали

на C-конце 10xHis-кластер и были получены, как описано ранее [7, 8]. Далее в проточную ячейку биосенсора вводили ACE2-Fc в концентрации от 50 до 300 нМ (150 мкл, 30 мкл/мин) в растворе 25 мМ фосфата натрия, pH 7,4, 150 мМ NaCl. После каждого введения ACE2-Fc проводили регенерацию поверхности имидазолом (0,4 М, 150 мкл, 30 мкл/мин). Измерения проводили относительно контрольной ячейки, в которой на поверхности чипа не иммобилизовали RBD, а остальные реагенты вносили так же, как в опытную ячейку. Сигнал биосенсора измеряли в относительных единицах измерения – RU. Аппроксимацию кинетических зависимостей проводили с помощью программы TraceDrawer 1.9.1 («Ridgeview Instruments», Швеция).

Иммуноферментный анализ, сВНТ. Для количественного анализа содержания ACE2-Fc в культуральной жидкости проводили ИФА с иммобилизованными мкАт мыши к тяжёлой цепи IgG человека (XG36, «Хема», Россия). Для всех вариантов ИФА и сВНТ после иммобилизации антигена планшеты трижды промывали PBS с 0,1%-ным Tween 20 (PBST) и блокировали 3%-ным раствором БСА («Диа-М», Россия) в PBS. Для детекции использовали конъюгат антител к тяжёлой цепи IgG человека с HRP (T271X, «Хема») в разведении 1 : 20 000. В качестве калибратора использовали гуманизированное мкАт или очищенный ACE2-Fc с известной концентрацией. Исследуемые и контрольные образцы анализировали в двух повторностях. Детекцию проводили с помощью готового раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорида («Биотест-системы», Россия), реакцию останавливали через 10 мин 5%-ным раствором фосфорной кислоты. Детектировали интенсивность окраски при 450 нм.

Для оценки способности ACE2-Fc связывать RBD S-белка коронавируса SARS-CoV-2 проводили ИФА, иммобилизуя в ячейках иммунологического микропланшета полученный ACE2-Fc в количестве 200 нг/лунку в PBS. Для детекции использовали конъюгат RBD-HRP [7].

Для определения уровня ВНА в лунках микропланшета иммобилизовали RBD SARS-CoV-2 дикого типа или варианта бета по 20 нг на лунку в растворе 50 мМ карбоната натрия, pH 9,4. Анализируемые образцы сывороток крови, полученных от доноров-реконвалесцентов в 2020–2021 гг. [7], разводили в 1%-ном БСА в PBS в диапазоне 1 : 20–1 : 160, вносили по 50 мкл в лунки микропланшета и инкубировали в течение 30 мин при 37 °С, а затем добавляли конъюгат ACE2-Fc-HRP в концентрации 312,5 нг/мл и инкубировали ещё 1 ч

при 37 °С. Лунки пять раз промывали PBST. Вносили раствор субстрата и инкубировали микропланшеты ровно 10 мин при комнатной температуре ($+25 \pm 2$ °С). Реакцию останавливали 100 мкл 5%-ной ортофосфорной кислоты и измеряли оптическую плотность при 450 нм. Расчёт IC_{50} проводили, как указано в работе Колесова и соавт. [7].

Статистический анализ проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для получения рекомбинантного ACE2-Fc нами была использована ОРС негликозилированного Fc-фрагмента IgG1 человека с заменой остатков Cys, образующих межцепочечные S-S связи, на остатки Ser. Такой Fc-фрагмент образует нековалентную димерную структуру и пригоден для стандартной аффинной очистки при помощи протеин А-сефарозы (рис. 1, б). Векторную плазмиду pTF-ACE2s-Fc трансфицировали в клетки линии CHO 4BGD, проводили первичную селекцию стабильно трансфицированных клеток, а затем увеличивали их продуктивность при помощи двух шагов геномной амплификации в присутствии 2 и 8 мкМ МТХ. Только первый шаг амплификации привёл к увеличению общей продуктивности клеток от $0,6 \pm 0,1$ до $24 \pm 0,9$ мг/л целевого белка за 3 дня культивирования (рис. 1, в), дальнейшее увеличение концентрации МТХ привело к небольшому падению концентрации целевого белка в среде, что может соответствовать достижению максимально возможной удельной продуктивности клеток для данного белка. Полученная нами пиковая концентрация ACE2-Fc (рис. 1, д) в среде – 154 мг/л – существенно превосходит опубликованные ранее значения, не превышавшие 1 мг/л [10], и соответствует пиковой концентрации для поликлональной линии клеток-продуцентов ACE2, полученной нами ранее при помощи аналогичной векторной плазмиды и двух циклов геномной амплификации.

Выделенный и очищенный ACE2-Fc не содержал ковалентных мультимеров по данным ДСН-ПААГ и практически не содержал примесных белков (рис. 2, а). По данным гель-фильтрации ACE2-Fc представляет собой смесь димерной и тетрамерной форм, при этом обе формы элюируют быстрее ожидаемого времени (рис. 2, б). Кажущаяся молекулярная масса основной димерной формы ACE2-Fc, определённая при помощи MALS-детектора, также составила 313 кДа (рис. 2, в, теоретически

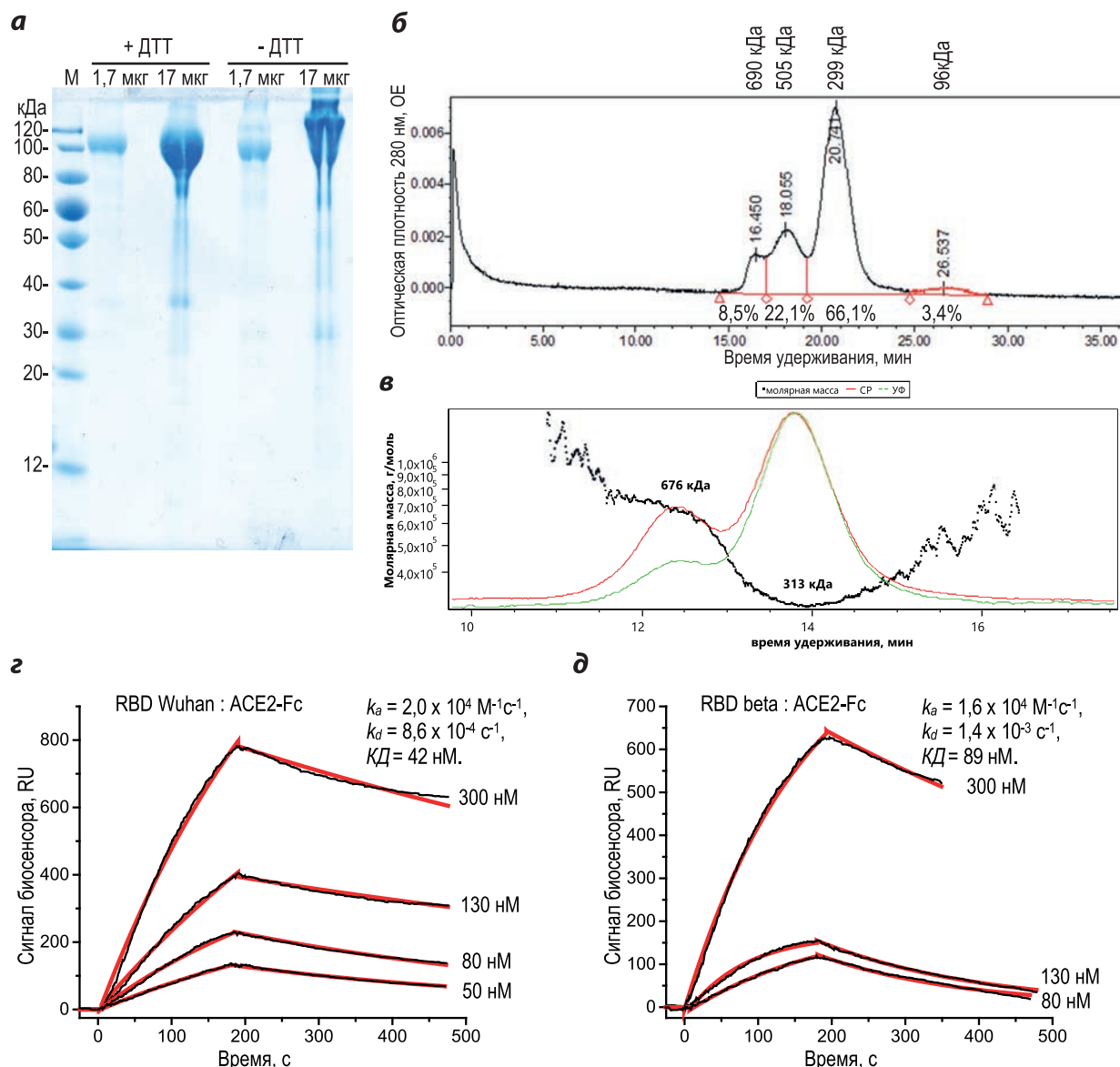


Рис. 2. Характеризация полученного белка ACE2-Fc методами ДСН-ПААГ (*а*), гель-фильтрации с УФ-детекцией (*б*) и с детекцией MALS (*в*), определение константы диссоциации ACE2-Fc и RBD вариантов SARS-CoV-2 методом ППР (*г, д*). Обозначения: М – маркер молекулярных масс, +ДТТ – внесение дитиотреитола до 10 мМ в образец для электрофореза; –ДТТ – без добавления дитиотреитола; 1,7 мкг, 17 мкг – количество целевого белка, внесённого в лунки геля, СР – светорассеяние, УФ – оптическая плотность на 280 нм, k_a – константа скорости ассоциации, k_d – константа скорости диссоциации

рассчитанная молекулярная масса мономера ACE2-Fc – 110 кДа), что может быть объяснено сильным N-гликозилированием белка и увеличением размера его глобулы.

Константа диссоциации (КД) ACE2-Fc и RBD Wuhan, определённая методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР), составила 42 нМ (рис. 2, *г*); для данного варианта RBD и мономерного ACE2 КД составляла 33 нМ при измерении кинетики образования и распада комплекса иммобилизованного мономерного ACE2 и RBD, находящегося в растворе [7]. Константа диссоциации ACE2-Fc и RBD вируса SARS-CoV-2 бета составила

89 нМ, что также соответствует литературным данным.

Реагент для проведения сВНТ был получен путём стандартной конъюгации ACE2-Fc с HRP периодатным методом. Полученный реагент ACE2-Fc-HRP так же, как и мономерный ACE2-HRP, давал в ИФА линейную зависимость оптической плотности раствора субстрата реакции от концентрации ACE2-Fc-HRP (рис. 3, *а*), вследствие этого расчёт степени ингибирования может выполняться без построения полной S-образной кривой ингибирования. Ингибирование образования комплекса RBD : ACE2-Fc-HRP нейтрализующими

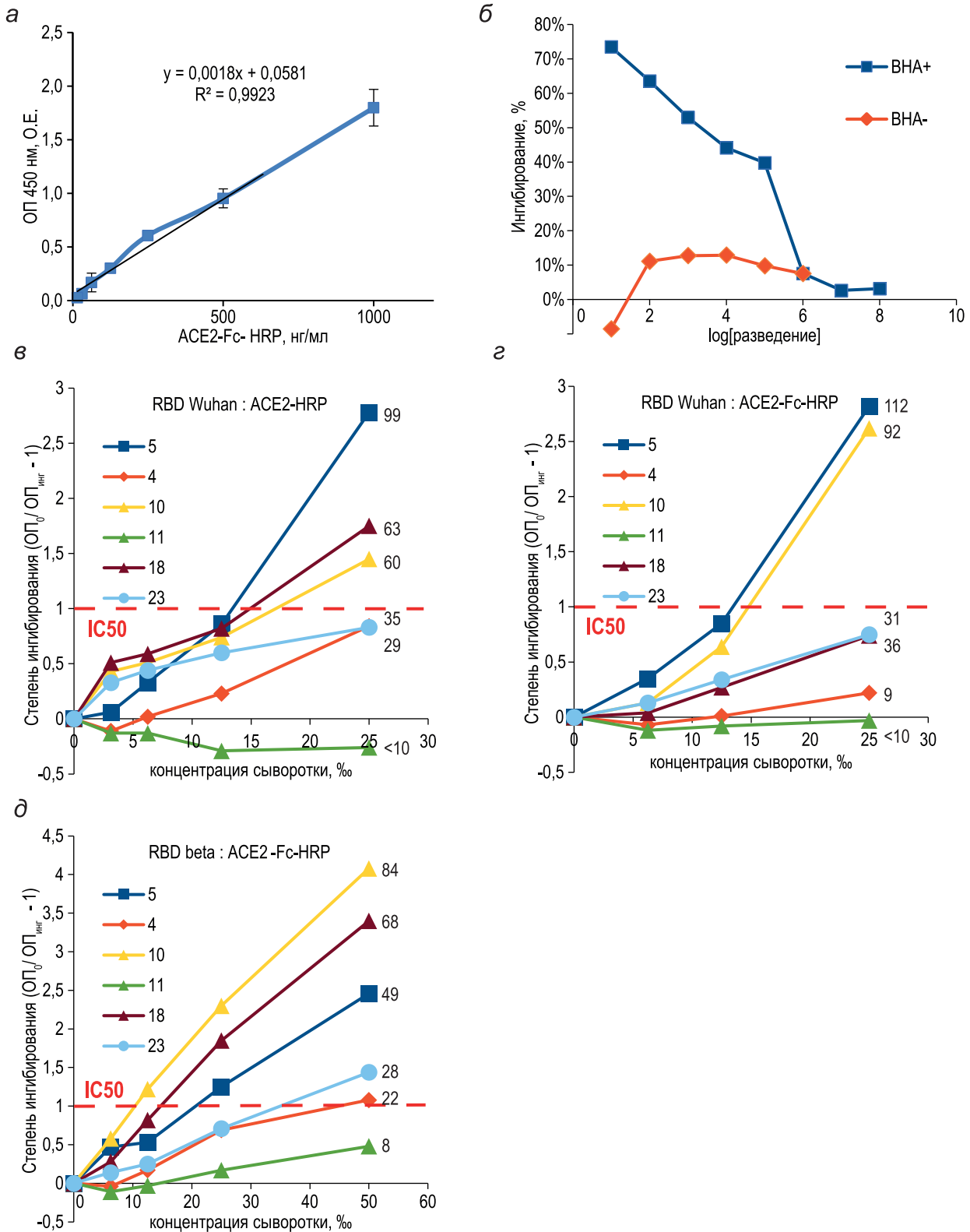


Рис. 3. Сравнительный анализ кривых ингибирования связывания ACE2-Fc-HRP и ACE2-HRP с RBD S-белка SARS-CoV-2 дикого типа. Калибровочная кривая зависимости сигнала в ИФА от концентрации ACE2-Fc-HRP (а), зависимость ингибирования связывания ACE2-Fc-HRP с RBD от разведения сывороток крови реконвалесцентов с высоким (BHA+) и низким (BHA-) содержанием BHA (б), кривые ингибирования для образцов сывороток крови из контрольной панели NIBSC (в-д). В нижнем слое на панелях а-г использован RBD Wuhan, на панели д – RBD beta. Панели а, б, г, д – ACE2-Fc-HRP, панель в – ACE2-HRP. Значения ID₅₀, выраженные как разведения тестируемых образцов, обеспечивающие 50%-ное ингибирование, приведены справа от соответствующих кривых ингибирования для панелей в-д. Обозначения: ОП 450 нм – оптическая плотность образцов, ОП₀ – оптическая плотность образцов контрольных образцов, ОП_{инг} – оптическая плотность образцов с добавлением антител

антителами в высокой концентрации приводило к почти полному прекращению связывания ACE2-Fc и RBD (рис. 3, б), а присутствие антител к RBD, не имеющих вирус-нейтрализующего действия, вызывало видимое ингибирование связывания RBD-Fc-HRP и RBD не более чем на 15%.

Для набора контрольных образцов сывороток крови из калибраторной панели NIBSC, исследованных нами ранее в сВНТ с мономерным ACE2-HRP, было установлено, что определяемые IC_{50} для димерного ACE2-Fc-HRP близки к IC_{50} для мономерного ACE2-HRP (рис. 3, в, г). При замене RBD Wuhan на RBD варианта вируса beta наблюдалось уменьшение IC_{50} для 5 из 6 тестируемых образцов, аналогичные данные были получены ранее для мономерного ACE2-HRP. Таким образом, димерный ACE2-Fc при обычном выполнении сВНТ в формате ИФА эквивалентен мономерному ACE2, может быть получен в больших количествах при помощи стабильно трансфицированных клеток CHO и пригоден для использования в рутинном тестировании динамики титров ВНА в отношении циркулирующих вариантов вируса SARS-CoV-2.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Суррогатные методы определения уровней ВНА, не требующие использования вирусов и культивируемых клеток, могут широко использоваться при наблюдениях за последствиями вакцинации, определении текущего состояния коллективного иммунитета (herd immunity), оценки вирулентности новых вариантов вирусов, а также скрининга библиотек малых молекул – ингибиторов комплексообразования S-белка с рецептором, либо быстрой оценки вирус-нейтрализующей способности мкАт [11]. Один из наиболее распространённых в мире наборов для сВНТ, сPass, показывает корреляцию с данными ВНТ несколько хуже, чем прямой ИФА с S-фрагментом S-белка [12].

В целом, различные варианты реализации сВНТ для SARS-CoV-2, описанные в литературе, дают сходные значения величины корреляции результатов сВНТ и «настоящего» ВНТ. Одновременно с этим при детальном сравнении значений IC_{50} , определённых для одних и тех же образцов сыворотки при помощи разных наборов для сВНТ, выявлялись сильные количественные различия между наборами (см., например, рис. 2 в работе Pieri et al. [13]). В нашем случае при сравнении вычисляемых IC_{50} для одних и тех же образцов сывороток с ВНА при

помощи реагентов ACE2-HRP и ACE2-Fc-HRP не наблюдается существенного изменения IC_{50} . Мы считаем, что причиной больших различий в определяемом уровне IC_{50} между различными коммерческими наборами для сВНТ в одних и тех же образцах являются не различия в состоянии реагента ACE2, а особенности связывания с антителами конъюгатов RBD-HRP и различающиеся протоколы прединкубации исследуемых образцов с RBD-HRP.

При проведении сВНТ с RBD в качестве иммобилизованного на поверхности микропланшетов антигена кооперативное взаимодействие молекул иммуноглобулинов или димерных молекул ACE2-Fc одновременно с двумя молекулами RBD представляется крайне маловероятным. Так, при нанесении 100 нг RBD на одну лунку стандартного 96-луночного микропланшета среднее расстояние между центрами соседних молекул RBD составит около 300 нм, что на два порядка превышает их молекулярный радиус. При использовании ACE2-Fc в качестве иммобилизованного антигена остаётся возможным взаимодействие с ним двух молекул RBD-HRP либо двух иммунокомплексов, содержащих цепочки из молекул иммуноглобулинов и молекул RBD-HRP, и образование таких мультимерных комплексов может давать завышенные величины IC_{50} , поэтому данный формат постановки сВНТ в настоящей работе не исследовался.

Константа диссоциации мономеров ACE2 и RBD S-белка SARS-CoV-2 дикого типа составляет около 30 нМ, а для многих вирус-нейтрализующих мкАт, направленных против SARS-CoV-2 дикого типа, были получены значительно более низкие константы диссоциации. Это ограничило интерес исследователей к созданию и исследованиям препаратов ACE2 в качестве противовирусных средств. Эволюция SARS-CoV-2 достаточно быстро привела к потере эффективности мкАт, получивших временную регистрацию в качестве лекарственных средств. Ферментативно активный растворимый ACE2 ранее проходил клинические испытания при респираторном дистресс-синдроме взрослых и продемонстрировал достаточную безопасность для пациентов, но недостаточную эффективность [14]. При местном применении в качестве аэрозоля этот препарат также был достаточно безопасен для здоровых добровольцев, но его эффективность как противовирусного средства была продемонстрирована только на животной модели [15]. Аффинность ACE2 к S-белку SARS-CoV-2 может быть увеличена до достижения КД около 10 нМ при внесении в ACE2 трёх мутаций:

T27Y, L79T, N330Y [16], такая КД сохраняется и для ACE2-Fc, при этом IC₅₀ в ВНТ составляет также около 10 нМ [17]. Набор мутаций A25V, K31N, E35K, L79F в ACE2 позволил получить КД с RBD SARS-CoV-2 дикого типа менее 1 нМ [18], при ко-культивации вируса SARS-CoV-2 с таким ACE2-Fc не наблюдали эволюции вируса против нейтрализации слитным белком в течение 15 пассажей. Тем не менее такая настройка ACE2 на большую аффинность к известным вариантам вируса SARS-CoV-2 может привести как к ухудшению аффинности против новых вариантов этого вируса, так и к падению аффинности по сравнению с природным ACE2 для новых вирусов, использующих его в качестве рецептора.

Ферментативно неактивные варианты ACE2 сохраняют способность связываться с S-белком сарбековирусов. На примере S-белка SARS-CoV было показано, что ACE2-Fc с мутациями H374N и H378N ингибирует псевдотипированный вирус в ВНТ с IC₅₀ около 2 нМ [19]. Нежелательная ферментативная активность ACE2 может быть устранена как точечными мутациями, так и необратимыми ингибиторами [20], что также может быть использовано для получения лекарственных препаратов ACE2-Fc. Более совершенные варианты ACE2-Fc, исследованные к настоящему моменту, содержат как точечные мутации, блокирующие карбоксипептидазную активность ACE2, так и укороченные формы внеклеточной части ACE2, варианты искусственной шарнирной области IgG и несколько вариантов Fc-фрагмента, обеспечивающих разный спектр его эффекторных функций [21].

Описанная в настоящей работе система экспрессии гена ACE2-Fc обладает достаточной удельной продуктивностью для получения прототипа лекарственного средства, которое может потребоваться при возникновении новых вариантов SARS-CoV-2 с высокой патогенностью или новых видов коронавирусов, использующих рецептор ACE2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Димерный слитный белок ACE2-Fc может быть получен в больших количествах в клетках CHO при помощи векторной плазмиды на основе нетранслируемых областей гена *EEF1A1* китайского хомячка и выделен в чистом виде как смесь димерной и тетрамерной форм. Димерный ACE2-Fc может быть конъюгирован с HRP при помощи стандартного протокола и полностью эквивалентен мономерному ACE2 в качестве реагента для сВНТ. Получение ферментативно неактивных вариантов ACE2-Fc как прототипов противовирусных лекарственных средств может быть предметом дальнейших исследований.

Вклад авторов. И.И. Воробьев – концепция и руководство работой; Е.А. Гаямова, Д.Э. Колесов, Н.А. Орлова – проведение экспериментов; все авторы – обсуждение результатов исследования; И.И. Воробьев и Н.А. Орлова – написание текста; Н.А. Орлова – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-04-00091).

Благодарности. Авторы выражают благодарность Н.Н. Случанко (Институт биохимии им. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН) за проведение определения молекулярной массы ACE2-Fc при помощи MALS-детекции, Сафенковой И.В. (ibid.) за проведение определения константы диссоциации ACE2-Fc и RBD методом ППР, Кострикиной Е.С. (ООО «Хема-Медика») за получение конъюгата ACE2-Fc-HRP.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lambert, D. W., Yarski, M., Warner, F. J., Thornhill, P., Parkin, E. T., Smith, A. I., Hooper, N. M., and Turner, A. J. (2005) Tumor necrosis factor-alpha convertase (ADAM17) mediates regulated ectodomain shedding of the severe-acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) receptor, angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2), *J. Biol. Chem.*, **280**, 30113-30119, doi: 10.1074/jbc.M505111200.
2. Smith, M. K., Tusell, S., Travanty, E. A., Berkhout, B., van der Hoek, L., and Holmes, K. V. (2006) Human angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) is a receptor for human respiratory coronavirus NL63, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **581**, 285-288, doi: 10.1007/978-0-387-33012-9_48.
3. Bohn, M. K., Lippi, G., Horvath, A., Sethi, S., Koch, D., Ferrari, M., Wang, C. B., Mancini, N., Steele, S.,

- and Adeli, K. (2020) Molecular, serological, and biochemical diagnosis and monitoring of COVID-19: IFCC taskforce evaluation of the latest evidence, *Clin. Chem. Lab. Med.*, **58**, 1037-1052, doi: 10.1515/ccm-2020-0722.
4. Bewley, K. R., Coombes, N. S., Gagnon, L., McInroy, L., Baker, N., Shaik, I., St-Jean, J. R., St-Amant, N., Buttigieg, K. R., Humphries, H. E., Godwin, K. J., Brunt, E., Allen, L., Leung, S., Brown, P. J., Penn, E. J., Thomas, K., Kulnis, G., Hallis, B., Carroll, M., et al. (2021) Quantification of SARS-CoV-2 neutralizing antibody by wild-type plaque reduction neutralization, microneutralization and pseudotyped virus neutralization assays, *Nat. Protoc.*, **16**, 3114-3140, doi: 10.1038/s41596-021-00536-y.
 5. Vandergaast, R., Carey, T., Reiter, S., Lathrum, C., Lech, P., Gnanadurai, C., Haselton, M., Buehler, J., Narjari, R., Schnebeck, L., Roesler, A., Sevola, K., Suksanpaisan, L., Bexon, A., Naik, S., Brunton, B., Weaver, S. C., Rafael, G., Tran, S., Baum, A., et al. (2021) IMMUNO-COV v2.0: Development and validation of a high-throughput clinical assay for measuring SARS-CoV-2-neutralizing antibody titers, *mSphere*, **6**, e0017021, doi: 10.1128/mSphere.00170-21.
 6. Tan, C. W., Chia, W. N., Qin, X., Liu, P., Chen, M. I., Tiu, C., Hu, Z., Chen, V. C., Young, B. E., Sia, W. R., Tan, Y. J., Foo, R., Yi, Y., Lye, D. C., Anderson, D. E., and Wang, L. F. (2020) A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2-spike protein-protein interaction, *Nat. Biotechnol.*, **38**, 1073-1078, doi: 10.1038/s41587-020-0631-z.
 7. Kolesov, D. E., Sinegubova, M. V., Dayanova, L. K., Dolzhikova, I. V., Vorobiev, I. I., and Orlova, N. A. (2022) Fast and accurate surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blocking of the interaction of ACE2 and SARS-CoV-2 spike protein RBD, *Diagnostics (Basel)*, **12**, 393, doi: 10.3390/diagnostics12020393.
 8. Рязанова А. Ю., Ходак Ю. А., Орлова Н. А., Синегубова М. В., Даянова Л. К., Ковнир С. В., Коробова С. В., Лёдов В. А., Ковальчук А. Л., Алхазова Б. И., Головина М. Э., Воробьев И. И., Апарин П. Г. (2022) Рецепторсвязывающий домен S-белка SARS-CoV-2, слитый с негликозилированным кристаллизующимся фрагментом IgG1 человека: получение и оценка иммуногенности, *Биотехнология*, **38**, 12-19, doi: 10.56304/S0234275822060102.
 9. Orlova, N. A., Dayanova, L. K., Gayamova, E. A., Sinegubova, M. V., Kovnir, S. V., and Vorobiev, I. I. (2022) Targeted knockout of the *dhfr*, *glul*, *bak1*, and *bax* genes by the multiplex genome editing in CHO cells, *Dokl Biochem Biophys*, **502**, 40-44, doi: 10.1134/S1607672922010082.
 10. Matthews, A. M., Biel, T. G., Ortega-Rodriguez, U., Falkowski, V. M., Bush, X., Faison, T., Xie, H., Agarabi, C., Rao, V. A., and Ju, T. (2022) SARS-CoV-2 spike protein variant binding affinity to an angiotensin-converting enzyme 2 fusion glycoproteins, *PLoS One*, **17**, e0278294, doi: 10.1371/journal.pone.0278294.
 11. Zhang, S., Gao, C., Das, T., Luo, S., Tang, H., Yao, X., Cho, C. Y., Lv, J., Maravillas, K., Jones, V., Chen, X., and Huang, R. (2022) The spike-ACE2 binding assay: An *in vitro* platform for evaluating vaccination efficacy and for screening SARS-CoV-2 inhibitors and neutralizing antibodies, *J. Immunol. Methods*, **503**, 113244, doi: 10.1016/j.jim.2022.113244.
 12. Ru, Z., Xhang, Y., Wu, J., Huang, H., Liang, Y., Yang, X., Wu, J., and Lou, J. (2021) Comparison of the SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test (sVNT) assay and direct binding ELISA (S-IgG) with the cytopathic effect assay (CPE) in analyzing the neutralization antibody of vaccination people, *J. Clin. Immunol. Immunother.*, **7**, 063, doi: 10.24966/CIIT-8844/1000063.
 13. Pieri, M., Infantino, M., Manfredi, M., Nuccetelli, M., Grossi, V., Lari, B., Tomassetti, F., Sarubbi, S., Russo, E., Amedei, A., Benucci, M., Casprini, P., Stacchini, L., Castilletti, C., and Bernardini, S. (2022) Performance evaluation of four surrogate Virus Neutralization Tests (sVNTs) in comparison to the *in vivo* gold standard test, *Front. Biosci. (Landmark Ed)*, **27**, 74, doi: 10.31083/j.fbl2702074.
 14. Khan, A., Benthin, C., Zeno, B., Albertson, T. E., Boyd, J., Christie, J. D., Hall, R., Poirier, G., Ronco, J. J., Tidswell, M., Harges, K., Powley, W. M., Wright, T. J., Siederer, S. K., Fairman, D. A., Lipson, D. A., Bayliffe, A. I., and Lazaar, A. L. (2017) A pilot clinical trial of recombinant human angiotensin-converting enzyme 2 in acute respiratory distress syndrome, *Crit. Care*, **21**, 234, doi: 10.1186/s13054-017-1823-x.
 15. Shoemaker, R. H., Panettieri, R. A., Jr., Libutti, S. K., Hochster, H. S., Watts, N. R., Wingfield, P. T., Starkl, P., Pimenov, L., Gawish, R., Hladik, A., Knapp, S., Boring, D., White, J. M., Lawrence, Q., Boone, J., Marshall, J. D., Matthews, R. L., Cholewa, B. D., Richig, J. W., Chen, B. T., et al. (2022) Development of an aerosol intervention for COVID-19 disease: Tolerability of soluble ACE2 (APN01) administered via nebulizer, *PLoS One*, **17**, e0271066, doi: 10.1371/journal.pone.0271066.
 16. Chan, K. K., Dorosky, D., Sharma, P., Abbasi, S. A., Dye, J. M., Kranz, D. M., Herbert, A. S., and Procko, E. (2020) Engineering human ACE2 to optimize binding to the spike protein of SARS coronavirus 2, *Science*, **369**, 1261-1265, doi: 10.1126/science.abc0870.
 17. Wines, B. D., Kurtovic, L., Trist, H. M., Esparon, S., Lopez, E., Chappin, K., Chan, L. J., Mordant, F. L., Lee, W. S., Gherardin, N. A., Patel, S. K., Hartley, G. E., Pymm, P., Cooney, J. P., Beeson, J. G., Godfrey, D. I., Burrell, L. M., van Zelm, M. C., Wheatley, A. K., Chung, A. W., et al. (2022)

- Fc engineered ACE2-Fc is a potent multifunctional agent targeting SARS-CoV2, *Front. Immunol.*, **13**, 889372, doi: 10.3389/fimmu.2022.889372.
18. Higuchi, Y., Suzuki, T., Arimori, T., Ikemura, N., Mihara, E., Kirita, Y., Ohgitani, E., Mazda, O., Motooka, D., Nakamura, S., Sakai, Y., Itoh, Y., Sugihara, F., Matsuura, Y., Matoba, S., Okamoto, T., Takagi, J., and Hoshino, A. (2021) Engineered ACE2 receptor therapy overcomes mutational escape of SARS-CoV-2, *Nat. Commun.*, **12**, 3802, doi: 10.1038/s41467-021-24013-y.
 19. Moore, M. J., Dorfman, T., Li, W., Wong, S. K., Li, Y., Kuhn, J. H., Coderre, J., Vasilieva, N., Han, Z., Greenough, T. C., Farzan, M., and Choe, H. (2004) Retroviruses pseudotyped with the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein efficiently infect cells expressing angiotensin-converting enzyme 2, *J. Virol.*, **78**, 10628-10635, doi: 10.1128/JVI.78.19.10628-10635.2004.
 20. Svilenov, H. L., Delhommel, F., Siebenmorgen, T., Ruhrnossl, F., Popowicz, G. M., Reiter, A., Sattler, M., Brockmeyer, C., and Buchner, J. (2023) Extrinsic stabilization of antiviral ACE2-Fc fusion proteins targeting SARS-CoV-2, *Commun. Biol.*, **6**, 386, doi: 10.1038/s42003-023-04762-w.
 21. Hernández, T., Bermúdez, E., Fundora, T., and Sánchez, B. (2022) COVID-19 therapy based on soluble ACE2: the use of receptor-Fc fusion proteins, *Open Acc. J. Bio Sci.*, **4**, 1970-1975, doi: 10.38125/OAJBS.000472.

DIMERIC ACE2-FC IS EQUIVALENT TO MONOMERIC ACE2 IN THE SURROGATE VIRUS NEUTRALIZATION TEST

D. E. Kolesov, E. A. Gaiamova, N. A. Orlova, and I. I. Vorobiev*

*Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology", Russian Academy of Sciences,
119071 Moscow, Russia; e-mail: ptichman@gmail.com*

Angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) is the main cellular receptor for the dangerous sarbecoviruses SARS-CoV and SARS-CoV-2. Its recombinant extracellular domain is used to monitor the level of the protective humoral immune response to a viral infection or vaccine using a surrogate virus neutralization test (sVNT). Soluble ACE2 is also being considered as an antiviral therapy option potentially insensitive to changes in the SARS-CoV-2 spike protein. For widespread sVHT testing, it is necessary to use ACE2 preparations or ACE2 conjugates with constant properties. Previously, we obtained a cell line that produces soluble monomeric ACE2 and showed that this variant of ACE2 can be used in sBHT, preferably in the form of a conjugate with horseradish peroxidase. To obtain a stable and universally applicable form of soluble ACE2, a cell line was obtained that produced the ACE2-Fc fusion protein with high productivity, more than 150 mg/l of the target protein during cultivation in a stirred flask. Affinity-purified ACE2-Fc is a mixture of dimeric and tetrameric forms, but allows one to obtain linearizable antibody inhibition curves for complexation with the receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 spike protein. The ACE2-Fc-HRP based sVHT testing system can be used to practically measure the levels of virus-neutralizing antibodies against various circulating variants of the SARS-CoV-2 virus.

Keywords: angiotensin-converting enzyme 2, SARS-CoV-2, sVHT, virus neutralization, protective immunity

УДК 577.1

АНАЛИЗ НЕКОТОРЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМОЗИНА СИБИРСКОЙ КОСУЛИ (*Capreolus pygargus*), ПОЛУЧЕННОГО В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ (СНО-К1)

© 2023 Д.Е. Мурашкин¹, С.В. Беленькая^{1,2*}, А.А. Бондарь³,
В.В. Ельчанинов⁴, Д.Н. Щербаков^{1,5}

¹ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559 Кольцово, Новосибирская обл., Россия; электронная почта: belenkaya.sveta@gmail.com

² Новосибирский государственный университет, 630090 Новосибирск, Россия

³ ЦКП «Геномика», Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090 Новосибирск, Россия

⁴ Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, Сибирский НИИ сыроделия, 656910 Барнаул, Россия

⁵ Алтайский государственный университет, 656049 Барнаул, Россия

Поступила в редакцию 16.05.2023

После доработки 13.07.2023

Принята к публикации 15.07.2023

Впервые установлена структура гена химозина (Хн) сибирской косули (*Capreolus pygargus*) и определена его экзон/интронная организация. Методом Golden Gate реконструирована и получена в виде ДНК-клона кодирующая часть гена Хн *S. pygargus*. Сравнительный анализ последовательностей прохимозинов (ПроХн) косули, коровы и одногорбого верблюда выявил ряд аминокислотных замен на участках, формирующих субстрат-связывающую полость фермента и затрагивающих субсайты специфичности S4 и S1' + S3'. С использованием интеграционного вектора rIP1 сконструирована рекомбинантная плазмида rIP1-Cap для экспрессии гена ПроХн косули в клетках СНО-К1. Получен поликлон клеток СНО-К1-СУМ-Cap, обеспечивающий синтез и секрецию рекомбинантного ПроХн в культуральную жидкость. В результате активации зимогена получен препарат рекомбинантного Хн косули с общей молокосвёртывающей активностью $468,4 \pm 11,1$ IMCU/мл (IMCU – International Milk Clotting Units, международные единицы молокосвёртывающей активности). Выход рекомбинантного Хн косули составил 500 мг/л или $\approx 468\,000$ IMCU/л, что превышает показатели выхода генно-инженерных Хн в большинстве используемых систем экспрессии. Основные биохимические свойства полученного фермента сравнивали с коммерческими препаратами рекомбинантных Хн одногорбого верблюда (*Camelus dromedarius*) и коровы (*Bos taurus*). Удельная молокосвёртывающая активность рекомбинантного Хн *S. pygargus* составила 938 ± 22 IMCU/мг белка и была сопоставима с показателями ферментов сравнения. Неспецифическая протеолитическая активность рекомбинантного Хн косули оказалась в 1,4–4,5 раза выше, чем у ферментов коровы и верблюда. По коагуляционной специфичности рекомбинантный Хн *S. pygargus* занимал промежуточное положение между генно-инженерными аналогами Хн *B. taurus* и *C. dromedarius*. Порог термостабильности рекомбинантного Хн косули был равен 55 °С. При 60 °С фермент сохранял < 1% от исходной молокосвёртывающей активности, а его полная термоинактивация наблюдалась при 65 °С.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: система экспрессии млекопитающих, СНО-К1, рекомбинантный химозин, сибирская косуля, молокосвёртывающая активность, протеолитическая активность, термостабильность.

DOI: 10.31857/S0320972523090087, EDN: WWNNWK

ВВЕДЕНИЕ

Гастральный молокосвёртывающий фермент химозин (КФ 3.4.23.4) относится к се-

мейству аспартатных протеиназ. Его активный центр несёт два остатка аспарагиновой аминокислоты в положениях 34 и 216 [1]. Аспартатные протеиназы входят в группу

Принятые сокращения: МА – молокосвёртывающая активность; ПА – протеолитическая активность; ПроХн – прохимозин; рПроХн – рекомбинантный прохимозин; рХн – рекомбинантный химозин; Хн – химозин; СНО – культура клеток яичника китайского хомячка; СН – казеин.

* Адресат для корреспонденции.

эндопептидаз — ферментов, гидролизующих внутримолекулярные пептидные связи [2, 3]. Химозин (Хн) избирательно и с высокой скоростью гидролизует связь F105-M106 в молекуле κ -казеина (κ -CN), что вызывает свёртывание молока. Натуральный Хн, получаемый из желудков новорожденных сельскохозяйственных животных, а также его генно-инженерные аналоги широко используются при производстве сыров.

Хн является удобной моделью для разработки и анализа эффективности как про-, так и эукариотических систем экспрессии. Его ферментативная (молокосвёртывающая) активность зависит от корректности процессов синтеза и посттрансляционного процессинга. Молокосвёртывающая активность (МА) Хн определяется с использованием простых клоттинговых тестов, не требующих дорогостоящих реагентов и оборудования.

Для получения рекомбинантного прохимозина (рПроХн) использовались различные системы продукции. В прокариотах (речь идёт преимущественно об *Escherichia coli*), несмотря на достаточно высокий уровень синтеза, целевой белок накапливается в нерастворимой форме в тельцах включения, что требует использования процедуры рефолдинга, эффективность которой в случае ПроХн невысока [4–7].

Уровень синтеза ПроХн клетками *Bacillus subtilis* предельно низок [8]. Видимо, поэтому данная система продукции для получения рекомбинантного Хн (рХн) не используется.

Опубликован ряд работ, описывающих получение рПроХн в растительных экспрессионных системах [9–11]. К недостаткам этих систем относится неразрешённая проблема гликозилирования белков по растительному типу [12].

Наиболее существенные результаты достигнуты при экспрессии гена ПроХн в грибных (*Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*) и дрожжевых (*Komagataella* (ранее — *Pichia*) *pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*) клетках. При использовании этих систем целевой белок секретируется в культуральную жидкость продуцента и, после активации, демонстрирует высокую ферментативную активность [13–17]. В настоящее время грибные системы продукции активно используются при промышленном получении рХн коровы (*Bos taurus*) и одногорбого верблюда (*Camelus dromedarius*) [18].

Системы экспрессии на основе клеток млекопитающих наилучшим образом подходят для получения рекомбинантных белков представителей этого класса, особенно в тех случа-

ях, когда принципиально важен определённый характер посттрансляционных модификаций (ПТМ) целевого продукта. Удивительно, но в научной периодике обнаруживается всего два примера описания экспрессии гена ПроХн коровы в клетках млекопитающих [19, 20].

Системы экспрессии на основе клеток теплокровных животных (СНО, NS0, Sp2/0, НЕК 293, ВНК-21, Per.C6) способны обеспечивать высокоэффективный синтез, ПТМ и секрецию рекомбинантных белков. Однако для культивирования клеток млекопитающих необходимы дорогостоящие питательные среды и оборудование, что приводит к увеличению цены конечных продуктов. Принято считать, что использование этих систем оправдано лишь для получения особо значимых белков и ферментов [21]. Поэтому основной сферой применения систем продукции млекопитающих является производство моноклональных антител и других терапевтических белков [22, 23].

С момента первых попыток получения Хн в клетках млекопитающих прошло более 30 лет. За это время достигнут серьёзный прогресс в развитии технологий конструирования продуцентов, накоплен значительный опыт использования высокоэффективных промоторов, разработаны новые питательные среды. Всё это увеличивает доступность систем экспрессии в клетках млекопитающих и позволяет рассматривать их как перспективный инструмент для получения самого широкого спектра рекомбинантных белков научного, технологического и терапевтического назначения [21].

По сравнению с другими системами экспрессии млекопитающих культура клеток яичника китайского хомячка (СНО) обладает рядом преимуществ, к которым следует отнести устойчивую жизнеспособность, возможность достижения высокой плотности клеток при суспензионном выращивании, продолжительную практику использования и высокую степень оптимизации условий культивирования. Наличие широкой линейки специализированных питательных сред позволяет обеспечивать длительное поддержание жизнеспособности клеток СНО [24].

Ранее нами были получены и исследованы Хн представителей семейства Оленевые (*Cervidae*) — рХн марала [25–27] и рХн лося [7], которые продемонстрировали биохимические свойства, перспективные с точки зрения технологического использования этих ферментов. Это позволяет предполагать, что и другие виды, относящиеся к семейству *Cervidae*, могут быть источниками Хн с необычными ферментативными свойствами. Поэтому в качестве

объекта для экспрессии в клетках млекопитающих выбран ген ПроХн сибирской косули (*Capreolus pygargus* Pallas, 1771).

Цель данной работы – частичная биохимическая характеристика рекомбинантного Хн косули (рХн-Сар), полученного в системе продукции СНО-К1.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Идентификация гена Хн косули. Нуклеотидная последовательность гена Хн (*СУМ*) косули была получена в виде ДНК нескольких перекрывающихся продуктов ПЦР и секвенирована как напрямую, так и в виде клонов в составе вектора рJET1.2. Для этого использовали суммарную геномную ДНК, выделенную из образцов рогов трёхлетнего самца *C. pygargus* и любезно предоставленную лабораторией сравнительной геномики ИМКБ СО РАН. Полученную геномную ДНК косули дополнительно очистили и сконцентрировали на колонках Amicon 100 kDa («Millipore», ФРГ).

В среднем размер гена *СУМ* у млекопитающих составляет приблизительно 13 000 п.н. Используя полученные нами ранее последовательности гена *СУМ* марала (*Cervus elaphus*) и лося (*Alces alces*), а также последовательности *СУМ* коровы (*B. taurus*), овцы (*Ovis aries*), козы (*Capra hircus*) и одногорбого верблюда (*C. dromedarius*) из базы GenBank, определили наиболее консервативные участки гена и рассчитали специфичные для *СУМ* олигонуклеотидные праймеры. Несколько пар дали в амплификации перекрывающиеся ПЦР-фрагменты гена *СУМ* косули (*СУМ-Сар*) (табл. 1).

Амплификацию проводили с использованием полимеразы Hot Start Q5 («New England Biolabs», США). Полученные ампликоны очищали от компонентов ПЦР с помощью сорбции на магнитных частицах Speed Beads («GE Healthcare», США) и секвенировали напрямую, используя 0,25–0,30 пкмоль ПЦР-фрагмента как матрицу ДНК для реакции Сэнгера. Затем клонировали полученные ампликоны в составе вектора рJET1.2. Плазмидную ДНК селективированных клонов-трансформантов нарабатывали в препаративном количестве и тоже секвенировали по методу Сэнгера на автоматических генных анализаторах ABI3130XL или ABI3500XL («Applied Biosystems», США). Полученные секвенограммы *СУМ-Сар* анализировали и сшивали в контиги с помощью академической версии программы Vector NTI 10 («Invitrogen», Швеция), а затем выравнивали с известными для других китопарнокопыт-

ных структурами генов *СУМ* из базы данных GenBank для подтверждения принадлежности к гену Хн и расчёта праймеров для следующего шага секвенирования. В итоге была получена полноразмерная нуклеотидная последовательность гена *СУМ* *C. pygargus* (регистрационный номер GenBank – OQ427063).

Подтверждение видовой принадлежности проверяли с помощью прямого секвенирования продукта амплификации фрагмента митохондриального гена цитохрома *b* (МТСВ) с использованием той же геномной ДНК, что и для гена *СУМ*.

Конструирование рекомбинантного интеграционного вектора, обеспечивающего экспрессию гена *СУМ* косули. Для конструирования плазмидного вектора, обеспечивающего синтез и секрецию ПроХн косули в эукариотической системе экспрессии, использовались следующие подходы и процедуры. На основе сравнительного анализа гена *СУМ* была установлена его интрон/экзонная структура и определена кодирующая последовательность, включающая пре- и про-фрагменты. Для получения одной рамки считывания, содержащей только экзона, были рассчитаны праймеры для амплификации каждого экзона с последующей бесшовной сборкой методом Golden Gate [28] (табл. 2).

Для клонирования полученных фрагментов использовалась экспрессионная плаزمида рIP1. Вектор рIP1 имеет в своём составе следующие основные генетические элементы: промотор CMV, сигнал полиаденилирования SV40, полилинкер для клонирования по методу Golden Gate, последовательность IRES вируса энцефаломиокардита и ген устойчивости к пуромицину для отбора трансгенных клеток.

Экспрессионная кассета в составе вектора рIP1 фланкирована с двух сторон плечами интеграции транспозона Sleeping Beauty. Амплификация экзонов проводилась с помощью полимеразы Q5 HotStart («NEB», США) согласно рекомендациям производителя. Далее полученные ампликоны очищались из реакционной смеси набором реагентов Cleanup S-Cap («Евроген», Россия). После измерения концентрации ДНК на спектрофотометре NanoDrop 2000C («Thermo Fisher Scientific», США) составлялась реакционная смесь в соответствии с рекомендациями производителя набора NEBridge® Golden Gate Assembly Kit BsaI-HF®v2 («NEB»). Далее реакционная смесь инкубировалась в термоциклере со следующей программой: (37 °C, 5 мин → 16 °C, 5 мин) × 30 циклов → 60 °C, 5 мин. После завершения инкубации проводилась трансформация компетентных клеток NEBStable 10 мкл реакционной смеси.

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры, использованные для амплификации (PCR-) фрагментов ДНК гена химозина косули *C. pygargus* и их секвенирования (SEQ) напрямую или в виде клонов в составе вектора pJET1.2

Праймер	Последовательность (5'–3')	Назначение
Cap-2614F	ggcttcttaaccattgcacca	PCR-2
Cap-3839R	gctctctggggcagcctaaca	SEQ
Cap-6633R	ctgagtcacctaacctgagc	SEQ
Cap-6830R	aacacgtattggcacttactacatg	SEQ
Cap-6932R	cagaccccggaagaactcaag	PCR-3, PCR-9
Cap-7552F	aaaccacggcacagagctgaa	SEQ
Cap-7877F	ctcggtttacatggacaggtagg	SEQ
Cap-9554F	gagcttgacgaaggacatgg	SEQ
Cap-9724F	agtctccctcacatccatggtc	PCR-1, PCR-9
Cap-10189F	cctgcatctcttattktttgagc	SEQ
Cap-11696R	gagaaaacaggaagacaagacgga	SEQ
Cap-11745R	gttaagtgtctggcatctagtagca	SEQ
Cap-11862R	tccttgtaggtctccacctatc	SEQ
Cap-12127R	acccagaccctcagacctt	PCR-7
Cap-12311R	caggaatgcagccctaaacg	SEQ
Cap-12624R	tactggggacaagactggctga	PCR-8
Cap-14050F	ctgaccaactacctggatgtgagt	PCR-3
Cap-15290F	catgccagtcggttctaagagaat	PCR-4
Cap-15300R	cctctcactttattctcttagaacg	SEQ
Cap-15475R	gccatctctatggttccagagactag	PCR-1
Cap-16024R	gctgggtggtttctggaacac	PCR-2
Cap-16798F	atcagatgagctgataacttgctt	PCR-6, PCR-8
Cap-17961R	tgcttagatgctggtgccttg	SEQ
Cap-19778R	cgctcgtcacatccaagtctg	SEQ
Cap-20433F	tccttgagatccaagaactcc	PCR-5, PCR-7
Cap-20856R	ggctcctctctggagatgcatac	PCR-4, PCR-6
Cap-22011R	cattcttactcaattccacctcaag	PCR-5

Скрининг колоний проводился с помощью пары праймеров, один из которых комплементарен 3'-концу нетранслируемой области экспрессирующего вектора, а другой – СУМ_REV_(9).

После скрининга клонов-трансформантов плазмидная ДНК положительных клонов была выделена. Корректность встройки подтверждалась секвенированием по Сэнгеру. В результате был получен интеграционный экспрессирующий вектор pIP1-Cap.

Получение рПроХн косули в культуре клеток СНО-К1. Клетки СНО-К1 трансфицировали полученным экспрессирующим вектором pIP1-Cap совместно с плазмидой pCMV(CAT) T7-SB100 в среде HyClone HyCell TransFx-C («Cytiva», Швеция) согласно описанному протоколу [29]. Плазмида pCMV(CAT)T7-SB100 содержит последовательность транспозазы SB100, обеспечивающей встройку целевой экспрессионной кассеты, фланкированной плечами интеграции, в геном клеток. Селекцию проводили в присутствии пурамицина в концентрации 50 мкг/мл. После добавления антибиотика к пятому дню селекции жизнеспособность клеток опустилась до 69%. На десятый день жизнеспособность клеток достигала значения 95% и селекция была остановлена. Полученный пул продуцентов дважды промывали фосфатно-солевым буфером, переносили в 600 мл среды HyClone™ HyCell™ СНО («Cytiva») и культивировали при 37 °С, 185 об./мин и 5% CO₂ до достижения концентрации жизнеспособных клеток 4·10⁶ клеток/мл. После этого понижали температуру до 31 °С и продолжали культивирование с питательными добавками HyClone™ Cell Boost™ Kit («Cytiva») в течение 14 дней, до снижения доли жизнеспособных клеток < 75%. Клетки продуцента отделяли центрифугированием при 8000 g в течение 10 мин и получали осветлённую культуральную жидкость, которую фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм («Thermo Fisher Scientific»).

Активация рПроХн косули. Активацию рПроХн косули проводили непосредственно в культуральной жидкости путём ступенчатого изменения рН [17]. В культуральную жидкость, содержащую рПроХн, при постоянном перемешивании вносили 2,0 М HCl до рН 3,0. Затем останавливали перемешивание и инкубировали смесь при рН 3,0 в течение 2 ч. По истечении времени инкубации доводили рН образца до 5,8, используя 1,0 М NaOH.

Белковый состав культуральных жидкостей и фермент-субстратных смесей анализировали методом электрофореза в присутствии

Таблица 2. Олигонуклеотидные праймеры, использованные для бесшовной сборки методом Golden Gate

Праймер	Последовательность 5'–3'	Назначение
CYM_FWD_(1)	ttacgtctccccatgaggtgtcttgggtgctac	экзон 1
CYM_FWD_(2)	ttacgtctcgagatcaccaggatccctctgtacaaaggc	экзон 2
CYM_FWD_(3)	ttacgtctcggtcagtactttgggaagatctacctcg	экзон 3
CYM_FWD_(4)	ttacgtctccaaaaccaccagcgcttcg	экзон 4
CYM_FWD_(5)	ttacgtctccctccgacattgtggatgtcc	экзон 5
CYM_FWD_(6)	ttacgtctcggaatggccaggggagc	экзон 6
CYM_FWD_(7)	ttacgtctccagtgcaccatcagcggtatg	экзон 7
CYM_FWD_(8)	ttacgtctccggatggcgagttgacatcgactgtgacagc	экзон 8
CYM_FWD_(9)	ttacgtctcccaggatgaggcttctgtacc	экзон 9
CYM_REV_(1)	ttacgtctccatctcggcgccctggg	экзон 1
CYM_REV_(2)	ttacgtctcgtgactatccaggtagttggtcaggg	экзон 2
CYM_REV_(3)	ttacgtctcgtttttgcaggcattgctcttgc	экзон 3
CYM_REV_(4)	ttacgtctcaggagacagtgacagtgctgtagcc	экзон 4
CYM_REV_(5)	ttacgtctccattcctgtccatgtaaaccgagaacac	экзон 5
CYM_REV_(6)	ttacgtctcgcactgtccacagtgaactgcca	экзон 6
CYM_REV_(7)	ttacgtctcctaccggttctgggtggct	экзон 7
CYM_REV_(8)	ttacgtctcccctggttggtataggcggag	экзон 8
CYM_REV_(9)	ttacgtctcccttacacggctttggccagc	экзон 9

додецилсульфата натрия (ЭФ-ДСН) по Лэммли [30]. В качестве маркеров молекулярных масс (ММ) использовали набор LMW-SDS Marker Kit («GE Healthcare», США).

В качестве препаратов сравнения использовали коммерческие рХн коровы (СНУ-MAX® Powder Extra, сухая форма) и одногорбого верблюда (СНУ-MAX® М 1000, жидкая форма) производства компании «Chr. Hansen» (Дания). Для определения концентрации белка и расчёта удельной МА использовали неразведённый препарат рХн верблюда и 1%-ный раствор рХн коровы в 20 мМ Na-ацетатном буфере (рН 5,8). При исследовании термостабильности (ТС) и протеолитической активности (ПА) ферменты сравнения разводили 20 мМ Na-ацетатным буфером (рН 5,8) до значений МА 8–12 ИМСУ/мл (ИМСУ – International Milk

Clotting Units, международные единицы МА). В ходе определения биохимических свойств препараты рХн козули (рХн-Cap), рХн коровы (рХн-Bos) и рХн одногорбого верблюда (рХн-Sam) нормировали по МА.

Концентрацию белка в препаратах рХн определяли по методу Бредфорда [31].

Определение общей и удельной МА. В качестве субстрата использовали сборное непастеризованное коровье молоко, в которое внесли NaN_3 до концентрации 0,02% и доводили рН до 6,5. Субстрат (1,25 мл), прогретый на водяной бане при 35 °С не менее 10 мин, быстро смешивали с 0,1 мл исследуемого рХн и регистрировали время образования первых хлопьев коагулята. В качестве стандарта коагуляционной активности использовали 0,5%-ный водный раствор сухого коммерческого рХн ко-

ровы «Chu-Max» («Chr. Hansen») с заявленной МА 2201 ИМСУ/г. Все измерения повторяли не менее трёх раз ($n \geq 3$). Общую МА выражали в ИМСУ/мл и рассчитывали по формуле (1):

$$MA = MA_{ст} / 200 \cdot T1 / T2, \quad (1)$$

где $MA_{ст}$ – заявленная МА стандарта в ИМСУ/г; 200 – фактор разведения (мл/г); T1 – время (с) свёртывания субстрата стандартом; T2 – время (с) свёртывания субстрата раствором исследуемого фермента.

Удельную МА рХн рассчитывали после определения общей МА и концентрации белка и выражали в ИМСУ/мг.

Определение общей ПА и специфичности.

Субстратом служил 1%-ный раствор казеина (СН) по Гаммерстену («MP Biomedicals», Франция) в 20 мМ Na-фосфатном буфере (рН 5,65). Аликвоты субстрата (2,0 мл) помещали в водяную баню (35 °С), прогревали в течение 15 мин и добавляли к ним 0,5 мл раствора исследуемого рХн. Фермент-субстратные смеси тщательно перемешивали и отмечали время начала инкубации. Через 30, 90 и 180 мин инкубации реакцию протеолиза останавливали, добавляя к фермент-субстратным смесям 2,5 мл 5%-ной трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Содержимое каждой пробирки перемешивали, оставляли на 30 мин при комнатной температуре и фильтровали через бумажный фильтр («белая лента»). В прозрачном фильтрате определяли поглощение при длине волны 280 нм (A280). Для подготовки спектрофотометрического контроля компоненты фермент-субстратной смеси вносили непосредственно в 5%-ную ТХУ, выдерживали 30 мин и фильтровали через бумажный фильтр. За общую (неспецифическую) ПА принимали значение A280 через 180 мин инкубации. Строили графики зависимости A280 от продолжительности инкубации. Специфичность определяли как соотношение удельной МА и общей ПА (МА/ПА).

Определение ПА методом электрофореза.

Для подготовки субстрата использовали цельное непастеризованное молоко коровы, в которое вносили NaN_3 до 0,01%-ной концентрации и разводили в соотношении 1 : 4 (v/v) 20 мМ Na-ацетатным буфером (рН 5,65). Субстрат использовали в день приготовления. В 250 мкл субстрата вносили 5 мкл исследуемого рХн с активностью ≈ 8 ИМСУ/мл и тщательно перемешивали. Полученные фермент-субстратные смеси инкубировали при 35 °С в течение 1 ч. После завершения инкубации смешивали фермент-субстратные смеси с буфером для подготовки образцов перед загруз-

кой в ПААГ (Sample buffer for SDS-PAGE, «Serva», ФРГ) в соотношении 1 : 1 (v/v) и прогревали на кипящей водяной бане в течение 90 с. Подготовленные таким способом образцы исследовали методом ЭФ-ДСН по Лэммли [30]. В контрольные образцы вместо раствора рХн вносили 5 мкл 20 мМ Na-ацетатного буфера (рН 5,65).

Определение ТС. Растворы рХн прогревали на водяной бане в диапазоне температур 30–70 °С в течение 30 мин, быстро охлаждали до комнатной температуры и определяли в них остаточную МА. За 100% принимали исходные значения МА, полученные в образцах, прогретых при 30 °С. Строили графики зависимости остаточной МА от температуры прогревания. Порогом ТС считали температуру прогревания, при которой исследуемый рХн сохранял не менее 80% от исходной МА.

Статистическую обработку полученных данных проводили в вычислительной среде табличного процессора Excel («Microsoft Corporation», США). Результаты определения количественных переменных представляли в виде среднего арифметического (M) с указанием среднеквадратического отклонения ($\pm SD$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация гена СУМ косули. На основании анализа нуклеотидных последовательностей генов СУМ, представленных в базе данных GenBank, было сделано предположение о том, что длина целевого гена составляет около 13 000 п.н. Было определено, что область границы гена *СУМ-Cap* демонстрирует высокую гомологию с аналогичными участками генов известных Хн. Поэтому на основе консенсусной последовательности были рассчитаны две пары олигонуклеотидных праймеров, необходимые для получения левого и правого перекрывающихся фрагментов.

ДНК полученных фрагментов гена после препаративной наработки и очистки использовалась для прямого секвенирования с обеих сторон, по методу Сэнгера. Множество перекрывающихся секвенограмм было собрано в контиг, включающий оба фрагмента гена. Для контроля правильности сборки была амплифицирована и секвенирована напрямую центральная область гена. Анализ структуры *СУМ-Cap* позволил выявить его высокую степень гомологии с ранее исследованными генами СУМ представителей семейства Оленевые: марала (*C. elaphus*), лося (*A. alces*) и северного оленя (*Rangifer tarandus*).

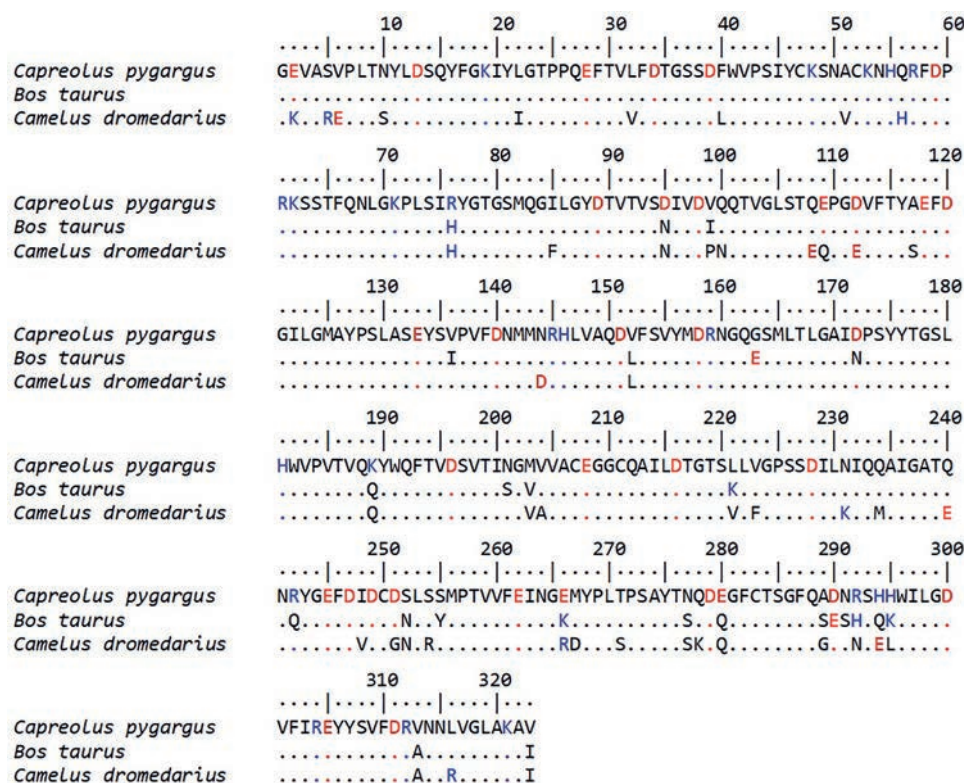


Рис. 1. Выравнивание аминокислотных последовательностей Хн козули, коровы и верблюда. Положительно заряженные аминокислотные остатки выделены синим, отрицательно заряженные – красным. Одинаковые аминокислотные остатки обозначены точками

Определение нуклеотидной и аминокислотной последовательности гена *СУМ* козули. Сравнение полученной последовательности гена *СУМ* *C. pygargus* с известными мРНК, кодирующими Хн у млекопитающих, позволило локализовать границы экзонов/интронов исследуемого гена и вывести структуру мРНК *СУМ-Cap*.

После установления интрон/экзонной структуры *СУМ-Cap* была определена его кодирующая последовательность, включающая пре- и про-фрагменты. Также был проведён сравнительный анализ полученной аминокислотной последовательности ПроХн козули с последовательностями ПроХн коровы и одногорбого верблюда.

В результате в выведенной аминокислотной последовательности Хн *C. pygargus* был обнаружен ряд примечательных замен, отличающих этот фермент от референсных Хн *B. taurus* и *C. dromedarius*. Эти замены расположены на участках, формирующих субстрат-связывающую полость, и теоретически могут влиять на свойства фермента. Так, у Хн козули остатком в положении 221, который формирует субсайт S4, является L, тогда как у коровы мы наблюдаем K, а у верблюда – V. В позиции 294, относящейся к субсайтам S1'+ S3', у козули находится H, в то время как у коровы это Q,

а у верблюда – E. Позицию 295 у Хн козули занимает H, в противоположность K у коровы и L у верблюда (рис. 1).

Конструирование рекомбинантного вектора, обеспечивающего экспрессию гена *СУМ-Cap* в клетках СНО-К1. Для бесшовной сборки экспрессионной кассеты, содержащей только кодирующие области гена *СУМ-Cap*, использовали сборку методом Golden Gate. Праймеры были рассчитаны таким образом, чтобы на 5'-конце каждого из них находился сайт Пс эндонуклеазы рестрикции Esp3I, который узнаёт последовательность CGTCTC и катализирует гидролиз ДНК через один нуклеотид после сайта узнавания с образованием четырёхнуклеотидных «липких» концов. «Липкие» концы подбирали так, чтобы они были непалиндромными, и каждый из них был комплементарен только одному другому «липкому» концу. В результате амплификации на матрице гена *СУМ-Cap* с использованием рассчитанных олигонуклеотидных праймеров было получено 9 фрагментов, кодирующих экзоны гена ПроХн *C. pygargus* (рис. 2).

Экспрессионная кассета была клонирована в составе вектора pIP1, разработанного в лаборатории иммунохимии ГНЦ «Вектор». Полученный вектор имел в своём составе плечи интеграции транспозона Sleeping

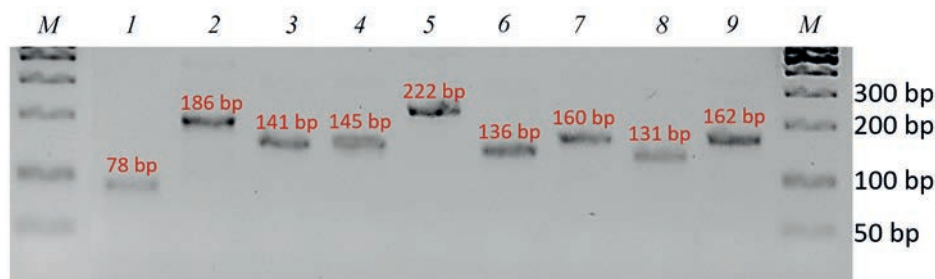


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР последовательностей экзонов гена ПроХн косули: 1–9 – экзоны 1–9; М – маркеры молекулярных масс 100 bp + 50 bp (SE-M33, «СибЭнзайм», Россия)

Beauty, которые фланкируют экспрессионную кассету и ген устойчивости к пуромицину для интеграции в геном клетки СНО и дальнейшего отбора трансфицированных клеток.

Получение препарата рПроХн косули. Выбор клеточной линии обусловлен следующими характеристиками СНО-К1: хорошо проработанные методы культивирования, устойчивость к изменению концентрации кислорода, рН, температуры, а также лёгкость адаптации к составу среды. Кроме того, метаболизм клеток СНО-К1 по сравнению с другими часто используемыми линиями (СНО-S и СНО-DG44) в большей степени направлен на экспрессию белка, чем на образование биомассы [32].

После трансфекции клеток плазмидой рIP1-Сар и проведения селекции в присутствии пуромицина в течение 10 дней была получена поликлональная культура клеток (СНО-К1-СУМ-Сар). Дальнейшее полупрепаративное культивирование проводили согласно вышеописанной методике в течение 14 дней до снижения доли жизнеспособных клеток < 75%. Полученная поликлональная культура клеток СНО-К1-СУМ-Сар обеспечивала синтез и секрецию целевого белка в культуральную жидкость. Электрофоретический анализ культуральной среды в процессе культивирования свидетельствовал о высоком (порядка 0,4–0,6 мкг/мкл) содержании в ней полипептидного компонента с ММ около 45 кДа, совпадающей с расчётной для рПроХн косули.

Активация зимогена. До активации коагуляционная активность культуральной жидкости, содержащей рПроХн *S. pygargus*, была < 0,1 ИМСУ/мл. После процедуры ступенчатого понижения и повышения рН общая МА препарата составила около 468 ИМСУ/мл. В результате активации МА культуральной жидкости увеличивалась более чем в 4600 раз, что свидетельствовало об эффективности превращения рПроХн в активный рХн косули.

Концентрация рХн косули в культуральной жидкости. После активации зимогена концен-

трация рХн-Сар в культуральной жидкости СНО-К1 равнялась $0,50 \pm 0,03$ мг/мл.

Выход рХн косули. Впервые возможность экспрессии гена ПроХн коровы в клетках млекопитающих были показана 1986 г. в работе Gottlieb et al. [19]. Авторы использовали трансгенные по ПроХн клетки почек собак линии MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) и регистрировали секрецию целевого белка в культуральную среду. Активацию зимогена не производили, поэтому оценить выход Хн в системе экспрессии MDCK невозможно.

В работе Kolmer et al. [20] сообщалось о получении рХн коровы в системе продукции клеток HeLa. Отобранные клоны-продуценты секретировали ПроХн в культуральную среду. Выход целевого белка достигал 10–20 мг/л.

В данной работе выход рХн косули в системе продукции СНО-К1 составил 500 мг/л или $\approx 468\ 000$ ИМСУ/л, что превышает показатели выхода генно-инженерных Хн даже в случае использования наиболее эффективных продуцентов этих ферментов на основе метилотрофных дрожжей (*Komagataella (Pichia) pastoris*) более чем в 2 раза [33–35]. Полученный нами поликлон СНО-К1-СУМ-Сар примерно в 2,6 раза уступал по продуктивности (в мг/л) хлорат-устойчивому мутанту *Aspergillus niger* var. *Awamori* (штамм GC1HF1-3; dgr246 Ch^R 25), который создавался для получения рХн коровы [36]. При этом необходимо отметить, что выход по МА рХн коровы, полученного с использованием штамма GC1HF1-3; dgr246 Ch^R 25, составлял $\approx 90\ 000$ ИМСУ/л [37], что в 5,2 раза меньше, чем в случае рХн косули, полученного нами в СНО-К1.

Анализ белкового состава культуральной жидкости. Согласно электрофоретическим данным, рХн-Сар являлся доминирующим полипептидным компонентом культуральной жидкости СНО-К1 (рис. 3). При ЭФ-ДСН полоса рХн косули мигрировала как полипептид с ММ ≈ 39 кДа. Таким образом, условия экспрессии гена Хн *S. pygargus* в клетках СНО-К1 обеспечивали высокоэффективный синтез

и секрецию целевого белка. После активации зимогена электрофоретическая чистота рХн косули в культуральной среде СНО-К1 была $\geq 95\%$.

Удельная МА. При определении параметров коагуляционной активности рХн косули и ферментов сравнения показатели рХн коровы принимали за 100% (табл. 3). По удельной МА рХн косули занял промежуточное положение в ряду исследованных ферментов: в $\sim 1,4$ раза превзошёл рХн коровы, но в $\sim 1,2$ раза уступил рХн одногорбого верблюда. Наибольшую коагуляционную эффективность продемонстрировал рХн верблюда, чья удельная МА была выше, чем у рХн коровы и косули, в $\sim 1,7$ и $\sim 1,2$ раза соответственно. Это согласуется с данными работы Carreler et al. [13], в которой было показано, что соотношение удельной МА рХн *B. taurus* и рХн *C. dromedarius* составляет 1 : 1,7.

Таким образом, рХн *C. pygargus*, полученный в системе экспрессии СНО-К1, является высокоэффективным коагулянтном коровьего молока, а по удельной МА сопоставим с высококачественными коммерческими препаратами рХн.

ПА и коагуляционная специфичность. Основными белками молока являются α -, β - и κ -казеины (α -CN, β -CN и κ -CN). В нативном молоке взаимодействие всех групп CN и коллоидного фосфата кальция приводит к формированию стабильных белковых агрегатов, которые называются казеиновыми мицеллами [38, 39]. Одной из первостепенных физиологических функций Хн является его способность свёртывать молоко в желудке новорожденного. В результате белки и другие молочные нутриенты дольше задерживаются в желудочно-кишечном тракте, что обеспечивает их полноценное усвоение [40]. Поскольку в основе МА аспаргатных протеиназ лежит способность гидролизовать определённые пептидные связи, биохимическая характеристика любого нового молокозвёртывающего фермента (МФ) включает в себя оценку его ПА.

ПА коагулянтов молока условно подразделяют на специфическую и неспецифическую. Специфическая или МА направлена на гидро-

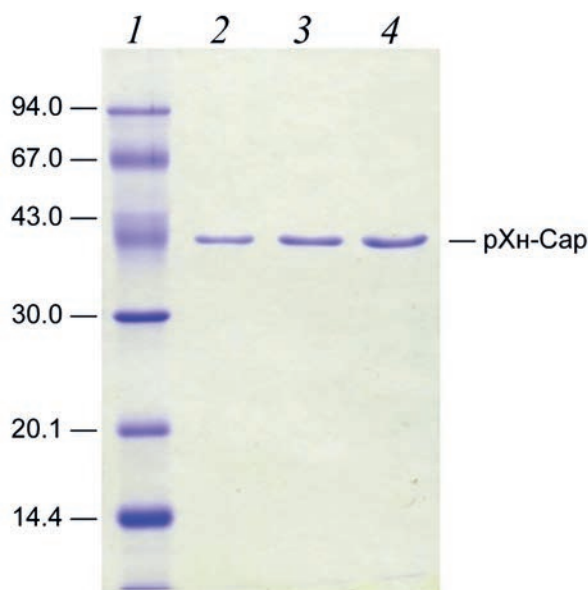


Рис. 3. Электрофорез препаратов культуральной жидкости СНО-К1 после активации зимогена рХн косули. Условные обозначения: 1 – маркеры молекулярных масс; 2 – 0,5 мкл препарата культуральной жидкости СНО-К1; 3 – 0,75 мкл препарата культуральной жидкости СНО-К1; 4 – 1,0 мкл препарата культуральной жидкости СНО-К1. Справа обозначено положение рХн-Сар. Слева указаны значения молекулярных масс маркеров в кДа

лиз только одной (ключевой) связи в молекуле κ -CN. Протеолиз этой единственной связи дестабилизирует казеиновые мицеллы, что позволяет им сблизиться и образовать трёхмерную сетчатую структуру – молочный сгусток. В случае κ -CN коровы ключевой является связь F105-M106. Неспецифическая или общая ПА характеризует способность МФ гидролизовать широкий спектр пептидных связей, за исключением связи F105-M106 или её аналога. Соотношение МА и общей ПА (МА/ПА) называется специфичностью и используется для сравнения коагуляционной эффективности молокозвёртывающих протеиназ [41].

Неспецифическая ПА рХн косули оказалась в 1,4–4,5 раза выше, чем у рХн сравнения (рис. 4). По динамике накопления продуктов протеолиза CN рХн косули напоминает рХн коровы и заметно отличается от рХн верблюда. В особенности эти различия проявляются

Таблица 3. Общая и удельная МА препаратов рХн

Препарат	Общая МА (ИМСУ/мл)	Концентрация белка (мг/мл)	Удельная МА (ИМСУ/мг)	Удельная МА (%)
рХн-Сар	468,4 ± 11,1	0,500 ± 0,030	938 ± 22	141
рХн-Вос	22,0 ± 0,7	0,033 ± 0,005	667 ± 21	100
рХн-Сам	1037,3 ± 13,0	0,936 ± 0,023	1108 ± 14	166

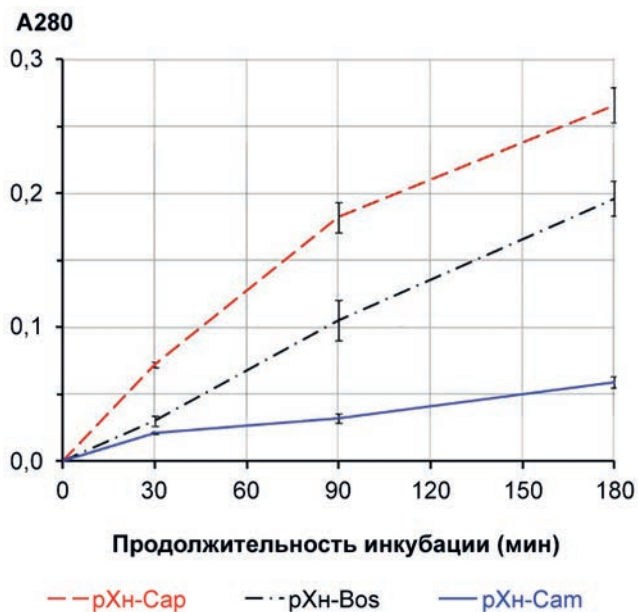


Рис. 4. Общая протеолитическая активность (A280) рекомбинантных химозинов. Условные обозначения: рХн-Сар – рХн козули; рХн-Вос – рХн коровы; рХн-Сам – рХн одногорбого верблюда

через 60 мин инкубации. Полученные нами низкие значения ПА характерны для рХн одногорбого верблюда и подтверждаются данными работы Karpeleer et al. [13], в которой было показано, что рХн верблюда обладает вчетверо меньшей неспецифической ПА, чем рХн коровы. В работе Velenka et al. [6] приводятся данные о том, что при одинаковой МА общая ПА рХн ближайшего филогенетического родственника одногорбого верблюда – альпака (*Vicugna pacos*) – примерно в 3 раза ниже, чем у рХн коровы. По-видимому, низкая общая ПА и высокая специфичность характерны для Хн представителей семейства Верблюдовые (*Camelidae*).

Для сравнения специфичности рХн козули и коммерческих генно-инженерных Хн использовали данные об их удельной МА (%) и общей ПА (%), при этом за 100% принимали показатели рХн коровы (табл. 4). По соотношению МА/ПА ферменты козули и коровы почти не различались и примерно в 5,5 раз уступали рХн одногорбого верблюда.

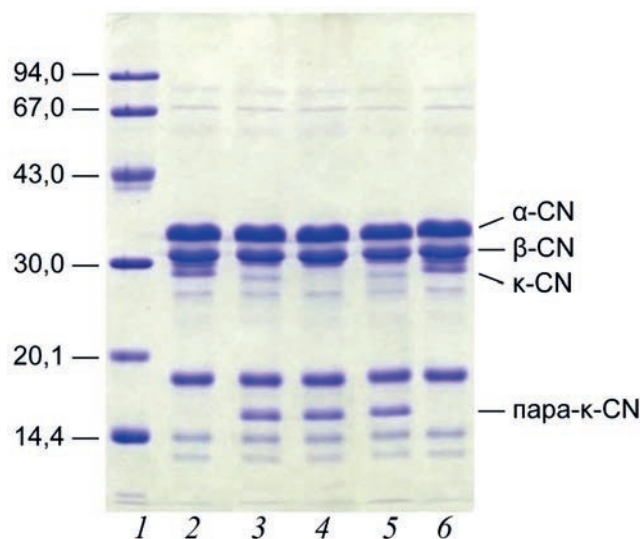


Рис. 5. Протеолитическая активность рекомбинантных химозинов по отношению к белкам цельного молока коровы при pH 5,65. Условные обозначения: 1 – маркеры молекулярных масс; 2 – молоко + 20 мМ Na-ацетатный буфер, pH 5,65, непрогретое (контроль 1); 3 – молоко + рХн-Вос; 4 – молоко + рХн-Сам; 5 – молоко + рХн-Сар; 6 – молоко + 20 мМ Na-ацетатный буфер, pH 5,65, прогретое, как и опытные образцы – 60 мин, 35 °С (контроль 2). Слева указаны значения молекулярных масс маркеров в кДа. Справа обозначены полосы α-, β-, κ-CN и пара-κ-CN (ММ ≈ 16 кДа, на треках 3–5).

Высокая коагуляционная специфичность (МА/ПА) служит одним из главных критериев эффективности и отбора МФ для сыроделия [41, 42]. Большинство известных молочкосвёртывающих аспарагиновых протеиназ различного генеза, за исключением Хн одногорбого верблюда, альпака и свиньи [6, 13], не могут сравниться по этому показателю с Хн коровы [18]. Поэтому значение МА/ПА = 1,04, полученное для рХн-Сар, синтезированного в системе экспрессии СНО-К1, представляет интерес с точки зрения перспектив практического применения этого фермента.

Протеолитическую специфичность рХн по отношению к белкам цельного коровьего молока исследовали методом ЭФ-ДСН (рис. 5). В результате инкубации молока с исследуемыми рХн в фермент-субстратных смесях накапливается пара-κ-CN (ММ ≈ 16 кДа), что является результатом специфической ПА, направленной

Таблица 4. Удельная МА, общая ПА и специфичность рекомбинантных химозинов

Препарат	Удельная МА (%)	Общая ПА (A280)	Общая ПА (%)	Специфичность (МА/ПА)
рХн-Сар	141	0,266 ± 0,013	136	1,04
рХн-Вос	100	0,196 ± 0,013	100	1,00
рХн-Сам	166	0,059 ± 0,004	30	5,53

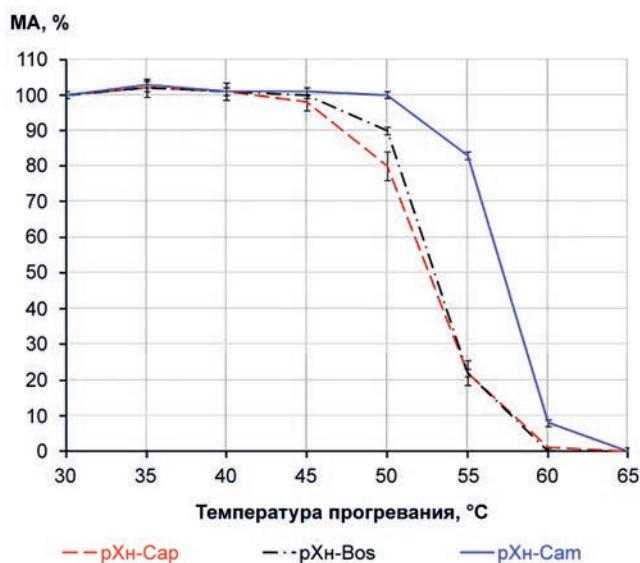


Рис. 6. Зависимость остаточной МА рекомбинантных химозинов от температуры прогревания (ТС). Условные обозначения: рХн-Сар – рХн косули; рХн-Вос – рХн коровы; рХн-Сам – рХн одногорбого верблюда

на гидролиз связи F105-M106 в молекуле к-CN (рис. 5, треки 3–5). Рекомбинантные Хн косули и коровы обладают похожей протеолитической специфичностью, и за время проведения анализа успевают гидролизовать не только к-CN, но также α - и β -CN. В результате на электрофореграммах, полученных с использованием этих ферментов, появляются слабые белковые полосы с ММ 28–29 кДа и низкомолекулярные полипептидные компоненты с ММ \ll 14 кДа, которые мигрируют в зоне лидирующего красителя (рис. 5, треки 3, 5). В случае рХн верблюда из полипептидного профиля белков молока исчезает только полоса к-CN (рис. 5, трек 4), что является отражением низкой неспецифической ПА этого фермента.

Термостабильность. ТС определяется как способность белка противостоять денатурации при повышении температуры и является важной биохимической характеристикой любого фермента. Результаты исследования ТС рХн косули, коровы и одногорбого верблюда представлены на рис. 6.

Порогом термоинактивации исследуемых рХн считали температуру (°C), при которой МФ сохранял $\geq 80\%$ от исходной коагуляционной активности, измеренной при 30 °C. Согласно этому критерию, пороги ТС рХн коровы и косули были одинаковыми и составили 55 °C. Несмотря на то, что профили ТС этих ферментов похожи, полная термоинактивация рХн коровы происходила при 60 °C, тогда как рХн косули при этой температуре ещё сохранял 0,8% от исходной МА.

Порог термоинактивации рХн одногорбого верблюда был выше и равнялся 60 °C.

Полученные нами профили термоинактивации рХн коровы и верблюда подтверждаются результатами калориметрических исследований, согласно которым ТС рХн *C. dromedarius* выше, чем у рХн *B. taurus*: точки плавления (T_m) этих ферментов различаются на 3 °C и равны 57,7 и 60,7 °C соответственно [41]. О том, насколько значимы такие различия, говорят результаты применения этих ферментов в сыроделии. Показано, что повышение температуры обработки молочного сгустка с 50 до 56 °C приводит к снижению интенсивности неспецифического протеолиза в сырах, произведённых с применением рХн коровы и верблюда. Тем не менее в сырах, выработанных с температурой нагревания сгустка 56 °C, в случае применения рХн верблюда обнаруживалась более высокая концентрация продуктов протеолитической деградации α -CN, чем при использовании рХн коровы. На основании этих данных был сделан вывод о том, что рХн верблюда, чья общая ПА на 75% ниже, чем у рХн коровы, а T_m на 3 °C выше, вызывает более интенсивный протеолиз α -CN в созревающих и хранящихся сырах [43].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведённого исследования впервые установлена структура гена Хн сибирской косули и определена его экзон/интронная организация. Проведён сравнительный анализ последовательностей ПроХн косули, коровы и одногорбого верблюда, который выявил ряд аминокислотных замен на участках, формирующих субстрат-связывающую полость фермента и затрагивающих субсайты S4 и S1'+ S3'.

С использованием интеграционного вектора рР1 сконструирована рекомбинантная плаزمид рР1-Сар для экспрессии гена СУМ косули в клетках СНО-К1. Получена поликлональная культура клеток СНО-К1-СУМ-Сар, обеспечивающая синтез и секрецию в культуральную жидкость рПроХн косули.

После активации зимогена получен препарат рХн косули с общей МА $468,4 \pm \pm 11,1$ ИМСУ/мл. Выход рХн косули в системе продукции СНО-К1 составил 500 мг/л или $\approx 468\ 000$ ИМСУ/л, что в 2–5 раз превышает показатели выхода генно-инженерных Хн в системах экспрессии дрожжей и плесневых грибов.

Определены основные биохимические свойства полученного фермента. Удельная МА рХн *C. pygargus* составила 938 ± 22 ИМСУ/мг

белка и была сопоставима с показателями коммерческих рХн коровы и верблюда. Неспецифическая ПА рХн косули оказалась в 1,4–4,5 раза выше, чем у рХн сравнения. Тем не менее за счёт высокой удельной МА рХн-Сар занимал промежуточное положение по коагуляционной специфичности (отношению МА/ПА) между генно-инженерными Хн коровы и одnogорбого верблюда. Порог ТС рХн косули был равен 55 °С. При 60 °С фермент сохранял < 1% МА от исходной, а его полная термоин- активация наблюдалась при 65 °С.

Исключительно высокая продуктивность культуры СНО-К1 по рХн косули является основным результатом данной работы и свидетельствует о необходимости дальнейшего изучения возможностей использования систем экспрессии млекопитающих для получения рекомбинантных молокосвёртывающих протеиназ.

Вклад авторов. Д.Е. Мурашкин и С.В. Беленккая написали рукопись; А.А. Бондарь подготовил иллюстрации; В.В. Ельчанинов и Д.Н. Щербаков отредактировали текст статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение от 12.10.2021 № 075-15-2021-1355) в рамках реализации отдельных мероприятий Федеральной научно-технической программы развития синхротронных и нейтронных исследований и исследовательской инфраструктуры на 2019–2027 гг.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gilliland, G. L., Winborne, E. L., Nachman, J., and Wlodawer, A. (1990) The three-dimensional structure of recombinant bovine chymosin at 2.3 Å resolution, *Proteins*, **8**, 82–101, doi: 10.1002/prot.340080110.
- Khan, A. R., Khazanovich-Bernstein, N., Bergmann, E. M., and James, M. N. (1999) Structural aspects of activation pathways of aspartic protease zymogens and viral 3C protease precursors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 10968–10975, doi: 10.1073/pnas.96.20.10968.
- Richter, C., Tanaka, T., and Yada, R. Y. (1998) Mechanism of activation of the gastric aspartic proteinases: pepsinogen, progastricsin and prochymosin, *Biochem. J.*, **335**, 481–490, doi: 10.1042/bj3350481.
- Chen, H., Zhang, G., Zhang, Y., Dong, Y., and Yang, K. (2000) Functional implications of disulfide bond, Cys206–Cys210, in recombinant prochymosin (chymosin), *Biochemistry*, **39**, 12140–12148, doi: 10.1021/bi000976o.
- Eskandari, M. H., Hosseini, A., Alasvand Zarasvand, S., and Aminlari, M. (2012) Cloning, expression, purification and refolding of caprine prochymosin, *Food Biotechnol.*, **26**, 143–153, doi: 10.1080/08905436.2012.670829.
- Belenkaya, S. V., Rudometov, A. P., Shcherbakov, D. N., Balabova, D. V., Kriger, A. V., et al. (2018) Biochemical properties of recombinant chymosin in alpaca (*Vicugna pacos* L.), *Appl. Biochem. Microbiol.*, **54**, 569–576, doi: 10.1134/S0003683818060054.
- Balabova, D. V., Rudometov, A. P., Belenkaya, S. V., Belov, A. N., Koval, A. D., et al. (2022) Biochemical and technological properties of moose (*Alces alces*) recombinant chymosin, *Vavilov J. Genet. Breeding*, **26**, 240–247, doi: 10.18699/VJGB-22-31.
- Parente, D., de Ferra, F., Galli, G., and Grandi, G. (1991) Prochymosin expression in *Bacillus subtilis*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **77**, 243–249, doi: 10.1111/j.1574-6968.1991.tb04356.x.
- Liu, W. G., Wang, Y. P., Zhang, Z. J., Wang, M., Lv, Q. X., et al. (2017) Generation and characterization of caprine chymosin in corn seed, *Protein Express. Purif.*, **135**, 78–82, doi: 10.1016/j.pep.2017.05.004.
- Wei, Z. Y., Zhang, Y. Y., Wang, Y. P., Fan, M. X., Zhong, X. F., et al. (2016) Production of bioactive recombinant bovine chymosin in tobacco plants, *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 624, doi: 10.3390/ijms17050624.
- Azizi-Dargahlou, S., Ahmadabadi, M., and Valizadeh Kamran, R. (2022) Biolistic transformation and expression of functional chymosin from a codon-optimized synthetic bovine gene in tobacco plants, *J. Med. Plants By-Product*, doi: 10.22092/jmpb.2022.356717.1425.
- Rozov, S. M., Permyakova, N. V., and Deineko, E. V. (2018) Main strategies of plant expression system glycoengineering for producing humanized recombinant pharmaceutical proteins, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 215–232, doi: 10.1134/S0006297918030033.
- Kappeler, S. R., Rahbek-Nielsen, H., Farah, Z., Puhhan, Z., Hansen, E. B., and Johansen, E. (2006) Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **342**, 647–654, doi: 10.1016/j.bbrc.2006.02.014.
- Vallejo, J. A., Ageitos, J. M., Poza, M., and Villa, T. G. (2008) Cloning and expression of buffalo active chymosin in *Pichia pastoris*, *J. Agricult. Food Chem.*, **56**, 10606–10610, doi: 10.1021/jf802339e.

15. Espinoza-Molina, J. A., Acosta-Muñiz, C. H., Sepulveda, D. R., Zamudio-Flores, P. B., and Rios-Velasco, C. (2016) Codon optimization of the “Bos Taurus Chymosin” gene for the production of recombinant chymosin in *Pichia pastoris*, *Mol. Biotechnol.*, **58**, 657-664, doi: 10.1007/s12033-016-9965-7.
16. Kappeler, S., Farah, Z., van den Brink, J. M., Rahbek-Nielsen, H., and Budtz, P. (2016) U.S. Patent No. 9,307,775, Washington, DC, U.S. Patent and Trademark Office.
17. Бельнская С. В., Ельчанинов В. В., Щербаков Д. Н. (2021) Разработка продуцента рекомбинантного химозина марала на основе дрожжей *Kluyveromyces lactis*, *Биотехнология*, **37**, 20-27, doi: 10.21519/0234-2758-2021-37-5-20-27.
18. Uniacke-Lowe, T., and Fox, P. F. (2017) Chymosin, pepsins and other aspartyl proteinases: Structures, functions, catalytic mechanism and milk-clotting properties, in *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Elsevier, Academic Press, pp. 69-113, doi: 10.1016/B978-0-12-417012-4.00004-1.
19. Gottlieb, T. A., Beaudry, G., Rizzolo, L., Colman, A., Rindler, M., et al. (1986) Secretion of endogenous and exogenous proteins from polarized MDCK cell monolayers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 2100-2104, doi: 10.1073/pnas.83.7.2100
20. Kolmer, M., Örd, T., and Ulmanen, I. (1991) Expression of recombinant calf prochymosin in mammalian cell culture, *J. Biotechnol.*, **20**, 131-139, doi: 10.1016/0168-1656(91)90222-H.
21. McKenzie, E. A., and Abbott, W. M. (2018) Expression of recombinant proteins in insect and mammalian cells, *Methods*, **147**, 40-49, doi: 10.1016/j.ymeth.2018.05.013.
22. Zhu, J. (2012) Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production, *Biotechnol. Adv.*, **30**, 1158-1170, doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.08.022.
23. Kunert, R., and Reinhart, D. (2016) Advances in recombinant antibody manufacturing, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **100**, 3451-3461, doi:10.1007/s00253-016-7388-9.
24. Tihanyi, B., and Nyitray, L. (2020) Recent advances in CHO cell line development for recombinant protein production, *Drug Discov. Today Technol.*, **38**, 25-34, doi: 10.1016/j.ddtec.2021.02.003.
25. Belenkaya, S. V., Shcherbakov, D. N., Balabova, D. V., Belov, A. N., Koval, A. D., and Elchaninov, V. V. (2020) Production of maral (*Cervus elaphus sibiricus Severtzov*) recombinant chymosin in the prokaryotic expression system and the study of the aggregate of its biochemical properties relevant for the cheese-making industry, *Appl. Biochem. Microbiol.*, **56**, 647-656, doi: 10.1134/S0003683820060034.
26. Belenkaya, S. V., Bondar, A. A., Kurgina, T. A., Elchaninov, V. V., Bakulina, A. Y., Rukhlova, E. A., Lavrik, O. I., Ilyichev, A. A., and Shcherbakov, D. N. (2020) Characterization of the Altai maral chymosin gene, production of a chymosin recombinant analog in the prokaryotic expression system, and analysis of its several biochemical properties, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 781-791, doi: 10.1134/S0006297920070068.
27. Белов А. Н., Коваль А. Д., Пушкарев В. А., Миронова А. В., Щербаков Д. Н., и др. (2022) Первый опыт применения отечественного рекомбинантного химозина при выработке сыра с низкой температурой второго нагревания, *Сыроделие и маслоделие*, **3**, 28-32, doi: 10.31515/2073-4018-2022-3-28-32.
28. Engler, C., Kandzia, R., and Marillonnet, S. (2008) A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability, *PLoS One*, **3**, e3647, doi: 10.1371/journal.pone.0003647.
29. Derouazi, M., Girard, P., Van Tilborgh, F., Iglesias, K., Muller, N., et al. (2004) Serum-free large-scale transient transfection of CHO cells, *Biotechnol. Bioeng.*, **87**, 537-545, doi: 10.1002/bit.20161.
30. 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.
31. 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: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
32. Reinhart, D., Damjanovic, L., Kaisermayer, C., Sommeregger, W., Gili, A., et al. (2019) Bioprocessing of recombinant CHO-K1, CHO-DG44, and CHO-S: CHO expression hosts favor either mAb production or biomass synthesis, *Biotechnol. J.*, **14**, 1700686, doi: 10.1002/biot.201700686.
33. Akishev, Z., Abdullayeva, A., Mussakhmetov, A., Bekbayeva, A., Tursunbekova, A., et al. (2023) The obtaining of the recombinant camel chymosin by submerge fermentation in the pilot bioreactor, *Eur. J. Appl. Biotechnol.*, **1**, 45-55, doi: 10.11134/btp.1.2023.4.
34. Ersöz, F., and İnan, M. (2019) Large-scale production of yak (*Bos grunniens*) chymosin A in *Pichia pastoris*, *Protein Express. Purif.*, **154**, 126-133, doi: 10.1016/j.pep.2018.10.007.
35. Wang, N., Wang, K. Y., Li, G., Guo, W., and Liu, D. (2015) Expression and characterization of camel chymosin in *Pichia pastoris*, *Protein Express. Purif.*, **111**, 75-81, doi: 10.1016/j.pep.2015.03.012.
36. Bodie, E. A., Armstrong, G. L., Dunn-Coleman, N. S. (1994) Strain improvement of chymosin-producing strains of *Aspergillus niger* var. *awamori* using parasexual recombination, *Enzyme Microb. Technol.*, **16**, 376-382, doi:10.1016/0141-0229(94)90151-1.
37. Van den Brink, H. J. M., Petersen, S. G., Rahbek-Nielsen, H., Hellmuth, K., and Harboe, M. (2006) Increased production of chymosin by glycosylation, *J. Biotechnol.*, **125**, 304-310, doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.02.024.

38. Horne, D. S. (2002) Casein structure, self-assembly and gelation, *Curr. Opin. Colloid Interf. Sci.*, **7**, 456-461, doi: 10.1016/S1359-0294(02)00082-1.
39. Holt, C. (1992) Structure and stability of bovine casein micelles, *Adv. Protein Chem.*, **43**, 63-151, doi: 10.1016/S0065-3233(08)60554-9.
40. Foltmann, B. (1992) Chymosin: a short review on foetal and neonatal gastric proteases, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **52**, 65-79, doi: 10.1080/00365519209104656.
41. Jensen, J. L., Mølgaard, A., Navarro Poulsen, J. C., Harboe, M. K., Simonsen, J. B., et al. (2013) Camel and bovine chymosin: the relationship between their structures and cheese-making properties, *Acta Crystallogr. Sec. D Biol. Crystallogr.*, **69**, 901-913, doi: 10.1107/S0907444913003260.
42. Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., and McSweeney, P. L. H. (2016) Enzymatic coagulation of milk, in *Fundamentals of Cheese Science*, pp. 185-229, doi: 10.1007/978-1-4899-7681-9_7.
43. Costabel, L. M., Bergamini, C. V., Pozza, L., Cuffia, F., Candiotti, M. C., and Hynes, E. (2015) Influence of chymosin type and curd scalding temperature on proteolysis of hard cooked cheeses, *J. Dairy Res.*, **82**, 375-384, doi: 10.1017/S0022029915000175.

ANALYSIS OF SOME BIOCHEMICAL PROPERTIES OF RECOMBINANT SIBERIAN ROE DEER (*Capreolus pygargus*) CHYMOSIN OBTAINED IN THE MAMMALIAN CELL CULTURE (CHO-K1)

D. E. Murashkin¹, S. V. Belenkaya^{1,2*}, A. A. Bondar³,
V. V. Elchaninov⁴, and D. N. Shcherbakov^{1,5}

¹ State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", 630559 Koltsovo, Russia

² Novosibirsk State University, 630090 Novosibirsk, Russia

³ Genomics Core Facility, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia

⁴ Federal Altai Scientific Center of Agrobiotechnologies, Siberian Research Institute of cheese making, 656910 Barnaul, Russia

⁵ Altai State University, 656049 Barnaul, Russia

The structure of the Siberian roe deer (*Capreolus pygargus*) chymosin gene has been established for the first time and its exon/intron organization has been determined. The coding part of the *C. pygargus* chymosin gene was reconstructed and obtained as a DNA clone using the Golden Gate method. Comparative analysis of the sequences of prochymosins of roe deer, cow and single-humped camel revealed a number of amino acid substitutions in the sites forming the substrate-binding cavity of the enzyme and affecting the specificity subsites S4 and S1' + S3'. The recombinant plasmid pIP1-Cap was constructed using the integration vector pIP1 for the expression of the roe deer prochymosin gene in CHO-K1 cells. A polyclone of CHO-K1-CYM-Cap cells was obtained, providing synthesis and secretion of recombinant prochymosin into the culture fluid of the producer. As a result of zymogen activation, a recombinant roe deer chymosin preparation with a total milk-clotting activity of 468.4 ± 11.1 IMCU/ml was obtained. The yield of recombinant roe deer chymosin was 500 mg/liter or $\approx 468,000$ IMCU/liter, which exceeds the yield of genetically engineered chymosins in most of the expression systems used. The main biochemical properties of the obtained enzyme were compared with commercial preparations of recombinant chymosins of single-humped camel (*Camelus dromedarius*) and cow (*Bos taurus*). The specific milk-clotting activity of recombinant *C. pygargus* chymosin was 938 ± 22 IMCU/mg of protein and was comparable with the indicators of comparison enzymes. The non-specific proteolytic activity of recombinant roe deer chymosin was 1.4-4.5 times higher than that of cow and camel enzymes. In terms of coagulation specificity, the recombinant *C. pygargus* chymosin occupied an intermediate position between the genetically engineered analogues of *B. taurus* and *C. dromedarius* chymosins. The threshold of thermal stability of recombinant roe deer chymosin was equal to 55°C. At 60°C, the enzyme retained <1% of the initial milk-clotting activity, and its complete thermal inactivation was observed at 65°C.

Keywords: mammalian expression system, CHO-K1, recombinant chymosin, Siberian roe deer, milk-clotting activity, proteolytic activity, thermal stability

РЕКОНСТРУКЦИЯ КАЛЬЦИЕВОГО КАНАЛА Orai3 В ЛИПОСОМАХ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ФУНКЦИИ ЭТОГО БЕЛКА

© 2023 Ch. Liang¹, F. Wu^{1,2*}

¹ Hubei University of Medicine, School of Basic Medical Sciences, 442000 Shiyan, China

² Nankai University, College of Life Sciences, Department of Genetics and Cell Biology, 300071 Tianjin, China; e-mail: wufuyun@hbm.u.edu.cn

Поступила в редакцию 29.03.2023

После доработки 14.07.2023

Принята к публикации 02.08.2023

Депо-управляемый вход кальция (store-operated calcium entry, SOCE) является основным механизмом притока Ca^{2+} в невозбудимые клетки. Основными компонентами SOCE являются молекула стромального взаимодействия 1 (stromal interaction molecule 1, STIM1), локализованная в эндоплазматическом ретикулуме, и активируемый в результате высвобождения ионов кальция Ca^{2+} -канал (Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel, CRAC) Orai, локализованный на плазматической мембране. Механизм SOCE требует взаимодействия между белками STIM1 и Orai. В клетках млекопитающих были выявлены три гомолога Orai: Orai1, Orai2 и Orai3. Хотя белок Orai1 был широко изучен, и было показано, что он необходим для множества клеточных процессов, Orai3 также недавно привлёк к себе значительное внимание. Механизмы запуска и активации канала Orai3 ещё полностью не выяснены. В настоящей работе нами был экспрессирован, очищен и реконструирован в липосомах белок Orai3. В полученных протеолипосомах была изучена ориентация и олигомерное состояние этого белка. Показано, что белок STIM1 взаимодействует с Orai3-содержащими протеолипосомами и опосредует высвобождение из них ионов кальция. Это указывает на функционально активное состояние канала Orai3 и то, что рекомбинантный белок STIM1 может напрямую открывать канал Orai3 в условиях *in vitro*. Разработанная нами система высвобождения ионов кальция *in vitro* может быть использована для изучения структуры, функции и фармакологических свойств канала Orai3.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: депо-управляемый вход ионов Ca^{2+} , Orai3, STIM1, реконструкция, липосомы.

DOI: 10.31857/S0320972523090099, **EDN:** WUNVBK

ВВЕДЕНИЕ

Ионы Ca^{2+} являются важным вторичным мессенджером, который участвует практически во всех физиологических процессах в клетке. Нарушения внутриклеточного гомеостаза кальция зачастую связаны с различными заболеваниями [1, 2]. Депо-управляемый вход кальция (store-operated calcium entry, SOCE) является одним из основных механизмов поступления внеклеточного кальция в клетки млекопитающих и центральным механизмом регуляции кальций-зависимой передачи сигнала в невозбудимых клетках. Ключевыми элементами процесса активации SOCE являются белок STIM1 (stromal interaction molecule 1, молекула стромального взаимодействия 1) и бе-

лок Orai1 [3–6]. Известно, что белок Orai1 образует высокоселективные кальциевые каналы в плазматической мембране. Показана связь недостатка Orai1 со многими заболеваниями, такими как иммунодефицит, мышечная гипотония и ангидротическая эктодермальная дисплазия [7–9]. У млекопитающих идентифицированы три белка Orai (Orai1, Orai2 и Orai3), которые имеют высокую степень гомологии аминокислотных последовательностей, но проявляют различные функциональные свойства [10–12]. Из этих трёх белков Orai1 вносит наибольший вклад в SOCE, взаимодействуя с белком STIM1. Поэтому его структура, функции и механизм активации были подробно изучены [13–15]. Orai1 представляет собой белок с четырьмя трансмембранными доменами,

Принятые сокращения: SOCE – store-operated calcium entry, депо-управляемый вход кальция; STIM1 – stromal interaction molecule 1, молекула стромального взаимодействия 1.

* Адресат для корреспонденции.

оба конца которого расположены в цитозоле, и он функционирует как гексамерный комплекс [16]. STIM1 представляет собой однопроходной белок мембраны эндоплазматического ретикулума (ЭР) с люминальным *N*-концевым участком, содержащим два мотива EF-ручка (EF-hand) и стерильный альфа-мотив (sterile alpha motif, SAM). С-Концевой участок белка STIM1 экспонирован в цитозоль. При истощении запасов кальция в ЭР белок STIM1 посредством своего домена EF-ручка реагирует на снижение концентрации ионов Ca^{2+} в ЭР. Это выражается в кластеризации белков и их транслокации в область стыковки мембран ЭР и плазматической мембраны. SOAR-домен белка STIM1 отвечает за связывание с *N*- и *C*-концевыми фрагментами Orai1 для обеспечения открытия канала [14, 17]. Канал Orai1 играет ключевую роль во многих клеточных функциях и ассоциирован со многими заболеваниями. Мутация R91W в белке Orai1 вызывает блокировку процесса активации канала, что приводит к тяжёлому комбинированному иммунодефициту (severe combined immunodeficiency, SCID) у пациентов [8]. Мутации с усилением функции (gain-of-function mutations) в белке Orai1, вызывающие конститутивную активность канала, приводят к возникновению несиндромальной тубулярной агрегатной миопатии и синдрома тромбоцитов Йорка, а также синдрома Сторморкен [18, 19].

Белок Orai3 является уникальным каналом, экспрессия которого наблюдается только у млекопитающих. Участвующие в образовании пор трансмембранные домены всех трёх белков Orai демонстрируют высокую степень консервативности. Как и Orai1, Orai3 представляет собой белок, образованный четырьмя трансмембранными доменами, и его *N*- и *C*-концевые фрагменты экспонированы в цитоплазму [20–22]. Показано, что белок Orai3 также индуцирует SOCE, однако величина притока кальция в этом случае меньше, чем в случае Orai1. Кроме того, Orai3 связывается с Orai1 с образованием гетеромультимерных Ca^{2+} -каналов, регулируемых арахидоновой кислотой (arachidonic acid-regulated Ca^{2+} , ARC), и Ca^{2+} -каналов, регулируемых лейкотриеном C4 (leukotriene C4 (LTC4)-regulated, LRC), но эти каналы являются депо-независимыми [23–26]. Недавно была показана критическая роль белка Orai3 в прогрессировании многих видов рака, например, рака молочной железы, экспрессирующего эстрогеновые рецепторы (ER⁺), немелкоклеточного рака лёгкого и рака предстательной железы [27–29]. Было также показано, что Orai3 способствует

ремоделированию гладкомышечных клеток сосудов при повреждении сосудов и аутоиммунных заболеваниях [30, 31]. Хотя в последние годы белок Orai3 привлёк значительное внимание исследователей, тем не менее механизмы его запуска и активации ещё полностью не выяснены. Реконструкция мембранных белков в липосомах оказалась мощным инструментом для изучения функции мембранных белков в упрощённой среде, которая, тем не менее, имитирует их нативную липидную среду [32, 33]. В настоящей работе нами были экспрессированы белок Orai3 и домен SOAR белка STIM1 в клетках *Escherichia coli* и получены их очищенные препараты. Солюбилизованный детергентом белок Orai3 был нами реконструирован в липосомах. В полученных протеолипосомах была изучена ориентация и олигомерное состояние этого канала. С помощью такой системы мы показали, что STIM1 может непосредственно вызывать высвобождение ионов кальция из протеолипосом, содержащих Orai3. Полученные нами результаты указывают на то, что реконструкция мембранного белка Orai3 в липосомах является эффективным инструментом для изучения функций каналов Orai3 *in vitro*. Этот метод может способствовать разработке новых стратегий для изучения молекулярных механизмов действия каналов Orai3 и разработки новых препаратов направленного действия для лечения заболеваний.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Плазмиды. Полный ген белка Orai3 человека был клонирован в вектор pGEX-6P-1 с прикреплением метки HA к *C*-концу. Фрагмент белка STIM1 человека из аминокислотных остатков 342–531 (STIM1 (a.o. 342–531)) был клонирован в вектор pET-28a с меткой Flag на *C*-конце. С полными последовательностями плазмид можно ознакомиться в Приложении.

Экспрессия и очистка белка. Чтобы вызвать экспрессию белков GST-Orai3-HA и His₆-STIM1 (342–531)-Flag, клетки *E. coli* Rosetta DE3 («Novagen», США) были трансформированы плазмидами. Клетки *E. coli* выращивали в среде LB при 37 °C до достижения значения оптической плотности среды при 600 нм (OD₆₀₀), равной 0,8. Индукцию экспрессии белка осуществляли путём добавления 0,5 мМ изопропил-β-D-тиогалактозида на 12 ч при 24 °C. Клетки собирали и затем лизировали с помощью ультразвука в растворе 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), содержащем 300 мМ NaCl и набор ингибиторов протеаз («Roche», Швей-

цария). Чтобы очистить белок GST-Orai3-НА, суммарные клеточные мембраны осаждали в ходе ультрацентрифугирования при 182 000 g в течение 1 ч при 4 °С. Полученный осадок гомогенизировали и солюбилизировали в 50 мМ буфера Tris-HCl (pH 8,0), содержащего 300 мМ NaCl и 2% (v/v) Triton X-100, в течение 2 ч. Нерастворимые остатки клеток удаляли при центрифугировании в режиме 100 000 g в течение 30 мин при 4 °С, и полученный супернатант инкубировали с гранулами глутатион-сефарозы («GE Healthcare», США). Затем гранулы промывали 50 мМ буфера Tris-HCl (pH 8,0), содержащего 300 мМ NaCl и 0,1% (v/v) Triton X-100. Связавшиеся с гранулами белки элюировали 10 мМ восстановленного глутатиона в 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), содержащего 300 мМ NaCl. Далее белок GST-Orai3-НА очищали путём гель-фильтрации с использованием 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), содержащего 300 мМ NaCl и 0,1% (v/v) Triton X-100, на колонке Superdex 200 («GE Healthcare»), предварительно уравновешенной тем же буфером. Для очистки STIM1 (а.о. 342–531) клетки выращивали и затем лизировали с помощью ультразвука в 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), содержащего 300 мМ NaCl, 4 мМ имидазола и 2 мМ β-меркаптоэтанола. Лизаты клеток осветляли путём центрифугирования при 38 900 g в течение 1 ч при 4 °С. Рекombинантный белок очищали с помощью хроматографии на колонке Ni-NTA («Qiagen», США). После нанесения раствора белка смолу промывали 20 мМ имидазола в 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), содержащего 300 мМ NaCl, и связавшийся белок элюировали 400 мМ имидазола. Белок His-STIM1 (342–531)-Flag дополнительно очищали с помощью ионообменной хроматографии с использованием колонки HiTrap Q HP («GE Healthcare»), предварительно уравновешенной буфером А (20 мМ Tris-HCl, pH 8,0). Образцы белка наносили на колонку с использованием петли объёмом 5 мл. Колонку промывали пятью объёмами буфера А. Связавшиеся белки элюировали с колонки линейным градиентом концентрации NaCl (от 0 до 1 М NaCl в пяти объёмах колонки).

Анализ белков путём совместного осаждения (pull-down assay). Меченные биотином концевые пептиды белка Orai3 были синтезированы «GL Biochem» (Шанхай, Китай). Пептиды иммобилизовывали на гранулах стрептактин сефарозы («Qiagen») и инкубировали с очищенным STIM1 (а.о. 342–531) в течение 1 ч при 4 °С. Гранулы промывали три раза и кипятили в двухкратном буфере для образцов белка, содержащем додецилсульфат натрия (SDS). Далее белки разделяли с использовани-

ем электрофореза в ПААГ в присутствии SDS (SDS-PAGE), и затем подвергали Вестерн-блоттингу с использованием антител против Flag.

Вестерн-блоттинг. Образцы белков подвергали разделению с использованием SDS-PAGE, и разделённые белки переносили на поливинилиденфторидную (PVDF) мембрану. Мембрану блокировали в течение 1 ч 5%-ным обезжиренным молоком в солевом растворе с Tris-буфером, содержащим 0,1%-ный Tween 20 (TBST), и затем инкубировали в течение ночи с первичными антителами при 4 °С. Затем мембрану промывали три раза в TBST и в течение 1 ч инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP). Белковые полосы идентифицировали с помощью реагента ECL Western blotting substrate («Pierce», США).

Получение липосом. Препараты 1,2-пальмитоил-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (POPC), 1,2-пальмитоил-олеоил-sn-глицеро-3-фосфосерина (POPS) и меченного родамином 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина, DPPE (Rho-PE), были получены от «Avanti Polar Lipids» (Алабастер, США). Липосомы приготавливали в стеклянной пробирке с помощью раствора липида (10 мМ) в хлороформе (83,5% POPC, 15% POPS, 1,5% Rho-PE). Липиды высушивали под мягким потоком азота до образования тонкой плёнки и затем сушили в вакуумном эксикаторе в течение ночи. Далее плёнки липида увлажняли с использованием буфера Hepes (25 мМ Hepes, 100 мМ KCl), после чего 10 раз замораживали и размораживали. Для получения однослойных липосом суспензию липидов 10 раз пропустили под давлением через поликарбонатные фильтры с диаметром пор, равным 100 нм («Whatman», Великобритания), с использованием аппарата Mini-Extruder («Avanti Polar Lipids»).

Реконструкция белка в липосомах. Очищенный белок GST-Orai3-НА смешивали с липосомами в молярном соотношении 1 : 1000 (белок : общий липид). Конечная концентрация белка составляла 2 мкМ, а липидов – 2 мМ. Для загрузки ионов Ca²⁺ в протеолипосомы в реконструкционную смесь добавляли Ca²⁺ до конечной концентрации, равной 200 мкМ. Эту смесь инкубировали при комнатной температуре при мягком встряхивании в течение 5 мин. Чтобы удалить детергент (Triton X-100), липосомы инкубировали при 4 °С с тремя сменами гранул Bio-Beads SM2 («Bio-Rad», США) – 20 мг гранул на 1 мл суспензии липосом. Реконструкционную смесь затем подвергали ультрацентрифугированию при 55 000 об./мин в течение 1 ч при 4 °С.

Полученный осадок промывали буфером Нерес и снова подвергали ультрацентрифугированию для удаления остатков ионов кальция. Ca^{2+} -содержащие протеолипосомы Orai3 ресуспендировали в буфере Нерес.

Флотационный анализ. Эффективность реконструкции белка определяли с помощью анализа флотации в градиенте сахарозы. Протеолипосомы (30 мкл) смешивали с 1,9 М сахарозы (100 мкл) и далее последовательно наслаивали 1,25 М (100 мкл) и 0,25 М (20 мкл) сахарозы. Образцы центрифугировали в течение 1 ч на роторе Beckman TLS 55 в режиме 55 000 об./мин при 4 °С. Градиент сахарозы собирали в виде пяти фракций, которые далее анализировали с помощью Вестерн-блоттинга.

Определение ориентации белка в липосомах. Протеолипосомы с белком GST-Orai3-НА инкубировали с протеазой 3С («Takara», Япония) или без неё в течение 3 ч при 4 °С. Реакцию останавливали путём добавления SDS-содержащего буфера для нанесения образцов, и образцы анализировали с помощью Вестерн-блоттинга с использованием антител против НА.

Определение олигомеров белков в липосомах. Протеолипосомы, содержащие GST-Orai3-НА, инкубировали с 1%-ным SDS или 1%-ным дигитонином при 4 °С в течение 1 ч и затем аккуратно наслаивали на верхний слой 5–25%-ного (w/v) градиента сахарозы. Образцы центрифугировали при 174 000 g и 4 °С в течение 2 ч. Градиент собирали в виде 14 фракций, которые затем анализировали с помощью Вестерн-блоттинга.

Определение потока кальция. После реконструкции белка GST-Orai3-НА в липосомах и их загрузки ионами Ca^{2+} функционирование Orai3 в качестве ионного канала оценивали с помощью метода определения потока ионов Ca^{2+} , основанного на измерении флуо-

ресценции с использованием пентанатриевой соли Fura-2 и ридера микропланшет. Контрольные липосомы и протеолипосомы, содержащие белок Orai3 (100 мкл), вносили в ячейки чёрной 96-ячеечной микропланшеты. В каждую ячейку добавляли краситель Fura-2 (конечная концентрация 50 мкМ), и микропланшету инкубировали в течение 2 мин на ридере микропланшет SpectraMax i3x (установленный на режим прочтения конечной точки) до начала измерения в каждой ячейке сигнала флуоресценции при 510 нм (возбуждение при 340 нм и 380 нм) без добавления или после добавления STIM1 (а.о. 342–531) (2 мкМ) или детергента Triton X-100 (5 мкл). Соотношение интенсивности флуоресценции, $F_{340 \text{ нм}} / F_{380 \text{ нм}}$, для красителя Fura-2 было прямо пропорционально концентрации ионов Ca^{2+} .

Статистическая обработка результатов. Анализ полученных данных проводили с использованием программы GraphPad Prism 5. Полученные результаты представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка отклонения (SD). Различия между двумя группами определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Экспрессия и очистка белка Orai3 и фрагмента белка STIM1. Белки Orai1 и STIM1 являются ключевыми молекулами процесса активации SOCE, который зависит от взаимодействия между доменом SOAR (а.о. 344–442) белка STIM1 и *N*- и *C*-концевыми фрагментами белка Orai1 (рис. 1, а). Хотя Orai3 является гомологом белка Orai1, его уникальные функции остаются невыясненными. Чтобы определить функции белка Orai3 и создать эффективную

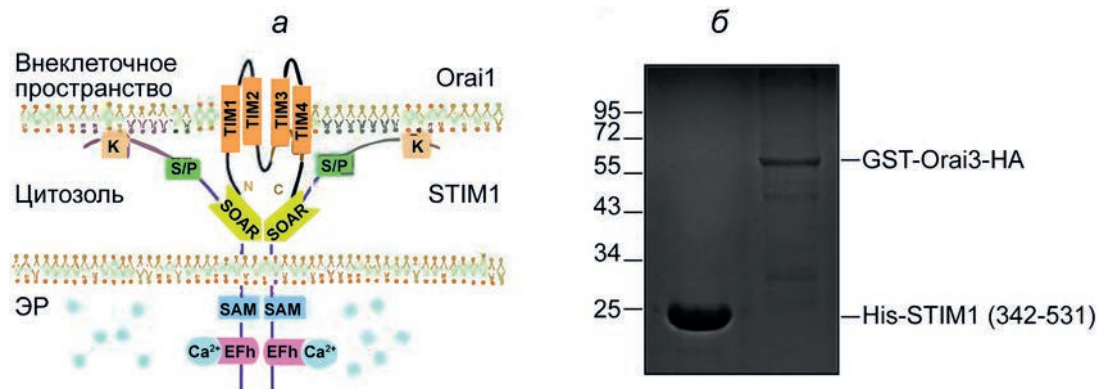


Рис. 1. Экспрессия и очистка Orai3 и STIM1 (а.о. 342–531). а – Схематичное изображение активации канала CRAC (Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel, активируемый в результате высвобождения ионов кальция Ca^{2+} -канал). Связывание SOAR-домена STIM1 с *N*- и *C*-концевыми фрагментами белка Orai1 приводит к открытию канала и проникновению ионов кальция. б – Окрашивание Кумасси бриллиантовым голубым очищенного Orai3 и STIM1 (а.о. 342–531)

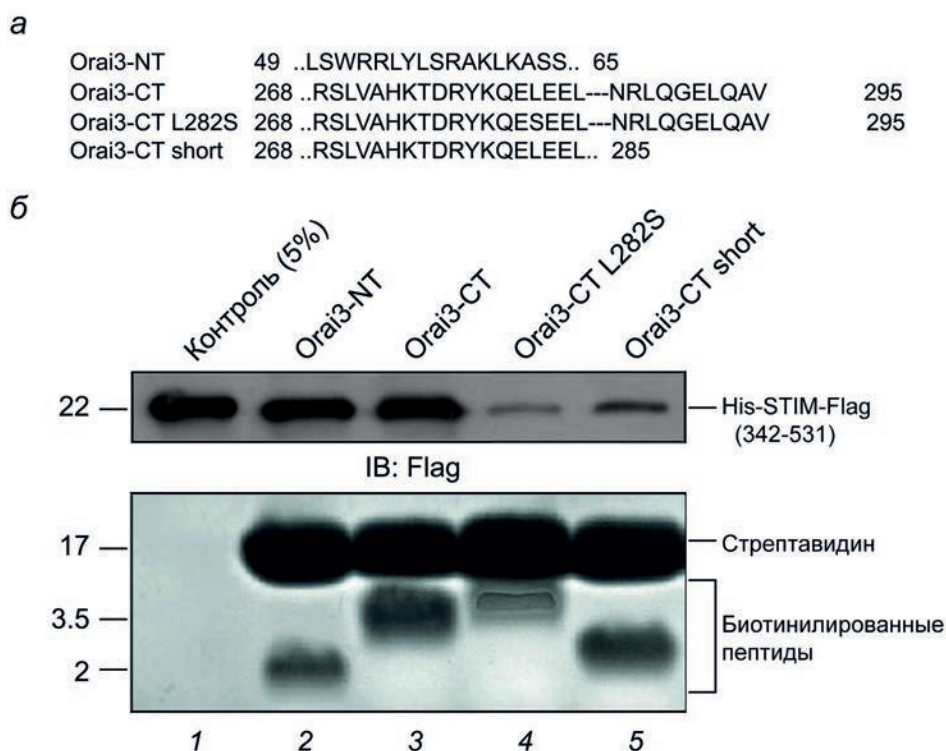


Рис. 2. Взаимодействия между STIM1 (а.о. 342–531) и *N*- и *C*-концевыми пептидами белка Orai3 (NT и CT соответственно). *a* – Аминокислотные последовательности синтетических пептидов белка Orai3. *б* – Анализ совместного осаждения (Pull-down assay) для определения связывания STIM1 (а.о. 342–531) и концевых пептидов белка Orai3. IB: Flag – антитела против Flag

и простую исследовательскую модель *in vitro*, полноразмерный белок Orai3 и фрагмент белка STIM1 (а.о. 342–531) были экспрессированы в клетках *E. coli* и далее очищены. Поскольку домен SOAR белка STIM1, как известно, трудно очистить, нами были протестированы несколько несущих домен SOAR конструкций, включая фрагменты STIM1 (а.о. 233–531), STIM1 (а.о. 310–531) и STIM1 (а.о. 342–531). Фрагмент оказалось легко выделить, и он демонстрировал более сильное связывание с Orai3. Реконбинантный белок Orai3 был помечен метками GST и HA, а STIM1 (а.о. 342–531) – метками His и Flag (рис. 1, б). Экспрессию и очистку белка GST-Orai3-HA (молекулярная масса ~ 58 кДа) подтверждали с помощью Вестерн-блоттинга с использованием антител против HA.

Взаимодействия между STIM1 (а.о. 342–531) и концевыми пептидами Orai3. В предыдущей работе мы показали, что STIM1 (а.о. 342–531) взаимодействует с каналом Orai [21]. В настоящей работе мы подтвердили с помощью метода совместного осаждения (pull-down assay) связывание STIM1 (а.о. 342–531) как с *N*-, так с *C*-концевыми фрагментами белка Orai3. С этой целью были синтезированы меченные биотином пептиды на основе последо-

вательностей белка Orai3 человека (рис. 2, а), которые связывали с гранулами, конъюгированными со стрептавидином. STIM1 (а.о. 342–531) инкубировали с гранулами при 4 °C в течение 1 ч. Гранулы осаждали, и связавшиеся с ними белки сначала разделяли с помощью SDS-PAGE, а затем визуализировали с помощью Вестерн-блоттинга с использованием антител против метки Flag. Очищенный STIM1 (а.о. 342–531) был способен физически взаимодействовать с *N*- и *C*-концевыми пептидами белка Orai3 (рис. 2, б, дорожки 2, 3). В то же время мутантный белок с аминокислотной заменой L282S (остаток L282 в белке Orai3 эквивалентен остатку L273 в белке Orai1) и укороченные *C*-концевые пептиды продемонстрировали пониженную способность взаимодействовать со STIM1 (рис. 2, б, дорожки 4, 5). Связывание биотинилированных пептидов со стрептавидином было подтверждено окрашиванием Кумасси бриллиантовым голубым (рис. 2, б, нижняя панель).

Реконструкция Orai3 в липосомах. Чтобы создать простую и эффективную исследовательскую модель для изучения функций Orai3 *in vitro*, очищенный белок GST-Orai3-HA был реконструирован в липосомах. Для контроля высвобождения кальция через канал Orai3,

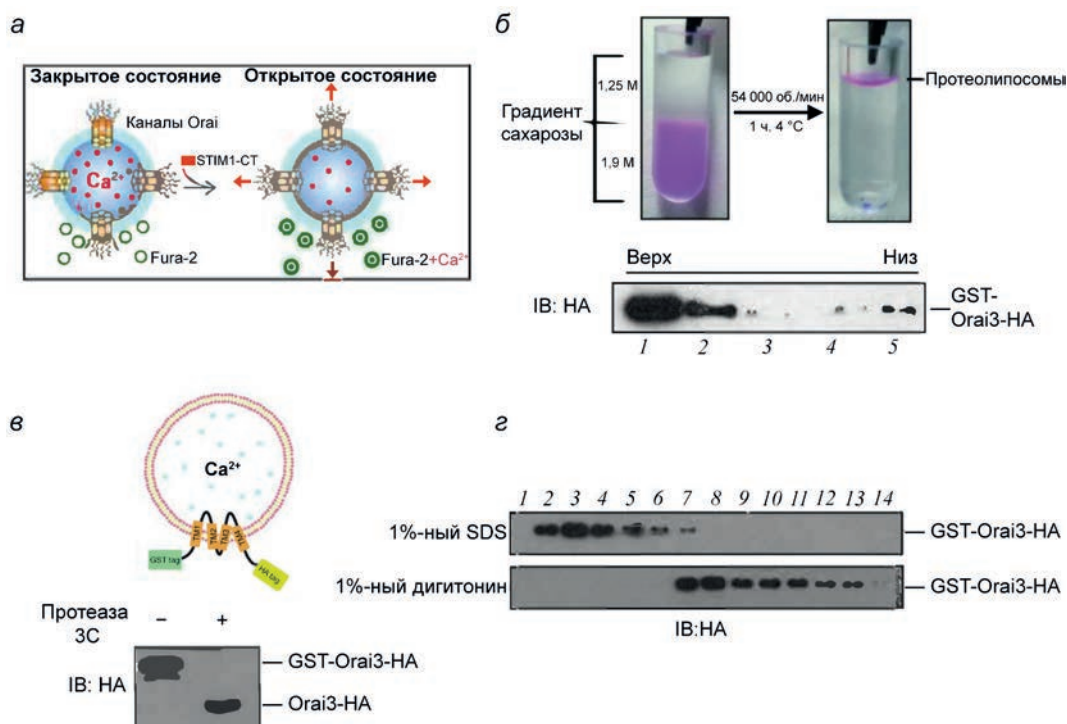


Рис. 3. Реконструированный в липосомах белок GST-Orai3-HA. *а* – Модель активации канала Orai3 *in vitro*. Активация канала Orai3, реконструированного в нагруженных ионами Ca²⁺ липосомах, путём добавления белка STIM1 приводила к высвобождению ионов Ca²⁺ из липосом. Количество выделившегося Ca²⁺ контролировали с помощью красителя Fura-2. *б* – Анализ эффективности реконструкции белка с помощью флотационного анализа. Пять фракций были проанализированы с помощью Вестерн-блоттинга с использованием антител против HA (IB: HA). *в* – Анализ ориентации GST-Orai3-HA в липосомах с использованием протеаз. Протеолипосомы, содержащие белок GST-Orai3-HA, обрабатывали протеазой 3C и анализировали с помощью Вестерн-блоттинга с использованием антител против HA (IB: HA). *г* – Анализ олигомерного состояния белка GST-Orai3-HA в липосомах с помощью центрифугирования в градиенте плотности сахарозы. Реконструированный белок GST-Orai3-HA обрабатывали указанными детергентами и наносили на градиент сахарозы. После центрифугирования 14 фракций были проанализированы с помощью Вестерн-блоттинга с использованием антител против HA (IB: HA)

активированный в результате взаимодействия с белком STIM1, использовали флуоресцентный индикатор Fura-2 (рис. 3, *а*). Белок GST-Orai3-HA со связанным детергентом (Triton X-100) смешивали с липосомами и инкубировали при 4 °C в течение 1 ч, после чего детергент медленно удаляли с помощью биогранул, что приводило к образованию протеолипосом. Эффективность реконструкции белка оценивали методом флотации в градиенте сахарозы. При центрифугировании белок GST-Orai3-HA, реконструированный в липосомах, всплывал на вершину градиента сахарозы. Как и ожидалось, Вестерн-блоттинг подтвердил высокую эффективность реконструкции. Так, почти все содержащие Orai3 протеолипосомы обнаруживались в верхней фракции (рис. 3, *б*). Поскольку ориентация канала Orai3 определяет направление потока кальция и экспозицию сайта связывания STIM1, мы также определили ориентацию встроенного в липосому белка GST-Orai3-HA с помощью анализа продуктов его расщепления протеазами. Ожидалось, что очищенный Orai3 будет представ-

лять собой белок с четырьмя трансмембранными доменами, помеченный метками GST и HA на N- и C-концах соответственно, причём оба конца будут экспонированы наружу из протеолипосом. Вестерн-блоттинг с использованием антител против метки HA показал, что метка GST реконструированного белка Orai3 была удалена протеазой 3C (рис. 3, *в*). Такая ориентация канала Orai3 достигалась после предварительной загрузки протеолипосом ионами Ca²⁺.

Анализ кристаллической структуры белка Orai у *Drosophila* выявил гексамерную структуру этого белка [34]. Чтобы изучить олигомеризацию белка GST-Orai3-HA в липосомах, нами был использован метод центрифугирования в градиенте плотности сахарозы. Реконструированный GST-Orai3-HA, солюбилизованный дигитонином (относительно мягкий детергент) или SDS (сильный ионный детергент), наносили на поверхность градиента сахарозы и подвергали центрифугированию. С помощью метода Вестерн-блоттинга было показано, что после обработки дигитонином белок

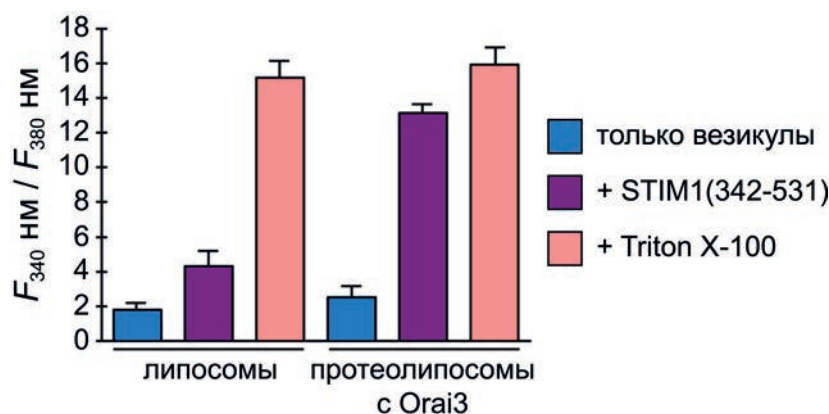


Рис. 4. Вызванное STIM1 высвобождение кальция из протеолипосом, содержащих Orai3, измеренное с помощью индикатора кальция Fura-2. Последовательно проводили возбуждение красителя Fura-2 на длинах волн 340 и 380 нм и определяли соотношение сигналов эмиссии для каждой длины волны возбуждения. Для определения концентрации ионов Ca^{2+} использовали соотношение $F_{340 \text{ нм}} / F_{380 \text{ нм}}$. Синий – концентрация Ca^{2+} вне липосом; фиолетовый – высвобождение Ca^{2+} , вызванное STIM1 (а.о. 342–531), розовый – общий Ca^{2+} , высвобождаемый из липосом детергентом Triton X-100

GST-Orai3-НА мигрировал в градиенте как белок со значительно большим молекулярным весом, что указывало на образование в липосомах олигомеров белка Orai3. При обработке SDS происходило разрушение олигомеров, в результате чего этот белок обнаруживался в верхних фракциях градиента (рис. 3, д). В целом, эти результаты свидетельствуют об успешной реконструкции в липосомах очищенного белка GST-Orai3-НА.

STIM1 индуцировал высвобождение ионов кальция из протеолипосом, содержащих Orai3. Чтобы дополнительно подтвердить, что канал Orai3 может быть активирован белком STIM1 *in vitro*, мы проанализировали высвобождение Ca^{2+} из липосом с использованием индикатора кальция Fura-2 с максимумом возбуждения при 380 нм (при низких концентрациях ионов кальция). Концентрация Ca^{2+} вне протеолипосом в начале эксперимента была очень низкой. Добавление STIM1 (а.о. 342–531) приводило к индукции флуоресценции Fura-2 с пиком эмиссии при 510 нм и сдвигу максимальной длины волны возбуждения от 340 до 380 нм в ответ на связывание кальция. Это свидетельствовало о том, что STIM1 (а.о. 342–531) вызывал значительное высвобождение Ca^{2+} из протеолипосом, содержащих Orai3. Небольшое увеличение соотношения интенсивностей флуоресценции Fura-2 ($F_{340 \text{ нм}} / F_{380 \text{ нм}}$) в ответ на добавление фрагмента белка STIM1 также наблюдалось в липосомах, не содержащих Orai3, что может быть связано с очень высокой чувствительностью Fura-2. Поэтому добавление раствора белка STIM1, содержащего некоторое количество ионов, могло вызвать небольшое увеличение сигнала флуоресценции. Также возможно, что добавление белка

STIM1 могло вызвать разрыв некоторых липосом, что привело к утечке ионов кальция и небольшому увеличению флуоресцентного сигнала. Обработка протеолипосом Triton X-100 приводила к практически полному высвобождению Ca^{2+} . Соотношение $F_{340 \text{ нм}} / F_{380 \text{ нм}}$ было одинаковым для Orai3-содержащих протеолипосом и контрольных липосом. Эти результаты свидетельствуют о том, что белок GST-Orai3-НА, реконструированный в липосомах, образует активные Ca^{2+} -каналы, и что взаимодействие между STIM1 и Orai3 было достаточным для открытия канала *in vitro* (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Реконструкция мембранных белков в искусственной липидной среде является мощным инструментом, широко используемым при изучении структуры и функций ионных каналов, транспортёров, рецепторов и т.д. [35–37]. SOCE является основным механизмом проникновения кальция в невозбудимые клетки, который используется в ряде физиологических и патологических процессов. Он опосредован взаимодействием между Orai1 и STIM1. Структура, функция и механизм активации белка Orai1 как ключевого компонента SOCE были широко изучены *in vitro*. Zhou et al. экспрессировали белок Orai1 человека в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* и выделили из аппарата Гольджи запечатанные мембранные везикулы, переносящие Orai1 к плазматической мембране. Авторы показали, что рекомбинантный STIM1, экспрессируемый в бактериях, может напрямую открывать канал Orai1 *in vitro* [38]. Liu et al. получили моноклональные антитела

против белка Orai1, используя в качестве антигена комплекс липосом и очищенного белка Orai1, синтезированного в бесклеточной системе [39]. Hou et al. определили кристаллическую структуру Orai из *Drosophila melanogaster* и изучили функцию канала Orai путём реконструкции очищенного белка Orai в липосомах с использованием флуоресценции для мониторинга потока ионов [34].

Белок Orai3, который является гомологом Orai1, встречается исключительно у млекопитающих. Для него характерны существенные отличия аминокислотной последовательности от других изоформ белка Orai. Этот белок обладает уникальными особенностями механизмов регуляции и модуляции. Идентичность последовательностей белков Orai3 и Orai1 в экспонированных в цитозоль N- и C-концевых участках составляет 34 и 46% соответственно [40], что может объяснить гораздо более сильное связывание Orai3 с белком STIM1. Индуцированные Orai3 депо-управляемые потоки протекают значительно медленнее, чем в случае Orai1 [41]. Биофизические и фармакологические свойства этих двух белков также различаются [10, 42, 43]. Было показано, что Orai3 является важным компонентом депо-независимых каналов ARC и LRC, ассоциированных с развитием рака и ремоделированием сердечно-сосудистой системы. Следовательно, канал Orai3 может играть критическую роль в специфических клетках или в специфических условиях у млекопитающих. В настоящей работе нами была разработана система *in vitro*, которую можно использовать для изучения структуры, функции и фармакологических свойств канала Orai3. Кроме того, мы разработали эффективный протокол очистки белка Orai3 из клеток *E. coli* и его реконструкции в протеолипосомах. Мы подтвердили ориентацию белка Orai3 в липосомах с помощью анализа продуктов его расщепления и показали, что оба концевых участка Orai3 обращены во

внешнюю среду и доступны для взаимодействия с рекомбинантным STIM1. Добавление рекомбинантного фрагмента STIM1 (а.о. 342–531) вызывало отток Ca^{2+} из липосом.

Можно заключить, что белок Orai3 привлекает значительное внимание исследователей и все чаще признается как терапевтическая мишень при различных заболеваниях. Однако уникальный механизм активации Orai3 остаётся плохо изученным. В настоящей работе мы реконструировали очищенный белок Orai3 в протеолипосомах в отсутствие загрязняющих факторов, что позволило преодолеть некоторые ограничения традиционных методов. Это может послужить основой для будущих исследований структуры и функции канала Orai3 и облегчить открытие его высокоселективных ингибиторов.

Вклад авторов. F. Wu разработал план работы и руководил исследованием. Ch. Liang и F. Wu подготовили и провели эксперименты, а также собрали и проанализировали данные; F. Wu написал текст статьи. Оба автора прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Финансирование. Работа была поддержана Национальным фондом естественных наук Китая (проект № 81702639) и Программой инновационных исследований для выпускников Медицинского университета провинции Хубэй (грант № JC2022010).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Данная статья не содержит описания проведённых кем-либо из авторов исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте издательства Springer (www.springer.com/journal/10541), том 88, вып. 9, 2023.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Putney, J. W., Jr. (1986) A model for receptor-regulated calcium entry, *Cell Calcium*, **7**, 1-12, doi: 10.1016/0143-4160(86)90026-6.
2. Putney, J. W., Jr., Broad, L. M., Braun, F. J., Lievreumont, J. P., and Bird, G. S. (2001) Mechanisms of capacitative calcium entry, *J. Cell Sci.*, **114**, 2223-2229, doi: 10.1242/jcs.114.12.2223.
3. Luik, R. M., Wu, M. M., Buchanan, J., and Lewis, R. S. (2006) The elementary unit of store-operated Ca^{2+} entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions, *J. Cell Biol.*, **174**, 815-825, doi: 10.1083/jcb.200604015.
4. Baba, Y., Hayashi, K., Fujii, Y., Mizushima, A., Watarai, H., Wakamori, M., Numaga, T., Mori, Y., Iino, M., Hikida, M., and Kurosaki, T. (2006) Coupling of STIM1 to store-operated Ca^{2+} entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum, *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. USA*, **103**, 16704-16709, doi: 10.1073/pnas.0608358103.
5. Hogan, P. G., and Rao, A. (2015) Store-operated calcium entry: MECHANISMS and modulation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **460**, 40-49, doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.110.
 6. Lunz, V., Romanin, C., and Frischauf, I. (2019) STIM1 activation of Orai1, *Cell Calcium*, **77**, 29-38, doi: 10.1016/j.ceca.2018.11.009.
 7. Lacruz, R. S., and Feske, S. (2015) Diseases caused by mutations in ORAI1 and STIM1, *Ann. NY Acad. Sci.*, **1356**, 45-79, doi: 10.1111/nyas.12938.
 8. Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S. H., Tanasa, B., Hogan, P. G., Lewis, R. S., Daly, M., and Rao, A. (2006) A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function, *Nature*, **441**, 179-185, doi: 10.1038/nature04702.
 9. Lian, J., Cuk, M., Kahlfuss, S., Kozhaya, L., Vaeth, M., Rieux-Laucat, F., Picard, C., Benson, M. J., Jakovcevic, A., Bilic, K., Martinac, I., Stathopoulos, P., Kacsiovics, I., Vraetz, T., Speckmann, C., Ehl, S., Issekutz, T., Unutmaz, D., and Feske, S. (2018) ORAI1 mutations abolishing store-operated Ca²⁺ entry cause anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **142**, 1297-1310.e1211, doi: 10.1016/j.jaci.2017.10.031.
 10. Hoth, M., and Niemeyer, B. A. (2013) The neglected CRAC proteins: Orai2, Orai3, and STIM2, *Curr. Top. Membr.*, **71**, 237-271, doi: 10.1016/b978-0-12-407870-3.00010-x.
 11. Zhang, X., Xin, P., Yeast, R. E., Emrich, S. M., Johnson, M. T., Pathak, T., Benson, J. C., Azimi, I., Gill, D. L., Monteith, G. R., and Trebak, M. (2020) Distinct pharmacological profiles of ORAI1, ORAI2, and ORAI3 channels, *Cell Calcium*, **91**, 102281, doi: 10.1016/j.ceca.2020.102281.
 12. Shuba, Y. M. (2019) Ca²⁺ channel-forming ORAI proteins: cancer foes or cancer allies? *Exp. Oncol.*, **41**, 200-206, doi: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-41-no-3.13473.
 13. Hou, X., Outhwaite, I. R., Pedi, L., and Long, S. B. (2020) Cryo-EM structure of the calcium release-activated calcium channel Orai in an open conformation, *eLife*, **9**, e62772, doi: 10.7554/eLife.62772.
 14. Stathopoulos, P. B., Schindl, R., Fahrner, M., Zheng, L., Gasmi-Seabrook, G. M., Muik, M., Romanin, C., and Ikura, M. (2013) STIM1/Orai1 coiled-coil interplay in the regulation of store-operated calcium entry, *Nat. Commun.*, **4**, 2963, doi: 10.1038/ncomms3963.
 15. Yeung, P. S., Yamashita, M., and Prakriya, M. (2020) Molecular basis of allosteric Orai1 channel activation by STIM1, *J. Physiol.*, **598**, 1707-1723, doi: 10.1113/jp276550.
 16. Yen, M., Lokteva, L. A., and Lewis, R. S. (2016) Functional analysis of Orai1 concatemers supports a hexameric stoichiometry for the CRAC channel, *Biophys. J.*, **111**, 1897-1907, doi: 10.1016/j.bpj.2016.09.020.
 17. Lewis, R. S. (2011) Store-operated calcium channels: new perspectives on mechanism and function, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **3**, a003970, doi: 10.1101/cshperspect.a003970.
 18. Riva, B., Pessolano, E., Quaglia, E., Cordero-Sanchez, C., Bhela, I. P., Topf, A., Serafini, M., Cox, D., Harris, E., Garibaldi, M., Barresi, R., Piralì, T., and Genazzani, A. A. (2022) STIM1 and ORAI1 mutations leading to tubular aggregate myopathies are sensitive to the Store-operated Ca²⁺-entry modulators CIC-37 and CIC-39, *Cell Calcium*, **105**, 102605, doi: 10.1016/j.ceca.2022.102605.
 19. Berna-Erro, A., Jardín, I., Smani, T., and Rosado, J. A. (2016) Regulation of platelet function by Orai, STIM and TRP, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **898**, 157-181, doi: 10.1007/978-3-319-26974-0_8.
 20. Prakriya, M., Feske, S., Gwack, Y., Srikanth, S., Rao, A., and Hogan, P. G. (2006) Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel, *Nature*, **443**, 230-233, doi: 10.1038/nature05122.
 21. Niu, L., Wu, F., Li, K., Li, J., Zhang, S. L., Hu, J., and Wang, Q. (2020) STIM1 interacts with termini of Orai channels in a sequential manner, *J. Cell Sci.*, **133**, jcs239491, doi: 10.1242/jcs.239491.
 22. Bergsmann, J., Derler, I., Muik, M., Frischauf, I., Fahrner, M., Pollheimer, P., Schwarzinger, C., Gruber, H. J., Groschner, K., and Romanin, C. (2011) Molecular determinants within N terminus of Orai3 protein that control channel activation and gating, *J. Biol. Chem.*, **286**, 31565-31575, doi: 10.1074/jbc.M111.227546.
 23. Shuttleworth, T. J. (2012) Orai3 – the “exceptional” Orai? *J. Physiol.*, **590**, 241-257, doi: 10.1113/jphysiol.2011.220574.
 24. Thompson, J., Mignen, O., and Shuttleworth, T. J. (2010) The N-terminal domain of Orai3 determines selectivity for activation of the store-independent ARC channel by arachidonic acid, *Channels*, **4**, 398-410, doi: 10.4161/chan.4.5.13226.
 25. Zhang, S. L., Kozak, J. A., Jiang, W., Yeromin, A. V., Chen, J., Yu, Y., Penna, A., Shen, W., Chi, V., and Cahalan, M. D. (2008) Store-dependent and -independent modes regulating Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel activity of human Orai1 and Orai3, *J. Biol. Chem.*, **283**, 17662-17671, doi: 10.1074/jbc.M801536200.
 26. Zhang, X., González-Cobos, J. C., Schindl, R., Muik, M., Ruhle, B., Motiani, R. K., Bisailon, J. M., Zhang, W., Fahrner, M., Barroso, M., Matrougui, K., Romanin, C., and Trebak, M. (2013) Mechanisms of STIM1 activation of store-independent leukotriene C4-regulated Ca²⁺ channels, *Mol. Cell. Biol.*, **33**, 3715-3723, doi: 10.1128/mcb.00554-13.
 27. Motiani, R. K., Abdullaev, I. F., and Trebak, M. (2010) A novel native store-operated calcium channel encoded

- by Orai3: selective requirement of Orai3 versus Orail1 in estrogen receptor-positive versus estrogen receptor-negative breast cancer cells, *J. Biol. Chem.*, **285**, 19173-19183, doi: 10.1074/jbc.M110.102582.
28. Ay, A. S., Benzerdjeb, N., Sevestre, H., Ahidouch, A., and Ouadid-Ahidouch, H. (2013) Orai3 constitutes a native store-operated calcium entry that regulates non small cell lung adenocarcinoma cell proliferation, *PLoS One*, **8**, e72889, doi: 10.1371/journal.pone.0072889.
 29. Holzmann, C., Kilch, T., Kappel, S., Armbrüster, A., Jung, V., Stöckle, M., Bogeski, I., Schwarz, E. C., and Peinelt, C. (2013) ICRAc controls the rapid androgen response in human primary prostate epithelial cells and is altered in prostate cancer, *Oncotarget*, **4**, 2096-2107, doi: 10.18632/oncotarget.1483.
 30. González-Cobos, J. C., Zhang, X., Zhang, W., Ruhle, B., Motiani, R. K., Schindl, R., Muik, M., Spinelli, A. M., Bisailon, J. M., Shinde, A. V., Fahrner, M., Singer, H. A., Matrougui, K., Barroso, M., Romanin, C., and Trebak, M. (2013) Store-independent Orai1/3 channels activated by intracrine leukotriene C4: role in neointimal hyperplasia, *Circ. Res.*, **112**, 1013-1025, doi: 10.1161/circresaha.111.300220.
 31. Motiani, R. K., Stolwijk, J. A., Newton, R. L., Zhang, X., and Trebak, M. (2013) Emerging roles of Orai3 in pathophysiology, *Channels*, **7**, 392-401, doi: 10.4161/chan.24960.
 32. Rigaud, J. L. (2002) Membrane proteins: functional and structural studies using reconstituted proteoliposomes and 2-D crystals, *Brazil. J. Med. Biol. Res.*, **35**, 753-766, doi: 10.1590/s0100-879x2002000700001.
 33. Rigaud, J. L., and Lévy, D. (2003) Reconstitution of membrane proteins into liposomes, *Methods Enzymol.*, **372**, 65-86, doi: 10.1016/s0076-6879(03)72004-7.
 34. Hou, X., Pedi, L., Diver, M. M., and Long, S. B. (2012) Crystal structure of the calcium release-activated calcium channel Orai, *Science*, **338**, 1308-1313, doi: 10.1126/science.1228757.
 35. Lee, H. B., Xu, L., and Meissner, G. (1994) Reconstitution of the skeletal muscle ryanodine receptor-Ca²⁺ release channel protein complex into proteoliposomes, *J. Biol. Chem.*, **269**, 13305-13312, doi: 10.1016/S0021-9258(17)36833-3.
 36. Lu, P., Liu, R., and Sharom, F. J. (2001) Drug transport by reconstituted P-glycoprotein in proteoliposomes. Effect of substrates and modulators, and dependence on bilayer phase state, *Eur. J. Biochem.*, **268**, 1687-1697, doi: 10.1046/j.1432-1033.2001.02041.x.
 37. Klein, U., and Fahrenholz, F. (1994) Reconstitution of the myometrial oxytocin receptor into proteoliposomes. Dependence of oxytocin binding on cholesterol, *Eur. J. Biochem.*, **220**, 559-567, doi: 10.1111/j.1432-1033.1994.tb18656.x.
 38. Zhou, Y., Meraner, P., Kwon, H. T., Machnes, D., Oh-hora, M., Zimmer, J., Huang, Y., Stura, A., Rao, A., and Hogan, P. G. (2010) STIM1 gates the store-operated calcium channel ORAI1 *in vitro*, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**, 112-116, doi: 10.1038/nsmb.1724.
 39. Liu, S., Hasegawa, H., Takemasa, E., Suzuki, Y., Oka, K., Kiyoi, T., Takeda, H., Ogasawara, T., Sawasaki, T., Yasukawa, M., and Maeyama, K. (2017) Efficiency and safety of CRAC inhibitors in human rheumatoid arthritis xenograft models, *J. Immunol.*, **199**, 1584-1595, doi: 10.4049/jimmunol.1700192.
 40. Shuttleworth, T. J. (2012) Orai channels – new insights, new ideas, *J. Physiol.*, **590**, 4155-4156, doi: 10.1113/jphysiol.2012.237552.
 41. Lis, A., Peinelt, C., Beck, A., Parvez, S., Monteilh-Zoller, M., Fleig, A., and Penner, R. (2007) CRACM1, CRACM2, and CRACM3 are store-operated Ca²⁺ channels with distinct functional properties, *Curr. Biol.*, **17**, 794-800, doi: 10.1016/j.cub.2007.03.065.
 42. Azimi, I., Milevskiy, M. J. G., Chalmers, S. B., Yapa, K., Robitaille, M., Henry, C., Baillie, G. J., Thompson, E. W., Roberts-Thomson, S. J., and Monteith, G. R. (2019) ORAI1 and ORAI3 in breast cancer molecular subtypes and the identification of ORAI3 as a hypoxia sensitive gene and a regulator of hypoxia responses, *Cancers*, **11**, 208, doi: 10.3390/cancers11020208.
 43. Stauderman, K. A. (2018) CRAC channels as targets for drug discovery and development, *Cell Calcium*, **74**, 147-159, doi: 10.1016/j.ceca.2018.07.005.

RECONSTITUTION OF CALCIUM CHANNEL PROTEIN Orai3 INTO LIPOSOMES FOR FUNCTIONAL STUDIES

Ch. Liang¹ and F. Wu^{1,2*}

¹ Hubei University of Medicine, School of Basic Medical Sciences, 442000 Shiyan, China

² Nankai University, College of Life Sciences, Department of Genetics and Cell Biology, 300071 Tianjin, China; e-mail: wufuyun@hbm.u.edu.cn

Store-operated calcium entry (SOCE) is the main mechanism for the Ca²⁺ influx in non-excitabile cells. The two major components of SOCE are stromal interaction molecule 1 (STIM1) in the endoplasmic

reticulum and Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel (CRAC) Orai on the plasma membrane. SOCE requires interaction between STIM1 and Orai. Mammals have three Orai homologs: Orai1, Orai2, and Orai3. Although Orai1 has been widely studied and proven to be essential for numerous cellular processes, Orai3 has also attracted a significant attention recently. The gating and activation mechanisms of Orai3 have yet to be fully elucidated. Here, we expressed, purified, and reconstituted Orai3 protein into liposomes and investigated its orientation and oligomeric state in the resulting proteoliposomes. STIM1 interacted with the Orai3-containing proteoliposomes and mediated calcium release from them, suggesting that the Orai3 channel was functional and that recombinant STIM1 could directly open the Orai3 channel *in vitro*. The developed *in vitro* calcium release system could be used to study the structure, function, and pharmacology of Orai3 channel.

Keywords: store-operated Ca^{2+} entry, Orai3, STIM1, reconstitution, liposomes

УДК 579.61

СОЗДАНИЕ СИСТЕМЫ ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ ЭКСПРЕССИИ И ОПТИМИЗАЦИЯ СПОСОБА НАРАБОТКИ β -СУБЪЕДИНИЦЫ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА В КЛЕТКАХ *E. coli*

© 2023 Х.Х. Жамгочян, М.В. Замахаев, Н.Н. Случанко, А.В. Гончаренко*, М.С. Шумков

ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт биохимии им. А.Н. Баха,
119071 Москва, Россия; электронная почта: pylaevanna@gmail.com

Поступила в редакцию 18.05.2023

После доработки 14.08.2023

Принята к публикации 15.08.2023

Холера является опасным инфекционным заболеванием, вероятность заражения которым резко возрастает в условиях ограниченного доступа к чистой питьевой воде. Эффективным способом предотвращения холеры является применение вакцин. Одним из их компонентов может служить белок StxV – β -субъединица холерного токсина. В настоящей работе мы создали генетическую систему для наработки рекомбинантного StxV в клетках *Escherichia coli* и выбрали условия для синтеза и очистки целевого продукта на уровне лабораторной культуры. Установлено, что наиболее простым и эффективным способом выделения рекомбинантного белка является выращивание культуры *E. coli* на синтетической среде M9 с глицерином с последующей очисткой StxV из среды культивирования методом металл-хелатной хроматографии. После 48-часовой индукции концентрация целевого продукта в среде может достигать значений 50 мг/литр, при этом белок сохраняет свою пентамерную структуру, что позволяет рассматривать созданную систему как перспективный инструмент промышленного синтеза рекомбинантного StxV в медицинских и исследовательских целях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: β -субъединица холерного токсина, StxV, экспрессия, рекомбинантный белок.

DOI: 10.31857/S0320972523090105, **EDN:** WYVGMK

ВВЕДЕНИЕ

Холера представляет собой острое инфекционное заболевание, основным симптомом которого является диарея. В случае отсутствия лечения болезнь приводит к быстрому обезвоживанию и смерти. Возбудителем холеры является *Vibrio cholerae*, относящийся преимущественно к серотипам O1 и O139 [1]. Заболевание наиболее распространено в странах Африки и Юго-Восточной Азии, однако за последние два столетия (с 1817 г.) также было зафиксировано 7 пандемий [2]. В 2020 г., по сообщениям ВОЗ, холера была отмечена более чем в 80 странах мира с общим числом больных около 323 000 человек [3].

Как правило, инфицирование холерой связано с потреблением заражённой воды или

пищи, поэтому заболевание широко распространено в жарких странах с низким уровнем жизни и ограниченным доступом к чистой питьевой воде [4]. Вместе с тем вероятность его распространения значительно возрастает в условиях стихийных бедствий, локальных конфликтов и гуманитарных кризисов, когда под ударом могут оказаться даже относительно благополучные регионы.

Основные способы профилактики холеры – это обеспечение населения чистой водой и незаражённой пищей, а также вакцинация [5, 6]. На международном уровне известны три холерные вакцины, одобренные ВОЗ. Это Dukoral (Швеция), Shanchol (Индия) и Euvichol (Корея) [7]. Все они являются оральными и созданы на основе цельных убитых клеток холерного вибриона. Однако Dukoral,

Принятые сокращения: ИПТГ – изопропил β -D-тиогалактопиранозид; StxV – β -субъединица холерного токсина; MALDI-TOF – времяпролётная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией-ионизацией; NB – Nutrient Broth, полноценная питательная среда, аналогичная по составу среде Лурия–Бертани (LB).

* Адресат для корреспонденции.

в отличие от Shanchol и Euvichol, помимо инактивированных нагреванием и формалином клеток *V. cholerae* серотипов O1 и O139, дополнена рекомбинантной β -субъединицей холерного токсина [5]. Такая модификация обеспечивает защиту организма человека не только от холерного вибриона, но и от инфекционных заболеваний, связанных с энтеротоксигенными вариантами кишечной палочки (ЕТЕС). Ревакцинация при использовании вакцины Dukoral рекомендуется через 2 г., при введении Shanchol или Euvichol – через 3 г.

Ранее клинические испытания проходили также вакцины Orochol и Mutachol, созданные на основе живых клеток мутантного холерного вибриона [5]. В медицинскую практику они вошли как препарат Vaxchora (США), однако в декабре 2020 г. производство и продажа этой вакцины были временно прекращены, и в настоящее время она недоступна.

Ещё одна перспективная вакцина создана малайзийскими исследователями [8]. Их прототип лекарственного препарата также содержит живые мутантные клетки возбудителя холеры. В настоящий момент идёт подготовка к клиническим испытаниям.

В России применяется собственная вакцина – холерная бивалентная химическая вакцина [9, 10]. Она представляет собой смесь холерогена-анатоксина и O-антигенов, полученных из инактивированных формалином бульонных культур *V. cholerae* путём выделения, очистки и концентрирования сернокислым аммонием. Приобретённый после вакцинации иммунитет сохраняется в течение полугода [11].

Учитывая возросшие риски биологических угроз для граждан РФ и возможное ограничение доступа к произведённым за рубежом лекарственным препаратам, представляется необходимым модифицировать имеющиеся отечественные вакцины или создать новые, отличающиеся повышенной эффективностью и продолжительностью действия.

Основным фактором патогенеза холеры является выделяемый ею в просвет кишечника холерный токсин, состоящий из α -субъединицы и пяти субъединиц β . Субъединица β (CtxB) формирует устойчивые гомопентамерные структуры с молекулярной массой ~55 кДа [12].

Выведение холерного холотоксина за пределы продуцирующей его клетки в естественных условиях является многостадийным процессом. Белковые молекулы за счёт специфической N-концевой сигнальной последовательности узнаются белком SecA, который обеспечивает их доставку к цитоплазматической мембране и дальнейший транспорт в периплазму за счёт

Sec-комплекса. В периплазме специальная пептидаза производит отщепление от полипептидов их лидерных последовательностей, что позволяет белкам принять нативную конформацию и в итоге соединиться в единую молекулу, включающую субъединицу α и пентамер CtxB. В таком виде собранный холерный токсин захватывается системой секреции второго типа и выводится в окружающую среду за пределы внешней мембраны [13, 14].

Токсичность холерного токсина для эукариотических клеток определяется его α -субъединицей. Пентамер CtxB нетоксичен, но обеспечивает взаимодействие холотоксина с GM1-рецепторами клеток кишечного эпителия человека при инфицировании, что приводит к попаданию токсина в эндоплазматический ретикулум и высвобождению высокотоксичной A1-цепи субъединицы α [15], непосредственно индуцирующей появление клинических симптомов.

Нетоксичность CtxB и его способность запускать развитие выраженного иммунного ответа позволяет широко применять этот белок в качестве адъюванта и основы при разработке вакцин против различных бактериальных и вирусных патогенов [16]. Помимо этого, его используют для подавления патологических иммунных реакций при аллергии и аутоиммунных заболеваниях [16], но в первую очередь вводят в состав противохолерной вакцины в качестве фактора формирования в кишечнике антител, нейтрализующих холотоксин [17].

Потребность в чистом CtxB довольно высока. Он нужен как для профилактики острых кишечных инфекций, так и для иммунологических и биохимических исследований. В связи с этим уже довольно давно предпринимались попытки искусственного получения β -субъединицы холерного токсина в различных организмах: в *V. cholerae* нарабатывали нативный белок [18, 19], в *Lactobacillus* [20], *Bacillus brevis* [21], *Escherichia coli* [22–24], а также растениях [25, 26] – рекомбинантный. В настоящей работе мы решили задачу создания генетической системы и определения условий получения рекомбинантной субъединицы β холерного токсина (CtxB), которая может быть использована либо как дополнение к имеющейся в России холерной вакцине, либо в качестве компонента новой потенциальной вакцины на основе генетически модифицированных нетоксигенных штаммов *V. cholerae*, дополненных наработанным отдельно белком CtxB.

В качестве продуцента CtxB для решения этой задачи мы выбрали клетки *E. coli*, отличающейся высокой скоростью роста, широким

спектром возможных инструментов для генетической инженерии и хорошо известными особенностями культивирования. Главным аргументом в пользу использования этой бактерии послужило её физиологическое сходство с *V. cholerae*: *E. coli* способна продуцировать аналогичный токсин (термочувствительный токсин *E. coli*), а её система секреции эффективно справляется с выведением в среду токсина холеры [27].

Попытки создания систем экспрессии CtxV в клетках *E. coli* ранее уже предпринимались. Так, в 2010 г. полноразмерный ген *ctxB* (с участком, кодирующим собственную лидерную последовательность) был клонирован в плазмиду pET28a. Экспрессируемый с неё белок нарабатывался в максимальной концентрации 1 мг/литр и, хотя распознавался специфическими антителами, не формировал пентамерных структур, что, по-видимому, было следствием присутствия на его C-конце 6 дополнительных остатков гистидина [22]. В более поздней работе другие авторы клонировали ген *ctxB*, лишённый участка, кодирующего сигнальную последовательность, в вектор pQE30. Максимальный выход белка в этом случае также составлял ~1 мг/литр, однако полученный ими CtxV был способен взаимодействовать с GM1-рецепторами, что свидетельствовало о его нативной конформации. Пентамерная структура рекомбинантного токсина формировалась, даже несмотря на присутствие гексагистидинового «хвоста». Однако в этом случае последний располагался на N-конце полипептидной цепи, что, вероятно, и определяло возможность правильной пространственной укладки целевого белка [23]. Наиболее эффективная система получения CtxV в клетках *E. coli* была создана Slos et al. [24]. Они соединили участок гена *ctxB*, кодирующий последовательность зрелой β-субъединицы холерного токсина, с мутагенизированным фрагментом ДНК лидерной последовательности гена *ompA* *E. coli*. Авторы не указали, какого уровня накопления целевого белка им удалось добиться в лабораторных культурах, однако при переходе к выращиванию в полноценной питательной среде в ферментёре (20 литров) выход рекомбинантного CtxV (иммунологически активного пентамера, способного взаимодействовать с GM1-рецепторами) составлял до 1 г/литр.

В настоящей работе мы поставили целью создание системы эффективной экспрессии рекомбинантной β-субъединицы холерного токсина в клетках *E. coli* путём конструирования химерной молекулы, включающей последовательность зрелого CtxV и сигнальную последо-

вательность белка OmpA внешней мембраны *E. coli* либо PelB *Erwinia carotovora*, а также отработку простого способа получения максимально чистого CtxV на уровне лабораторных культур.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы и условия культивирования. Использованные в работе штаммы *E. coli* были взяты из коллекции лаборатории. Для осуществления молекулярно-биологических процедур в работе применяли штамм *E. coli* DH5α. С целью наработки целевого белка – штамм *E. coli* BL21(DE3), трансформированный вектором pET22b (+), несущим вставки *ompA–ctxB* или *pelB–ctxB*. Культуры выращивали при 37 °C и 190 об./мин в среде Nutrient Broth (NB), содержащей (в расчёте на литр) 5 г пептона, 1,5 г мясного экстракта, 1,5 г дрожжевого экстракта и 5 г NaCl («HiMedia», Индия); среде M9, содержащей 2% глицерина в качестве источника углерода и энергии, или средах модифицированного состава (подробности указаны в соответствующих разделах работы). При культивировании штаммов, трансформированных плазмидами, в среду вносили 100 мкг/мл ампициллина.

Создание экспрессионных плазмид. Конструирование экспрессионных плазмид осуществляли по следующей схеме: (1) амплификация последовательностей ДНК сигнальных пептидов белков OmpA и PelB с использованием в качестве матрицы хромосомы *E. coli* DH5α [28] и плазмиды pET22b (+) («Novagen», США) соответственно; (2) амплификация гена β-субъединицы холерного токсина CtxV с ДНК хромосомы кандидатного вакцинного штамма *V. cholerae* rVCH-31.1 [29]; (3) проведение объединяющей ПЦР для получения *ompA–ctxB*- и *pelB–ctxB*-конструкций, последовательности праймеров указаны ниже (таблица); (4) гидролиз очищенных ПЦР-продуктов и плазмиды pET22b (+) с помощью эндонуклеаз EcoRI и NdeI («Thermo Scientific», Литва) и последующее лигирование продуктов реакции для получения векторов pET22b *ompA–ctxB* и pET22b *pelB–ctxB*. Итоговые конструкции были проверены секвенированием.

Экспрессия CtxV. Созданные экспрессионные конструкции вводили в штамм *E. coli* BL21(DE3) методом электропорации. Отобранные на агаризованной (1,5%) среде NB клоны инокулировали в 4 мл жидкой среды NB с ампициллином и выращивали при 37 °C в течение ночи (18 ч). Затем культуры пересевали в питательные среды необходимого состава,

Последовательности праймеров для получения *ompA-ctxB*- и *pelB-ctxB*-конструкций

Праймер	Последовательность	Сайты рестрикции	Матрица
PelB_Up	atacatATGAAATACCTGCTGCCGACC	NdeI	pET22b (+)
PelB_Low	tcagtaatatTTTgaggtGTGCCATCGCCGGCT		
OmpA_Up	GGCGCAACATATGAAAAAGACAGCTATC	NdeI	<i>E. coli</i> DH5 α
OmpA_Low	TCAGTAATATTTTgaggtGTAGCGGCCTGCGCTAC		
CtxB_Up_Pel	CTGCCAGCCGGCGATGGCCACACCTCAAAATATTACT	EcoRI	<i>V. cholerae</i>
CtxB_Low_Pel	CCCCTGAATTCGGCTTTTTTATATCTTAATTTG		
CtxB_Up_Omp	CTACCGTAGCGCAGGCCGCTACACCTCAAAATATTACT	EcoRI	<i>V. cholerae</i>
CtxB_Low_Omp	CTGAATTCGGCTTTTTTATATCTTAATTTG		

Примечание. Нуклеотиды, входящие в состав соответствующего сайта рестрикции, выделены полужирным. Строчными буквами обозначены нуклеотиды, вводимые для сайт-направленного мутагенеза в ходе ПЦР.

выращивали при 37 °С до ОП₆₀₀ = 0,8–1,0 и индуцировали наработку целевого белка добавлением в качестве индуктора изопропил β -D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 1 мМ. Сбор образцов производили через 4 или 18 ч после индукции (особенности температурного режима выращивания культуры после внесения индуктора и детали отбора образцов указаны в подписях к рисункам).

Фракционирование клеточной культуры.

С целью выявления локализации нарабатываемого белка культуры, экспрессирующие CtxB, разделяли на клеточную (цитоплазматическую), периплазматическую и средовую фракции. Средовой фракцией считали супернатант культуры, отделённый при центрифугировании в центрифуге Eppendorf 5424R («Eppendorf», Германия) в режиме: 20 000 g, 4 °С, 2 мин. Осадок клеток, полученный в этих условиях, ресуспендировали в гиперосмотическом буфере (10 мМ Tris-HCl (pH 7,6); 1 мМ ЭДТА; 20% сахарозы), выдерживали в течение 10 мин при 4 °С и центрифугировали при 20 000 g, 4 °С в течение 2 мин. Супернатант использовали в качестве периплазматической фракции [14, 24]. Для получения альтернативного варианта периплазматической фракции клетки обрабатывали гиперосмотическим буфером как указано выше, после чего клеточный осадок ресуспендировали в деионизированной воде (4 °С), выдерживали в течение 10 мин и центрифугировали при 20 000 g, 4 °С, 2 мин. По итогам получали

периплазматические фракции, собранные в гипер- (периплазма гиперосм.) и гипоосмотических (периплазма гипоосм.) условиях [30]. Клеточный осадок ресуспендировали в деионизированной воде и считали клеточной (цитоплазматической) фракцией.

ДСН-ПААГ-электрофорез и иммуноблоттинг. Визуализацию и анализ экспрессируемых белков осуществляли классическим методом денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле – ДСН-ПААГ [31, 32]. Для подтверждения сохранения пентамерной структуры нарабатываемого белка CtxB электрофорез проводили в неденатурирующих условиях (буфер для нанесения образцов не содержал додецилсульфата натрия (ДСН) и дитиотреитола, подготовка образцов проводилась без этапа тепловой денатурации [18]). Средовые образцы и белки периплазматической фракции перед нанесением на электрофорез концентрировали путём добавления 3 объёмов 95%-ного этанола, преципитации в течение 1–1,5 ч при –20 °С, последующего центрифугирования (20 000 g) в течение 40 мин при 4 °С и разведения небольшим объёмом воды. По завершении электрофореза гели окрашивали в растворе Кумасси, фотографировали, используя GBox («Syngene», США) и обрабатывали с использованием GelAnalyzer 19.1 [33]. Наличие целевого белка в образцах определяли при помощи вестерн-блот-анализа: вначале образцы из геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad», США) с размером пор 0,2 мкм методом влажного

переноса в камере Mini Trans-Blot («Bio-Rad»). После проведения переноса мембрану инкубировали в течение 1 ч в блокирующем растворе, содержащем 5% бычьего сывороточного альбумина («VWR», США) в 157 мМ фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) с pH = 7,4. Первичную гибридизацию осуществляли с использованием первичных моноклональных антител к β-субъединице холерного токсина («Хайтест», Россия, каталожный № 2С4) в разведении 1 : 1000 в том же буферном растворе (pH = 7,4) в течение 1 ч. Вторичную гибридизацию проводили с применением конъюгата вторичных поликлональных антител с пероксидазой хрена («Биалекса», Россия, каталожный № L18/02) в разведении 1 : 1000 в том же буферном растворе в течение 1 ч. После каждого этапа мембрану отмывали 157 мМ PBS с добавлением реагента Tween 20 до конечной концентрации 0,1% (v/v). Для визуализации иммунных комплексов осуществляли цветную реакцию в том же буферном растворе с добавлением 4-хлор-1-нафтола («Aldrich», США) в присутствии 0,015% пероксида водорода.

Времяпролётная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией-ионизацией (MALDI-TOF). Подтверждение природы нарабатываемого белка осуществляли методом MALDI-TOF-анализа. Для этого из полиакриламидного геля, окрашенного Ку-масси, вырезали фрагмент размером 3–4 мм³ и дважды промывали его в 100 мкл 40%-ного раствора ацетонитрила в 0,1 М NH₄HCO₃ в течение 20 мин. После удаления отмывочного раствора гель дегидратировали добавлением 100 мкл ацетонитрила, который затем сливали. Высушенный на воздухе фрагмент геля обрабатывали раствором модифицированного трипсина (3,5 мкл, 15 мкг/мл, растворитель – 50 мМ NH₄HCO₃). Гидролиз проводили в течение 3 ч при 37 °С. Затем к раствору добавляли 5,25 мкл 0,5%-ной ТФУ в 50%-ном растворе водного ацетонитрила и тщательно перемешивали. Надгелевый раствор использовали в качестве образца для получения MALDI-масс-спектров: на мишени смешивали по 1,5 мкл образца и 0,5 мкл 2,5-дигидроксибензойной кислоты (10 мг/мл в 20%-ном водном ацетонитриле в присутствии 0,5% ТФУ), полученную смесь высушивали на воздухе.

Масс-спектры были получены на MALDI-времяпролётном масс-спектрометре Ultraflex-treme BRUKER («Bruker Daltonik», Германия), оснащённом УФ-лазером (Nd), в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона; точность измеренных моноизотопных масс после докалибровки по пикам автолиза

трипсина составляла 0,004% (40 ppm). Спектры получали в диапазоне масс 500–6500 m/z, выбирая оптимальную для достижения наилучшего разрешения мощность лазера.

Обработку масс-спектров осуществляли с помощью программного пакета FlexAnalysis 3.3 («Bruker Daltonik»). Идентификация образцов была проведена по локальной базе данных, содержащей аминокислотную последовательность исследуемого белка (с учётом возможных модификаций) при помощи программы Biotools 3.2 («Bruker Daltonik») (опция «пептидный фингерпринт»).

Выделение рекомбинантного CtxV. Металл-хелатная хроматография. Изолированные колонии культуры *E. coli* BL21(DE3) pET22b *ompA*–*ctxV* засеивали в 4 мл среды NB с ампициллином и растили на орбитальном шейкере («Biosan», Латвия) в течение ночи при 37 °С и 190 об./мин. Наутро культуру переносили в 150-мл колбу с 50 мл среды M9, содержащей 2% глицерина (инокуляция 1 : 100), и культивировали в тех же условиях. Через сутки культуру разводили в среде M9 с глицерином или 2-кратной среде NB (2NB) до ОП₆₀₀ = 0,3, переносили в колбу на 750 мл (250 мл культуры), выращивали при тех же условиях до ОП₆₀₀ = 0,8–1,0 и индуцировали экспрессию рекомбинантного CtxV добавлением ИПТГ. Индуцированную культуру оставляли на ночь (18 ч) при температуре 20 или 25 °С и 190 об./мин. Далее супернатант отделяли центрифугированием (3150 g, 4 °С, 20 мин, затем повторно – 20 000 g, 4 °С, 20 мин) и использовали для выделения CtxV методом аффинной хроматографии [34]. Для этого через колонку с иммобилизованной на сефарозе иминодиуксусной кислотой («Sigma», США; I4510), активированной 0,1 М NiSO₄, предварительно уравновешенную буфером А (20 мМ Tris-HCl, 500 мМ NaCl, pH = 8,0) пропускали бесклеточный супернатант (осветлённую культуральную жидкость без дополнительных модификаций). Затем колонку промывали буфером А от несвязавшихся с носителем белков. Смыв с колонки целевого рекомбинантного белка осуществляли буфером В (20 мМ Tris-HCl, 500 мМ NaCl, 150 мМ имидазола, pH = 8,0), установив градиент 0–100%. Собранные фракции диализовали (состав буфера: 2,7 мМ KCl, 1,5 мМ KH₂PO₄, 136,9 мМ NaCl, 8,09 мМ Na₂HPO₄·7H₂O, pH = 7,1) и анализировали электрофоретически.

Анализ олигомерного состояния рекомбинантного CtxV методом гель-фильтрации с многоугловой детекцией статического светорассеяния (SEC-MALS). Раствор электрофоретически чистого препарата CtxV центрифуги-

ровали (20 000 g) в течение 5 мин при 4 °С, и полученный супернатант использовали для анализа, внося аликвоту через инжектор хроматографической системы Prostar («Varian», Австралия), состоящей из насосов высокого давления Prostar 210, диодноматричного детектора (Prostar 335, 190–950 нм) и детектора miniDAWN («Wyatt technology», США), регистрирующего статическое светорассеяние при трёх фиксированных углах 45, 90 и 135 градусов. В качестве колонки использовали Superdex 200 Increase 10/300 («GE Healthcare», США), которую предварительно уравнивали несколькими объёмами дегазированного и отфильтрованного через 0,1 мкм фильтры Millipore («Millipore», США) буфера для гель-фильтрации (20 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, pH = 7,6), в котором также проводили анализ исследуемых образцов. Скорость потока составляла 0,8 мл/мин. В первую очередь получали профиль элюции и проводили анализ массы бычьего сывороточного альбумина (БСА, объём нанесения 100 мкл с концентрацией 1,8 мг/мл), представленного смесью мономеров (66,5 кДа), димеров (133 кДа), тримеров (199 кДа) и небольшой фракции тетрамеров (265 кДа) для проверки правильности обработки данных. Затем наносили аликвоту CtxV (100 мкл с концентрацией 1,75 мг в мл). Для проверки стабильности олигомерного состояния CtxV получали профиль элюции, нанося впятеро меньшее количество белка на колонку. Полученные для каждой точки профиля элюции данные о концентрации белка, измеряемые с помощью диодноматричного детектора (поглощение при 280 нм, коэффициент экстинкции равен $0,667 \text{ (мг/мл)}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ для БСА и $0,86 \text{ (мг/мл)}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ – для зрелой формы CtxV), а также значения интенсивности статического лазерного (660 нм) светорассеяния при трёх фиксированных углах использовали для расчёта молярной массы. Расчёты проводили в программном пакете Astra 8.0 («Wyatt technology»), принимая dn/dc равным 0,185 и используя указанные выше коэффициенты экстинкции. Детектор светорассеяния был предварительно откалиброван по рассеянию толуола.

Определение концентрации белка. Концентрацию белка измеряли спектрофотометрически при помощи NanoPhotometer NP80 («Implen», Германия) в режиме УФ-поглощения при 280 нм. Расчётный коэффициент поглощения для CtxV составил 0,86, коэффициент молярной экстинкции – $9970 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Статистический анализ. Все эксперименты по индукции CtxV проведены не менее, чем

двукратно. Определение достоверности различий между выборками проводили с использованием U-критерия Манна–Уитни при уровне значимости $p \leq 0,05$. Статистический анализ осуществляли в пакете программного обеспечения Statistica 7.0 («StatSoft»).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Создание системы экспрессии β -субъединицы холерного токсина в клетках *E. coli*. β -Субъединица холерного токсина является секретуемым белком и в естественных условиях выходит из клеток *V. cholerae* в просвет кишечника [15]. Для этого в аминокислотной последовательности CtxV присутствует N-концевая сигнальная последовательность, обеспечивающая транспорт белка через цитоплазматическую мембрану в периплазму [35], где холерный токсин захватывается системой секреции второго типа и выводится в окружающую среду [13]. Поскольку система секреции второго типа *E. coli* способна эффективно транспортировать CtxV [27], создание системы гетерологичной экспрессии субъединицы β холерного токсина в клетках этого микроорганизма подразумевает необходимость оптимизации экспорта нарабатываемого белка в первую очередь за счёт подбора сигнальной последовательности. Ранее осуществлялись попытки экспрессии CtxV в клетках *E. coli* с собственной лидерной последовательностью [22, 23], но созданные генетические системы отличались довольно низким выходом целевого продукта (~1 мг/л). В настоящей работе в качестве сигналов экспорта β -субъединицы холерного токсина за пределы цитоплазмы мы выбрали лидерную последовательность гена «родного» для *E. coli* белка наружной мембраны *ompA* [36] и используемую в коммерческих системах (вектор pET22b (+); «Novagen», США) сигнальную последовательность пектидазы В (*pelB*) *E. carotovora* [37, 38] – оба эти пептида довольно давно известны в качестве инструмента транспорта синтезируемого белка через внутреннюю мембрану в периплазматическое пространство [39–41]. Предлагаемая нами система экспрессии β -субъединицы холерного токсина была создана путём конструирования химерных ДНК, содержащих ген *ctxB* *V. cholerae* [42], слитый с последовательностями, кодирующими лидерные пептиды OmpA и PelB (рис. 1). Итоговые конструкции в составе вектора pET22b (+) ввели в клетки экспрессионного штамма *E. coli* BL21(DE3).

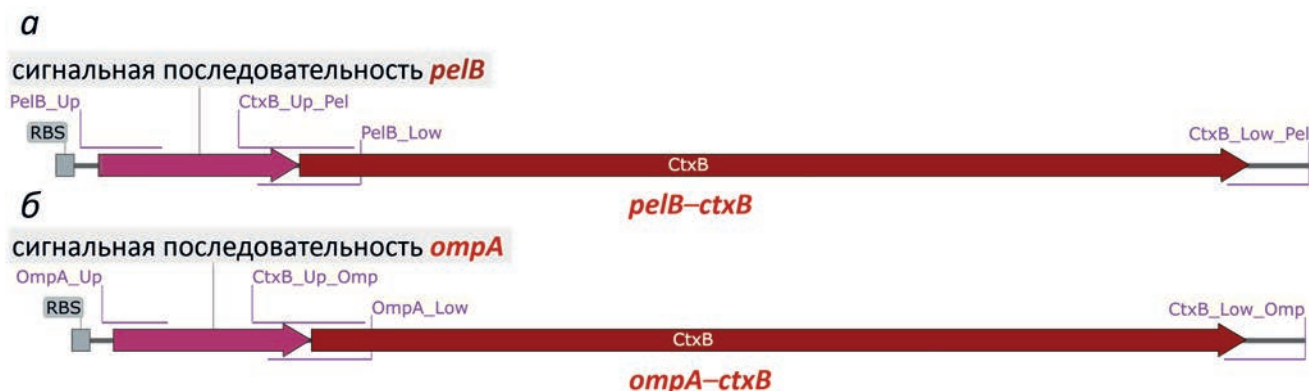


Рис. 1. Схемы генетических конструкций *pelB-ctxB* (а) и *ompA-ctxB* (б), интегрированных в экспрессионный вектор рЕТ22b (+). Указаны последовательности, кодирующие лидерные пептиды OmpA и PelB, последовательности, кодирующие зрелый белок CtxB, места расположения использованных праймеров и сайты связывания рибосом (RBS)

Полные карты созданных плазмид, аминокислотные последовательности транслируемых с векторов химерных полипептидов и аминокислотная последовательность белка CtxB без лидерного участка (каким он должен быть в составе пентамера) представлены на рис. П1–П5 в Приложении.

Определение температурного и временного режимов экспрессии *ctxB*. На следующем этапе выбрали по 2 варианта клонов трансформантов *E. coli* BL21(DE3) с каждой из генетических конструкций (*ompA-ctxB* и *pelB-ctxB*). Оценка работоспособности созданных плазмид показала, что рекомбинантный CtxB синтезируется во всех проверенных клонах (рис. 2, а). При этом максимальное накопление целевого белка в клетках *E. coli* наблюдалось в условиях «холодовой» индукции в течение ночи (20 °С, 18 ч) и было наиболее высоким в варианте *E. coli* BL21(DE3) рЕТ22b *ompA-ctxB* А1 (рис. 2, б).

Таким образом, нам удалось создать генетические конструкции, пригодные для наработки CtxB в клетках *E. coli*, и определить режим культивирования, обеспечивающий наиболее эффективный синтез целевого белка.

Выявление локализации нарабатываемого CtxB. Поскольку экспрессируемый CtxB должен выбрасываться клеткой за её пределы [14], на следующем этапе работы был поставлен вопрос о локализации нарабатываемого белка: накапливается ли он в цитоплазме, остаётся в периплазматическом пространстве или выходит в среду.

Отделение культуральной жидкости и последующее фракционирование клеток показали, что в анализируемых условиях в среду экспортируется относительно небольшое количество синтезируемого CtxB (3–6%), его основная часть остаётся в клеточной фракции (92–94%). При этом в периплазматическом

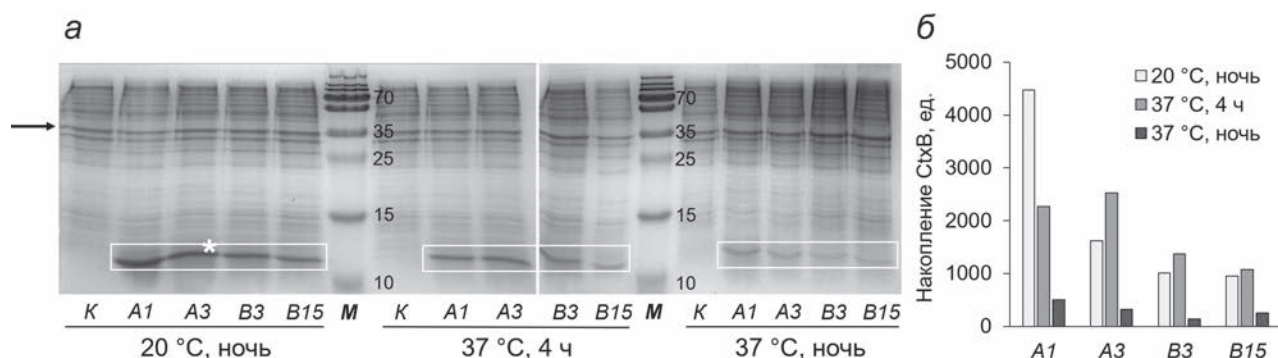


Рис. 2. Определение температурного и временного режимов экспрессии *ctxB*. а – Денатурирующий электрофорез лизатов клеток, экспрессирующих CtxB. 15%-ный ДСН-ПААГ. Культуры *E. coli* BL21(DE3) рЕТ22b *ompA-ctxB* (варианты А1 и А3) и BL21(DE3) рЕТ22b *pelB-ctxB* (варианты В3 и В15) выращивали при 37 °С и 190 об./мин в пробирках на 15 мл, содержащих 4 мл среды NB с добавлением ампициллина. На гель нанесено 8 мкл бактериальной культуры, доведённой до ОП₆₀₀ = 1,0. К – контрольная культура *E. coli* BL21(DE3); М – маркер молекулярных масс белков PageRuler Plus Prestained protein ladder («Thermo Fisher Scientific», США), цифрами обозначены значения молекулярных масс (кДа). Область расположения CtxB выделена белым прямоугольником. * – фрагмент геля, взятый для MALDI-TOF-анализа. б – Количественный анализ содержания CtxB в геле, проведённый на основе пересчёта интенсивности полос целевого белка на интенсивность полос референсного белка, в качестве которого взят белок *E. coli* массой 35 кДа (обозначен стрелкой). Светлые столбцы – индукция в течение 18 ч при 20 °С, серые столбцы – индукция 4 ч, 37 °С, тёмно-серые – 18 ч, 37 °С

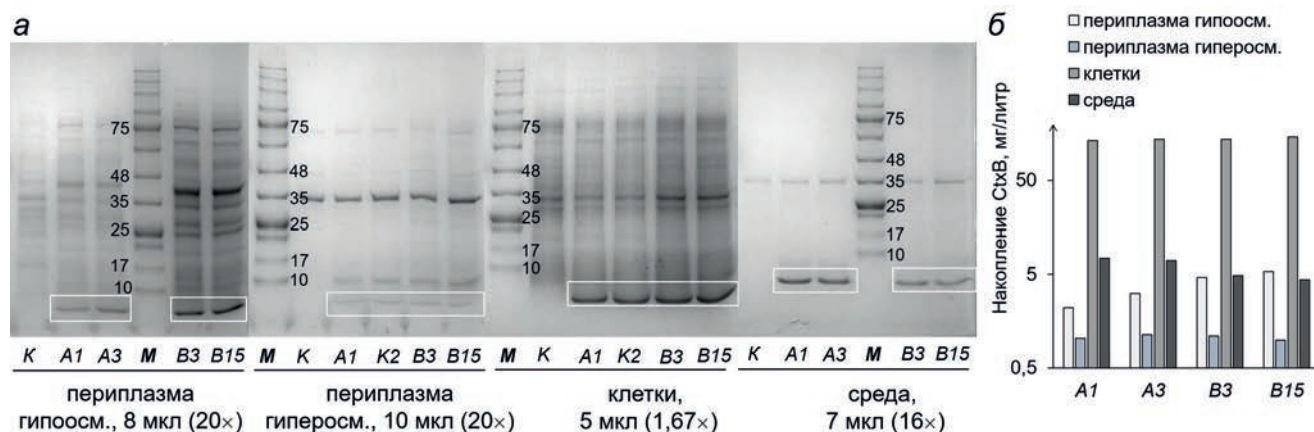


Рис. 3. Выявление локализации нарабатываемого CtxB. *а* – Электрофорез фракций культур *E. coli*, экспрессирующих CtxB. Градиентный ДСН-ПААГ (8–18%), неденатурирующие условия. Культуры *E. coli* BL21(DE3) pET22b *ompA-ctxB* (варианты А1 и А3) и BL21(DE3) pET22b *pelB-ctxB* (варианты В3 и В15) выращивали при 37 °С и 190 об./мин в колбах на 150 мл, содержащих 50 мл среды NB с добавлением ампициллина, после внесения ИПТГ выдерживали при 20 °С, 190 об./мин, 18 ч. Количество нанесённого на гель образца и степень его концентрирования указаны под электрофореграммой. *К* – контрольная культура *E. coli* BL21(DE3); *М* – маркер молекулярных масс белков PageRuler Plus Prestained protein ladder, цифрами обозначены значения молекулярных масс (кДа). Область расположения CtxB выделена белым прямоугольником. *б* – Количественный анализ содержания CtxB в геле, проведённый путём пересчёта интенсивности полос целевого белка по калибровочной кривой, построенной на основе интенсивности полос известных концентраций БСА, нанесённых на тот же гель, с учётом концентрирования образцов при пробоподготовке и объёма нанесённого на гель образца. Представлены данные по периплазматической фракции, полученной при обработке клеточного осадка гипосмотическим раствором после гиперосмотического, периплазматической фракции, полученной при обработке клеточного осадка гиперосмотическим раствором, лизату клеток штамма-продуцента и средовой фракции

пространстве в зависимости от способа фракционирования обнаруживается 0,6–4% целевого белка (рис. 3). Следует заметить, что известно несколько способов выделения периплазматической фракции клеток *E. coli*. Наиболее простые из них – обработка клеточного осадка гиперосмотическим раствором или комбинацией гипер- и гипосмотического растворов [30]. Применяв каждый из них, мы выявили, что в первом случае выход белка существенно ниже (менее 1% от общего содержания CtxB в клетке в сравнении с 2,2–4% при комбинации гипер- и гипосмотических стрессов). В то же время именно гиперосмотический шок позволяет получить фракцию периплазматических белков с минимальной примесью клеточных полипептидов (рис. 3). Эти результаты практически совпали с полученными ранее данными других авторов [30] и послужили основанием к использованию только гиперосмотической обработки с целью получения периплазматической фракции в последующих экспериментах.

Таким образом, анализ локализации нарабатываемого CtxB позволяет заключить, что созданная система экспрессии даёт возможность очищать β -субъединицу холерного токсина как из лизата клеток, так и из супернатанта культуры-продуцента.

Анализируя штаммы-продуценты, экспрессирующие CtxB с разными лидерными последовательностями, мы также попытались

установить, есть ли связь между уровнем продукции целевого белка и введённым сигналом секреции. Относительную эффективность лидерных пептидов проверяли на основе цифровых данных, отражённых на рис. 2 и 3. Сравнение уровня накопления CtxB в разных условиях индукции (рис. 2) и в различных фракциях бактериальной культуры (рис. 3) было проведено с использованием *U*-критерия Манна–Уитни при уровне значимости $p \leq 0,05$. Несмотря на заметную на графиках тенденцию к более высокому уровню накопления целевого белка в штаммах, несущих конструкцию *ompA-ctxB*, статистически значимых различий обнаружено не было. Таким образом, нам не удалось показать преимущество лидерных последовательностей *ompA* либо *pelB* для наработки в клетках *E. coli* рекомбинантной β -субъединицы холерного токсина (вероятно, это связано с ограниченным объёмом выборки), однако обнаруженная тенденция послужила основанием для использования в дальнейших экспериментах штамма BL21(DE3) pET22b *ompA-ctxB* А1.

Выбор оптимальной среды для экспрессии CtxB и оценка его способности образовывать олигомерные структуры. Эффективность синтеза рекомбинантного белка, его выхода из клетки и последующей очистки может в значительной степени определяться составом среды культивирования. Это связано и с различной скоростью роста штамма-продуцента,

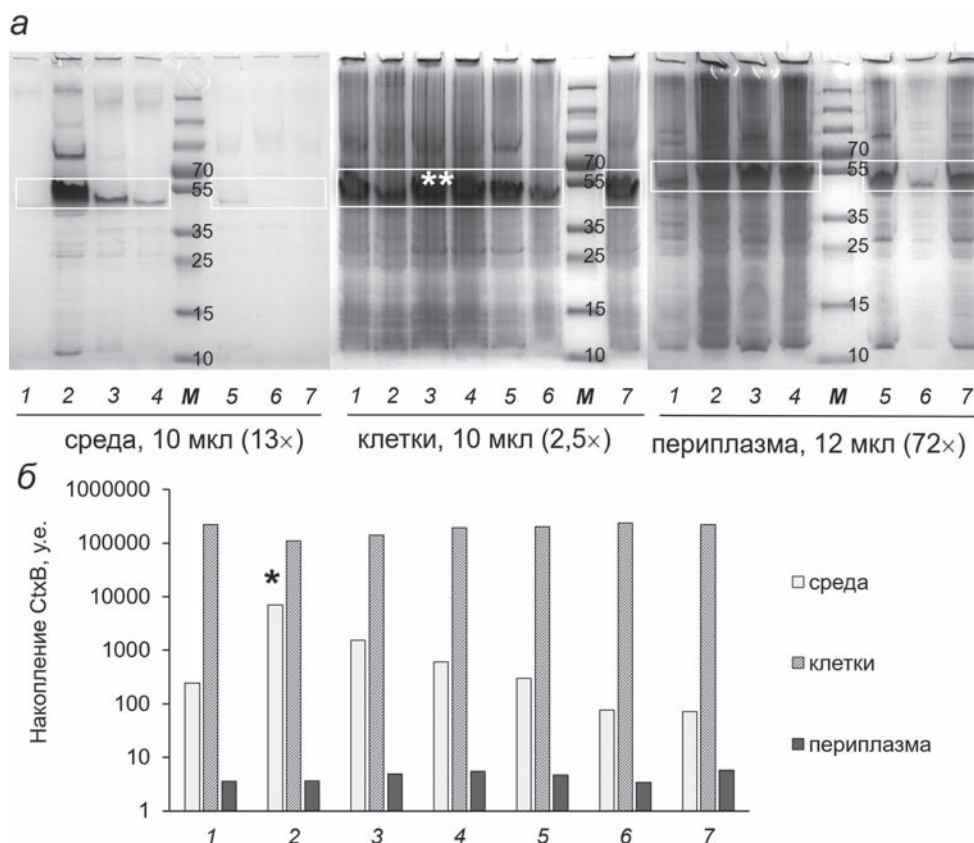


Рис. 4. Определение наилучшей среды культивирования для экспрессии и очистки StxV. *а* – Электрофорез фракционированных культур *E. coli* BL21(DE3) pET22b *ompA-ctxB* A1, выращенных на разных средах. Градиентный ДСН-ПААГ (8–18%), неденатурирующие условия. Клетки культивировали при 37 °С и 190 об./мин в колбах на 250 мл, содержащих 50 мл среды с добавлением ампициллина. После внесения ИПТГ культуры выдерживали при 20 °С и 190 об./мин 18 ч. 1 – среда NB; 2 – среда 2NB; 3 – 1/2NB + 1/2M9, содержащая 2% глицерина в качестве источника углерода и энергии; 4 – 1/2NB + 1/2M9, содержащая 2% глицерина и 0,05% глюкозы; 5 – M9, содержащая 2% глицерина; 6 – M9, содержащая 0,1% глюкозы; 7 – M9, содержащая 2% глицерина и 0,1% глюкозы; M – маркер молекулярных масс белков PageRuler Plus Prestained protein ladder. Область расположения белка StxV выделена белым прямоугольником. ** – фрагмент геля, взятый для MALDI-TOF-анализа. *б* – Количественный анализ содержания StxV в геле, проведённый на основе интенсивности полос целевого белка с учётом концентрирования образцов при пробоподготовке, объёма нанесённых на гель образцов и пересчётом на плотность культуры. Светло-серые столбцы – средовая фракция, серые – лизат клеток штамма-продуцента, тёмно-серые – периплазматическая фракция, полученная при обработке клеточного осадка гиперосмотическим раствором. Количество нанесённого на гель образца и степень его концентрирования указаны под электрофореграммой, кроме * – концентрирование в 9,5 раз

и с особенностями его метаболизма, и с присутствием в среде, помимо целевого белка, иных полипептидных молекул, которые могут мешать его связыванию с носителем на колонке. Помимо этого, состав среды определяет её стоимость, что является значимым фактором при переходе от лабораторной наработки рекомбинантного белка к его промышленному производству. Исходя из этого, перед нами встала задача определения наилучшей для экспрессии и очистки целевого белка среды культивирования.

Для анализа были подготовлены 7 сред: (1) NB; (2) 2NB (2-кратная NB); (3) 1/2NB + 1/2M9 (среда с половинной концентрацией компонентов NB и половинной концентрацией компонентов M9), содержащая 2% глицерина в качестве источника углерода и энергии; (4) 1/2NB + 1/2M9, содержащая 2% глицерина

и 0,05% глюкозы; (5) M9, содержащая 2% глицерина; (6) M9, содержащая 0,1% глюкозы; (7) M9, содержащая 2% глицерина и 0,1% глюкозы. Из четырёх использованных ранее штаммов-продуцентов выбрали один – BL21(DE3) pET22b *ompA-ctxB* A1 (рис. 4).

При анализе фракций бактериальной культуры в условиях неденатурирующего электрофореза было хорошо заметно (рис. 3), что белок успешно формировал комплексные структуры с электрофоретической подвижностью, соответствующей кажущейся массе ~50 кДа, что примерно совпадало с подвижностью пентамера белка (расчётная масса – 58 кДа). Проведённый затем MALDI-TOF-анализ показал соответствие аминокислотной последовательности анализируемого белка β-субъединице холерного токсина. При этом накопление

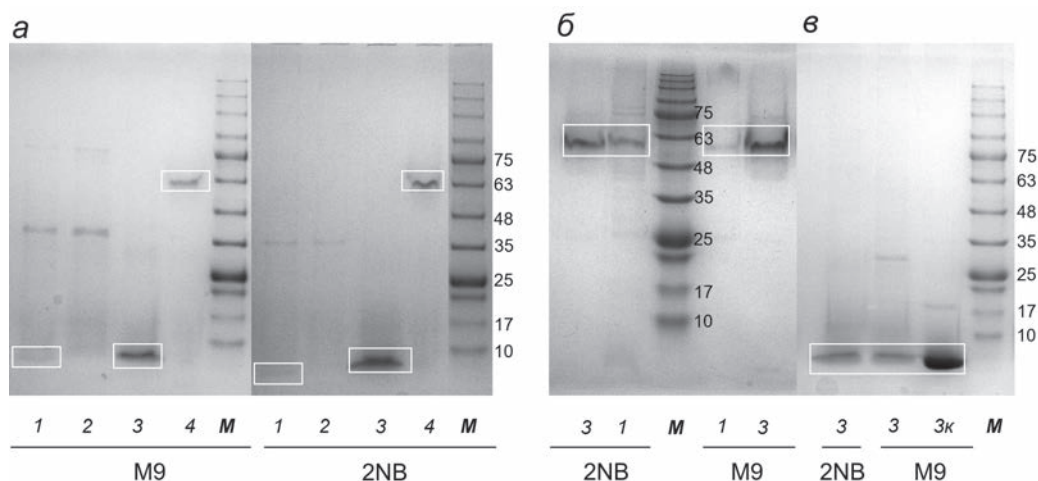


Рис. 5. Электрофорез рекомбинантного CtxB в процессе очистки и после диализа. Градиентный ДСН-ПААГ (8–18%). Показаны последовательные фракции нанесения и элюции образцов на металл-хелатную колонку (а), денатурирующий (б) и денатурирующий (в) электрофорез супернатанта культур-продуцентов и очищенного белка CtxB. М – Маркер молекулярных масс белков Prestained Protein Ladder, HiGenoMB, цифрами обозначены значения молекулярных масс (кДа). 1 – Супернатант культур-продуцентов, который наносили на колонку, 2 – фракция белков, не связавшихся с колонкой, 3 – выделенный CtxB после проведения диализа, 4 – образец 3 в неденатурирующих условиях; 3к – концентрированный образец 3. Количество CtxB, нанесённого на дорожки панели в составило 0,33 мкг (2NB); 0,48 мкг (M9); 2,8 мкг (M9, дорожка 3к). Область расположения CtxB выделена белым прямоугольником

рекомбинантной β -субъединицы холерного токсина в клеточном лизате штамма-продуцента мало отличалось в различных питательных средах. Максимальное содержание CtxB в супернатанте культуры наблюдалось в наиболее «богатой» среде 2NB. В силу присутствия значительного разнообразия пептидных компонентов выделение CtxB из такой среды может требовать дополнительных ступеней очистки. При этом мы ставили перед собой задачу сделать процесс выделения целевого белка максимально простым и эффективным, а при переходе к промышленным объёмам его наработки – ещё и сопровождающимся минимальными затратами. Исходя из этого, на следующем этапе работы мы оценили выход рекомбинантного CtxB при его очистке из супернатанта культур-продуцентов, выращенных как на богатой, так и на минимальной питательных средах.

Выделение рекомбинантного CtxB. Для очистки белка CtxB были выращены две различные культуры *E. coli* BL21(DE3) rET22b *ompA-ctxB* A1 – на богатой питательной среде 2NB и минимальной среде M9 с глицерином. Поскольку β -субъединица холерного токсина способна эффективно адсорбироваться на колонке, активированной ионами никеля [43], очистку целевого белка проводили методом металл-хелатной хроматографии. Супернатант культуры (осветлённую среду без дополнительных модификаций) наносили на колонку, содержащую 2 мл носителя, порциями объёмом до 150 мл. Скорость потока при нанесении составляла 3 мл/мин, при смыве CtxB с ко-

лонки – 1 мл/мин. Хроматограммы нанесения и элюции супернатантов культур, выращенных на 2NB и M9, приведены на рис. П6 и П7 в Приложении.

К сожалению, по результатам серии из 4 экспериментов нам не удалось установить, какую среду предпочтительнее использовать для наработки рекомбинантного CtxB. В неденатурирующих условиях β -субъединица холерного токсина в случае обеих сред движется в геле как белок массой ~60 кДа, что соответствует расчётной массе пентамера CtxB (рис. 5, а и б). Чистота этого белка, если оценивать её на основе электрофореза (рис. 5, б), составляет ~96% для CtxB, выделенного из супернатанта культуры, выращенной на среде M9, и ~80% – в случае супернатанта культуры, выращенной на 2NB. В то же время общее накопление белка (по результатам обчётов рис. 5, а, выполненных с использованием калибровочной кривой, построенной по яркости полос известных концентраций БСА, нанесённых на тот же гель) выше в супернатанте бульонной культуры (43 мг/литр в сравнении с 28 мг/литр в супернатанте культуры, выращенной на среде M9). Эффективность очистки CtxB из супернатанта (доля целевого белка в диализованном растворе относительно исходного количества белка в осветлённом супернатанте) не зависела от состава среды и изменялась в пределах 28–35%. Таким образом, исходя из итогового выхода белка, лучше выращивать штамм-продуцент на среде 2NB, однако с целью получения максимально чистого

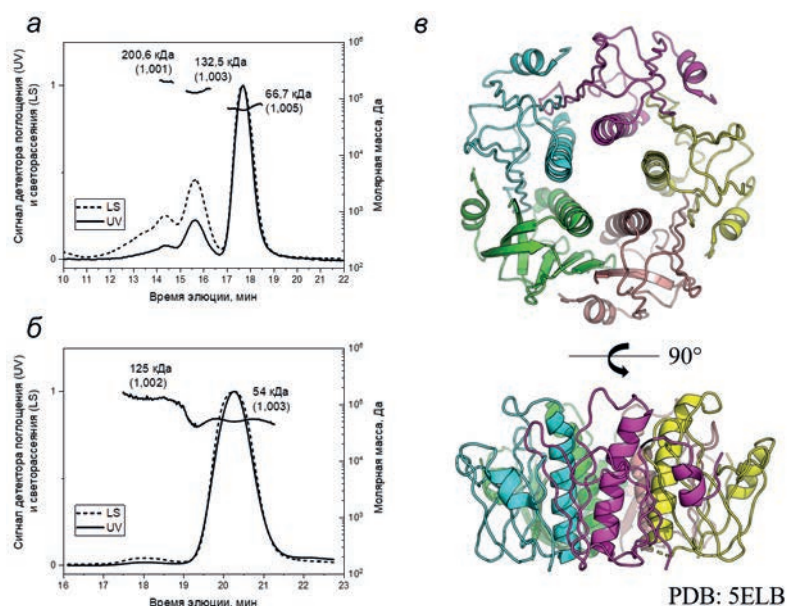


Рис. 6. Анализ олигомерного состояния рекомбинантного белка CtxV методом SEC-MALS. *a* – Профиль элюции БСА, детектированный по поглощению на 280 нм (UV) и светорассеянию при 90° (LS). Показано распределение молярной массы для трёх основных пиков БСА – мономеров, димеров и тримеров, с указанием средней массы по каждому из пиков и их показателем полидисперсности (указанное в скобках соотношение Mw/Mn). Абсолютно монодисперсный образец имеет Mw/Mn, равное 1. *б* – Профиль элюции CtxV, зарегистрированный аналогично БСА. Показано распределение молярной массы, захватывающее основной пик и предшествующий ему минорный пик, средние значения массы по каждому из пиков даны в кДа, также приведено значение индекса полидисперсности для каждого из пиков. *в* – Кристаллическая структура пентамера CtxV, показанная с двух ортогональных ракурсов. Субъединицы визуализированы разными цветами в виде ленточной диаграммы

препарата за одну стадию очистки следует наработать CtxV в среде M9.

Анализ олигомерного состояния рекомбинантного CtxV. Для оценки чистоты и олигомерного состояния выделенного CtxV мы взяли образец препарата, полученного путём выделения из супернатанта культуры, выращенной на среде M9. После диализа и концентрирования путём переосаждения в присутствии этанола раствор CtxV был проанализирован методом SEC-MALS, который является одним из наиболее точных способов определения абсолютной молекулярной массы растворимых белков даже в присутствии примесей [44–46]. Так, с помощью данного метода мы разделили олигомерные формы БСА и смогли определить их молярную массу с ошибкой менее чем 1% (например, расчётная масса мономера БСА составляет 66,5 кДа, экспериментально полученное значение – 66,7 кДа) (рис. 6, *a*). Профиль элюции белка CtxV был представлен основным пиком, в котором находилось ~97% материала, а также минорным пиком (2,7%) (рис. 6, *б*). Средняя абсолютная молярная масса в основном пике составила 54 кДа, что достаточно близко к расчётному значению для пентамера CtxV (58 кДа) (модель его структуры приведена на рис. 6, *в*). Минорный пик, возможно, соответствует декамеру CtxV, однако точность

определения массы (125 кДа, против 116 кДа расчётной массы) не позволяет утверждать это однозначно. Тем не менее любопытно отметить, что в независимой части кристаллической структуры CtxV (PDB: 5ELB) присутствует именно димер из пентамеров (декамер). Проведённый анализ указывает на то, что рекомбинантный CtxV является преимущественно пентамером (и выделяется в таком виде) и содержит незначительное количество примесей (не более 3%).

Динамика накопления целевого продукта в периодической культуре. Поскольку скорость роста культуры *E. coli* в полноценной и синтетической среде существенно различаются, мы предположили, что 18 ч культивирования может быть недостаточно для реализации потенциала накопления CtxV в среде M9 с глицерином. В связи с этим была проведена оценка динамики наработки рекомбинантного CtxV в периодической культуре *E. coli* BL21(DE3) pET22b *ompA-cxtxB* A1 при выращивании её на синтетической питательной среде M9 в течение продолжительного времени. Анализ накопления CtxV в среде культивирования показал, что синтез целевого белка и его транспорт за пределы клетки не останавливаются при достижении культурой стационарной фазы и продолжают не менее чем в течение 2 суток

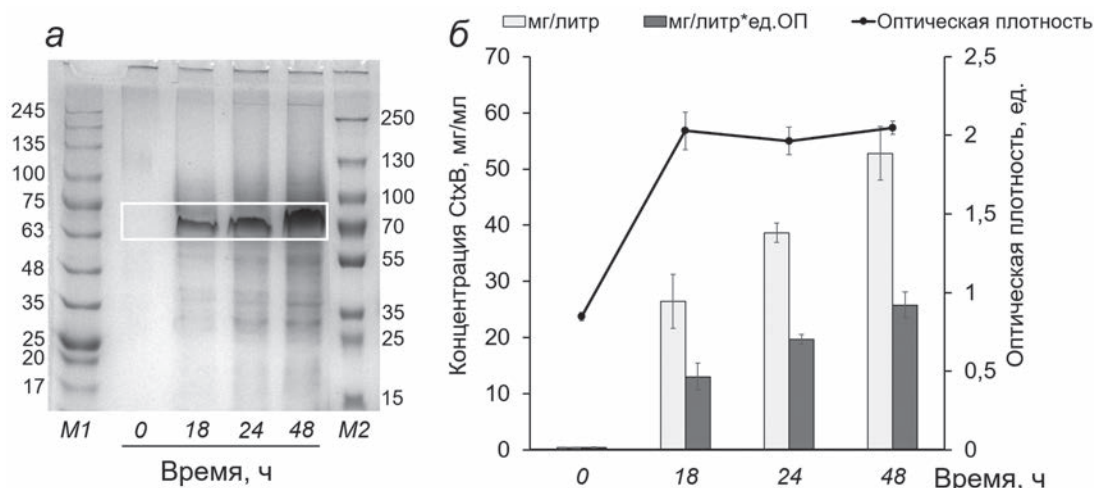


Рис. 7. Динамика накопления CtxV в периодической культуре. *a* – Электрофорез средней фракции культуры *E. coli* BL21(DE3) pET22b *ompA*–*ctxV* A1, выращенной на среде M9 с глицерином. После добавления индуктора клетки культивировали при 25 °C и 190 об./мин в колбах на 250 мл, содержащих 50 мл среды с добавлением ампицилина. Электрофорез проводили в градиенте ДСН-ПААГ (8–18%) в неденатурирующих условиях. Представлены образцы, взятые через разное время после добавки ИПТГ. *M1* и *M2* – Маркеры молекулярных масс белков Prestained Protein Ladder, HiGenoMB и PageRuler Plus Prestained protein ladder («Thermo Fisher Scientific») соответственно. Цифрами обозначены значения молекулярных масс (кДа). Область расположения белка CtxV выделена белым прямоугольником. *б* – Количественный анализ содержания CtxV в геле, проведённый на основе оценки интенсивности полос целевого белка с учётом концентрирования образцов при пробоподготовке и сравнения с полосой белка известной концентрации. Светлые столбцы – концентрация CtxV в супернатанте, рассчитанная на 1 литр культуры (мг/литр), тёмные – концентрация CtxV, скорректированная с учётом оптической плотности (мг/литр × ед. ОП). Кривая отражает оптическую плотность (ОП) культуры в момент отбора образцов (ассоциирована с правой осью ординат). Данные представлены в формате среднее ± среднее квадратичное отклонение

с момента индукции (рис. 7, *a*). Продукция CtxV при этом достигает значений более 50 мг/литр среды (рис. 7, *б*).

Таким образом, увеличение времени индукции и, вероятно, использование для выращивания культур-продуцентов аппаратов непрерывного культивирования должно позволить получить больший выход целевого белка на единицу объёма культуры.

Подтверждение природы рекомбинантного белка. Белок, нарабатываемый в созданной нами системе экспрессии, был идентифицирован методом MALDI-TOF. Анализ фрагментов гелей по результатам денатурирующего (рис. 2) и неденатурирующего (рис. 4) электрофорезов подтвердил, что полосы с молекулярной массой ~10 и ~60 кДа соответственно действительно содержат зрелый белок CtxV *V. cholerae*. Вестерн-блоттинг очищенного на колонке CtxV показал, что белок эффективно взаимодействует со специфичными моноклональными антителами (рис. 8), что подтверждает его антигенное соответствие β-субъединице холерного токсина дикого типа.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе мы создали генетическую систему, позволяющую синтезировать

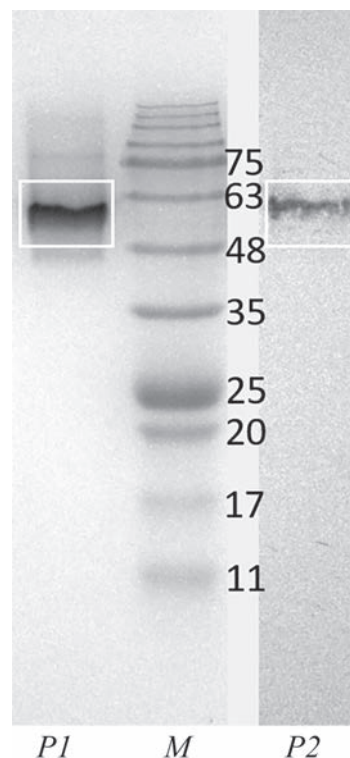


Рис. 8. Электрофорез (*P1*) и вестерн-блоттинг (*P2*) очищенного CtxV. 15%-ный ДСН-ПААГ, неденатурирующие условия. *M* – Маркер молекулярных масс белков Prestained Protein Ladder, HiGenoMB. Цифрами обозначены значения молекулярных масс (кДа). Область расположения белка CtxV выделена белым прямоугольником

препаративные количества рекомбинантной β-субъединицы холерного токсина (до 50 мг/литр) в клетках *E. coli*. Она характеризуется введением в экспрессионный вектор фрагмента гена, кодирующего зрелый белок CtxV, слитого с последовательностью, кодирующей лидерный пептид гена *ompA* *E. coli* (рис. 1, а) или гена *pelB* *E. carotovora* (рис. 1, б). Экспрессия полученного составного гена приводит к синтезу химерной полипептидной цепи, транспортируемой за пределы клетки.

Экспериментально установлено, что выход целевого белка повышается при культивировании клеток *E. coli* в условиях сниженной температуры – 20–25 °С (рис. 2 и 7). Наибольшее накопление рекомбинантного CtxV отмечено в лизате клеток, выращенных на богатой питательной среде (рис. 3 и 4). Максимальное содержание CtxV в супернатанте культур-продуцентов наблюдалось также в среде 2NB.

Нам не удалось продемонстрировать статистически значимых различий в уровне накопления CtxV при использовании лидерных последовательностей генов *ompA* и *pelB*, однако тенденция к большему выходу β-субъединицы холерного токсина в штаммах с конструкцией *ompA–ctxV* (рис. 2 и 3) послужила основанием для использования в экспериментах по выделению целевого белка и определению динамики его накопления в среде культивирования штамма *E. coli* BL21(DE3) pET22b *ompA–ctxV* A1.

Выделение белка CtxV методом металл-хелатной хроматографии показало, что выход целевого продукта больше в случае бактериальной культуры, выращенной на полноценной питательной среде 2NB (~15 мг/литр), в то же время его чистота значительно выше (96%) при использовании супернатанта культуры, выращенной на синтетической среде M9 (рис. 5 и 6). Мы предполагаем, что это обусловлено присутствием в богатых питательных средах компонентов пептидной природы, которые могут выделяться на колонке вместе с CtxV. Очевидно, это означает необходимость использования дополнительных этапов очистки целевого белка при его получении из супернатанта культур, выращенных на богатых питательных средах. Вместе с тем при выращивании бактерии-продуцента на синтетической среде получение чистого целевого белка возможно в одну стадию.

При продолжительном росте на среде M9 содержание целевого белка в среде культивирования постоянно возрастает и через 48 ч после индукции достигает 50 мг/литр (рис. 7). При этом белок отличается стабильностью и

сохраняет свою естественную пентамерную структуру (рис. 4–7).

Следует заметить, что нам удалось достигнуть довольно высоких значений выхода рекомбинантного CtxV при его наработке в клетках *E. coli*. Единственная из более ранних работ, в которой выход целевого продукта был больше (1 г/литр), реализована с использованием биореактора для выращивания культуры [24]. Соответственно, достигалась существенно более высокая плотность биомассы (18 г/литр) и, как следствие, большая наработка β-субъединицы холерного токсина. В своей работе авторы экспрессировали CtxV с лидерной последовательностью белка *OmpA*, однако, в отличие от нашей системы экспрессии, использованный ими сигнальный пептид нес ряд аминокислотных замен. Кроме того, для очистки целевого белка они использовали катионообменную хроматографию.

Системы получения рекомбинантной β-субъединицы холерного токсина, созданные ранее в России, отличались значительно более низким уровнем накопления CtxV в среде культивирования. Штамм KS3043 давал выход целевого белка 0,85 мг/литр [47], штамм KM174 – 10 мг/литр [48]. В обоих случаях авторы вводили в экспрессионную конструкцию ген β-субъединицы холерного токсина без дополнительных модификаций (замена участка лидерной последовательности или промотора). По-видимому, именно это стало причиной относительно невысокой продукции рекомбинантного CtxV [24]. Кроме того, в случае штамма KS3043 низкий выход белка, очевидно, был связан с накоплением β-субъединицы холерного токсина в периплазме без её секреции в среду культивирования [24]. В штамме *E. coli* KM147 продуцируемый CtxV транспортировался за пределы клетки, однако использование интегративного вектора ограничивало копийность введённого гена, тем самым снижая уровень накопления β-субъединицы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами создана генетическая система и разработан способ наработки рекомбинантного CtxV, в соответствии с которым оптимальным для одностадийного выделения высокоочищенной β-субъединицы холерного токсина представляется выращивание культуры штамма-продуцента на синтетической питательной среде M9 с последующей очисткой белка из культуральной жидкости методом металл-хелатной хроматографии.

Для получения большего выхода СтхВ с единицы объёма культуры предпочтительны выращивание культуры-продуцента в полноценной питательной среде и очистка целевого белка в несколько стадий. Максимальный полученный нами уровень накопления рекомбинантной β -субъединицы холерного токсина в среде культивирования на уровне лабораторной культуры составил 50 мг/литр (с выходом очищенного белка 15 мг/литр). При переходе к выращиванию культуры-продуцента в аппаратах непрерывного культивирования выход рекомбинантного СтхВ наверняка удастся многократно повысить, однако оптимизация методов наработки и очистки белка на этом уровне потребует дополнительных исследований.

Вклад авторов. М.С. Шумков, А.В. Гончаренко – концепция и руководство работой; Х.Х. Жамгочян, М.С. Шумков, М.В. Замахаев,

Н.Н. Случанко – проведение экспериментов; М.С. Шумков, А.В. Гончаренко – обсуждение результатов исследования; М.С. Шумков, М.В. Замахаев – написание текста; М.В. Замахаев – редактирование текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-74-30004).

Благодарности. Авторы благодарят за помощь в проведении MALDI-TOF-анализа сотрудников ЦКП «Индустриальная Биотехнология» ФИЦ Биотехнологии РАН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Almagro-Moreno, S., and Taylor, R. K. (2013) Cholera: environmental reservoirs and impact on disease transmission, *Microbiol. Spectr.*, **1**, doi: 10.1128/microbiolspec.ON-0003-2012.
- Hu, D., Liu, B., Feng, L., Ding, P., Guo, X., Wang, M., Cao, B., Reeves, P. R., and Wang, L. (2016) Origins of the current seventh cholera pandemic, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E7730-E7739, doi: 10.1073/pnas.1608732113.
- WHO. The Weekly Epidemiological Record (2021) URL: www.who.int/publications/journals/weeklyepidemiological-record (дата обращения: 18.08.2023).
- Всемирная организация здравоохранения (11 февраля 2023 г.). Новости о вспышках болезней. Холера – ситуация в мире, URL: www.who.int/ru/emergencies/disease-outbreak-news/item/2023-DON437 (дата обращения: 18.08.2023).
- Clemens, J., Shin, S., Sur, D., Nair, G. B., and Holmgren, J. (2011) New-generation vaccines against cholera, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **8**, 701-710. doi: 10.1038/nrgastro.2011.174.
- Hui Xian, T., Parasuraman, S., Ravichandran, M., and Prabhakaran, G. (2022) Dual-use vaccine for diarrhoeal diseases: cross-protective immunogenicity of a cold-chain-free, live-attenuated, oral cholera vaccine against enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) challenge in BALB/c mice, *Vaccines*, **10**, 2161, doi: 10.3390/vaccines10122161.
- WHO. Cholera vaccine, URL: www.who.int/teams/immunization-vaccines-and-biologicals/diseases/cholera (дата обращения: 18.08.2023).
- Ravichandran, M., Tew, H. X., Prabhakaran, G., Parasuraman, S., and Norazmi, M. N. (2022) Live, genetically attenuated, cold-chain-free cholera vaccine – a research and development journey: light at the end of a long tunnel, *Malays. J. Med. Sci.*, **29**, 1-7, doi: 10.21315/mjms2022.29.2.1.
- Sumarokov, A. A., Ivanov, N. R., Dzhaparidze, M. N., Rystsova, E. A., Reznikov, Iu. B., et al. (1991) The characteristics of the reactogenicity and immunological activity of a new cholera bivalent chemical vaccine based on the results of controlled trials, *Zhurn. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.*, **7**, 55-58.
- Sumarokov, A. A., Dzhaparidze, M. N., Eliseev, Iu. Iu., Nikitina, G. P., Poliakov, K. A., et al. (1993) The determination of the optimal inoculation dose of an oral cholera bivalent chemical vaccine in a controlled trial of the vaccination of children and adolescents, *Zhurn. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.*, **5**, 55-60.
- Вакцина холерная бивалентная химическая, инструкция по применению, URL: www.vidal.ru/drugs/cholera_bivalent_chemical_vaccine__42897 (дата обращения: 18.08.2023).
- Zhang, R. G., Westbrook, M. L., Westbrook, E. M., Scott, D. L., and Otwinowski, Z. (1995) The 2.4 Å crystal structure of cholera toxin B subunit pentamer: cholera genoid, *J. Mol. Biol.*, **251**, 550-562, doi: 10.1006/jmbi.1995.0455.
- Korotkov, K. V., Sandkvist, M., and Hol, W. G. (2012) The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism, *Nat. Rev. Microbiol.*, **10**, 336-351, doi: 10.1038/nrmicro2762.

14. Overbye, L. J., Sandkvist, M., and Bagdasarian, M. (1993) Genes required for extracellular secretion of enterotoxin are clustered in *Vibrio cholerae*, *Gene*, **132**, 101-106, doi: 10.1016/0378-1119(93)90520-D.
15. Wernick, N. L., Chinnapen, D. J., Cho, J. A., and Lencer, W. I. (2010) Cholera toxin: an intracellular journey into the cytosol by way of the endoplasmic reticulum, *Toxins (Basel)*, **2**, 310-325, doi: 10.3390/toxins2030310.
16. Baldauf, K. J., Royal, J. M., Hamorsky, K. T., and Matoba, N. (2015) Cholera toxin B: one subunit with many pharmaceutical applications., *Toxins (Basel)*, **7**, 974-996, doi: 10.3390/toxins7030974.
17. Jelinek, T., and Kollaritsch, H. (2008) Vaccination with Dukoral against travelers' diarrhea (ETEC) and cholera, *Expert Rev. Vaccines*, **7**, 561-567, doi: 10.1586/14760584.7.5.561.
18. Lebens, M., Johansson, S., Osek, J., Lindblad, M., and Holmgren, J. (1993) Large-scale production of *Vibrio cholerae* toxin B subunit for use in oral vaccines, *Biotechnology*, **11**, 1574-1578, doi: 10.1038/nbt1293-1574.
19. Rhie, G. E., Jung, H. M., Park, J., Kim, B. S., and Mekalanos, J. J. (2008) Construction of cholera toxin B subunit-producing *Vibrio cholerae* strains using the Mariner-FRT transposon delivery system, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **52**, 23-28, doi: 10.1111/j.1574-695X.2007.00346.x.
20. Slos, P., Dutot, P., Reymund, J., Kleinpeter, P., and Prozzi, D. (1998) Production of cholera toxin B subunit in *Lactobacillus*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **169**, 29-36, doi: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb13295.x.
21. Goto, N., Maeyama, J., Yasuda, Y., Isaka, M., and Matano, K. (2000) Safety evaluation of recombinant cholera toxin B subunit produced by *Bacillus brevis* as a mucosal adjuvant, *Vaccine*, **18**, 2164-2171, doi: 10.1016/s0264-410x(99)00337-0.
22. Zeighami, H., Sattari, M., and Rezayat, M. (2010) Cloning and expression of a cholera toxin beta subunit in *Escherichia coli*, *Ann. Microbiol.*, **60**, 451-454, doi: 10.1007/s13213-010-0062-z.
23. Dakterzada, F., Mobarez, A. M., Roudkenar, M. H., and Forouzandeh, M. (2012) Production of pentameric cholera toxin B subunit in *Escherichia coli*, *Avicenna J. Med. Biotechnol.*, **4**, 89-94.
24. Slos, P., Speck, D., Accart, N., Kolbe, H. V., and Schubnel, D. (1994) Recombinant cholera toxin B subunit in *Escherichia coli*: high-level secretion, purification, and characterization, *Protein Expr. Purif.*, **5**, 518-526, doi: 10.1006/prep.1994.1071.
25. Matoba, N. (2015) N-glycosylation of CHOLERA toxin B subunit: serendipity for novel plant-made vaccines? *Front Plant Sci.*, **6**, 1132, doi: 10.3389/fpls.2015.01132.
26. Hamorsky, K. T., Kouokam, J. C., Bennett, L. J., Baldauf, K. J., and Kajjura, H. (2013) Rapid and scalable plant-based production of a cholera toxin B subunit variant to aid in mass vaccination against cholera outbreaks, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **7**, e2046, doi: 10.1371/journal.pntd.0002046.
27. Mudrak, B., and Kuehn, M. J. (2010) Specificity of the type II secretion systems of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* for heat-labile enterotoxin and cholera toxin, *J. Bacteriol.*, **192**, 1902-1911, doi: 10.1128/JB.01542-09.
28. Strain – DH5α. The Coli Genetic Stock Center (CGSC). Yale University, URL: <https://cgsc.biology.yale.edu/Strain.php?ID=150015> (дата обращения: 18.08.2023).
29. Karpov, D. S., Goncharenko, A. V., Usachev, E. V., Vasina, D. V., Divisenko, E. V., Chalenko, Y. M., Pochtovyi, A. A., Ovchinnikov, R. S., Makarov, V. V., Yudin, S. M., Tkachuk, A. P., and Gushchin, V. A. (2021) A strategy for the rapid development of a safe *Vibrio cholerae* candidate vaccine strain, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 11657, doi: 10.3390/ijms222111657.
30. Quan, S., Hiniker, A., Collet, J. F., and Bardwell, J. C. (2013) Isolation of bacteria envelope proteins, *Methods Mol. Biol.*, **966**, 359-366, doi: 10.1007/978-1-62703-245-2_22.
31. 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.
32. Brunelle, J. L., and Green, R. (2014) One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE), *Methods Enzymol.*, **541**, 151-159, doi: 10.1016/B978-0-12-420119-4.00012-4.
33. GelAnalyzer 19.1, URL: www.gelalyzer.com (дата обращения: 18.08.2023).
34. Hamorsky, K., and Matoba, N. (2016) Facile method for the production of recombinant cholera toxin B subunit in *E. coli*, *Methods Mol. Biol.*, **1404**, 511-518, doi: 10.1007/978-1-4939-3389-1_33.
35. Naha, A., Mandal, R. S., Samanta, P., Saha, R. N., and Shaw, S. (2020) Deciphering the possible role of ctxB7 allele on higher production of cholera toxin by Haitian variant *Vibrio cholerae* O1, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **14**, e0008128, doi: 10.1371/journal.pntd.0008128.
36. Wang, Y. (2002) The function of OmpA in *Escherichia coli*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **292**, 396-401, doi: 10.1006/bbrc.2002.6657.
37. Keen, N. T., and Tamaki, S. (1986) Structure of two pectate lyase genes from *Erwinia chrysanthemi* EC16 and their high-level expression in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **168**, 595-606, doi: 10.1128/jb.168.2.595-606.1986.
38. Lei, S. P., Lin, H. C., Wang, S. S., Callaway, J., and Wilcox, G. (1987) Characterization of the *Erwinia carotovora pelB* gene and its product pectate lyase, *J. Bacteriol.*, **169**, 4379-4383, doi: 10.1128/jb.169.9.4379-4383.1987.
39. Ruppert, A., Arnold, N., and Hobom, G. (1994) OmpA-FMDV VP1 fusion proteins: production,

- cell surface exposure and immune responses to the major antigenic domain of foot-and-mouth disease virus, *Vaccine*, **12**, 492-498, doi: 10.1016/0264-410x(94)90305-0.
40. Low, K. O., Mahadi M. N., and Illias R. M. (2013) Optimisation of signal peptide for recombinant protein secretion in bacterial hosts, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 3811-3826, doi: 10.1007/s00253-013-4831-z.
41. Zhou, Y., Lu, Z., Wang, X., Selvaraj, J. N., and Zhang, G. (2018) Genetic engineering modification and fermentation optimization for extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **102**, 1545-1556, doi: 10.1007/s00253-017-8700-z.
42. Lee, J. H., Choi, S. Y., Jeon, Y. S., Lee, H. R., and Kim, E. J. (2009) Classification of hybrid and altered *Vibrio cholerae* strains by CTX prophage and RS1 element structure, *J. Microbiol.*, **47**, 783-788, doi: 10.1007/s12275-009-0292-6.
43. Dertzbaugh, M. T., and Cox, L. M. (1998) The affinity of cholera toxin for Ni²⁺ ion, *Protein Eng.*, **11**, 577-581, doi: 10.1093/protein/11.7.577.
44. Zhu, P., Stanisheuski, S., Franklin, R., Vogel, A., Vesely, C. H., Reardon, P., Sluchanko, N. N., Beckman, J. S., Karplus, P. A., Mehl, R. A., and Cooley, R. B. (2023) Autonomous synthesis of functional, permanently phosphorylated proteins for defining the interactome of monomeric 14-3-3 ζ , *ACS Cent Sci.*, **9**, 816-835, doi: 10.1021/acscentsci.3c00191.
45. Shatov, V. M., Muranova, L. K., Zamotina, M. A., Sluchanko, N. N., and Gusev, N. B. (2023) α -Crystallin domains of five human small heat shock proteins (sHsps) differ in dimer stabilities and ability to incorporate themselves into oligomers of full-length sHsps, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 1085, doi: 10.3390/ijms24021085.
46. Slonimskiy, Y. B., Zupnik, A. O., Varfolomeeva, L. A., Boyko, K. M., Maksimov, E. G., and Sluchanko, N. N. (2022) A primordial orange carotenoid protein: structure, photoswitching activity and evolutionary aspects, *Int. J. Biol. Macromol.*, **222**, 167-180, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.09.131.
47. Янишевский Н. В., Гинцбург А. Л., Вертиев Ю. В., Демме Ю. М., Каратаев Г. И. (1987) Конструирование рекомбинантных плазмид, кодирующих биосинтез β -субъединицы холерного токсина, *Мол. Генет.*, **4**.
48. Смирнова Н. И., Чеховская Г. В., Ливанова Л. Ф., Кобкова И. М. (2004) Штамм бактерий *Escherichia coli* КМ 147 – продуцент β -субъединицы холерного токсина, Патент на изобретение № 2238975.

DEVELOPMENT OF A HETEROLOGOUS EXPRESSION SYSTEM AND OPTIMIZATION OF THE ALGORITHM FOR CHOLERA TOXIN β -SUBUNIT PRODUCTION IN *E. coli*

**H. H. Jamgochian, M. V. Zamakhaev, N. N. Sluchanko,
A. V. Goncharenko*, and M. S. Shumkov**

*Bach Institute of Biochemistry, FRC Biotechnology, Russian Academy of Sciences,
119071 Moscow, Russia; e-mail: pylaevanna@gmail.com*

Cholera is a deadly infection disease, which is usually associated with low hygiene levels and restricted access to high-quality drinking water. An effective way to prevent cholera is the use of vaccines. Among active vaccine components there is the CtxB protein (cholera toxin β -subunit). In the current work, we have developed a genetic system for the production of recombinant CtxB in *E. coli* cells and studied the conditions for the synthesis and purification of the target product at the laboratory culture level. It has been found that the optimal algorithm for isolation of the recombinant protein is to grow an *E. coli* culture in a synthetic M9 medium with glycerol, followed by CtxB purification out of the spent culture medium through Ni²⁺-ions affinity chromatography techniques. Forty-eight hours following CtxB expression induction, the concentration of the target product can be up to 50 mg/liter in the culture medium. The CtxB protein retains its pentameric structure while expressing and through purification. The latter makes it possible to consider the developed system as a promising tool for the industrial-level synthesis of recombinant CtxB for medical and research purposes.

Keywords: cholera toxin β -subunit, CtxB, expression, recombinant protein

УДК 577.29

ПОВЫШЕНИЕ УРОВНЯ СИНТЕЗА БЕЛКА YciM ПОЗВОЛЯЕТ СНИЗИТЬ ЗАГРЯЗНЕНИЕ ЭНДОТОКСИНАМИ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ, ПОЛУЧАЕМЫХ В *Escherichia coli*

© 2023 П.А. Бобровский^{1,2}, Д.Д. Харлампиева¹, С.А. Кириллин¹, К.А. Бровина^{1,2},
Е.Н. Графская¹, В.Н. Лазарев^{1,2}, В.А. Манувера^{1,2*}

¹ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина
Федерального медико-биологического агентства,
119435 Москва, Россия; электронная почта: vmanuvera@yandex.ru

² Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
141701 Долгопрудный, Московская обл., Россия

Поступила в редакцию 29.06.2023

После доработки 10.08.2023

Принята к публикации 11.08.2023

Загрязнение эндотоксинами рекомбинантных белков, полученных из *Escherichia coli*, в ряде случаев является достаточно серьёзной проблемой. Одним из путей её решения может быть использование специальных модифицированных штаммов со сниженным содержанием липополисахаридов (ЛПС). Мы сравнили два подхода к получению подобных штаммов. Первый достаточно широко известен и заключается в модификации метаболического пути синтеза ЛПС с помощью нокаута семи генов *E. coli*. Второй подход, ранее не применявшийся, основан на повышении экспрессии белка *E. coli* YciM. По литературным данным, повышение экспрессии YciM приводит к снижению количества белка LpxC, который является ключевым ферментом пути биосинтеза ЛПС. Мы решили проверить, приведёт ли коэкспрессия YciM и eGFP к снижению количества эндотоксинов в препаратах выделенного рекомбинантного eGFP. В итоге оба подхода показали сходный результат. И в том и в другом случае происходит падение количества эндотоксинов в препаратах очищенного модельного белка.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рекомбинантный белок, липополисахарид, эндотоксин, штамм-продуцент, липид IVa, CRISPR, Cas9.

DOI: 10.31857/S0320972523090117, **EDN:** WUMDOY

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день *Escherichia coli* широко используется в биотехнологии как эффективный продуцент рекомбинантных белков. Главные преимущества этой бактерии при получении рекомбинантных белков заключаются в простоте манипуляций, дешевизне и лёгкой масштабируемости процесса культивирования. Однако использование *E. coli* для производства белков связано с целым рядом проблем, основными из которых являются частый неправильный фолдинг с образованием продуктом телец включения и отсутствие большинства посттрансляционных модификаций. В ряде случаев серьёзной проблемой оказывается также загрязнение препаратов бел-

ков липополисахаридами (ЛПС). ЛПС – это основной компонент внешней мембраны, при этом они являются сильным эндотоксином [1]. ЛПС действуют как агонисты рецепторного комплекса CD14/TLR4/MD2 клеток млекопитающих, что вызывает септический шок и может приводить к летальному исходу [1]. В связи с этим при медицинском использовании рекомбинантных белков, полученных в *E. coli*, а также при целом ряде биологических экспериментов, на результаты которых оказывают влияние ЛПС, требуется тщательная очистка препаратов белков от эндотоксинов.

Проблема загрязнения рекомбинантных белков ЛПС закономерно привела к тому, что исследователи пытаются её решить разными способами. Один из них – дополнительная

Принятые сокращения: ЛПС – липополисахариды; ОП₆₀₀ – оптическая плотность раствора при длине волны 600 нм и длине оптического пути 1 см; eGFP – рекомбинантный зелёный флуоресцирующий белок.

* Адресат для корреспонденции.

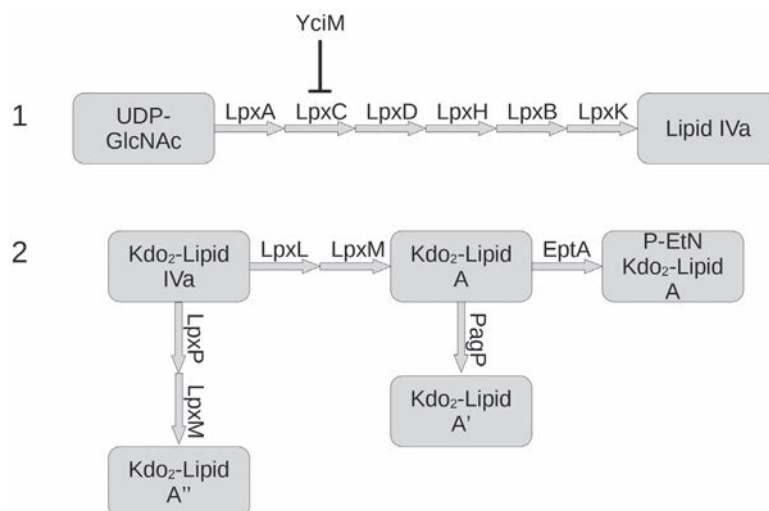


Рис. 1. Схема двух отрезков пути биосинтеза ЛПС у *E. coli*. 1 – Путь образования липида IVa (Lipid IVa) из UDP-N-ацетилглюкозамина (UDP-GlcNAc). Белок YciM подавляет одну из стадий биосинтеза липида IVa за счёт снижения количества фермента LpxC. 2 – Путь образования Kdo₂-липид A (Kdo₂-Lipid A), его производных и вариантов из Kdo₂-липид IVa (Kdo₂-Lipid IVa). P-EtN-Kdo₂-Lipid A – фосфоэтанолламин-Kdo₂-липид A, Kdo₂-Lipid A' – гептацилированный Kdo₂-липид A, Kdo₂-Lipid A'' – вариант Kdo₂-липид A с остатком пальмитолеиновой кислоты вместо остатка лауриновой. Для блокирования синтеза ЛПС были нокаутированы гены всех ферментов, обозначенных на схеме 2, а также гены *kdsD* и *gutQ*, ответственные за синтез Kdo (3-дезоксид-D-манно-2-октулозоновой кислоты) [4, 7]

очистка белков *in vitro*. Одним из самых эффективных способов её проведения является использование специальных сорбентов с иммобилизованным полимиксином, который специфически связывает бактериальные ЛПС, например, Affi-Prep Polymyxin Support («Bio-Rad», США) или Detoxi-Gel («Thermo Fisher Scientific», США). Другое направление представляет собой использование метаболической инженерии для получения штаммов *E. coli* со сниженным содержанием ЛПС и модификации ЛПС для снижения их токсичности. Молекула ЛПС грамотрицательных бактерий состоит из трёх частей – гидрофобного липида A (который определяет эндотоксические свойства ЛПС), корового олигосахарида и O-антигена [1, 2]. При этом у многих лабораторных штаммов *E. coli* O-антиген отсутствует, у штамма *E. coli* V и его производных отсутствует также дистальная часть корового олигосахарида [3]. Сообщается, что возможна модификация структуры липида A при помощи генно-инженерных методов таким образом, чтобы он не распознавался рецепторами на клетках млекопитающих и, следовательно, терял свою пирогенность [4]. Показано, что количество, длина, положение ацильных остатков, а также наличие или отсутствие остатков фосфорной кислоты в положениях 1 и 4' липида A критичны для активации TLR4/MD-2-комплекса клеток млекопитающих [5, 6]. Mamat et al. были получены модифицированные штаммы *E. coli* K12 и BL21(DE3), у которых во внешней мембране присутствовал только предшественник ЛПС – липид IVa [4].

Для этого был последовательно выключен ряд генов, участвующих в синтезе ЛПС – *kdsD*, *gutQ*, *lpxL*, *lpxM*, *pagP*, *lpxP*, *eptA*, а также введена компенсаторная мутация C52A для штамма K12 или C148A для штамма BL21 (DE3) в гене *msbA*, позволяющая выживать летальному фенотипу с нокаутами генов *kdsD* и *gutQ*.

Помимо модификации структуры ЛПС, желательнее также добиться общего снижения их количества. Согласно литературным данным, лимитирующей стадией синтеза липида A является стадия деацетилирования UDP-3-O-(R-3-гидроксимиристоил)-N-ацетилглюкозамина, которая катализируется продуктом гена *lpxC* [7]. Описан белок YciM, выключение гена которого приводит к увеличению количества фермента LpxC и значительному возрастанию количества ЛПС, приводящему к гибели клетки. Напротив, повышение синтеза YciM способствует снижению количества ЛПС [7]. В этой работе мы использовали оба подхода с целью сравнить их между собой, а также проверить возможное усиление эффекта при совместном использовании (рис. 1). Для этого мы с помощью системы CRISPR/Cas9 нокаутировали в штамме *E. coli* Rosetta 2(DE3) гены *kdsD*, *gutQ*, *lpxL*, *lpxM*, *pagP*, *lpxP*, *eptA* и ввели мутацию C52A в гене *msbA*. В то же время мы сконструировали рекомбинантную плазмиду для повышения наработки белка YciM. Мы сравнили уровень содержания ЛПС в образцах выделенного из бактерий рекомбинантного зелёного флуоресцирующего белка (eGFP, enhanced GFP) для мутантного штамма и для

штамма с повышенным синтезом YciM, а также используя два этих подхода одновременно.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы, плазмиды, условия культивирования. При конструировании рекомбинантных плазмид использовали штамм *E. coli* Top10 (F^- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (*ara-leu*)7697 *galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1* λ^-) («Invitrogen», США). В качестве исходного штамма для геномной инженерии выступал *E. coli* Rosetta 2(DE3) (F^- *ompT hsdSB(rB⁻ mB⁻) gal dcm* (DE3) *pRARE23 (CamR)*) («Novagen», США). Клетки *E. coli* культивировали в среде LB с повышенным содержанием NaCl в модификации Миллера (1% (m/v) триптона, 0,5% (m/v) дрожжевого экстракта, 1% (m/v) NaCl) при 37 °C или 30 °C. При необходимости добавляли ампициллин (150 мг/л), канамицин (50 мг/л), спектиномицин (50 мг/л) или хлорамфеникол (6 мг/л). Для клонирования структурной части гена *yciM* использовали плазмиду pBAD/Myc-His A («Thermo Fisher Scientific»), для геномного редактирования использовали плазмиды pCas и pTargetT, любезно предоставленные Шенг Янгом [8]. Для продукции модельного белка eGFP использовали плазмиду pET-eGFP(Kan), сконструированную нами ранее (Приложение 1).*

Конструирование экспрессионной плазмиды, кодирующей белок YciM. Для получения экспрессионного вектора использовали метод неполного полимеразного удлинения праймера (PIPE) [9]. Фрагмент ДНК, кодирующий YciM, а также плазмиду pBAD/Myc-His A были амплифицированы с использованием пар олигонуклеотидов *yciM*F/*yciM*R и *bad-pipe1/bad-pipe2* соответственно (Приложение 2), и также геномной ДНК *E. coli* Rosetta 2(DE3) в качестве матрицы. С целью избавления от матричной ДНК ампликоны были очищены с помощью электрофореза в агарозном геле, а затем смешаны в приблизительно эквимольных количествах. Полученной смесью напрямую трансформировали клетки *E. coli* Top10 и рассевали их на агаризованную среду LB, содержащую 150 мкг/мл ампициллина. Выросшие колонии анализировали на наличие рекомбинантной вставки в плаزمиде путём ПЦР с использованием олигонуклеотидов *badF* и *badR* (Приложение 2). Клоны, содержащие плазмиды со вставкой нужного размера, пересевали в жидкую среду LB, содержащую 150 мкг/мл ампициллина, подращивали и выделяли из

полученной биомассы плазмидную ДНК. Валидацию структуры рекомбинантных плазмид проводили путём секвенирования целевого участка ДНК по Сэнгеру с использованием автоматического капиллярного секвенатора ABI Prism 3500xl («Applied Biosystems», США). В результате получена плаزمида pBAD-YciM, содержащая рекомбинантный ген под контролем промотора арабинозного оперона, кодирующий белок YciM (Приложение 1).

Нокаут генов биосинтеза ЛПС в штамме *E. coli* Rosetta 2(DE3). Для направленного редактирования последовательности геномной ДНК штамма *E. coli* Rosetta 2(DE3) применяли систему CRISPR/Cas9 с использованием плазмид pCas и pTargetT [8]. Все генетические конструкции, а также последовательности протоспейсеров гидовых РНК и схема сборки плазмид приведены в Приложении 3. Конструирование сайт-направляющих векторов pTargetT проводилось по общей схеме для всех выбранных мишеней. На первом этапе с помощью ПЦР получали фрагмент ДНК, кодирующий последовательность гидовой РНК с N20-спейсером, специфичным к гену-мишени, а также донорный фрагмент ДНК, гомологичный гену-мишени, для последующей гомологичной рекомбинации с целью редактирования. Ампликоны очищали с помощью электрофореза в агарозном геле и смешивали в эквимольных количествах. Смесью ампликонов использовали в качестве матрицы при ПЦР-амплификации, в результате чего были получены фрагменты ДНК для встраивания в плазмиду pTargetT. Каждый из них имел участок, кодирующий гидовую РНК, специфичную к одному из генов-мишеней, а также область, гомологичную гену-мишени, для последующей рекомбинации. Полученные фрагменты ДНК были очищены и клонированы в составе плазмиды pTargetT. Для этого смесь плазмиды и одного из фрагментов обрабатывали эндонуклеазами рестрикции SpeI и SalI, после чего проводили реакцию лигирования. Продуктами реакции трансформировали клетки *E. coli* Top10. Выросшие колонии анализировали на наличие рекомбинантной вставки в плазмиде путём ПЦР с использованием праймеров *pts1* и *pts2* (Приложение 2). Процедуру геномного редактирования проводили согласно описанной ранее методике [8] (Приложение 3). Компетентные клетки *E. coli* Rosetta 2(DE3) трансформировали плазмидой pCas, после чего готовили электрокомпетентные клетки *E. coli* Rosetta 2(DE3)/pCas по методике, описанной в работе Dower et al. [10]. Культивирование клеток осуществлялось

в присутствии 10 мМ L-арабинозы для индукции экспрессии компонентов системы λ -Red. Полученные компетентные клетки трансформировали одной из плазмид серии pTargetT путём электропорации. Для этого 50 мкл клеток смешивали со 100 нг плазмидной ДНК, электропорацию проводили в 1 мм кювете Gene Pulser Xcell («Bio-Rad») при 1,8 кВ. Клетки инкубировали в 1 мл среды LB при 30 °С в течение 1 ч, а затем высевали на LB-агар, содержащий канамицин (50 мг/л) и спектиномицин (50 мг/л), и инкубировали в течение 20–44 ч при 30 °С. Успешность редактирования оценивали с помощью анализа размера продуктов ПЦР с использованием специфичных к мишени пар праймеров и секвенирования ДНК. Полученных мутантов использовали для следующего цикла редактирования.

Подбор условий индукции рекомбинантного гена *yciM*. Клетки *E. coli* Rosetta 2(DE3) (далее Rosetta WT) и клетки *E. coli* Rosetta 2(DE3) *msbA52*⁻, *kdsD*⁻, *gutQ*⁻, *lpxM*⁻, *lpxL*⁻, *lpxP*⁻, *pagP*⁻, *eptA*⁻ (далее Rosetta 8m) трансформировали плазмидой pBAD-*YciM*. В качестве контрольных использовались те же штаммы, трансформированные плазмидой pBAD/Мус-His A. Одиночные колонии переносили в стеклянную пробирку, содержащую 2 мл среды LB (150 мг/л ампициллина, 6 мг/л хлорамфеникола) с различной концентрацией L-арабинозы – от 0,2 до 2000 мг/л с шагом в 10 раз (Приложение 4). Культуры растили в шейкере-инкубаторе при 30 °С в течение 18 ч. Далее измеряли оптическую плотность культуры при длине волны 600 нм (ОП₆₀₀). Определение ОП₆₀₀ проводили с помощью спектрофотометра UV-1900 («Shimadzu», Япония) в кюветах с длиной оптического пути 1 см. Каждая культура наращивалась в трёх независимых повторях. В качестве рабочей концентрации L-арабинозы принимали максимальное значение, не приводящее к полному ингибированию роста культуры для всех исследованных вариантов (Приложение 4).

Наработка и выделение рекомбинантного eGFP в модифицированных штаммах. Клетки *E. coli* Rosetta WT и Rosetta 8m трансформировали плазмидой pET-eGFP(Kan). Из полученных трансформантов готовили компетентные клетки и трансформировали их плазмидой pBAD-*YciM* или pBAD/Мус-His A. Таким образом, были получены по два варианта штаммов Rosetta WT и Rosetta 8m, несущие плазмиду pET-eGFP(Kan) и в дополнение к ней либо pBAD-*YciM*, либо pBAD/Мус-His A без вставки. Каждый из вариантов культивировали в трёх независимых повторях, после чего

из биомассы с помощью металл-хелатной хроматографии выделяли eGFP. Для этого единичной колонией бактерий засеивали 2 мл среды LB (150 мг/л ампициллина, 50 мг/л канамицина, 6 мг/л хлорамфеникола) и растили в шейкере-инкубаторе при 30 °С в течение 18 ч при 250 об./мин и амплитуде 25 мм. Далее, 2 мл ночной культуры переносили в 20 мл свежей среды того же состава с добавлением 20 мг/л арабинозы и растили в шейкере-инкубаторе при 30 °С. После достижения культурой оптической плотности при длине волны ОП₆₀₀ = 0,6–0,7 к культуре добавляли раствор изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 0,5 мМ и продолжали рост ещё в течение четырёх часов. Клетки осаждали центрифугированием в течение 10 мин при ускорении 5000 g, ресуспендировали в физрастворе и снова осаждали. К осадку добавляли 2 мл буферного раствора А (20 мМ Tris-HCl, 500 мМ NaCl, 10 мМ имидазол, pH 7,5), после чего разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора Branson 250 Sonifier («Branson», США) при 22 кГц 2 мин на льду. Лизат для удаления остатков клеток центрифугировали 15 мин при ускорении 15 000 g. Полученный раствор наносили на хроматографическую колонку Tricorn 5/50, содержащую 0,3 мл сорбента Ni Sepharose FF («GE Healthcare», США) и уравновешенную тем же буфером. После нанесения колонку промывали раствором А (5 мл), а затем элюировали связавшиеся с сорбентом полипептиды раствором для элюции Е (20 мМ Tris-HCl, 500 мМ NaCl, 500 мМ имидазол, pH 7,5) в объёме 1 мл. Скорость протока раствора через колонку составляла 1 мл/мин, контроль процесса и сбор фракций осуществлялся на основании проточного измерения оптической плотности элюата при длине волны 280 нм. Все операции по хроматографическому разделению выполнялись с помощью хроматографа NGC («Bio-Rad»).

Определение бактериальных эндотоксинов (ЛАЛ-тест). Грубую оценку содержания бактериальных эндотоксинов в препаратах выделенного модельного рекомбинантного белка проводили путём проведения гель-тромб теста с использованием лизата амёбоцитов мечехвостов рода *Tachypleus* PYROSTAR ES-F («Wako Chemicals», США). Количественное определение содержания эндотоксинов в образцах проводили с помощью хромогенного теста по конечной точке («BioEndo», Китай). Чувствительность теста определялась выбранным диапазоном калибровочной кривой (от 0,1 до 1 ЕЭ/мл, ЕЭ – единицы эндотоксина).

В качестве отрицательного контроля использовали воду для ЛАЛ-теста AL-WATER («Альгимед Техно», Республика Беларусь) и буферный раствор для элюции E. Раствор белка в буферном растворе E напрямую использовали для определения содержания эндотоксинов. Рабочие разведения образцов составляли от 10^3 до 10^8 раз, что полностью нивелировало влияние компонентов буфера на результаты теста, что подтверждается одинаковыми результатами для контрольных образцов с использованием воды и разведённого буферного раствора. Детекцию результатов осуществляли на планшетном сканере Multiscan Ascent («Thermo Fisher Scientific») при длине волны 405 нм.

Перед определением содержания эндотоксинов образцы выделенного eGFP выравнились по концентрации на основании измерения флуоресценции раствора. Определение флуоресценции проводили с помощью флуориметра Qubit 4 Fluorometer («Thermo Fisher Scientific») в режиме fluorometer (blue, 470 нм).

Статистический анализ проводили с использованием U-критерия Манна–Уитни. Статистические вычисления выполняли на языке Python (версия 3.11.4) в среде для разработки Jupyter Notebook (6.5.4).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Подбор условий индукции рекомбинантного гена *yciM*. Было показано, что высокое содержание арабинозы в культуральной среде ведёт к сильному ингибированию и даже полному прекращению роста клеток, содержащих плазмиду pBAD-*YciM*. В случае штамма с восемью мутациями (Rosetta 8m) ингибирование роста было более выражено по сравнению с Rosetta WT и достигалось при концентрациях арабинозы на два порядка меньших (Приложение 4).

При этом полного ингибирования роста клеток Rosetta WT/pBAD-*YciM* не наблюдалось, в то время как рост Rosetta 8m/pBAD-*YciM* при концентрациях арабинозы 2 и 0,2 г/л полностью подавлялся. Также было отмечено незначительное подавление роста как Rosetta 8m, так и Rosetta WT, трансформированных плазмидой pBAD/Мус-His A при высоких концентрациях арабинозы. Для дальнейшей работы было выбрано максимальное значение концентрации арабинозы, которое не ведёт к полному подавлению роста самого чувствительного штамма – Rosetta 8m/pBAD-*YciM*, оно составило 20 мг/л.

Уровень накопления рекомбинантного eGFP в различных исследуемых штаммах. Для каждого из двенадцати выделенных образцов eGFP определялся уровень флуоресценции в условных единицах и концентрация белка по методу Брэдфорда относительно бычьего сывороточного альбумина с использованием реагентов Bio-Rad Protein Assay («Bio-Rad»). В результате было установлено, что оба этих значения чётко коррелируют между собой (коэффициенты корреляции 0,92–0,99) (рис. 2).

Установлено, что коэкспрессия *YciM* и eGFP в клетках Rosetta WT не приводит к снижению выхода eGFP. В случае Rosetta 8m наблюдалась другая ситуация: совместная экспрессия обоих рекомбинантных генов приводит к снижению выхода eGFP на 40%, что соотносится со снижением общей плотности бактериальной культуры (табл. 1).

Содержание эндотоксинов в препаратах очищенного eGFP. Результаты измерения содержания эндотоксинов в образцах очищенного eGFP с помощью хромогенного теста приведены на рис. 3 и в табл. 2.

Как совместная экспрессия *YciM* и eGFP, так и использование клеток Rosetta 8m с нокаутированными генами пути биосинтеза ЛПС

Таблица 1. Концентрация белка, флуоресценция образцов выделенного eGFP и оптическая плотность исходных бактериальных культур

Образец	RFU·10 ⁴	C, мг/мл	ОП ₆₀₀
Rosetta 8m/pBAD- <i>YciM</i>	18,5 ± 6,5	0,6 ± 0,3	1,5 ± 0,1
Rosetta 8m/pBAD/Мус-His A	27,7 ± 2,5	1,0 ± 0,1	1,8 ± 0,1
Rosetta WT/pBAD- <i>YciM</i>	37,7 ± 7,0	1,3 ± 0,2	2,3 ± 0,2
Rosetta WT/pBAD/Мус-His A	36,9 ± 9,2	1,4 ± 0,2	2,4 ± 0,2

Примечание. RFU – флуоресценция в условных единицах; C – концентрация белка по методу Брэдфорда; ОП₆₀₀ – оптическая плотность исходной культуры. Приведено усреднённое значение для трёх образцов каждого вида с 95%-ными доверительными интервалами. Объём каждого образца составлял 1 мл, концентрации численно соответствуют общему количеству выделенного белка.

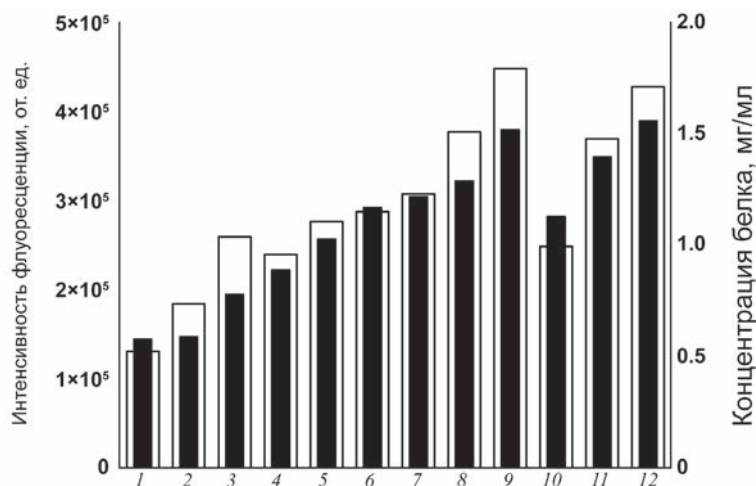


Рис. 2. Уровень флуоресценции и концентрация выделенного рекомбинантного eGFP, определённая по методу Брэдфорда. На гистограмме отложены значения концентраций (мг/мл) чёрным цветом, а флуоресценции eGFP (отн. ед.) – белым цветом для каждого выделенного образца. Образцы 1–3 – белок, выделенный из Rosetta 8m/pBAD-YciM; образцы 4–6 – белок, выделенный из Rosetta 8m/pBAD-Myc-His A; образцы 7–9 – белок, выделенный из Rosetta WT/pBAD-YciM; образцы 10–12 – белок, выделенный из Rosetta WT/pBAD-Myc-His A

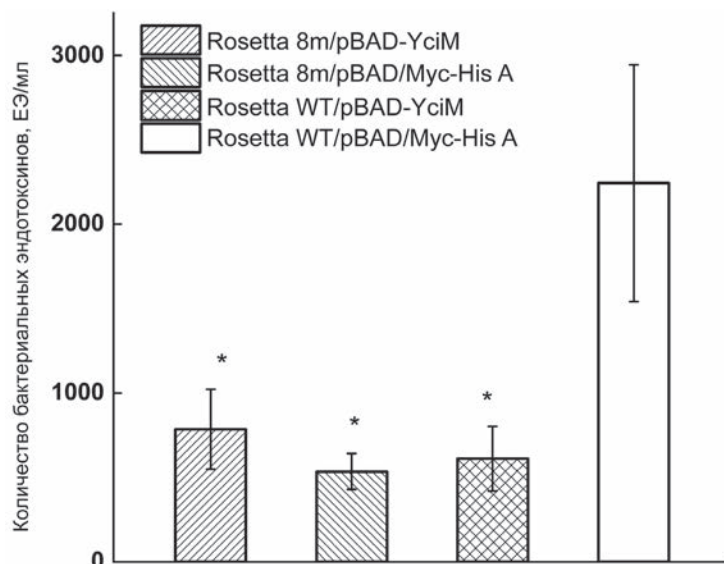


Рис. 3. Содержание эндотоксинов в препаратах очищенного eGFP. Содержание бактериальных эндотоксинов определяли с помощью хромогенного ЛАЛ-теста по конечной точке. Для определения содержания эндотоксинов в образцах строили калибровочную кривую, используя контрольный стандарт эндотоксина. Данные представлены в виде медианных значений содержания бактериальных эндотоксинов в образцах выделенных рекомбинантных eGFP из штаммов Rosetta 8m/pBAD-YciM, Rosetta 8m/pBAD-Myc-His A, Rosetta WT/pBAD-YciM и Rosetta WT/pBAD-Myc-His A с 95%-ными доверительными интервалами. Отличия от контрольного штамма Rosetta WT/pBAD-Myc-His A считали достоверными при уровне значимости меньше 0,027 (*)

ведёт к снижению содержания эндотоксинов в образцах очищенного eGFP относительно значения, полученного для eGFP, выделенного из клеток Rosetta WT/pBAD/Myc-His A. Для Rosetta WT/pBAD-YciM это снижение составляет 3,7 раза, для Rosetta 8m/pBAD/Myc-His A – 4,2 раза, а в случае Rosetta 8m/pBAD-YciM – 2,9 раза. Количества эндотоксинов в этих трёх случаях статистически достоверно отличаются от таковых для образца Rosetta WT/pBAD/Myc-His A ($p < 0,027$) и не отличаются между собой.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Снижение количества эндотоксинов в препаратах рекомбинантных белков, синтезируемых в *E. coli*, является обязательным при их медицинском применении. Одним из подходов к решению этой проблемы является получение специальных штаммов со сниженным содержанием ЛПС или с модификацией ЛПС для снижения пирогенности. Самым известным подобным штаммом является проприетарный ClearColi BL21(DE3), который позволяет

Таблица 2. Содержание бактериальных эндотоксинов в препаратах выделенного eGFP из разных штаммов *E. coli*

Штамм	Rosetta 8m/ pBAD-YciM	Rosetta 8m/ pBAD-Myc-His A	Rosetta WT/ pBAD-YciM	Rosetta WT/ pBAD-Myc-His A
Медиана	785	535	611	2243
95%-ный ДИ	548–1022	430–640	421–801	1543–2943
Изменение по сравнению с контролем, раз	2,85	4,19	3,67	1
<i>p</i>	0,027	0,0035	0,0081	

Примечание. Данные представлены в виде медианных значений содержания бактериальных эндотоксинов в единицах ЕЭ в образцах выделенных рекомбинантных eGFP из штаммов Rosetta 8m/pBAD-YciM, Rosetta 8m/pBAD-Myc-His A, Rosetta WT/pBAD-YciM, Rosetta WT/pBAD-Myc-His A. Образцы нормированы по уровню флуоресценции eGFP. Различия между группами оценивали с помощью 95%-ных доверительных интервалов. Дополнительно использовали U-критерий Манна–Уитни для определения уровня значимости различий между группами (*p*). Изменение количества бактериальных токсинов оценивали относительно контрольного штамма Rosetta WT/pBAD-Myc-His A.

экспрессировать рекомбинантные гены под контролем промотора бактериофага T7. По сообщениям в научной литературе [4], в ClearColi BL21(DE3) проведён нокаут семи генов, участвующих в биосинтезе ЛПС, и введена компенсаторная мутация С148А в гене *msbA*. С помощью технологии редактирования генома мы нокаутировали эти семь генов в широко известном экспрессионном штамме *E. coli* Rosetta 2(DE3) и ввели мутацию в ген *msbA*. В качестве альтернативного подхода мы воспользовались описанным ранее явлением [7], которое заключается в снижении общего уровня ЛПС при повышении экспрессии гена *yciM* [7]. Мы предположили, что при совместной экспрессии целевого белка и рекомбинантного YciM возможно снижение содержания ЛПС, и решили экспериментально сравнить результат этого возможного снижения с достигаемым при использовании штамма с семью нокаутированными генами пути биосинтеза ЛПС. Для этого мы сконструировали экспрессионную плазмиду pBAD-YciM, содержащую рекомбинантный ген под контролем промотора арабинозного оперона, кодирующий белок YciM.

В качестве модельного белка для экспрессии, очистки и последующего определения содержания эндотоксинов мы использовали мутантный вариант eGFP с повышенной светимостью [11]. Мы сконструировали экспрессионную плазмиду pET-eGFP(Kan), содержащую рекомбинантный ген под контролем промотора бактериофага T7, кодирующий eGFP, слитый с С-концевым гексагистидиновым мотивом. Несмотря на то, что плазмиды pBAD-YciM и pET-eGFP(Kan) относятся к одной группе совместимости, возможно их устойчивое совместное наследование в клетках ввиду того,

что первая из них обеспечивает устойчивость к ампициллину, а вторая – к канамицину. Использование двух разных плазмид с разными промоторно-операторными областями рекомбинантных генов вызвано в нашем случае необходимостью обеспечить сильно несбалансированный уровень их экспрессии. Как описано в разделе «Подбор условий индукции рекомбинантного гена *yciM*», высокое содержание арабинозы в культуральной среде ведёт к сильному ингибированию и даже полному прекращению роста клеток. Как видно из таблицы и графика в Приложении 4, сильная индукция гена, кодирующего YciM, приводит к фатальным последствиям для культуры клеток. В то же время eGFP должен нарабатываться в максимально возможном количестве. Это ведёт к тому, что необходимо обеспечивать разный уровень экспрессии рекомбинантных генов – максимально возможный для гена, кодирующего eGFP, и небольшой и гибко регулируемый для гена, кодирующего YciM.

В результате экспериментов мы установили, что оба использованных подхода ведут к статистически достоверному снижению содержания эндотоксинов в образцах выделенного eGFP. При этом экспрессия YciM в штамме Rosetta 8m приводит к значительному подавлению его роста вплоть до полной остановки при высоких концентрациях арабинозы. Экспрессия YciM в штамме Rosetta WT тоже подавляет рост культуры, но в гораздо меньшей степени и при более высоких концентрациях индуктора. При этом удельный выход рекомбинантного белка на единицу биомассы во всех случаях отличался незначительно (табл. 1).

При экспрессии YciM в Rosetta 8m дополнительного усиления эффекта не наблюдалось. Более того, среднее значение содержания

эндотоксинов в этом случае даже выше, чем при использовании Rosetta 8m с контрольной плазмидой pBAD/Myc-His A, однако статистически это различие не достоверно.

В литературных источниках имеется весьма ограниченная информация о содержании эндотоксинов в препаратах рекомбинантных белков, выделенных из штаммов ClearColi. При использовании штамма ClearColi BL21(DE3) сообщается о снижении содержания эндотоксинов в выделенных препаратах в 750 раз для белка AroA1 [12] и в 36 раз – для белка Hsp70 [4]. При этом для AroA1, выделенного из ClearColi K12, это снижение составляет 4–18 раз [4], а для выделенного домена тяжёлой цепи иммуноглобулина G VHm36 – 35 раз. В последнем случае сообщение приведено не в рецензируемом журнале, а в рекламной презентации фирмы-разработчика [https://clearcoli.com/wp-content/uploads/2013/04/RCT_lucigen-Aug-2016.pptx]. Данные о содержании эндотоксинов в белках, полученных с использованием штаммов ClearColi, которые удалось найти авторам, обобщены в Приложении 5.

В ходе нашего исследования мы провели нокаут генов, описанных для ClearColi, в штамме *E. coli* Rosetta 2(DE3) и добились снижения содержания эндотоксинов в препарате eGFP в четыре раза. Ввиду фрагментарности литературных данных прямое сравнение с коммерческим штаммом ClearColi BL21(DE3) представляется затруднительным. В целом, создаётся впечатление, что ClearColi BL21(DE3) с теми же нокаутированными генами, что и полученный нами Rosetta 8m, обеспечивает большее снижение концентрации эндотоксинов. Однако надо учитывать, что на этот параметр может влиять множество факторов, начиная от природы рекомбинантного белка и кончая параметрами культивирования и очистки. Также следует отметить, что ClearColi BL21(DE3) является проприетарным штаммом и может быть описан в литературных источниках недостаточно полно.

Таким образом, оба использованных подхода дают сходные результаты, приводя к снижению содержания эндотоксинов в препаратах выделенного рекомбинантного eGFP. Использование коэкспрессии с YciM имеет некоторое преимущество из-за того, что с помощью трансформации плазмидой можно модифицировать широкий круг уже существующих штаммов *E. coli*. Но это преимущество относится, скорее, к лабораторной практике, так как в биофармацевтических приложениях предпочтительнее использовать более стабильные штаммы с модифицированным геномом,

не требующие применения дополнительного антибиотика.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Снижение количества эндотоксинов в препаратах рекомбинантных белков, получаемых в *E. coli*, является важным условием их медицинского применения. Один из подходов к решению этой проблемы – использование специальных штаммов, продуцирующих меньшее количество ЛПС или модифицированные ЛПС со сниженной пирогенностью. Мы сравнили два подхода к решению этой задачи. Первый подход заключается в нокауте генов пути биосинтеза ЛПС с помощью геномного редактирования и повторяет способы получения ранее известных коммерческих штаммов. Второй подход ранее не встречался в литературных источниках. Он заключается в совместной экспрессии целевого рекомбинантного белка и белка кишечной палочки YciM. Проведённые эксперименты показали, что и использование штамма с нокаутом генов, и коэкспрессия с белком YciM приводят к снижению содержания эндотоксинов в выделенном модельном рекомбинантном белке eGFP на сравнимую величину. Коэкспрессия с YciM имеет преимущество в гибкости и возможности модифицировать уже существующие штаммы. В биофармацевтических же приложениях представляется предпочтительным использование стабильных штаммов с модифицированным геномом.

Вклад авторов. П.А. Бобровский – генная инженерия, подготовка текста; Д.Д. Харлампиева – анализ содержания эндотоксинов, подготовка текста; С.А. Кириллин – генная инженерия; К.А. Бровина – микробиологическая работа; Е.Н. Графская – микробиологическая работа; В.Н. Лазарев – общее руководство; В.А. Манувера – очистка рекомбинантных белков, подготовка текста.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 23-24-00080, <https://rscf.ru/project/23-24-00080/>.

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.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Raetz, C. R., and Whitfield, C. (2002) Lipopolysaccharide endotoxins, *Annu. Rev. Biochem.*, **71**, 635-700, doi: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414.
2. Bos, M. P., Robert, V., and Tommassen, J. (2007) Biogenesis of the gram-negative bacterial outer membrane, *Annu. Rev. Microbiol.*, **61**, 191-214, doi: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093245.
3. Yoon, S. H., Jeong, H., Kwon, S. K., and Kim, J. F. (2009) Genomics, Biological Features, and Biotechnological Applications of *Escherichia coli* B: "Is B for better?!", in *Systems Biology and Biotechnology of Escherichia coli* (Lee, S. Y., ed), Springer, Dordrecht, doi: 10.1007/978-1-4020-9394-4_1.
4. Mamat, U., Wilke, K., Bramhill, D., Schromm, A. B., Lindner, B., Kohl, T. A., Corchero, J. L., Villaverde, A., Schaffer, L., Head, S. R., Souvignier, C., Meredith, T. C., and Woodard, R. W. (2015) Detoxifying *Escherichia coli* for endotoxin-free production of recombinant proteins, *Microb. Cell Fact.*, **14**, 1-15, doi: 10.1186/s12934-015-0241-5.
5. Kayagaki, N., Wong, M. T., Stowe, I. B., Ramani, S. R., Gonzalez, L. C., Akashi-Takamura, S., Miyake, K., Zhang, J., Lee, W. P., Muszyński, A., Forsberg, L. S., Carlson, R. W., and Dixit, V. M. (2013) Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4, *Science*, **130**, 1246-1249, doi: 10.1126/science.1240248.
6. Park, B. S., Song, D. H., Kim, H. M., Choi, B. S., Lee, H., and Lee, J.-Oh (2009) The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex, *Nature*, **458**, 1191-1195, doi: 10.1038/nature07830.
7. Mahalakshmi, S., Sunayana, M. R., Saisree, L., and Reddy, M. (2014) YciM is an essential gene required for regulation of lipopolysaccharide synthesis in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.*, **91**, 145-157, doi: 10.1111/mmi.12452.
8. Jiang, Y., Chen, B., Duan, C., Sun, B., Yang, J., and Yang, S. (2015) Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system, *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 2506-2514, doi: 10.1128/AEM.04023-14.
9. Klock, H. E., and Lesley, S. A. (2009) The Polymerase Incomplete Primer Extension (PIPE) method applied to high-throughput cloning and site-directed mutagenesis, *Methods Mol. Biol.*, **498**, 91-103, doi: 10.1007/978-1-59745-196-3_6.
10. Dower, W. J., Miller, J. F., and Ragsdale, C. W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation, *Nucleic Acids Res.*, **16**, 6127-6145, doi: 10.1093/nar/16.13.6127.
11. Cormack, B. P., Valdivia, R. H., and Falkow, S. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP), *Gene*, **173**, 33-38, doi: 10.1016/0378-1119(95)00685-0.
12. Mamat, U., Woodard, R. W., Wilke, K., Souvignier, C., Mead, D., Steinmetz, E., Terry, K., Kovacich, Ch., Zegers, A., and Knox, C. (2013) Endotoxin-free protein production – ClearColi™ technology, *Nat. Methods*, **10**, 916, doi: 10.1038/nmeth.f.367.

UPREGULATION OF YciM EXPRESSION REDUCES ENDOTOXIN CONTAMINATION OF RECOMBINANT PROTEINS PRODUCED IN *Escherichia coli* CELLS

P. A. Bobrovsky^{1,2}, D. D. Kharlampieva¹, S. A. Kirillin¹, K. A. Brovina^{1,2}, E. N. Grafkskaia¹, V. N. Lazarev^{1,2}, and V. A. Manuvera^{1,2*}

¹ Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, 119435 Moscow, Russia; e-mail: vmanuvera@yandex.ru

² Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University)", 141701 Dolgoprudny, Russia

Recombinant proteins produced in *Escherichia coli* are often contaminated with endotoxins, which can be a serious problem for their further application. One of the possible solutions is the use of modified strains with reduced lipopolysaccharide (LPS) levels. We compared two approaches to engineering such strains. The first commonly known approach was modification of LPS biosynthesis pathway by knocking out seven genes in the *E. coli* genome. The second approach, which has not been previously used, was to increase expression of *E. coli* protein YciM. According to the published data, elevated expression of YciM leads to the reduction in the amount of the LpxC enzyme involved in LPS biosynthesis. We investigated the impact of YciM coexpression with eGFP on the content of endotoxins in the purified recombinant eGFP samples. Both approaches provided similar outcomes, i.e., decreased the endotoxin levels in the purified protein samples.

Keywords: recombinant protein, lipopolysaccharide, endotoxin, expression strain, lipid IVa, CRISPR, Cas9

ВЛИЯНИЕ РАСПОЛОЖЕНИЯ И ОРИЕНТАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТОКСИН-АНТИТОКСИНОВОГО ЭЛЕМЕНТА *hok/sok* НА УРОВЕНЬ БИОСИНТЕЗА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ БЕЛКОВ В БАКТЕРИАЛЬНОЙ СИСТЕМЕ ЭКСПРЕССИИ

© 2023 Ю.А. Ходак, Р.Р. Шайфутдинов, Д.С. Хасанов,
Н.А. Орлова, И.И. Воробьев*

ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт биоинженерии,
117312 Москва, Россия; электронная почта: ptichman@gmail.com

Поступила в редакцию 20.04.2023

После доработки 15.08.2023

Принята к публикации 15.08.2023

Генетический токсин-антитоксिन элемент *hok/sok* из плазмиды R1 *Escherichia coli* обеспечивает сегрегационную стабильность плазмид. Бактериальные клетки, потерявшие все копии плазмиды, кодирующей короткоживущий антитоксин, гибнут под действием долгоживущего токсина. Элемент *hok/sok* в составе векторных плазмид для бактериальной экспрессии может увеличивать продуктивное время биосинтеза рекомбинантных белков, замедляя накопление в популяции непродуцирующих клеток, лишенных целевой плазмиды. В настоящей работе были исследованы различные варианты расположения и ориентации элемента *hok/sok* в составе стандартной плазмиды рЕТ28а с индуцибельным промотором T7lac и геном устойчивости к канамицину. Было обнаружено, что элемент *hok/sok* сохраняет функциональную активность вне зависимости от расположения на плазмиде и ориентации, бактериальные клетки сохраняли плазмиды с *hok/sok* после 4-х дней культивирования без антибиотика и теряли контрольную плазмиду без данного элемента. На примере трех целевых белков – аспаргиназы *E. coli* тип II, гормона роста человека и нуклеопротеина вируса SARS-CoV-2 было продемонстрировано, что для цитоплазматических целевых белков максимальная продуктивность бактерий сохраняется только при расположении элемента *hok/sok* на плазмиде выше промотора целевого гена. В случае периплазматической локализации белка продуктивность бактерий уменьшается для всех вариантов расположения *hok/sok* при культивировании с антибиотиком, а при периодическом культивировании бактерий без антибиотика продуктивность лучше сохраняется также при расположении элемента *hok/sok* выше промотора целевого гена. Данный вариант векторной плазмиды рЕНУ позволяет увеличить биосинтез нерасстворимого в цитоплазме бактерий гормона роста человека более, чем в 2 раза при культивировании бактерий без антибиотика, а также поддерживать биосинтез аспарагиназы при периодическом культивировании без антибиотика в течение 4-х дней на уровне не менее 10 мг/литр. Разработанный сегрегационно стабилизированный плазмидный вектор может быть использован для получения в клетках *E. coli* различных рекомбинантных белков без применения антибиотиков.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гетерологичная экспрессия рекомбинантных белков, системы токсин-антитоксин, аспарагиназа, нуклеопротеин, соматотропин.

DOI: 10.31857/S0320972523090129, EDN: WUOWEN

ВВЕДЕНИЕ

Обеспечение сегрегационной устойчивости плазмид в бактериальных системах экспрессии генов остается актуальной задачей биофармацевтики. Удаление всех копий плазмиды, кодирующей ген гетерологичного белка,

обеспечивает бактериальной клетке значительное преимущество в скорости деления. Вследствие этого даже при времени индукции промотора целевого гена 4–8 ч популяция бактерий-продуцентов обычно замещается непродуцирующими клетками, что приводит к ограничению общей продуктивности системы [1].

Принятые сокращения: ИПТГ – изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид; ОРС – открытая рамка считывания; ТА – токсин-антитоксин; АСН – L-аспарагиназа; НГН – гормон роста человека; НР – нуклеопротеин варианта «Ухань» коронавируса SARS-CoV-2.

* Адресат для корреспонденции.

Базовую защиту бактериальных клеток от потери плазмиды обеспечивает ген устойчивости к действию антибиотика, однако для плотных бактериальных культур концентрация селективного антибиотика в ростовой среде постепенно падает под действием инактивирующих его ферментов и становится слишком низкой [1]. Возможен второй уровень защиты бактериальных клеток от потери целевых плазмид – это введение в них природных или модифицированных пар генов токсин-антитоксин (ТА), обеспечивающих немедленную смерть бактериальной клетки, потерявшей все активные копии гена антитоксина.

Генетические элементы ТА присутствуют в большом числе копий в геномах прокариот [2], плаزمидах [3] и бактериофагах [4]; для некоторых свободноживущих бактерий описывают более 40 таких генетических элементов [2]. Данные системы классифицируют на основании способа нейтрализации токсина антитоксином. Традиционно их разделяли на 6 типов, однако в последние годы было выделено еще 2 новых типа, таким образом, их общее число достигло 8 [5]. Наиболее изученным и распространенным является тип I, состоящий из гена стабильного токсичного белка и малостабильной антисмысловой РНК, блокирующей трансляцию мРНК токсина [2]. Исследуемый в настоящей работе локус *hok/sok* (host killing/suppressor of killing) относится к первому типу систем ТА, механизм его действия будет подробно описан ниже.

Тип II систем ТА представляет собой пару генов, кодирующих стабильный белковый токсин и нестабильный белковый антитоксин. Типичный пример системы ТА типа II – локус *ccd*, содержащий ген токсичного для бактериальной клетки ингибитора ДНК-гиразы *CcdB* и ген малостабильного ингибитора *CcdA*, подверженного быстрому распаду под действием протеазы *Lon* [6]. При потере всех копий плазмиды, кодирующей локус *ccd*, концентрация белка *CcdA* быстро уменьшается и свободный белок *CcdB* блокирует активность ДНК-гиразы *E. coli* в достаточной мере для прекращения клеточного деления и индукции SOS-ответа [7].

Остальные типы систем ТА распространены значительно реже и характеризуются другими способами взаимодействия токсина и антитоксина. Системы типа III основаны на прямом взаимодействии антитоксической РНК с белковой молекулой токсина [8]; системы типа IV – на блокировании функции токсина без прямого белок-белкового взаимодействия, например, путем катализа антитоксином об-

ратной химической реакции для пары *DarT/DarG* [9]; системы типа V – на селективном разрушении мРНК токсического белка белковым антитоксином, как в паре *GhoT/GhoS* [10]. В типе VI систем ТА, разновидности систем типа II, белковый антитоксин *SocB* является протеолитическим адаптером, обеспечивающим быстрый протеолиз токсина *SocA* клеточной протеазой *ClpXP* [11]. Недавно был выделен новый VII-тип систем, включающий антитоксины, ферментативно модифицирующие токсины. В отличие от систем типа II, в данном случае модификации вносятся в процессе кратковременного, а не постоянного взаимодействия между токсином и антитоксином [12]. В последнем описанном VIII-типе систем в качестве токсина выступают малые РНК, блокирующиеся антисмысловыми РНК, которые кодируются в том же локусе и выступают в качестве антитоксина [13].

Первые системы ТА были открыты при изучении природных плазмид *E. coli* и, по исходным предположениям исследователей, их биологической функцией было обеспечение сегрегационной стабильности таких плазмид. В дальнейшем было обнаружено, что системы ТА вовлечены в обеспечение персистенции бактерий [14], ответа на факторы стресса и защиту от бактериофагов [15]. Несмотря на крайне высокое разнообразие генетических оперонов систем ТА, их известные токсины атакуют очень небольшой набор биохимических процессов бактериальной клетки – трансляцию мРНК, репликацию хромосомной ДНК, рост клеточной стенки и поддержание мембранного потенциала.

Рассматриваемый в настоящей работе генетический локус *hok/sok* относится к системам ТА типа I. Он был впервые обнаружен в плазмиде R1 *E. coli* [16], исходно обозначен как *ParB* и описан как оперон двух цистронов *hok* и *sok*. Матричная РНК гена *hok* кодирует токсичный полипептид размером 52 аминокислоты, который нарушает поляризацию внутренней мембраны бактерий за счет формирования пор, что приводит к стазису и/или гибели бактериальных клеток [17]. Ген *sok* обладает сильным промотором и кодирует антисмысловую РНК, связывающуюся с участком мРНК *hok* и обеспечивающую быструю деградацию мРНК *hok* под действием РНКазы III. Несмотря на кажущуюся очевидность механизма действия генов токсина и антитоксина в паре *hok/sok*, их фактическое взаимодействие является достаточно сложным и многоступенчатым процессом, подробно описанным в обзорной работе Gerdes [18].

Вкратце, большая часть мРНК *hok* образуется в форме трансляционно неактивного продукта увеличенной длины, который может быть описан как продукт гена *tok*, перекрывающего ген *hok*. В данной мРНК с размером ~400 п.о. 5'- и 3'-концевые области образуют дуплекс, блокирующий ее связывание с рибосомами и с антисмысловой РНК *Sok*. Стабильная и неактивная форма мРНК (400 п.о.) медленно превращается в активную форму размером 360 п.о. в результате удаления 3'-фрагмента под действием РНКазы II. Активная мРНК *hok* становится доступной для связывания антисмысловой РНК *Sok*, сайт связывания которой расположен вблизи первого кодона AUG [8]. Возникающий гетеродуплекс РНК быстро гидролизует РНКазой III [19, 20]. Если в клетке нет достаточных количеств РНК *Sok*, то стартует трансляция мРНК *hok*, вырабатывается белок Нок, который формирует мембранные поры, что приводит к переходу клеток в персистирующее состояние, а при дальнейшем росте концентрации Нок возникает состояние стазиса и клеточной смерти.

Предположительно, уровень антисмысловой РНК *Sok* в клетке определяется не только активностью копий ее гена, но и механизмом отрицательной обратной связи, включающим мембрано-ассоциированную РНКазу E, активность которой снижается при деполяризации мембраны [18], таким образом, антитоксическое действие *Sok* сохраняется даже при недостаточном уровне транскрипции гена, однако при потере всех копий гена *sok* данный механизм уже не может действовать.

В геноме базового лабораторного штамма K12 *E. coli* выявляется до 5 локусов типа *hok/sok* [21], при этом 4 из них, по мнению группы Gerdes, инактивированы мутациями вблизи открытой рамки считывания (ОРС) *hok* [22], а единственный активный локус *hokB/sokB*, по-видимому, участвует в регуляции входа и выхода клеток в состояние персистенции за счет процессинга белка НокВ протеазами периплазмы [23]. Также локус *hokB/sokB* определяет, наряду с другими локусами ТА, повышение устойчивости бактериальных клеток к стрессовым условиям [24] путем увеличения продолжительности лаг-фазы и последующего увеличения скорости роста на экспоненциальной фазе.

Увеличение сегрегационной стабильности искусственных, т.е. обычных лабораторных плазмид при включении в их состав локуса *hok/sok* было продемонстрировано во множестве работ. В частности, в работе Pecota et al. [25] наблюдали 9-кратное замедление процесса по-

тери клетками *E. coli* плазмид в неселективных условиях. В случае плазмиды с индуцибельным промотором T7 и селективным маркером устойчивости к действию тетрациклина было заявлено сохранение у 100% клеток устойчивости к антибиотику после 20 ч индукции целевого гена, при этих условиях контрольную плазмиду сохраняли только 17% клеток [26], уровень биосинтеза целевого белка – пролактина человека, был увеличен в 2,3 раза, хотя и оставался достаточно низким.

В случае токсичной для бактериальных клеток фосфолипазы D из *Streptomyces antibioticus* введение элемента *hok/sok* в состав плазмид с промотором T7lac и геном устойчивости к ампициллину привело к исчезновению клеток, терявших плазмиду при ведении культуры до индукции и позволило удвоить общий уровень биосинтеза ферментативно активной фосфолипазы, однако быстрое исчезновение клеток с плазмидой после начала индукции было зафиксировано как для контрольных плазмид, так и для плазмид с локусом *hok/sok* и другими локусами ТА [27].

Генетический элемент *hok/sok* увеличивает устойчивость плазмид не только в *E. coli*, но и в иных видах бактерий, в частности, в *Salmonella enterica* (серовар Typhi) [28] и *Vibrio cholerae* [29]. В случае сальмонеллы при 24-часовой культивировании в селективной среде плазмиды с локусом *hok/sok* сохранялась у 48% клеток, контрольная плазмиды – у 13% клеток. При культивировании холерного вибриона с плазмидами, содержащими локус *hok/sok*, в течение 4-х дней все клетки сохраняли способность экспрессировать ген люциферазы, кодируемый плазмидами, однако в данном исследовании не использовались контрольные плазмиды, не содержащие локуса *hok/sok*.

Несмотря на то что локус *hok/sok* изучен значительно лучше, чем другие локусы ТА, и применялся для стабилизации плазмид различных типов, в литературе отсутствуют данные о его фактическом влиянии на свойства широко распространенных в биофармацевтике экспрессионных плазмид с индуцибельным сильным промотором T7lac и селекционным маркером устойчивости к канамицину. Мы предположили, что инсерция генетического локуса *hok/sok* в плазмиды данного типа может в достаточной мере увеличить их сегрегационную устойчивость в процессе индукции промотора целевого гена и, как следствие, значимо увеличить продуктивное время индукции, т.е. общую продуктивность бактериальной системы экспрессии гетерологичных белков.

Последовательности праймерных олигонуклеотидов

Название праймера	Нуклеотидная последовательность	Сайт рестрикции
AS-HOS-F5	ACACGTGGATCCAACAAACTCCGGGAGGCAGCGTGATGCGG	<i>PspCI</i>
AS-HOS-R5	TCACGTGCATGCACAACATCAGCAAGGAGAAAGGGGCTACCGG	<i>PspCI</i>
AD-Asp-NcoF	ACCATGGAGTTTTTCAAAAAGACGGCACTT	<i>NcoI</i>
AD-Asp-HindR	TAAGCTTCTATTAGTACTGATTGAAGATCTGCTGG	<i>HindIII</i>
M13-dir	GTTGTAAACGACGGCCAGTG	
T7prom	TAATACGACTCACTATAGGG	
T7t	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение векторных плазмид pENU, pEND, pENR. Участок *hok/sok* природной плазмиды R1 *E. coli* (GenBank X05813), фланкированный сайтами узнавания эндонуклеаз рестрикции *PspCI*, *BamHI* и *SphI* синтезировали в «Synbio Technologies» (Китай) и клонировали в плазмиду pUC57. Плазмиду pUC57-HS секвенировали со стандартных праймеров M13, после чего элемент клонировали в плазмиду pET28a (+) («Novagen», США) двумя разными способами. Для получения вектора pENU, где элемент *hok/sok* расположен до целевого гена, реципиентную плазмиду pET28a расщепляли эндонуклеазами *BglII* и *SphI* и лигировали с элементом *hok/sok*, расщепленным *BamHI* и *SphI*. Для получения векторов pEND и pENR, где элемент *hok/sok* расположен после целевого гена, реципиентную плазмиду pET28a расщепляли эндонуклеазой *PsiI* и лигировали с элементом *hok/sok*, расщепленным эндонуклеазой *PspCI*. Методом ПЦР определяли ориентацию вставки с использованием праймеров T7prom и AS-HOS-F5 или AS-HOS-R5 (таблица). Плаزمиды pEND содержала вставку в прямой ориентации, плазмиды pENR – в обратной ориентации.

Получение экспрессионных плазмид. ОПС природного гена L-аспарагиназы (ASN) *E. coli* получали методом ПЦР с адапторных праймеров AD-Asp-NcoF и AD-Asp-HindR (таблица), содержащих сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции для последующего клонирования, используя геномную ДНК *E. coli* штамма BL21[DE3] («Novagen») в качестве матрицы и набор и Encyclo Plus PCR kit («Евроген», Россия). Продукт ПЦР выделяли из 1%-ного агарозного геля, клонировали в T-вектор pAL2-T

(«Евроген»), секвенировали со стандартных праймеров T7prom и M13rev (таблица).

ОПС нуклеопротеина (NP) варианта «Ухань» коронавируса SARS-CoV-2 и экспрессионные конструкции на ее основе получали, как описано в статье Kolesov et al. [30].

Оптимизированную для экспрессии в *E. coli* последовательность ОПС гормона роста человека (HGH) с метионином [–1] и двумя стоп-кодонами синтезировали в ООО «Клонинг Фасилити» (Россия), клонировали в pAL2-T, секвенировали со стандартных праймеров к вектору.

Экспрессионные векторы pET28a, pENU, pEND, pENR рестрицировали по сайтам *NcoI* и *HindIII* и лигировали с фрагментами, содержащими ОПС целевых белков, вырезанными по сайтам *NcoI* и *HindIII* в случае аспарагиназы, или *PciI* и *HindIII* – в случае нуклеопротеина и гормона роста человека.

Полученные плазмиды pET28-ASN, pENU-ASN, pEND-ASN, pENR-ASN; pET28-NP, pENU-NP, pEND-NP, pENR-NP; pET28-HGH, pENU-HGH, pEND-HGH, pENR-HGH секвенировали с праймеров T7prom и T7t и использовали для трансформации клеток BL21[DE3] («Евроген»); трансфицированные клетки далее были использованы в опытах по биосинтезу целевых белков.

Плазмидную ДНК выделяли набором Plasmid Miniprep («Евроген»), очистку рестриционных фрагментов и продуктов ПЦР из агарозного геля проводили набором Cleanup Standard («Евроген»). Использовали эндонуклеазы рестрикции производства ООО «СибЭнзайм» (Россия) и T4-ДНК-лигазу («Евроген»).

Секвенирование ДНК проводили в Межинститутском Центре коллективного пользования «ГЕНОМ» ИМБ РАН.

Культивирование штаммов-продуцентов и получение образцов для ДСН-ПААГ. Выращивание бактерий вели в среде либо 2x Yeast extract and Trypton (2x YТ) состава (из расчета на литр): казеиновый пептон – 16 г, дрожжевой экстракт – 10 г, NaCl – 5 г, pH среды – $7,0 \pm 0,2$; либо в среде Terrific broth (ТВ) состава (из расчета на литр): триптон – 12 г, дрожжевой экстракт – 24 г, гидрофосфат калия – 12,54 г, дигидрофосфат калия – 2,31 г, pH среды – $7,0 \pm 0,2$.

Посевную культуру получали в среде 2x YТ, содержащей 30 мкг/мл канамицина и 1% глюкозы, в течение 14–18 ч при 37 °С и 160 об./мин, если не указано иное. Инокулировали полученным посевным материалом в соотношении 1 : 1000 250 мл сред 2x YТ или Terrific broth, дополненных 30 мкг/мл канамицина и 0,1% глюкозы, растили культуру на качалке в течение 3,5 ч при 37 °С, добавляли в качестве индуктора ИПТГ до конечной концентрации 0,2–1 мМ и растили в течение 3–30 ч при температуре 30–37 °С.

Культивирование штаммов с плазмидами, кодирующими ASN, NGH и NP, для электрофоретического анализа проводили следующим образом: стартовую культуру получали в среде 2x YТ, содержащей 30 мкг/мл канамицина и 1% глюкозы, в течение 14–18 ч при 37 °С. Инокулировали полученным посевным материалом в соотношении 1 : 50 5 мл среды 2x YТ, содержащей 0,1% глюкозы с 30 мкг/мл канамицина; растили культуру на качалке в течение 1 ч при 37 °С, затем добавляли ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ и растили в течение 18 ч при температуре 30 °С (NP) и 37 °С (NGH и ASN). Осадок биомассы отделяли центрифугированием (30 с 12 200 g), ресуспендировали в буфере (1/5 объема исходной аликвоты) для образцов (25 мМ Tris-HCl (pH 6,8), 50 мМ ДТТ, 1% ДСН, 5% глицерина и 0,05% бромфенолового синего), прогревали 5 мин при 95 °С. Проводили электрофоретический анализ (12%-ный ДСН-ПААГ) белковых фракций, гель окрашивали коллоидным раствором Кумасси синий («Диа-М», Россия), сканировали при помощи планшетного сканера в просвечивающем режиме Epson Perfection V700 Photo («Epson», Япония). Получаемое изображение геля с глубиной цвета 16 бит/канал анализировали с помощью программы TotalLab («Nonlinear Dynamics», Великобритания).

Анализировали распределение целевого белка по фракциям растворимых и нерастворимых белков. Для этого отделяли осадок биомассы центрифугированием, бактерии ресуспендировали в растворе для лизиса (1/10 объема исходной аликвоты), содержащем

50 мМ Tris-HCl (pH 7,4), 10 мкг/мл лизоцима и 0,1% (v/v) Triton X-100, и инкубировали 30 мин на льду. Разрушали геномную ДНК клеток ультразвуковым диспергатором («Misonix», США) пульсами по 10 с до исчезновения повышенной вязкости суспензии. Отделяли осадки центрифугированием (10 мин при 12 200 g). Фракцию нерастворимых белков (телец включения) повторно ресуспендировали в растворе (1/10 объема исходной аликвоты), содержащем 50 мМ Tris-HCl (pH 7,4) и 500 мМ NaCl, и отделяли супернатант центрифугированием (10 мин при 12 200 g). Проводили ДСН-ПААГ-анализ белковых фракций (12%-ный ДСН-ПААГ), гель окрашивали коллоидным раствором Кумасси синий («Fermentas», Литва), сканировали при помощи планшетного сканера в просвечивающем режиме. Получаемое изображение геля с глубиной цвета 16 бит/канал анализировали с помощью программы TotalLab, в качестве калибратора интенсивности окраски полос использовали бычий сывороточный альбумин («Диа-М»), по 0,25–2 мкг на дорожку.

Определение доли бактериальных клеток, способных к колониеобразованию в присутствии канамицина. Готовили посевную культуру штаммов, как указано выше. Вели выращивание культур без канамицина – переносили 1 мл посевной культуры в стерильную микропробирку, и отделяли среду с остатками антибиотика центрифугированием, ресуспендировали осадок клеток в 1 мл 2x YТ. Инокулировали полученной суспензией в соотношении 1 : 100 5 мл 2x YТ, содержащей 0,1% глюкозы, но без канамицина, растили культуру 2 ч, после чего добавляли ИПТГ до 0,2–2 мМ и продолжали культивирование в течение 8–24 ч. Отбирали аликвоты тестируемых культур, при помощи стерильной среды 2x YТ делали последовательные 100-кратные разведения. Из разведений культур с кратностью 10 тыс и 1 млн высевали по 250 мкл бактериальных суспензий на чашки Петри с агаризованной средой 2x YТ, содержащей 1% глюкозы, с добавлением и без добавления 30 мкг/мл канамицина. Инкубировали при 37 °С 14–18 ч и подсчитывали число колоний.

Измерение ферментативной активности аспарагиназы. Отделяли бактерии от культуральной среды и проводили их лизис с Triton X-100 и лизоцимом, как указано выше. Для измерения активности использовали аликвоты суспензии лизированных бактерий, типичное разведение – 100 раз. Исследуемые образцы (≤ 100 мкл), содержащие не более 0,3 МЕ аспарагиназы, смешивали с 20 мкл раствора Tris-HCl (pH 8,5) до конечной концентрации

по Tris – 50 мМ, добавляли 17 мкл 100 мМ L-аспарагина и инкубировали ровно 10 мин при +37 °С. Аналогично готовили раствор отрицательного контрольного образца, в который вместо лизата добавляли 100 мкл буферного раствора для лизиса, не содержащего аспарагиназной активности, также проводили его инкубацию (10 мин при +37 °С). Активность аспарагиназы в лизате клеток, отобранных до внесения индуктора, составляла менее 1% от типичной активности аспарагиназы в индуцированных клетках.

Реакцию гидролиза останавливали добавлением 100 мкл 50%-ного раствора трихлоруксусной кислоты в воде. При появлении видимого осадка его отделяли центрифугированием (10 мин, 14 100 g). Супернатант полностью переносили в новую пробирку.

В пробирку калибратора вносили 137 мкл раствора 0,5 мМ сульфата аммония (1 мМ ионов аммония), затем вносили 100 мкл раствора ТХУ. Во все пробирки вносили по 650 мкл разведенного реактива Несслера, полученного смешиванием 550 мкл очищенной воды («Milli-Q», Германия) и 100 мкл готового реактива Несслера («Уральский завод химической продукции», Россия). Растворы перемешивали на вортексе и выдерживали ~10 мин при комнатной температуре. Измеряли поглощение при длине волны 480 нм при помощи спектрофотометра, рассчитывали концентрацию ионов аммония по поглощению калибровочного образца (0,5 мМ сульфата аммония).

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку производили в программе Microsoft Excel при помощи модуля Data Analysis. Первичные данные и статистические расчеты приведены в Приложениях 1–6.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Вследствие того, что в плаزمиде типа рЕТ действуют не менее трех достаточно сильных промоторов – T7lac, lac, KanR, мы предположили, что уровни транскрипции смысловой и антисмысловой РНК *Hok* (*Mok*) и *Sok* могут быть существенно изменены из-за активности близлежащих сильных промоторов. Для проверки влияния позиционного и ориентационного эффектов для генетического локуса *hok/sok* были получены 3 плазмиды – рЕНУ, рЕНД и рЕНР (рис. 1, а). В случае плазмиды рЕНУ локус *hok/sok* был помещен upstream от сильного индуцибельного промотора T7lac и ориентирован таким образом, чтобы продолжение транскрипции гена *hok* за его терминатор

транскрипции не создавало антисмысловую мРНК для целевого гена. В случае плазмид рЕНД и рЕНР локус *hok/sok* располагался downstream от промотора T7lac, после терминатора транскрипции целевого гена, т.е. уровни мРНК генов, кодирующих *Hok* и *Sok*, могли изменяться при неполной терминеции транскрипции как целевого гена с индуцибельным промотором, так и гена устойчивости к действию канамицина (*KanR*) с конститутивным промотором. Плазмиды рЕНД и рЕНР различались ориентацией локуса *hok/sok* – в плазмиде рЕНД неполная терминеция транскрипции целевого гена могла приводить к возрастанию уровня антитоксической РНК *Sok*, а неполная терминеция транскрипции гена *KanR* – к возрастанию уровня мРНК *hok*. В случае плазмиды рЕНР влияние неполной терминеции было обратным – промотор целевого гена мог увеличивать уровень мРНК токсина.

Таким образом, в плазмиде рЕНУ уровни транскрипции *hok* и *sok* не должны были изменяться при индукции промотора основного гена; в плазмиде рЕНД возможно возрастание уровня транскрипции *sok* при индукции целевого гена, а в плазмиде рЕНР – возрастание уровня транскрипции *hok*, что потенциально может приводить к токсическому поражению клеток при индукции целевого гена.

Для сравнения фактической сегрегационной стабильности полученных плазмид и влияния их структуры на уровень экспрессии генов целевых белков в них клонировали ОРС трех типичных рекомбинантных белков – природную ОРС аспарагиназы *E. coli* типа II, как нетоксичного для *E. coli* растворимого белка с периплазматической локализацией; кодон-оптимизированную ОРС гормона роста человека, как малотоксичного для *E. coli* нерастворимого в цитоплазме белка; а также кодон-оптимизированную ОРС нуклеопротеина коронавируса SARS-CoV-2, как пример умеренно токсичного для клеток преимущественно растворимого в цитоплазме белка. Электрофореграммы, демонстрирующие распределение указанных белков по фракциям, приведены на рис. 1, б.

Для плазмид с ОРС аспарагиназы была проверена сегрегационная стабильность при периодическом культивировании в жидкой среде без антибиотика и без индуктора экспрессии целевого гена. Для всех вариантов расположения *hok/sok* (конструкции рЕНД–ASN, рЕНР–ASN и рЕНУ–ASN) плазмиды сохранялись в течение как минимум 8 дней, а доля клеток, сохранивших контрольную плазмиду рЕТ28a–ASN, составила менее 10% через 1 день культивирования, т.е. приблизительно через 20 ге-

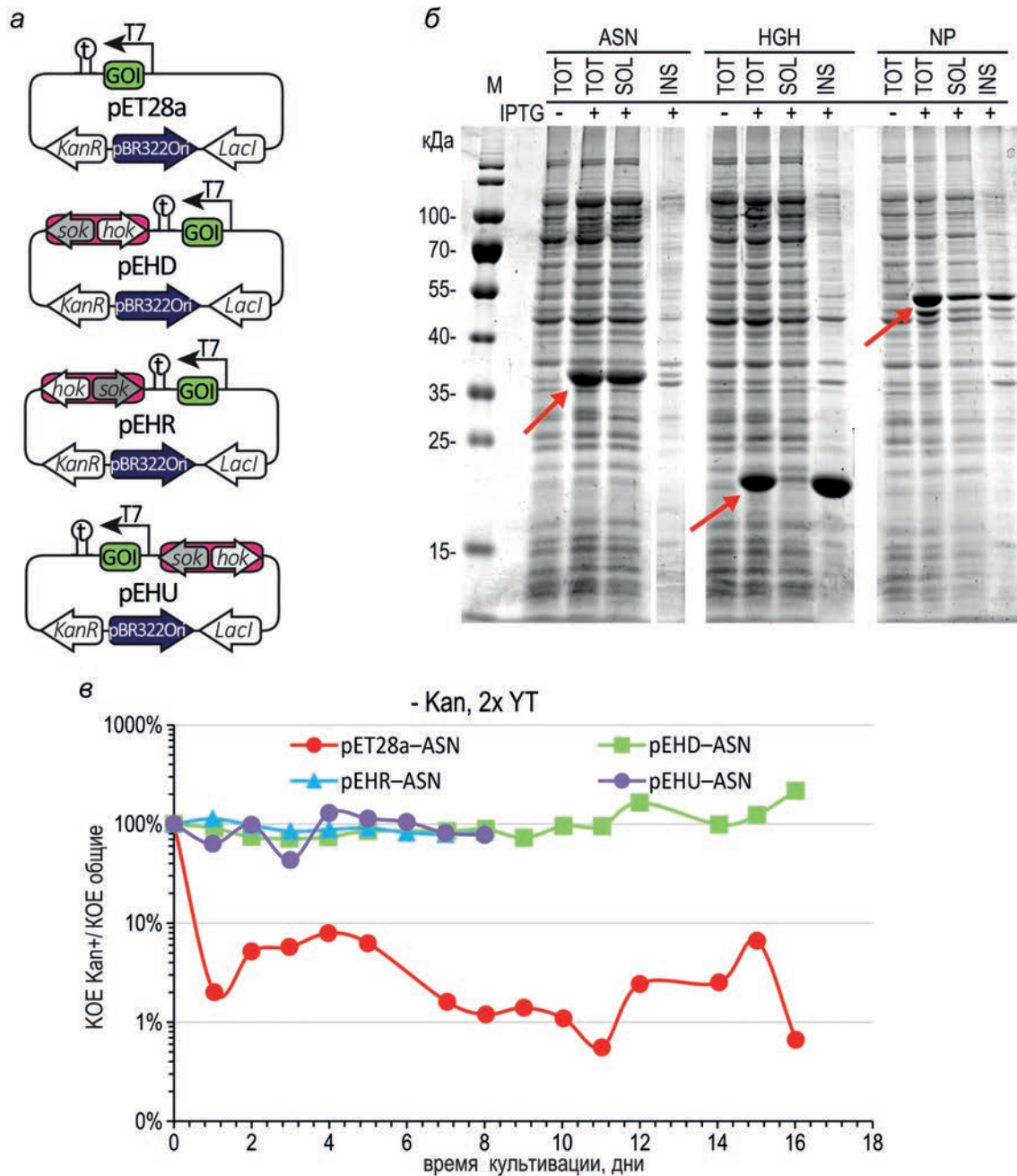


Рис. 1. Схемы вариантов сегрегационно-стабилизированных векторных плазмид, электрофореграммы белковых фракций штаммов-продуцентов, динамика элиминации плазмид. *а* – Схема экспрессионных векторных плазмид, обозначения: T7 – промотор целевого гена; GOI – область ОПС целевого белка; t – терминатор транскрипции целевого гена; KanR – ген устойчивости к канамицину NPT II/Neo; pBR322Ori – вариант области начала репликации плазмид ColE1; LacI – ген белка-репрессора LacI; hok и sok – гены локуса hok/sok. Стрелками обозначены направления транскрипции генов. *б* – Электрофореграмма тотального белка (TOT), фракций растворимых (SOL) и нерастворимых (INS) белков клеток штаммов BL21[DE3]/pET28a–ASN, BL21[DE3]/pET28a–HGH, BL21[DE3]/pET28a–NP при индукции 1 мМ ИПТГ 3 ч, +30 °С. Обозначения: М – маркер молекулярных масс. Молекулярные массы полос маркера указаны в кДа. Положения целевых белков указаны стрелками. *в* – Динамика элиминации плазмид при периодическом культивировании штаммов в среде 2x YT без канамицина, без ИПТГ, +37 °С; кратность пересева – 1000×; пересев 1 раз в 24 ч; в дни 6 и 13 пересев для штаммов BL21[DE3]/pET28a–ASN и BL21[DE3]/pEHD–ASN проводился, но измерение числа КОЕ не проводилось. Не менее 25 колоний для чашек без канамицина. Для всех дней, кроме дня 0, по критерию Пирсона (хи-квадрат) доля канамицин-устойчивых КОЕ для плазмиды pET28a–ASN достоверно отличается от долей канамицин-устойчивых КОЕ для остальных плазмид; $P < 0,001$

нераций клеток (рис. 1, в). При индукции экспрессии гена аспарагиназы в присутствии антибиотика канамицина при помощи 1 мМ ИПТГ

скорость накопления целевого белка была сходной для всех вариантов плазмиды (рис 2, а), таким образом, в этих условиях генетический

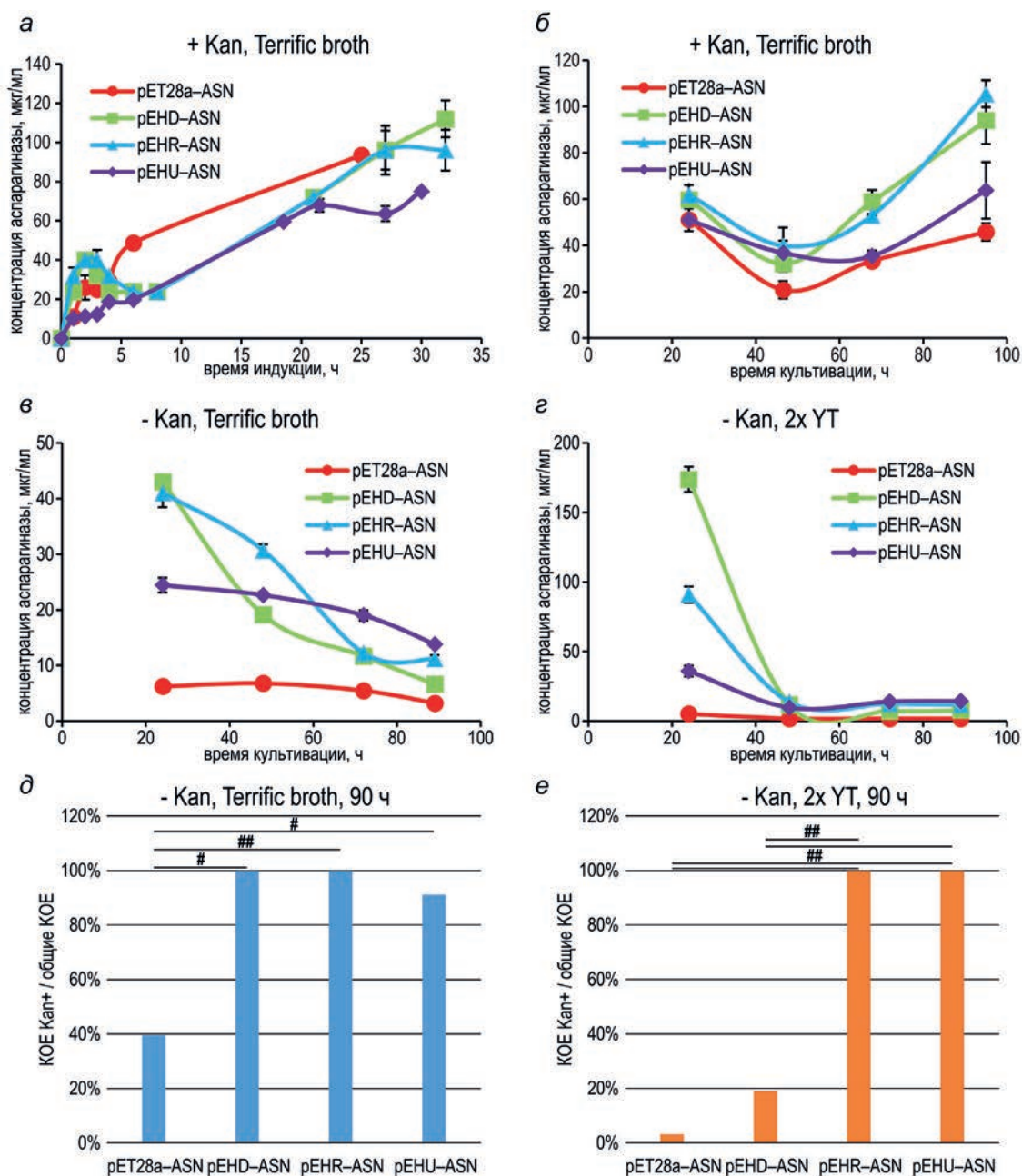


Рис. 2. Динамика накопления аспарагиназы и элиминации плазмид при культивировании штаммов в различных условиях. Концентрацию аспарагиназы измеряли, как ее ферментативную активность в лизате клеток, условия культивирования обозначены над соответствующими панелями. *а* – Культивирование без пересевов. *б–г* – Пересевы с кратностью 1×1000 каждые 24 ч. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям, $n = 2$, биологические повторы. *д* и *е* – Определение КОЕ для культур, соответствующих точкам 90 ч на панелях *в* и *г*. В случае, когда для одного и того же образца количество колоний на чашках с антибиотиком превышало таковое на чашках без антибиотика, за 100% принимали отношение числа колоний на чашках с антибиотиком к числу колоний на чашках без антибиотика. Не менее 65 колоний на чашках без канамицина. Статистически значимые различия в долях канамицин-устойчивых колоний по критерию Пирсона (хи-квадрат) обозначены горизонтальными чертами – # $P < 0,05$; ## $P < 0,001$

элемент *hok/sok* не влиял существенным образом на продуктивность клеток. Поскольку промышленное культивирование продуцентов рекомбинантных белков часто ведется в ферментерах в течение нескольких суток с подпиткой, мы оценили изменение продуктивности клеток при периодическом культивировании в при-

сутствии 1 мМ ИПТГ и канамицина (рис. 2, *б*). Было обнаружено, что концентрация аспарагиназы падает на втором цикле пересева, однако затем возрастает на следующих двух пассажах, этот эффект был более выражен для плазмид pEHD-ASN и pEHR-ASN, содержащих *hok/sok*-элемент downstream от целевого гена.

При периодическом культивировании бактерий без канамицина, но с 1 мМ ИПТГ, в буферизованной среде Terrific broth наблюдали практически полное прекращение накопления аспарагиназы в случае контрольной плазмиды рЕТ28а–ASN и постепенное падение уровня аспарагиназы для остальных плазмид, наименее выраженное для плазмиды рЕНУ–ASN (рис. 2, в). Такой режим культивирования соответствует текущей практике выращивания продуцентов без антибиотиков. Прекращение накопления аспарагиназы в случае плазмиды рЕТ28а–ASN могло быть объяснено ее потерей у большей части клеток (рис. 2, д), в то же время все 3 варианта плазмид с элементом *hok/sok* полностью сохранялись в клетках после 4-х дней культивирования, а продукция целевого белка многократно падала. Данный эффект – прекращение накопления целевого белка при сохранении плазмид в клетках – был еще сильнее выражен при культивировании в среде 2х YT, не обладающей буферной емкостью (рис. 2, г и е). Уже после второго пассажа уровень продукции аспарагиназы многократно падал для всех вариантов плазмид, а после 4-х пассажей наблюдали практически полную потерю контрольной плазмиды рЕТ28а–ASN клетками, сохранение плазмиды рЕНД–ASN – у 20% клеток и полное сохранение плазмид рЕНР–ASN и рЕНУ–ASN – у всех клеток. Таким образом, при продолжительном культивировании бактерий с 1 мМ ИПТГ без канамицина элемент *hok/sok* обеспечивает сохранение плазмид клетками, но не обеспечивает сохранение экспрессии гена аспарагиназы. Прекращение синтеза клетками ферментативно активной аспарагиназы могло быть вызвано мутациями в плаزمиде или генетическими изменениями в самих бактериальных клетках.

Для двух случайно отобранных колоний клеток с плазмидой рЕНД–ASN, выращенных на агаризованной среде с канамицином из бактериальной культуры, полученной после 4-х дней культивирования в среде 2х YT без канамицина с 1 мМ ИПТГ, провели выращивание в жидкой среде с канамицином, выделили плазмиды и трансформировали ими повторно клетки BL21[DE3]. Для трех случайно отобранных колоний провели индукцию экспрессии целевого гена 1 мМ ИПТГ в среде с канамицином, и во всех случаях наблюдали уровень накопления аспарагиназы, аналогичный исходному штамму с плазмидой рЕНД–ASN (данные не приводятся).

Таким образом, прекращение накопления клетками ферментативно активной аспарагиназы при периодическом культивировании

вызывалось не мутациями в плазмиде, а изменениями в бактериальных клетках. Сегрегационная стабилизация плазмид, в случае аспарагиназы, существенно увеличила время накопления целевого белка, однако не позволила получить штаммы-продуценты, постоянно накапливающие целевой белок при культивировании без канамицина вследствие возникновения изменений в бактериях-хозяевах.

Влияние расположения и ориентации элемента *hok/sok* на уровень биосинтеза целевых белков было также изучено для локализованных в цитоплазме бактерий белков НGH и NP, накапливающихся только в нерастворимой форме (НGH) или в частично растворимой форме (NP). При выращивании культур в среде 2х YT с канамицином и 1 мМ ИПТГ уровень биосинтеза NP и НGH снижался в 2–4 раза для всех вариантов плазмид с элементом *hok/sok* (рис. 3, а и б). При культивировании штаммов без канамицина при индукции экспрессии 1 мМ ИПТГ для NP общая продуктивность оставалась максимальной для контрольной плазмиды рЕТ28а–NP (рис. 3, в), а в случае НGH общая продуктивность была значительно выше для плазмиды рЕНУ–НGH, чем для контрольной плазмиды и других вариантов расположения элемента *hok/sok* (рис. 3, г). Все варианты плазмид с *hok/sok* сохранялись после 18 ч индукции, контрольная плаزمида сохранялась только у 33% клеток для НGH и менее 1% – для NP (рис. 3, д и е).

Таким образом, для трех различных сверхэкспрессируемых белков мы обнаружили, что токсин-антитоксиновый генетический элемент *hok/sok* поддерживает сегрегационную стабильность плазмид при любом положении относительно промотора целевого гена, однако увеличивает продуктивность бактерий только при определенном положении в плазмиде – downstream от целевого гена в случае аспарагиназы и upstream – в случае гормона роста человека.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на то что эффекты позиции элемента *hok/sok* и его ориентации в лабораторных плазмиде непосредственно не исследовались ранее, возможность влияния окружающих генов на функционирование цистронов *hok/sok* уже отмечалась. В частности, Gerdes et al. [31] было сделано предположение о том, что элемент *hok/sok* в составе плазмиды с индуцибельным промотором может быть окружен двумя терминаторами транскрипции и, таким образом, изолирован от влияния близкорасположенных генов.

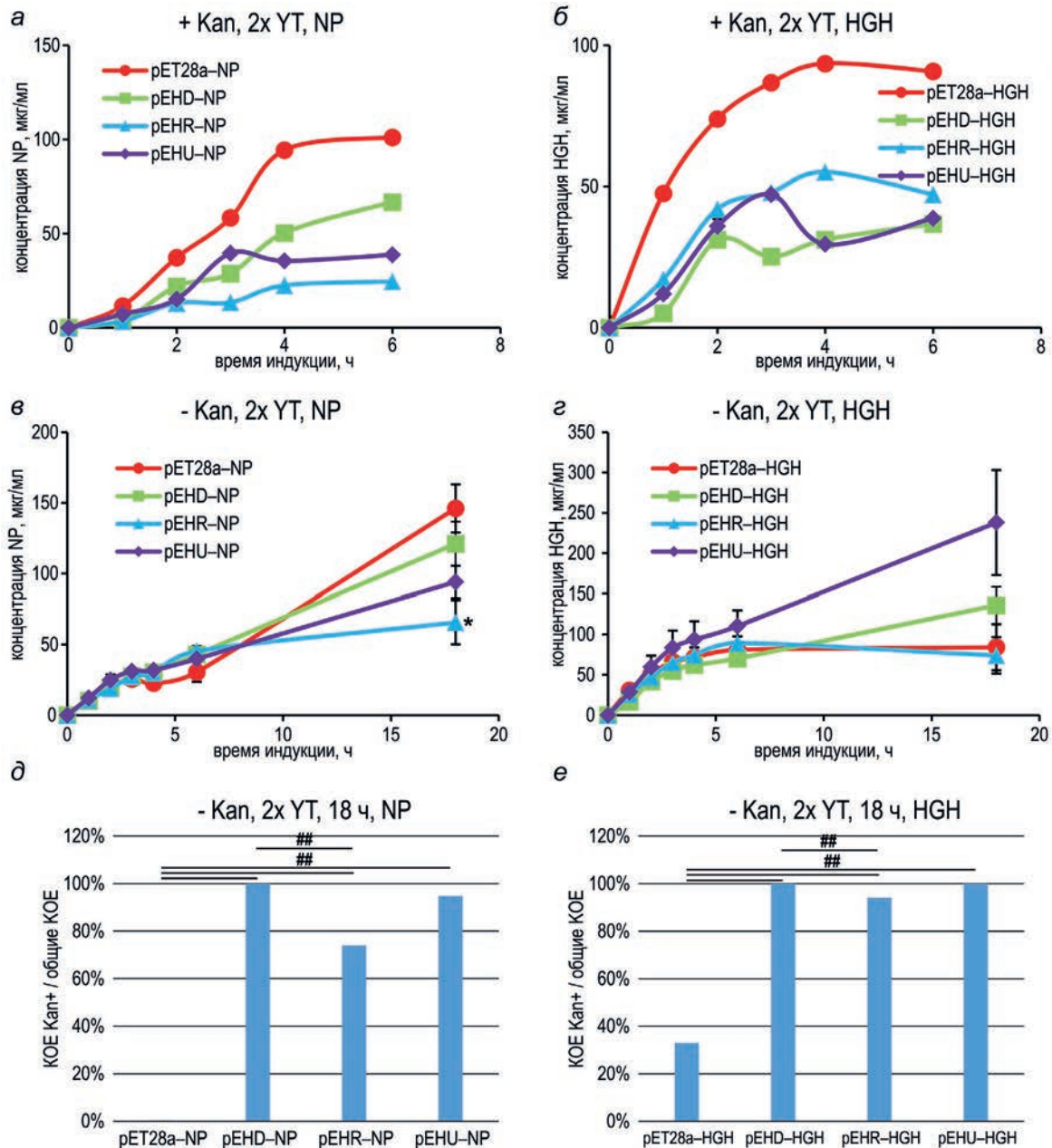


Рис. 3. Динамика накопления нуклеопротеина и гормона роста при культивировании штаммов в присутствии и при отсутствии канамицина. Концентрацию целевых белков измеряли денситометрией электрофорезграмм, условия культивирования обозначены над соответствующими панелями. *а, б* – Приведены данные одного репрезентативного эксперимента из трех. На панелях *в* и *г* планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям, $n = 2$, независимые биологические повторы. Для времени индукции 18 ч различия определяли с помощью однопараметрического дисперсионного анализа (ANOVA) с апостериорным критерием Тьюки; * $p < 0.05$. *д, е* – Определение числа КОЕ для культур, соответствующих точкам 18 ч для панелей *в* и *г*, не менее 16 колоний на каждой анализируемой чашке. В случае, когда для одного и того же образца количество колоний на чашках с антибиотиком превышало таковое на чашках без антибиотика, за 100% принимали отношение числа колоний на чашках с антибиотиком к числу колоний на чашках без антибиотика. Статистически значимые различия в долях канамицин-устойчивых колоний по критерию Пирсона (хи-квадрат) обозначены горизонтальными чертами; ## $P < 0,001$. Первичные данные приведены в Приложении 7

В ходе настоящего исследования было установлено, что элемент *hok/sok* сохраняет свою способность предотвращать сегрегацию плазмиды при расположении как *upstream*, так и *downstream* от гена целевого белка. Одновременно с этим мы обнаружили, что сама

по себе полная сегрегационная устойчивость плазмид с генами целевых белков недостаточна для поддержания высокого уровня биосинтеза соответствующих полипептидов при продолжительном культивировании без антибиотиков.

При культивировании бактерий в присутствии канамицина для плазмид с элементом *hok/sok* уровень биосинтеза периплазматического белка аспарагиназы не изменялся значимым образом, а уровни биосинтеза цитоплазматических целевых белков падали примерно вдвое по сравнению с контрольными плазмидами.

Количество аспарагиназы в основном повышается во временном диапазоне 6–35 ч. Возможно, волнообразное изменение количества аспарагиназы в течение первых 6 ч с прохождением через максимум в районе 2–3 ч может быть связано с адаптацией клеток к делению в присутствии в периплазме больших количеств аспарагиназы.

При культивировании бактерий без канамицина для всех тестовых белков наблюдали сильное падение продуктивности в случае контрольных плазмид и сохранение продуктивности для некоторых плазмид с элементом *hok/sok*. По-видимому, оптимальное положение и ориентация элемента *hok/sok* в плазмидах на основе рЕТ28 не универсальны, а должны быть подобраны под целевой белок, поскольку для трех исследованных в настоящей работе белков были выявлены разные варианты оптимальных плазмид: рЕНД и рЕНР – для аспарагиназы, рЕНД – для NP и рЕНУ – для нерастворимого НГН. Мы предполагаем, что уровень экспрессии мРНК токсина Нок оказывается максимален для плазмиды рЕНР при индукции целевого гена, минимален для рЕНД и не изменяется от базального уровня для плазмиды рЕНУ, вследствие чего при индукции экспрессии гена, кодирующего НГН, наибольшая продуктивность фиксируется для плазмиды рЕНУ, а в случае NP и ASN – для плазмиды рЕНД. Токсичность целевых белков для клетки может быть установлена как доля бактерий, сохраняющих контрольные плазмиды после индукции в среде без антибиотика. В случае НГН 33% клеток сохраняли плазмиду рЕТ28а–НГН, а плазмиды рЕТ28а–ASN и рЕТ28а–NP сохранялись у 2% и 0,3% клеток соответственно. Исходя из полученных данных можно заключить, что изначальные представления относительно токсичности указанных белков оказались неточными. Поскольку при длительном культивировании (18 ч индукции) плазмиды без *hok/sok* почти не сохраняются в случае NP и аспарагиназы, данные белки можно признать относительно токсичными. В случае НГН плазида без *hok/sok* сохраняется у 33% клеток, поэтому был сделан вывод о том, что этот белок менее токсичен для клеток.

Сходные выводы были сделаны при конструировании сегрегационно стабилизирован-

ных плазмид с элементом *hok/sok* [32] – вместо перемещения генетического элемента *hok/sok* в разные позиции экспрессионных конструкций авторы получили один вариант плазмиды рРНВ01, аналогичный рЕНР, констатировали токсичность такой плазмиды для бактерий вследствие избыточного уровня синтеза Нок и провели изоляцию элемента *hok/sok* от целевого оперона *phaCAB* при помощи дополнительного р-независимого терминатора транскрипции. При конструировании плазмиды, кодирующей ген *metL* под контролем промотора P_{tac}, также были рассмотрены 2 варианта размещения элемента *hok/sok* – до терминатора транскрипции целевого гена и после терминатора, ориентация элемента в обоих случаях аналогична рЕНР [33]. Только вариант плазмиды с перемещением элемента *hok/sok* за терминатор транскрипции целевого гена обеспечивал сохранение нормальной при выращивании штамма-продуцента L-гомосерина в ферментере без добавления антибиотиков. Следует также отметить, что другие варианты токсин-антитоксиновых элементов, например, использованный в работе Liao et al. [32] *alp7*, не демонстрируют необходимой сегрегационной стабилизации плазмид с промотором T7 целевого гена. По-видимому, элемент *hok/sok* на настоящий момент остается единственным вариантом обеспечения необходимой сегрегационной стабилизации плазмид семейства рЕТ для их промышленного культивирования без антибиотиков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обычно промышленное получение рекомбинантных белков для медицинского применения в *E. coli* предполагает использование сильных индуцибельных промоторов целевого гена и относительно небольшое время индукции. Для таких систем экспрессии генов 2-кратное повышение общего уровня биосинтеза целевого белка, достигаемое за счет введения в состав плазмиды небольших генетических локусов, представляет значительный практический интерес. Для случая хорошо изученной токсин-антитоксиновой системы *hok/sok* нами было обнаружено, что варьирование положения и ориентации *hok/sok* относительно целевого гена позволяет подобрать вариант сегрегационно стабилизированной плазмиды, сохраняющий продуктивность бактерий при их культивировании без антибиотиков в течение продолжительного времени индукции.

Разработанные нами плазмидные векторы рЕНД, рЕНД и рЕНУ могут быть использованы для получения в клетках *E. coli* различных рекомбинантных белков без применения антибиотиков.

Вклад авторов. И.И. Воробьев – концепция и руководство работой; Н.А. Орлова, Ю.А. Ходак, Р.Р. Шайфутдинов, Д.С. Хасанов – проведение экспериментов; И.И. Воробьев, Н.А. Орлова, Ю.А. Ходак – обсуждение результатов исследования; И.И. Воробьев, Н.А. Орлова – написание текста; Ю.А. Ходак – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена в рамках госзадания ФИЦ Биотехнологии РАН.

Благодарности. Л.А. Усакину, В.О. Шендер (ИБХ РАН); А.А. Пискаревой (МГУ имени Ломоносова).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistry.moscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Collins, T., Azevedo-Silva, J., da Costa, A., Branca, F., Machado, R., and Casal, M. (2013) Batch production of a silk-elastin-like protein in *E. coli* BL21(DE3): key parameters for optimisation, *Microb. Cell Fact.*, **12**, 21, doi: 10.1186/1475-2859-12-21.
- Pandey, D. P., and Gerdes, K. (2005) Toxin–antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes, *Nucleic Acids Res.*, **33**, 966–976, doi: 10.1093/nar/gki201.
- Gerdes, K., Rasmussen, P. B., and Molin, S. (1986) Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 3116–3120, doi: 10.1073/pnas.83.10.3116.
- Lehnherr, H., Maguin, E., Jafri, S., and Yarmolinsky, M. B. (1993) Plasmid addiction genes of bacteriophage P1: doc, which causes cell death on curing of prophage, and phd, which prevents host death when prophage is retained, *J. Mol. Biol.*, **233**, 414–428, doi: 10.1006/jmbi.1993.1521.
- Singh, G., Yadav, M., Ghosh, C., and Rathore, J. S. (2021) Bacterial toxin-antitoxin modules: classification, functions, and association with persistence, *Curr. Res. Microb. Sci.*, **2**, 100047, doi: 10.1016/j.crmicr.2021.100047.
- Van Melderen, L., Thi, M. H., Lecchi, P., Gottesman, S., Couturier, M., and Maurizi, M. R. (1996) ATP-dependent degradation of CcdA by Lon protease. Effects of secondary structure and heterologous subunit interactions, *J. Biol. Chem.*, **271**, 27730–27738, doi: 10.1074/jbc.271.44.27730.
- Michel, B. (2005) After 30 years of study, the bacterial SOS response still surprises us, *PLoS Biol.*, **3**, e255, doi: 10.1371/journal.pbio.0030255.
- Fineran, P. C., Blower, T. R., Foulds, I. J., Humphreys, D. P., Lilley, K. S., and Salmond, G. P. (2009) The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 894–899, doi: 10.1073/pnas.0808832106.
- Jankevicius, G., Ariza, A., Ahel, M., and Ahel, I. (2016) The toxin-antitoxin system DarTG catalyzes reversible ADP-ribosylation of DNA, *Mol. Cell*, **64**, 1109–1116, doi: 10.1016/j.molcel.2016.11.014.
- Wang, X., Lord, D. M., Hong, S. H., Peti, W., Benedik, M. J., Page, R., and Wood, T. K. (2013) Type II toxin/antitoxin MqsR/MqsA controls type V toxin/antitoxin GhoT/GhoS, *Environ. Microbiol.*, **15**, 1734–1744, doi: 10.1111/1462-2920.12063.
- Aakre, C. D., Phung, T. N., Huang, D., and Laub, M. T. (2013) A bacterial toxin inhibits DNA replication elongation through a direct interaction with the beta sliding clamp, *Mol. Cell*, **52**, 617–628, doi: 10.1016/j.molcel.2013.10.014.
- Wang, X., Yao, J., Sun, Y. C., and Wood, T. K. (2021) Type VII toxin/antitoxin classification system for antitoxins that enzymatically neutralize toxins, *Trends Microbiol.*, **29**, 388–393, doi: 10.1016/j.tim.2020.12.001.
- Choi, J. S., Kim, W., Suk, S., Park, H., Bak, G., Yoon, J., and Lee, Y. (2018) The small RNA, SdsR, acts as a novel type of toxin in *Escherichia coli*, *RNA Biol.*, **15**, 1319–1335, doi: 10.1080/15476286.2018.1532252.
- Gerdes, K., and Maisonneuve, E. (2012) Bacterial persistence and toxin-antitoxin loci, *Annu. Rev. Microbiol.*, **66**, 103–123, doi: 10.1146/annurev-micro-092611-150159.
- Yamaguchi, Y., and Inouye, M. (2011) Regulation of growth and death in *Escherichia coli* by toxin-antitoxin systems, *Nat. Rev. Microbiol.*, **9**, 779–790, doi: 10.1038/nrmicro2651.
- Gerdes, K., Larsen, J. E., and Molin, S. (1985) Stable inheritance of plasmid R1 requires two different loci, *J. Bacteriol.*, **161**, 292–298, doi: 10.1128/JB.161.1.292-298.1985.
- Pecota, D. C., Osapay, G., Selsted, M. E., and Wood, T. K. (2003) Antimicrobial properties of the *Escherichia*

- coli* R1 plasmid host killing peptide, *J. Biotechnol.*, **100**, 1-12, doi: 10.1016/s0168-1656(02)00240-7.
18. Gerdes, K. (2016) Hypothesis: type I toxin-antitoxin genes enter the persistence field—a feedback mechanism explaining membrane homeostasis, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **371**, 20160189, doi: 10.1098/rstb.2016.0189.
 19. Unterholzner, S. J., Poppenberger, B., and Rozhon, W. (2013) Toxin-antitoxin systems: Biology, identification, and application, *Mob. Genet. Elements*, **3**, e26219, doi: 10.4161/mge.26219.
 20. Van Melderen, L. (2010) Toxin-antitoxin systems: why so many, what for? *Curr. Opin. Microbiol.*, **13**, 781-785, doi: 10.1016/j.mib.2010.10.006.
 21. Pedersen, K., and Gerdes, K. (1999) Multiple hok genes on the chromosome of *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.*, **32**, 1090-1102, doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01431.x.
 22. Pedersen, K., Christensen, S. K., and Gerdes, K. (2002) Rapid induction and reversal of a bacteriostatic condition by controlled expression of toxins and antitoxins, *Mol. Microbiol.*, **45**, 501-510, doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03027.x.
 23. Wilmaerts, D., Dewachter, L., De Loose, P. J., Bollen, C., Verstraeten, N., and Michiels, J. (2019) HokB monomerization and membrane repolarization control persister awakening, *Mol. Cell*, **75**, 1031-1042.e4, doi: 10.1016/j.molcel.2019.06.015.
 24. Chukwudi, C. U., and Good, L. (2015) The role of the *hok/sok* locus in bacterial response to stressful growth conditions, *Microb. Pathog.*, **79**, 70-79, doi: 10.1016/j.micpath.2015.01.009.
 25. Pecota, D. C., Kim, C. S., Wu, K., Gerdes, K., and Wood, T. K. (1997) Combining the hok/sok, parDE, and pnd postsegregational killer loci to enhance plasmid stability, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 1917-1924, doi: 10.1128/AEM.63.5.1917-1924.1997.
 26. De Moerlooze, L., Struman, I., Renard, A., and Martial, J. A. (1992) Stabilization of T7-promoter-based pARHS expression vectors using the parB locus, *Gene*, **119**, 91-93, doi: 10.1016/0378-1119(92)90070-6.
 27. Mishima, N., Mizumoto, K., Iwasaki, Y., Nakano, H., and Yamane, T. (1997) Insertion of stabilizing loci in vectors of T7 RNA polymerase-mediated *Escherichia coli* expression systems: a case study on the plasmids involving foreign phospholipase D gene, *Biotechnol. Prog.*, **13**, 864-868, doi: 10.1021/bp970084o.
 28. Galen, J. E., Nair, J., Wang, J. Y., Wasserman, S. S., Tanner, M. K., Sztejn, M. B., and Levine, M. M. (1999) Optimization of plasmid maintenance in the attenuated live vector vaccine strain *Salmonella typhi* CVD 908-htrA, *Infect. Immun.*, **67**, 6424-6433, doi: 10.1128/IAI.67.12.6424-6433.1999.
 29. Morin, C. E., and Kaper, J. B. (2009) Use of stabilized luciferase-expressing plasmids to examine *in vivo*-induced promoters in the *Vibrio cholerae* vaccine strain CVD 103-HgR, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **57**, 69-79, doi: 10.1111/j.1574-695X.2009.00580.x.
 30. Kolesov, D. E., Sinegubova, M. V., Safenkova, I. V., Vorobiev, I. I., and Orlova, N. A. (2022) Antigenic properties of the SARS-CoV-2 nucleoprotein are altered by the RNA admixture, *PeerJ*, **10**, e12751, doi: 10.7717/peerj.12751.
 31. Gerdes, K., Jacobsen, J. S., and Franch, T. (1997). Plasmid Stabilization by Post-Segregational Killing, in *Genetic Engineering* (Setlow, J. K., ed), Vol. 19, Springer, Boston, MA, doi: 10.1007/978-1-4615-5925-2_3.
 32. Liao, Y. C., Saengsawang, B., Chen, J. W., Zhuo, X. Z., and Li, S. Y. (2022) Construction of an antibiotic-free vector and its application in the metabolic engineering of *Escherichia coli* for polyhydroxybutyrate production, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **10**, 837944, doi: 10.3389/fbioe.2022.837944.
 33. Sun, B. Y., Wang, F. Q., Zhao, J., Tao, X. Y., Liu, M., and Wei, D. Z. (2023) Engineering *Escherichia coli* for l-homoserine production, *J. Basic Microbiol.*, **63**, 168-178, doi: 10.1002/jobm.202200488.

LOCATION AND ORIENTATION OF THE GENETIC TOXIN-ANTITOXIN ELEMENT *hok/sok* IN THE PLASMID AFFECTS THE EXPRESSION LEVEL OF PHARMACEUTICALLY SIGNIFICANT PROTEINS

Yu. A. Khodak, R. R. Shaifutdinov, D. S. Khasanov, N. A. Orlova, and I. I. Vorobiev*

*Institute of Bioengineering, FRC Biotechnology, Russian Academy of Sciences,
117312 Moscow, Russia; e-mail: ptichman@gmail.com*

The genetic toxin-antitoxin element *hok/sok* from the natural *Escherichia coli* R1 plasmid ensures the segregation stability of the plasmids. Bacterial cells that have lost all copies of the plasmid encoding the short-lived antitoxin die under the action of the long-lived toxin. The *hok/sok* element in vector plasmids for bacterial expression can increase the productive time of biosynthesis of recombinant proteins, slowing

down the accumulation of non-producing cells lacking the target plasmid in the population. In this work, we studied various variants of the position and orientation of the *hok/sok* element in the standard plasmid pET28a with the inducible T7lac promoter and the kanamycin resistance gene. It was found that the *hok/sok* element retained functional activity regardless of location on the plasmid and orientation, bacterial cells retained *hok/sok* plasmids after four days of cultivation without antibiotics and lost the control plasmid without this element. Using the example of three target proteins – *E. coli* type II asparaginase, human growth hormone, and the SARS-CoV-2 virus nucleoprotein, it was demonstrated that for cytoplasmic target proteins, the maximum productivity of bacteria is maintained only when the *hok/sok* element is located on the plasmid upstream of the target gene promoter. In the case of periplasmic localization of the protein, the productivity of bacteria decreases for all variants of the *hok/sok* location during cultivation with an antibiotic, and in the case of periodic cultivation of bacteria without an antibiotic, productivity is also better preserved when the *hok/sok* element is located upstream of the target gene promoter. This variant of the pEHU vector plasmid makes it possible to more than double the biosynthesis of human growth hormone, which is insoluble in the cytoplasm of bacteria, when bacteria are cultivated without antibiotics, and also to maintain asparaginase biosynthesis during periodic cultivation without antibiotics for four days at a level of at least 10 mg/liter. The developed segregation-stabilized plasmid vector can be used to obtain various recombinant proteins in *E. coli* cells without the use of antibiotics.

Keywords: heterologous expression of recombinant proteins, toxin-antitoxin systems, asparaginase, nucleoprotein, somatotropin

РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА *Komagataella phaffii* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas9 ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЗМАРКЕРНОГО ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА ФИТАЗЫ

© 2023 А.А. Ткаченко*, Л.Н. Борщевская, С.П. Синеокий, Т.Л. Гордеева

НИЦ «Курчатовский институт»,
117545 Москва, Россия; электронная почта: artur.tka4enko10@gmail.com

Поступила в редакцию 19.04.2023

После доработки 19.04.2023

Принята к публикации 19.05.2023

На основе штамма *Komagataella phaffii* ВКПМ Y-4287 с высоким экспрессионным потенциалом с использованием системы CRISPR/Cas9 были разработаны штаммы-реципиенты *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 (фенотип His⁻) и *K. phaffii* ВКПМ Y-5014 (фенотип Leu⁻), позволяющие на их основе получать безмаркерные штаммы-продуценты гетерологичных белков. Эффективность инактивации генов с использованием различных вариантов гидовых РНК (sgРНК) составила 65–98% для гена *HIS4* и 15–72% – для гена *LEU2*. Было показано, что полученные штаммы-реципиенты сохранили ростовые характеристики, присущие родительскому штамму *K. Phaffii* ВКПМ Y-4287, и высокий экспрессионный потенциал, оцененный по уровню продукции гетерологичного фермента фитазы из *Citrobacter gillenii*. Средняя продуктивность трансформантов, полученных на основе штаммов *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 и *K. phaffii* ВКПМ Y-5014, была в 2,1 и 2,0 раза выше продуктивности трансформантов, полученных на основе коммерческого штамма *K. phaffii* GS115 соответственно. Предложен способ последовательной интеграции экспрессионной кассеты в геном штамма-реципиента *K. phaffii* ВКПМ Y-5013, и получен высокоэффективный многокопийный безмаркерный штамм-продуцент фитазы *C. gillenii*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: CRISPR/Cas9, *Komagataella phaffii*, геномное редактирование, фитаза, *Citrobacter gillenii*.

DOI: 10.31857/S0320972523090130, EDN: WUVMUH

ВВЕДЕНИЕ

Фитазы (мио-инозитол-1,2,3,4,5,6-гексакисфосфат фосфогидролазы, ЕС 3.1.3.8 и 3.1.3.26) – ценные промышленные ферменты, широко применяющиеся в качестве кормовых добавок к комбикормам сельскохозяйственных животных и рыб.

Создание современных ферментных препаратов, содержащих фитазы, основано на использовании промышленных рекомбинантных штаммов-продуцентов. Наиболее привлекательным объектом для создания штаммов-продуцентов рекомбинантных белков являются мейотрофные дрожжи *Komagataella phaffii* благодаря их биобезопасности, легкости молекулярно-генетических манипуляций, мощным системам экспрессии генов и секреции

рекомбинантных белков, способности достигать высоких плотностей клеток при культивировании в минимальных средах [1]. В *K. phaffii* были экспрессированы фитазы таких микроорганизмов, как *Escherichia coli*, *Yersinia intermedia*, *Peniophora lycii*, *Shigella* sp. CD2, *Citrobacter freundii* и др. [2–6]. Однако применение в России зарубежных штаммов-реципиентов *K. phaffii* в коммерческих целях ограничено политикой распространения материала [7].

Для получения штаммов-продуцентов гетерологичных белков на основе прототрофных штаммов необходимо использование экспрессионных кассет, содержащих гены устойчивости к антибиотикам в качестве селективных маркеров. Отбор целевых антибиотикорезистентных штаммов требует добавления этих токсичных соединений в питательные среды,

Принятые сокращения: КЖ – культуральная жидкость; sgРНК – single guide РНК (единая направляющая, или гидовая РНК); РАМ – protospacer adjacent motif (мотив, расположенный рядом с протоспейсером).

* Адресат для корреспонденции.

что может негативно влиять на их клеточную функцию [8]. Кроме того, в промышленных биотехнологических производствах существуют ограничения на использование генов устойчивости к антибиотикам в штаммах-продуцентах с целью предотвращения их возможного нежелательного распространения среди микроорганизмов окружающей среды.

Таким образом, получение и использование в биотехнологическом производстве безмаркерных штаммов-продуцентов гетерологичных белков является актуальным и практически значимым.

Одним из подходов к получению многокопийных безмаркерных дрожжевых штаммов является использование систем сайт-специфической рекомбинации [9]. Существуют способы удаления селективных маркеров с использованием различных систем, например, Cre/loxP, FLP/FRT и др. Однако удаление фланкированных специфическими сайтами генетических элементов (селективных маркеров) с помощью таких систем в значительной мере является трудоемким и времязатратным процессом.

Еще одним подходом является получение штаммов-продуцентов на основе ауксотрофных штаммов с использованием экспрессионных кассет, содержащих селективные маркеры, способные восстанавливать прототрофность. Однако при таком подходе исключается возможность повторной многократной интеграции. Ауксотрофные штаммы возможно получить либо с помощью неспецифического мутагенеза, как в случае коммерческого штамма-реципиента *K. phaffii* GS115 [10], либо путем делеции целевого гена с использованием механизма гомологичной рекомбинации. Применение неспецифического мутагенеза часто негативно сказывается на физиологических характеристиках штамма-реципиента, а процесс скрининга целевых мутантов является весьма трудоемким [11]. Использование же механизма гомологичной рекомбинации для получения ауксотрофных штаммов осложняется низкой вероятностью данного события в дрожжах *K. phaffii* [12, 13].

В настоящее время для редактирования генома *K. phaffii* и других организмов успешно применяется система CRISPR/Cas9, основанная на РНК-направляемых ДНК-нуклеазах [14]. Несмотря на ее относительно недавнее появление, эта система уже зарекомендовала себя как точный и высокоэффективный инструмент геномной инженерии. По сравнению с таргетными системами геномного редактирования на основе химерных

нуклеаз, такими как ZNF (Zink Finger Nucleases) и TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases), система CRISPR/Cas9 имеет ряд преимуществ, а также является более эффективной, простой и удобной платформой для прицельного геномного редактирования [15, 16].

Ранее нами был описан прототрофный штамм *K. phaffii* ВКПМ Y-4287 с высоким экспрессионным потенциалом [17] и фитаза *Citrobacter gillenii*, обладающая промышленно-ценными характеристиками [18].

Целью настоящей работы явилась разработка штаммов-реципиентов на основе *K. phaffii* ВКПМ Y-4287 с неизменными ростовыми характеристиками и экспрессионным потенциалом с использованием высокоспецифичной системы CRISPR/Cas9, а также возможность осуществления последовательного введения генетического материала в хромосому реципиента для получения многокопийного штамма-продуцента фитазы *C. gillenii*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы. Триптон, пептон, дрожжевой экстракт, глюкоза, L-лейцин, L-гистидин были получены от компании «Диа-М» (Россия); все ферменты для молекулярных работ – от фирмы «Fermentas» (Литва); фитат натрия («Sigma-Aldrich», США); соли и другие реагенты (все реактивы отечественного производства марки «х.ч.» или «ч.д.а.») – от фирмы «Химмед» (Россия).

Штаммы и среды. Для стандартных генно-инженерных работ (конструирование плазмид, наработка плазмидной ДНК) использовали штамм *E. coli* XL-1 Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tet^r)*]) ВКПМ В-5667. Культуру растили при 37 °С в среде LB, г/литр: триптон – 10; дрожжевой экстракт – 5; NaCl – 10; если необходимо, добавляли ампициллин или канамицин («Sigma-Aldrich») в концентрации 100 мкг/мл или 50 мкг/мл соответственно.

Штаммы *K. phaffii* GS115 (*his4⁻*) ВКПМ Y-2837 и *K. phaffii* ВКПМ Y-4287 были получены из Биоресурсного Центра Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов (БРЦ ВКПМ). Культуру дрожжей *K. phaffii* растили при 30 °С на среде YPD, г/литр: пептон – 10; дрожжевой экстракт – 10; глюкоза – 20.

Селекцию трансформантов с инактивированным геном *HIS4* или *LEU2* проводили по способности к росту на минимальной среде

без содержания аминокислот YNB («Himedia», Индия) с добавлением и без добавления в среду гистидина или лейцина в концентрации 50 мкг/мл. В качестве источника углерода в среду добавляли глюкозу в количестве 2 мас. %.

Отбор трансформантов, несущих в составе хромосомы ген фитазы из бактерий *C. gillanii*, осуществляли с использованием среды YNB.

Селекцию трансформантов, содержащих автономно реплицирующиеся плазмиды с различными вариантами гидовых РНК (sgРНК), проводили на агаризованной среде YPD с добавлением селективного агента генетицина (G418) («Thermo Scientific», США) в количестве 600 мкг/мл.

Все плотные среды содержали агар в концентрации 20 г/литр.

Конструирование sgРНК. Дизайн sgРНК, состоящих из последовательностей, кодирующих рибозим Hammerhead (НН), транс-активирующей РНК (tracrРНК), рибозим Hepatitis Delta Virus (HDV) и варибельных спейсерных последовательностей, осуществляли как описано в работе Gao и Zhao [19]. Последовательности НН, tracrРНК и HDV приведены в работе Gao и Zhao [19]. Подбор спейсерных последовательностей и мотивов, расположенных рядом с протоспейсерами (РАМ), осуществляли с использованием онлайн-инструмента E-CRISPR [20]. Чтобы исключить внесение возможных нецелевых мутаций («off-target-эффектов»), проводили гомологичное выравнивание подобранных нуклеотидных последовательностей спейсеров с геномом *Pichia pastoris* (*K. phaffii*) CBS7435 с использованием программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). В случае если последовательность спейсера встречалась в геноме более одного раза (при 100% гомологии с целевым локусом), она не использовалась.

Для исследования были выбраны по 3 спейсерные последовательности для нацеливания sgРНК на гены *HIS4* и *LEU2* (табл. 1).

Фрагменты ДНК, кодирующие sgРНК, были синтезированы в компании «Евроген» (Россия). На 5'- и 3'-концах нуклеотидных последовательностей были предусмотрены сайты рестрикции *BpiI*.

Конструирование плазмид с sgРНК, и получение ауксотрофных штаммов *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 и *K. phaffii* ВКПМ Y-5014. Автономно реплицирующиеся экспрессионные плазмиды с sgРНК для инактивации генов *HIS4* и *LEU2* конструировали на основе экспрессионного вектора BB3cK_pGAP_23*_pTEF_Cas9 («Addgene», США) [21]. Фрагменты ДНК, кодирующие sgРНК, клонировали в вектор BB3cK_pGAP_23*_pTEF_Cas9 по сайтам *BpiI*.

В результате были получены следующие плазмиды:

pGAP-sgRNA1_his4-pTEF-Cas9-Km,
pGAP-sgRNA2_his4-pTEF-Cas9-Km,
pGAP-sgRNA3_his4-pTEF-Cas9-Km – для инактивации гена *HIS4* и

pGAP-sgRNA1_leu2-pTEF-Cas9-Km,
pGAP-sgRNA2_leu2-pTEF-Cas9-Km,
pGAP-sgRNA3_leu2-pTEF-Cas9-Km – для инактивации гена *LEU2*. Корректность плазмид была подтверждена с помощью рестриционного анализа и секвенированием (данные не приведены).

Плазмиды трансформировали в штамм *K. phaffii* ВКПМ Y-4287 методом электропорации, как описано ранее [22]. Селекцию трансформантов проводили на агаризованной среде YPD с добавлением генетицина в течение 3-х суток при температуре 30 °С. Для инактивации генов *HIS4* и *LEU2* отобранные трансформанты пересевали 2 раза на среде YPD с добавлением генетицина.

Таблица 1. Нуклеотидный состав спейсерных и РАМ-последовательностей

	sgРНК	Спейсерные последовательности (5'→3')	РАМ-последовательности (5'→3')
<i>HIS4</i>	sgРНК1_his4 (1074–1093 п.н.)	GTACGGTGTGACGTTGGACG	AGG
	sgРНК2_his4 (1591–1610 п.н.)	GTTGGCCTCTATATTCCTGG	TGG
	sgРНК3_his4 (1690–1709 п.н.)	GCACTCCACCTAAGAAGGA	TGG
<i>LEU2</i>	sgРНК1_leu2 (430–449 п.н.)	GTTGTTTCGTGAGCTTGTAGG	CGG
	sgРНК2_leu2 (283–302 п.н.)	GGTGATGTCAGACCAGAACA	AGG
	sgРНК3_leu2 (872–891 п.н.)	GCAAGGCTCGTACAGTCCAA	AGG

Селекцию трансформантов с инактивированным геном *HIS4* или *LEU2* проводили по способности к росту на среде YNB с добавлением и без добавления в среду гистидина или лейцина в концентрации 50 мкг/мл. Отбирали штаммы, являющиеся ауксотрофными по гистидину или лейцину.

Выщепление автономно реплицирующихся плазмид из дрожжевых клеток проводили путем культивирования штаммов в жидкой питательной среде YPD при 30 °С и 250 об./мин в течение 48 ч. Далее клетки высевали на агаризованную среду YPD и инкубировали в течение 48 ч при 30 °С. Полученные колонии реплицировали на чашки со средой YPD с добавлением и без добавления генетицина. Отбирали клоны, не способные к росту на среде с генетицином.

Эффективность инактивации генов *HIS4* и *LEU2* с использованием различных sgРНК определяли по отношению количества трансформантов, не способных к росту на среде YNB без добавления в среду гистидина или лейцина, к общему количеству трансформантов.

Был получен штамм *K. phaffii* ВКПМ Y-5013, ауксотрофный по гистидину, и штамм *K. phaffii* ВКПМ Y-5014, ауксотрофный по лейцину.

Секвенирование области гена *HIS4* в штамме *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 и гена *LEU2* в штамме *K. phaffii* ВКПМ Y-5014 осуществляли с использованием праймеров His-F и His-R (для фрагмента гена *HIS4*), LEU2-F и LEU2-R1 (для фрагмента гена *LEU2*). Последовательности праймеров представлены в табл. 2.

Конструирование экспрессионной интегративной плазмиды рАОХ-PhyCg-ор-LEU2. Для конструирования плазмиды рАОХ-PhyCg-ор-LEU2 использовали полученную ранее плазмиду рPIC9-PhyCg-ор [18], содержащую в своем составе ген *phyCg-ор*, кодирующий фитазу *C. gillanii*, встроенный в единую рамку считывания с нуклеотидной последовательностью сигнального пептида α -фактора *Saccharomyces cerevisiae*, под контролем индуцибельного промотора АОХ1, терминатор транскрипции ТТАОХ1 и дрожжевой селективный маркер РрHIS4. В плазмиде рPIC9-PhyCg-ор селективный маркер РрHIS4 заменяли на селективный маркер РрLEU2, комплементирующий у дрожжей *K. phaffii* мутацию в гене *LEU2*. Ген *LEU2* с его регуляторной областью синтезировали методом ПЦР, используя в качестве матрицы геномную ДНК дрожжей *K. phaffii* ВКПМ Y-4287 и специфические праймеры LEU2-F и LEU2-R (табл. 2). На 5'- и 3'-концах

Таблица 2. Праймеры и зонды, использованные в работе

Название	Последовательность (5'→3')
LEU2-F	gattgtagtttacctctgccca
LEU2-R	ctagtttttcaaaatg
PhyCg-ор-F	gacgaacaatctggtatgcaatt
PhyCg-ор-R	ttacttttcagcacattcgcct
His-F	ttaaataagtcaccagtttc
His-R	acttattttattttgcattag
LEU2-R1	ctttcaatggggagagcct
GAPref-F	tttccagagctgacatcaaggt
GAPref-R	cttgtaagccttgggtagagt
GAP-X	(ROX)-atcaacgaccattcattgctccaga-(BHQ2)
PHYref-F	ccaaagaactagaagactgg
PHYref-R	tggtcagacttagactgt
PHY-X	(FAM)-tggtttggctccaaagtgaaggt-(RTQ1)

нуклеотидной последовательности были предусмотрены сайты рестрикции *PaeI* и *NheI* для клонирования в вектор рPIC9-PhyCg-ор.

В результате была получена экспрессионная плаزمида рАОХ-PhyCg-ор-LEU2. Рестрикционный анализ и секвенирование показали, что плазмиды сконструированы корректно (данные не приведены).

Выделение геномной ДНК проводили с использованием комплекта реагентов для экспресс-выделения ДНК «ДНК-экспресс» («Синтол», Россия). Выделение и очистку ПЦР-продуктов проводили с использованием набора GeneJET Gel Extraction Kit #K0692 («Thermo Scientific»). Все стандартные генно-инженерные манипуляции (обработка ДНК ферментами, лигирование, трансформация клеток *E. coli*) проводили в соответствии со сборником методик [23].

Получение трансформантов штаммов *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 и *K. phaffii* ВКПМ Y-5014, продуцирующих фитазу *C. gillanii*. Плазмиды рPIC9-PhyCg-ор и рАОХ-PhyCg-ор-LEU2 лианеризовали эндонуклеазой рестрикции BglII, получали экспрессионные кассеты рCIT-His и рCIT-Leu, которые трансформировали в

клетки штаммов *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 и *K. phaffii* ВКПМ Y-5014 методом электропорации, как описано ранее [22]. Трансформанты отбирали по способности расти на среде YNB без добавления гистидина или лейцина.

Наличие интегративной кассеты в составе хромосомы трансформантов штаммов *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 и *K. phaffii* ВКПМ Y-5014 определяли методом ПЦР с использованием праймеров PhyCg-op-F и PhyCg-op-R (табл. 2).

Условия ферментации дрожжевых штаммов. Трансформанты культивировали следующим образом. Посевную культуру (инокулят) получали выращиванием трансформантов в течение 24 ч при 30 °C и 250 об./мин в жидкой питательной среде YPD. Затем ауксотрофные штаммы засеивали инокулятом в соотношении 1/10 в среду YPD, а восстановившие прототрофность трансформанты засеивали инокулятом в том же соотношении в среду YNB и выращивали при 30 °C в течение 24 ч при 250 об./мин. Далее проводили культивирование в течение 48 ч, добавляя метанол в количестве 1% от объема культуральной жидкости (КЖ) каждые 24 ч. После ферментации отбирали аликвоту, КЖ центрифугировали при 14 000 g в течение 5 мин на центрифуге MiniSpin («Eppendorf», Германия) и проводили анализ супернатанта на наличие фитазной активности.

Определение фитазной активности проводили с помощью модифицированного метода Фиске–Субарроу [24], как описано в работе Tkachenko et al. [18].

При исследовании ростовых характеристик ночные культуры исследуемых штаммов инокулировали с начальным поглощением A_{600} 0,1 в жидкую среду YPD и растили в течение 24 ч. Поглощение КЖ измеряли на спектрофотометре VersaMax Microplate Reader («Molecular Devices», США). Все измерения проводили в трех независимых повторях.

Последовательное введение экспрессионной кассеты в хромосому штамма *K. phaffii* ВКПМ Y-5013. В ауксотрофный штамм методом электропорации трансформировали экспрессионную кассету pCIT-His. Трансформанты отбирали по способности расти на среде YNB без добавления гистидина. Ферментацию отобранных трансформантов проводили, как описано выше. После ферментации клетки осаждали центрифугированием, супернатанты анализировали на наличие фитазной активности. По результатам ферментации отбирали наиболее продуктивный трансформант *K. phaffii* Y-5013/PHF1.

Инактивацию гена *HIS4* в штамме *K. phaffii* Y-5013/PHF1 осуществляли, как описано выше. Полученные ауксотрофные трансформанты культивировали, измеряли фитазную активность в КЖ и отбирали трансформант, в котором не произошло изменение уровня продукции фермента по сравнению с родительским штаммом *K. phaffii* Y-5013/PHF1.

В клетки штамма Y-5013/PHF1 Δ his4 повторно трансформировали экспрессионную кассету pCIT-His и отбирали трансформанты на среде YNB без добавления гистидина. Ферментацию отобранных трансформантов проводили, как описано выше, оценивали уровень продукции фитазы и отбирали наиболее продуктивный трансформант. Таким образом, был получен многокопийный безмаркерный штамм *K. phaffii* Y-5013/PHF2X.

Определение относительного числа копий гена *phyCg-op*. Относительное количество копий гена *phyCg-op*, кодирующего фитазу *C. gillanii*, в геномах дрожжевых штаммов определяли при помощи ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) на приборе АНК-32 (Институт аналитического приборостроения РАН, Москва) методом Δ Ct [25]. Рассчитывали разницу между значениями Ct референсного гена *GAP*, представленного в геноме в одной копии [26], и исследуемого гена. Для референсного гена были синтезированы праймеры GAPref-F, GAPref-R и зонд GAP-X, меченный флуорофором ROX и гасителем флуоресценции ВНQ-2; для гена *phyCg-op* – PHYref-F, PHYref-R, а также зонд PHY-X, меченный флуорофором FAM и гасителем флуоресценции RTQ-1. Последовательности праймеров приведены в табл. 2. Для проведения ПЦР-РВ использовали набор реактивов ПЦР-Микс («Синтол»). В реакционную смесь вносили по 5 пМ каждого праймера и зонда, 2 мкл матрицы; общий объем реакционной смеси доводили до 25 мкл ddH₂O. В качестве матрицы использовали хромосомную ДНК штаммов *K. phaffii* Y-5013/PHF1 и *K. phaffii* Y-5013/PHF2X. ПЦР-РВ проводили по следующей программе: первоначальное плавление цепей ДНК при 95 °C в течение 300 с; далее 37 циклов: 95 °C – 15 с, 60 °C – 40 с. ПЦР проводили в трех независимых повторях. Относительное количество продукта, образовавшегося в процессе ПЦР, рассчитывали по формуле: $P \sim (1 + E)^n$, где P – относительное количество продукта, E – средняя эффективность цикла, n – число циклов. Специфичность ампликонов была подтверждена путем анализа кривой плавления после 30 циклов и электрофореза в агарозном геле.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение ауксотрофных штаммов *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 и *K. phaffii* ВКПМ Y-5014. Ауксотрофные штаммы получали путем инактивации гена *HIS4* или гена *LEU2* в хромосоме штамма *K. phaffii* Y-4287 с помощью системы CRISPR/Cas9.

Для успешного геномного редактирования исследуемого штамма и исключения нецелевых мутаций необходим рациональный дизайн sgРНК. Кроме того, эффективная sgРНК должна одновременно демонстрировать наивысшую целевую эффективность и наименьшую нецелевую активность. Поскольку фактическая эффективность sgРНК может различаться, для исследования были разработаны по 3 варианта sgРНК с различными спейсерными последовательностями, нацеленные на разные участки генов *HIS4* и *LEU2*. Содержание GC-пар в спейсерных последовательностях составляло 50–60%, так как в работе Wong et al. [27] было показано, что высокое и низкое содержание GC-пар в спейсерной последовательности характерно для нефункциональных sgРНК. Последовательности спейсеров приведены в табл. 1.

Преимуществом нацеливания sgРНК на последовательности генов, кодирующих ферменты биосинтеза аминокислот, является простое и надежное подтверждение инактивации этих генов, основанное на способности полученных штаммов к росту на минимальной среде.

Для инактивации генов *HIS4* и *LEU2* были сконструированы автономно реплицирующиеся плазмиды pGAP-sgRNA1_his4-pTEF-Cas9-Km,

pGAP-sgRNA2_his4-pTEF-Cas9-Km, pGAP-sgRNA3_his4-pTEF-Cas9-Km, pGAP-sgRNA1_leu2-pTEF-Cas9-Km, pGAP-sgRNA2_leu2-pTEF-Cas9-Km и pGAP-sgRNA3_leu2-pTEF-Cas9-Km, содержащие различные варианты sgРНК под контролем GAP-промотора, а также оптимизированную последовательность гена *cas9* из *Streptococcus pyogenes*, встроенную в единую рамку считывания с нуклеотидной последовательностью сигнала ядерной локализации большого Т-антигена SV40, под контролем дрожжевого TEF-промотора и CYC1-терминатора.

Плазмиды трансформировали в штамм *K. phaffii* ВКПМ Y-4287. Для определения эффективности инактивации генов *HIS4* и *LEU2* было проанализировано по 100 трансформантов, полученных с использованием каждого варианта sgРНК (рис. 1).

Исследования показали, что эффективность инактивации целевых генов различалась в зависимости от используемой конструкции. Так, эффективность инактивации гена *HIS4* с использованием различных sgРНК составила 65–98%. Самыми эффективными оказались sgРНК1_his4 и sgРНК2_his4, показав сравнительно одинаковую эффективность (97% – для sgРНК1_his4 и 98% – для sgРНК2_his4).

Эффективность инактивации гена *LEU2* составила 15–72%. Самую низкую эффективность инактивации показала sgРНК1_leu2 (15%), а самой эффективной оказалась sgРНК2_leu2 с эффективностью 72%.

Известно, что эффективность системы CRISPR/Cas9 зависит от нуклеотидного состава спейсерных последовательностей sgРНК и PAM-сайта [28]. Так, в работе Yang et al. [29]

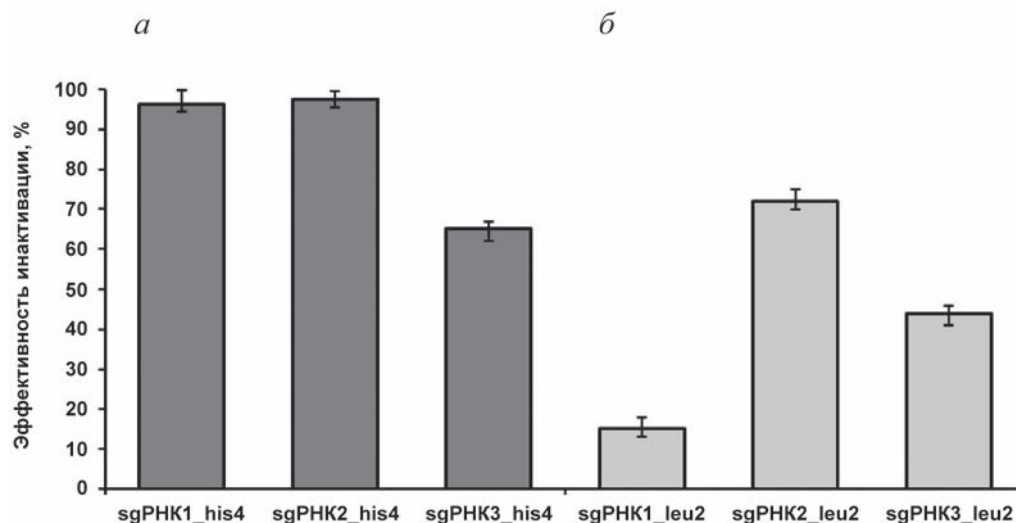


Рис. 1. Эффективность инактивации генов *HIS4* и *LEU2* с использованием различных вариантов sgРНК. *a* – Инактивация гена *HIS4*; *б* – инактивация гена *LEU2*. Приведены средние значения и стандартные отклонения

утверждалось, что предпочтительным РАМ-сайтом, примыкающим к спейсеру sgРНК, является CGG, однако в нашей работе высокую эффективность инактивации показали sgРНК, для которых сайтами РАМ были AGG и TGG. Опираясь на результаты исследований в работе Doench et al. [30], это можно, предположительно, объяснить различным нуклеотидным составом РАМ-проксимальных областей спейсеров sgРНК.

Для дальнейшей работы были отображены штаммы *K. phaffii* TGBF7 (фенотип His⁻, получен с использованием sgРНК3_his4) и *K. phaffii* YLM9 (фенотип Leu⁻, получен с использованием sgРНК2_leu2), не способные к росту на среде YNB без добавления гистидина или лейцина. Выщепление автономно реплицирующихся плазмид проводили путем двукратных пересевов на среде YPD без селективного давления.

Для подтверждения инактивации гена *HIS4* в штамме *K. phaffii* TGBF7 и гена *LEU2* в штамме *K. phaffii* YLM9 было проведено секвенирование областей, в которых при воздействии нуклеазы Cas9 должны были произойти мутации. Результаты секвенирования представлены на рис. 2.

В результате действия комплекса sgРНК3_his4-Cas9 в последовательности гена *HIS4* произошла делеция размером 1 п.н. на расстоянии 3 п.н. от сайта РАМ, а в результате действия комплекса sgРНК2_leu2-Cas9 в последовательности гена *LEU2* произошла делеция размером 1 п.н. на расстоянии 4 п.н. от сайта РАМ. Полученные результаты объясняются тем, что у дрожжей *K. phaffii* двухцепочечные разрывы геномной ДНК, вносимые нуклеазой Cas9, восстанавливаются в основном клеточным механизмом негомологичного соединения концов, в результате чего в месте разрыва, как правило, происходят делеции или вставки нуклеотидов, что приводит к сдвигу рамки считывания кодирующей последовательности [31].

Сдвиг рамок считывания и образование преждевременных стоп-кодонов в последовательностях генов *HIS4* и *LEU2* привело к невозможности синтеза гистидиндегидрогеназы и β-изопротилмалатдегидрогеназы, участвующих в биосинтезе гистидина и лейцина, в результате чего штаммы приобрели ауксотрофность по этим аминокислотам.

Ауксотрофные штаммы *K. phaffii* TGBF7 и *K. phaffii* YLM9 были депонированы в БРЦ ВКПМ под номерами ВКПМ Y-5013 и ВКПМ Y-5014 соответственно [32, 33].

Изучение ростовых характеристик штаммов *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 и *K. phaffii*

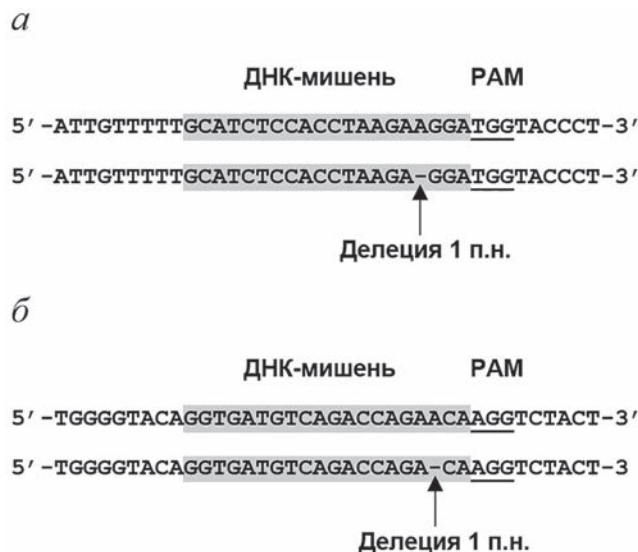


Рис. 2. Результаты секвенирования фрагментов гена *HIS4* штамма *K. phaffii* TGBF7 (а) и гена *LEU2* штамма *K. phaffii* YLM9 (б). Последовательности ДНК-мишеней выделены серым цветом, сайты РАМ – подчеркиванием

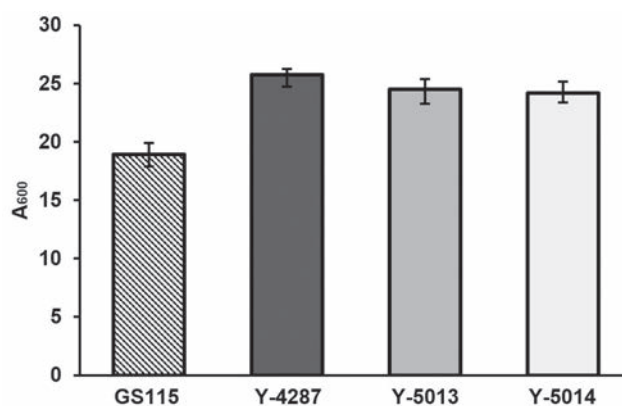


Рис. 3. Накопление биомассы штаммами за 24 ч при 30 °С

ВКПМ Y-5014. Ростовые характеристики штаммов *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 и *K. phaffii* ВКПМ Y-5014 изучались в сравнении с характеристиками родительского штамма *K. phaffii* Y-4287 и коммерческого штамма *K. phaffii* GS115 Y-2837. Было проведено сравнение уровня накопления биомассы за 24 ч в среде YPD путем измерения поглощения КЖ исследуемых штаммов. Результаты измерений представлены на рис. 3.

Исследования показали, что количество накопленной биомассы штаммами *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 и *K. phaffii* ВКПМ Y-5014 превышало таковое для контрольного штамма *K. phaffii* GS115 Y-2837 более чем на 20%. Также наблюдалось незначительное снижение накопленной биомассы ауксотрофных штаммов относительно штамма дикого типа *K. phaffii* Y-4287.

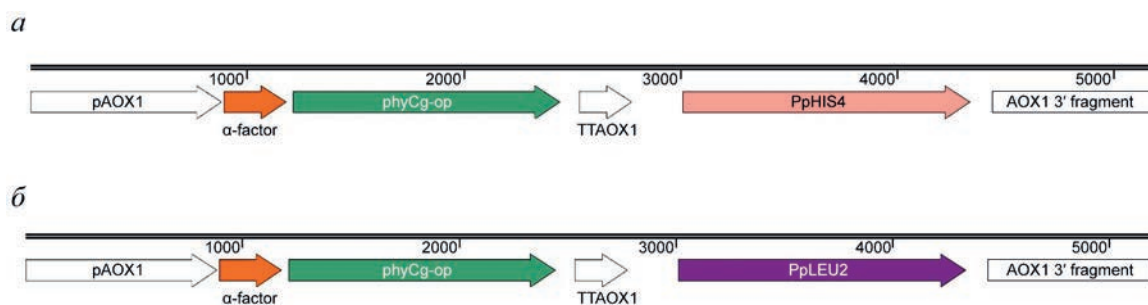


Рис. 4. Структура интегративных экспрессионных кассет. *a* – Кассета pCIT-His; *b* – кассета pCIT-Leu

Широко известно, что система CRISPR/Cas9 обеспечивает высокоэффективное редактирование генома у широкого спектра организмов [34], однако, несмотря на свою высокую специфичность, может проявлять нецелевую активность [35], что может негативно сказываться на их физиологических характеристиках. Несущественное изменение ростовых характеристик штаммов *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 и *K. phaffii* ВКПМ Y-5014 относительно родительского штамма *K. phaffii* Y-4287 свидетельствует о высокой специфичности и низкой нецелевой активности разработанных sgРНК, с использованием которых были получены ауксотрофные штаммы.

Изучение экспрессионного потенциала штаммов-реципиентов. Экспрессионный потенциал штаммов *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 и *K. phaffii* ВКПМ Y-5014 изучали по продуктивности получаемых на их основе трансформантов, секретирующих фитазу *S. gillanii*. Ранее было показано, что ген *phyCg-op*, кодирующий данную фитазу, эффективно экспрессируется в дрожжах *K. phaffii* [18].

Плазмиды pIC9-PhyCg-op и pAOX-PhyCg-op-LEU2 лианеризовали эндонуклеазой рестрикции BglII, и получали экспрессионные кассеты pCIT-His (рис. 4, *a*) и pCIT-Leu (рис. 4, *b*), которые были трансформированы в клетки штаммов *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 и *K. phaffii* ВКПМ Y-5014.

Таблица 3. Средняя продуктивность трансформантов ауксотрофных штаммов

Штамм	Средняя продуктивность трансформантов, ед./мл	Относительная продуктивность трансформантов, %
Y-2837	126,2 ± 3,1	100
Y-5013	265,4 ± 1,9	210
Y-5014	253,6 ± 2,6	201

В качестве контроля получали трансформанты штамма *K. phaffii* GS115 ВКПМ Y-2837. Затем случайным образом отбирали по 10 ПЦР-положительных трансформантов каждого штамма и проводили их ферментацию. После ферментации измеряли фитазную активность трансформантов в КЖ.

На основании полученных данных определяли среднюю продуктивность трансформантов исследуемых штаммов. Результаты сравнения этих величин со средней продуктивностью трансформантов контрольного штамма *K. phaffii* GS115 ВКПМ Y-2837, принятой за 100%, приведены в табл. 3.

Из данных, приведенных в табл. 3, следует, что среднее значение продуктивности трансформантов штаммов *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 и *K. phaffii* ВКПМ Y-5014 превышает таковое для трансформантов коммерческого штамма *K. phaffii* GS115 ВКПМ Y-2837 более чем в 2,1 и 2,0 раза соответственно. Таким образом, было показано, что полученные штаммы-реципиенты обладают высоким экспрессионным потенциалом, что позволяет использовать их для получения высокопродуктивных штаммов-продуцентов гетерологичных белков.

По результатам ферментации был отобран наиболее продуктивный штамм *K. phaffii* Y-5013/PHF1, секретирующий фитазу *S. gillanii* в количестве 286 ед./мл. Определение количества копий гена *phyCg-op* в хромосоме отобранного штамма проводили методом ПЦР-РВ. Было выявлено наличие 2-х копий гена, кодирующего фитазу *S. gillanii*.

Повторная интеграция экспрессионной кассеты pCIT-His. Количество копий целевого гена является важным фактором для продукции целевого белка в дрожжах *K. phaffii* [36]. Введение в состав хромосомы штаммов-реципиентов множественных копий целевых генов является одним из подходов к получению высокоактивных штаммов-продуцентов гетерологичных белков. В связи с этим был предложен способ последовательной интеграции генетического материала в геном дрожжей

K. phaffii с использованием системы CRISPR/Cas9.

В штамме *K. phaffii* Y-5013/PHF1 была проведена инактивация маркерного гена *HIS4*. Для этого в клетки штамма трансформировали плазмиду pGAP-sgRNA3_{his4}-pTEF-Cas9-Km, получали трансформанты и проводили их селекцию на предмет приобретения ауксотрофности по гистидину, как описано выше. Проверка продуктивности 10 случайно отобранных ауксотрофных трансформантов показала отсутствие влияния введенной мутации на продукцию фитазы. Был выбран штамм Y-5013/PHF1Δ*his4*, в который повторно трансформировали экспрессионную кассету pCIT-His. Продуктивность трансформантов определяли путем измерения фитазной активности в КЖ. В результате был отобран наиболее продуктивный штамм *K. phaffii* Y-5013/PHF2X, секретирующий фитазу *C. gillenbergii* в количестве 480,5 ед./мл. Штамм был депонирован в БРЦ ВКПМ под номером ВКПМ Y-5127. Методом ПЦР-РВ было определено, что в хромосоме штамма *K. phaffii* ВКПМ Y-5127 содержится 5 копий гена *phyCg-op*. Таким образом, была показана возможность последовательной интеграции генетического материала в хромосому штамма-реципиента с использованием системы CRISPR/Cas9.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 были скон-

струированы ауксотрофные штаммы-реципиенты *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 (фенотип His⁻) и *K. phaffii* ВКПМ Y-5014 (фенотип Leu⁻), обладающие ростовыми характеристиками, сравнимыми с родительским штаммом, и высоким экспрессионным потенциалом, что было продемонстрировано на примере экспрессии гена фитазы *C. gillenbergii*.

Был продемонстрирован способ последовательной интеграции генетического материала в хромосому дрожжей *K. phaffii* с использованием системы CRISPR/Cas9. Применение данного способа позволило получить многокопийный безмаркерный штамм-продукцент фитазы *C. gillenbergii* с активностью 480,5 ед./мл КЖ.

Вклад авторов. Т.Л. Гордеева, С.П. Синюк — концепция и руководство работой; А.А. Ткаченко — проведение экспериментов; Т.Л. Гордеева, А.А. Ткаченко, Л.Н. Борщевская — обсуждение результатов исследования; А.А. Ткаченко, Т.Л. Гордеева — написание текста; Т.Л. Гордеева, Л.Н. Борщевская, А.А. Ткаченко — редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации: грант для Курчатовского центра геномных исследований (Соглашение № 075-15-2019-1659).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., and Schwab, H. (2014) Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 5301-5317, doi: 10.1007/s00253-014-5732-5.
- Luo, H. Y., Yao, B., Yuan, T. Z., Wang, Y. R., Shi, X. Y., Wu, N. F., and Fan, Y. L. (2004) Overexpression of *Escherichia coli* phytase with high specific activity, *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao=Chin. J. Biotechnol.*, **20**, 78-84.
- Huang, H., Luo, H., Yang, P., Meng, K., Wang, Y., Yuan, T., Bai, Y., and Yao, B. (2006) A novel phytase with preferable characteristics from *Yersinia intermedia*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **350**, 884-889, doi: 10.1016/j.bbrc.2006.09.118.
- Xiong, A. S., Yao, Q. H., Peng, R. H., Zhang, Z., Xu, F., Liu, J. G., Han, P. L., and Chen, J. M. (2006) High level expression of a synthetic gene encoding *Peniophora lycii* phytase in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *App. Microbiol. Biotechnol.*, **72**, 1039-1047, doi: 10.1007/s00253-006-0384-8.
- Pal Roy, M., Mazumdar, D., Dutta, S., Saha, S. P., and Ghosh, S. (2016) Cloning and expression of phytase *appA* gene from *Shigella* sp. CD2 in *Pichia pastoris* and comparison of properties with recombinant enzyme expressed in *E. coli*, *PLoS One*, **11**, e0145745, doi: 10.1371/journal.pone.0145745.
- Zhao, W., Xiong, A., Fu, X., Gao, F., Tian, Y., and Peng, R. (2010) High level expression of an acid-stable phytase from *Citrobacter freundii* in *Pichia pastoris*, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **162**, 2157-2165, doi: 10.1007/s12010-010-8990-4.
- Розанов А. С., Першина Е. Г., Богачева Н. В., Шляхтун В., Сычев А. А., Пельтек С. Е. (2020)

- Разнообразие и распространение метилотрофных дрожжей, используемых в генной инженерии, *Вавиловский журнал генетики и селекции*, **24**, 149-157, doi: 10.18699/VJ20.602.
8. Pronk, J. T. (2002) Auxotrophic yeast strains in fundamental and applied research, *App. Environ. Microbiol.*, **68**, 2095-2100, doi: 10.1128/AEM.68.5.2095-2100.2002.
 9. Wang, Y., Yau, Y. Y., Perkins-Balding, D., and Thomson, J. G. (2011) Recombinase technology: applications and possibilities, *Plant Cell Rep.*, **30**, 267-285, doi: 10.1007/s00299-010-0938-1.
 10. Cregg, J. M., Barringer, K. J., Hessler, A. Y., and Madden, K. R. (1985) *Pichia pastoris* as a host system for transformations, *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 3376-3385, doi: 10.1128/mcb.5.12.3376-3385.1985.
 11. Theodorakis, C. W. (2018) Mutagenesis, in *Encyclopedia Ecology* (S. E. Jørgensen, B. D. Fath, eds.) Academic Press, pp. 2475-2484, doi: 10.1016/b978-008045405-4.00408-0.
 12. Näätäsaari, L., Mistlberger, B., Ruth, C., Hajek, T., Hartner, F. S., and Glieder, A. (2012) Deletion of the *Pichia pastoris* KU70 homologue facilitates platform strain generation for gene expression and synthetic biology, *PLoS One*, **7**, e39720, doi: 10.1371/journal.pone.0039720.
 13. Weninger, A., Fischer, J. E., Raschmanova, H., Vogl, T., and Glieder, A. (2018) Expanding the CRISPR/Cas9 toolkit for *Pichia pastoris* with efficient donor integration and alternative resistance markers, *J. Cell. Biochem.*, **119**, 3183-3198, doi: 10.1002/jcb.26474.
 14. Weninger A., Hatzl A. M., Schmid C., Vogl, T., and Glieder, A. (2016) Combinatorial optimization of CRISPR/Cas9 expression enables precision genome engineering in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *J. Biotechnol.*, **235**, 139-149, doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.03.027.
 15. Немудрый А. А., Валетдинова К. Р., Медведев С. П., Закиян С. М. (2014) Системы редактирования геномов TALEN и CRISPR/Cas инструменты открытий, *Acta Naturae*, **6**, 20-42, doi: 10.32607/20758251-2014-6-3-19-40.
 16. Mohammadhassan, R., Tutunchi, S., Nasehi, N., Goudarziasl, F., and Mahya, L. (2023) The prominent characteristics of the effective sgRNA for a precise CRISPR genome editing, *CRISPR Technol. Recent Adv.*, IntechOpen, doi: 10.5772/intechopen.106711.
 17. Гордеева Т. Л., Боршевская Л. Н., Федай Т. В., Ткаченко А. А., Синеокий С. П. (2021) Изучение экспрессионного потенциала новых штаммов дрожжей рода *Komagataella*, *Биотехнология*, **37**, 5-13, doi: 10.21519/0234-2758-2021-37-4-5-13.
 18. Tkachenko, A. A., Kalinina, A. N., Borshchevskaya, L. N., Sineoky, S. P., and Gordееva, T. L. (2021) A novel phytase from *Citrobacter gillenii*: characterization and expression in *Pichia pastoris* (*Komagataella pastoris*), *FEMS Microbiol. Lett.*, **368**, fnaa217, doi: 10.1093/femsle/fnaa217.
 19. Gao, Y., and Zhao, Y. (2014) Self-processing of ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs *in vitro* and *in vivo* for CRISPR-mediated genome editing, *J. Integr. Plant. Biol.*, **56**, 343-349, doi: 10.1111/jipb.12152.
 20. Heigwer, F., Kerr, G., and Boutros, M. (2014) E-CRISP: fast CRISPR target site identification, *Nat. Methods*, **11**, 122-123, doi: 10.1038/nmeth.2812.
 21. Gassler, T., Heisteringer, L., Mattanovich, D., Gasser, B., and Prielhofer, R. (2019) CRISPR/Cas9-mediated homology-directed genome editing in *Pichia pastoris*, *Recombinant protein production in yeast, Methods in Molecular Biology*, Humana Press, N.Y., pp. 211-225, doi: 10.1007/978-1-4939-9024-5_9.
 22. Gasser, B., Prielhofer, R., Marx, H., Maurer, M., Nocon, J., Steiger, M., Puxbaum, V., Sauer, M., and Mattanovich, D. (2013) *Pichia pastoris*: protein production host and model organism for biomedical research, *Fut. Microbiol.*, **8**, 191-208, doi: 10.2217/fmb.12.133.
 23. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edn.*, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
 24. Chen, C. C., Wu, P. H., Huang, C. T., and Cheng, K. (2004) A *Pichia pastoris* fermentation strategy for enhancing the heterologous expression of an *Escherichia coli* phytase, *Enzyme Microb. Technol.*, **35**, 315-320, doi: 10.1016/j.enzmictec.2004.05.007.
 25. Ребриков Д. В. (2011) *ПЦР в реальном времени*, БИНОМ, Москва.
 26. Waterham, H. R., Digan, M. E., Koutz, P. J., Lair, S. V., and Cregg, J. M. (1997) Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter, *Gene*, **186**, 37-44, doi: 10.1016/S0378-1119(96)00675-0.
 27. Wong, N., Liu, W., and Wang, X. (2015) WU-CRISPR: characteristics of functional guide RNAs for the CRISPR/Cas9 system, *Genome Biol.*, **16**, 218, doi: 10.1186/s13059-015-0784-0.
 28. Cho, S. W., Kim, S., Kim, Y., Kweon, J., Kim, H. S., Bae, S., and Kim, J. S. (2014) Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases, *Genome Res.*, **24**, 132-141, doi: 10.1101/gr.162339.113.
 29. Yang, Y., Liu, G., Chen, X., Liu, M., Zhan, C., Liu, X., and Bai, Z. (2020) High efficiency CRISPR/Cas9 genome editing system with an eliminable episomal sgRNA plasmid in *Pichia pastoris*, *Enzyme Microb. Technol.*, **138**, 109556, doi: 10.1016/j.enzmictec.2020.109556.
 30. Doench, J. G., Hartenian, E., Graham, D. B., Tothova, Z., Hegde, M., Smith, I., Sullender, M., Ebert, B. L., Xavier, R. J., and Root, D. E. (2014)

- Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation, *Nat. Biotechnol.*, **32**, 1262-1267, doi: 10.1038/nbt.3026.
31. Liu, Q., Shi, X., Song, L., Liu, H., Zhou, X., Wang, Q., Zhang, Y., and Cai, M. (2019) CRISPR-Cas9-mediated genomic multiloci integration in *Pichia pastoris*, *Microb. Cell Factories*, **18**, 144, doi: 10.1186/s12934-019-1194-x.
 32. Патент № 2787584С1 Российская Федерация, МПК С12N1/19, С12N15/81, С12N9/24. Штамм дрожжей *Komagataella phaffii* с инактивированным геном *HIS4* – реципиент для конструирования безмаркерных штаммов-продуцентов гетерологичных белков: №2022127026: заявл. 18.10.2022: опубл. 11.01.2023/Ткаченко А. А., Гордеева Т. Л., Синеокий С. П., Борщевская Л. Н., Федайт Т. Д.; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”» – 11 с.
 33. Патент № 2788528 Российская Федерация, МПК С12N 1/19, С12N 15/63. Штамм дрожжей *Komagataella phaffii* с инактивированным геном *LEU2* – реципиент для конструирования штаммов-продуцентов гетерологичных белков: № 2022127025: заявл. 18.10.2022: опубл. 23.01.2023/Ткаченко А. А., Гордеева Т. Л., Синеокий С. П., Борщевская Л. Н.; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”» – 13 с.
 34. Hsu, P. D., Lander, E. S., and Zhang, F. (2014) Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering, *Cell*, **157**, 1262-1278, doi: 10.1016/j.cell.2014.05.010.
 35. Zhang, X. H., Tee, L. Y., Wang, X. G., Huang, Q. S., and Yang, S. H. (2015) Off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated genome engineering, *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **4**, E264, doi: 10.1038/mtna.2015.37.
 36. Zhu, T., Guo, M., Tang, Z., Zhang, M., Zhuang, Y., Chu, J., and Zhang, S. (2009) Efficient generation of multi-copy strains for optimizing secretory expression of porcine insulin precursor in yeast *Pichia pastoris*, *J. Appl. Microbiol.*, **107**, 954-963, doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04279.x.

CRISPR/Cas9-MEDIATED GENOME EDITING OF THE *Komagataella phaffii* TO OBTAIN A PHYTASE-PRODUCER MARKERLESS STRAIN

A. A. Tkachenko*, L. N. Borshchevskaya, S. P. Sineoky, and T. L. Gordeeva

NRC “Kurchatov Institute”, 117545 Moscow, Russia; e-mail: artur.tka4enko10@gmail.com

Using the CRISPR/Cas9 system, the recipient strains *K. phaffii* VKPM Y-5013 (His⁻ phenotype) and *K. phaffii* VKPM Y-5014 (Leu⁻ phenotype) were derived from the *K. phaffii* VKPM Y-4287 strain, which has a high expression potential. Based on developed recipients, markerless producers can be obtained. The gene inactivation efficiency with different variants of sgRNA ranged from 65 to 98% and from 15 to 72% for *HIS4* and *LEU2*, respectively. The recipient strains retained the growth characteristics of the parent strain and have a high expression potential, as estimated by the production of heterologous phytase from *Citrobacter gillenii*. The average productivity of the transformants based on *K. phaffii* VKPM Y-5013 and *K. phaffii* VKPM Y-5014 strains was 2.1 and 2.0 times higher than the productivity of the transformants of the commercial *K. phaffii* GS115 strain. Sequential integration of genetic material into the genome of the *K. phaffii* VKPM Y-5013 strain was proposed. A highly effective multicopy markerless strain producing *C. gillenii* phytase was obtained.

Keywords: CRISPR/Cas9, *Komagataella phaffii*, genome editing, phytase, *Citrobacter gillenii*

**ЭКСПРЕССИЯ СИНТЕТИЧЕСКОГО ГЕНА *CYP102A1-LG23*
И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ
РЕКОМБИНАНТНОГО ЦИТОХРОМА P450 BM3-LG23
В АКТИНОБАКТЕРИЯХ *Mycolicibacterium smegmatis***

© 2023 В.Ю. Пошихонцева^{1*}, Н.И. Стрижов¹, М.В. Карпов¹, В.М. Николаева¹,
А.В. Казанцев², О.И. Сазонова¹, А.А. Шутов¹, М.В. Донов¹

¹ Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН,
142290 Пушкино, Московская обл., Россия; электронная почта: rikahameleon@mail.ru

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет,
119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 15.05.2023

После доработки 15.06.2023

Принята к публикации 16.06.2023

Цитохром CYP102A1 (P450 BM3) из *Priestia megaterium* (bas. *Bacillus megaterium*) имеет ряд уникальных функциональных особенностей, которые делают его идеальным объектом для направленной эволюции и других синтетических приложений. Ранее был получен мутант CYP102A1-LG23 с 14 мутациями в гем-связывающей части белка, осуществляющий 7β-гидроксилирование стероидных субстратов ряда андростанов с образованием продуктов, обладающих противовоспалительной и нейропротекторной активностью. В настоящем исследовании синтетический ген *cyp102A1-LG23*, кодирующий мутантный вариант P450 BM3, экспрессирован в клетках *Mycolicibacterium smegmatis* в составе моно- и бицистронных оперонов совместно с синтетическими генами *gdh* или *zwf2*, кодирующими глюкозодегидрогеназу (ГДГ) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу (Г6ФД) соответственно. Показана функциональная активность рекомбинантных ферментов *in vivo* на примере гидроксилирования андрост-4-ен-3,17-диона (АД) до 7β-гидрокси-АД (7β-ОН-АД) в растущих культурах миколицибактерий. Биокаталитическая активность увеличена вдвое за счет повышения растворимости белка CYP102A1-LG23 в клетке и организации дополнительной системы регенерации кофакторов путем введения ГДГ и Г6ФД. Максимальный выход 7β-ОН-АД, составляющий 37,68% мольн., был достигнут коэкспрессией в *M. smegmatis* генов *cyp102A1-LG23* и *gdh*. Результаты свидетельствуют о перспективности использования синтетических генов для получения рекомбинантных ферментов, расширяют представления о гидроксилировании стероидных соединений бактериальными цитохромами и могут быть востребованы для разработки методов микробиологического получения 7β-гидроксистероидов с помощью генетически модифицированных миколицибактерий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: цитохром CYP102A1 (P450 BM3), гетерологическая экспрессия, гидроксилирование, 7β-гидроксиандрост-4-ен-3,17-дион, *Mycolicibacterium smegmatis*, биоконверсия, стероиды.

DOI: 10.31857/S0320972523090142, EDN: WUZTVO

ВВЕДЕНИЕ

Обширный спектр биологической активности стероидных соединений обеспечивает их широкое применение в клинической практике. Стероиды активно используются в терапии воспалительных процессов, эндокринологических и нейродегенеративных нарушений,

ряда онкологических заболеваний и других областей медицины [1].

Биологическая активность стероидных соединений зависит от степени окисления циклоалканового ядра и присутствия в молекулах стероидов функциональных кислородсодержащих групп. Широко известно, что гидроксилированные стероиды проявляют более высокую

Принятые сокращения: АД – андрост-4-ен-3,17-дион; 7β-ОН-АД – 7β-гидроксиандрост-4-ен-3,17-дион; ГДГ – глюкозодегидрогеназа; Г6ФД – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа.

* Адресат для корреспонденции.

активность в сравнении с их негидроксилированными аналогами. Наличие гидроксильных групп в циклоалкановом ядре стероидов обеспечивает повышение полярности молекул, их растворимости, влияет на их токсичность и сорбционные свойства. Регио- и стереоположение гидроксильных групп важно для связывания с соответствующими клеточными рецепторами, запускающими каскады метаболических реакций в организме [2–5].

Химический синтез специфических гидроксистероидов зачастую многостадийен и сложен (если вообще возможен), и решением проблемы является гидроксилирование неактивных С-Н-связей с применением микроорганизмов или ферментов [1, 6]. Перспективным подходом является создание и применение рекомбинантных ферментов, обладающих регио- и стереоспецифической активностью в отношении стероидных соединений [7, 8].

Исключительно важная роль в реакции оксифункционализации неактивных углеродных атомов принадлежит цитохром-Р450-монооксигеназам (P450/CYP), что определяет глубокий интерес к ним для генной и белковой инженерии. Цитохром P450 BM3 (CYP102A1) из *Priestia megaterium* (bas. *Bacillus megaterium*) имеет ряд уникальных функциональных особенностей, которые делают его идеальным объектом для направленной эволюции и других синтетических приложений. В отличие от большинства цитохромов P450, BM3 является водорастворимым белком. Другой его важной отличительной особенностью является бифункциональность, которой соответствует двухкомпонентная структура белка, где монооксигеназный домен P450 природно слит с его редуктазным доменом в одной белковой молекуле. В настоящее время P450 BM3 является самым быстрым катализатором из известных P450 с числом оборотов до 17 000 в минуту (при использовании в качестве субстрата арахидоновой кислоты) [9], что на порядки выше, чем у большинства P450 млекопитающих [10]. Основной причиной такой чрезвычайно высокой каталитической скорости, предположи-

тельно, является слияние окислительно-восстановительных партнеров в одной белковой молекуле, обеспечивающее быстрый перенос электронов от флавина к гему [11].

Природный P450 BM3 не участвует в метаболизме стероидов [12]. Методом направленной эволюции получены мутантные варианты белка, в том числе мутант P450 BM3-LG23 с 14 мутациями в гем-связывающей части белка, осуществляющий гидроксилирование стероидных субстратов ряда андростанов [13].

Актинобактерии рода *Mycolicibacterium* способны к утилизации стероидов (холестерина, фитостероидов), что обуславливает их широкое применение для получения терапевтических стероидов и их предшественников [14, 15]. Непатогенный быстрорастущий штамм *Mycolicibacterium smegmatis* mc² 155 (syn. *Mycobacterium smegmatis*) является удобным хозяйским организмом для гетерологической экспрессии генов стероидогенеза, поскольку обладает эффективной системой транспорта экзогенных стероидных соединений и отличается высокой частотой трансформации [16]. С целью предотвращения полной деструкции циклоалканового ядра стероидов ранее нами были введены делеции в гены *kshB* (кодирует 3-кетостероид- Δ^1 -дегидрогеназу) и *kstD* (кодирует редуктазную субъединицу 3-кетостероид-9 α -гидроксилазы), и получен мутантный штамм *M. smegmatis* BD, осуществляющий окисление фитостерина и холестерина до андрост-4-ен-3,17-диона (АД) [15].

В настоящем исследовании на основе *M. smegmatis* BD были созданы рекомбинантные штаммы, гетерологически экспрессирующие P450 BM3-LG23 и осуществляющие гидроксилирование АД в положении C7 β – одну из наиболее трудноосуществимых и востребованных реакций оксифункционализации стероидов (рис. 1).

Наряду с 7 β -гидроксилированием полученные штаммы осуществляли введение гидроксильных групп в положение C1 β . Образование 1 β -гидрокси- и 1 β ,7 β -дигидроксистероидов с помощью мутантных вариантов P450 BM3 ранее не описывалось.

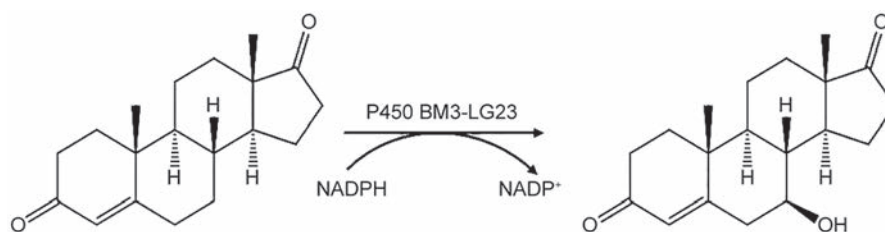


Рис. 1. C7 β -гидроксилирование АД мутантным P450 BM3-LG23

Разработанная методология может быть использована также при создании других микробных катализаторов на основе *CYP102A1-LG23*, а также открывает перспективы одностадийного получения гидроксилированных андростанов из фитостерина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы. В работе были использованы следующие реактивы: андрост-4-ен-3,17-дион («Steraloids», США); ацетамид («Sigma-Aldrich», США); агароза («Invitrogen», Великобритания); метил-β-циклодекстрин (МЦД; «Wacker Chemie», Германия); бромистый этидий («Serva», Германия); канамицин («БиоХим», Россия); гигромицин, ампициллин, глицерин, дрожжевой экстракт, пептон, агар-агар («Panreac», Испания); триптон («Диа-М», Россия); Tween-80 («Serva», Германия); ДНК-модифицирующие ферменты и наборы для экстракции ДНК («Thermo Fisher», США); силикагель («Fluka», США). Остальные реактивы были отечественного производства (Россия) квалификации х. ч. или ч. д. а.

Бактериальные штаммы, плазмиды и условия выращивания. Праймеры, бактериальные штаммы и плазмиды, использованные в работе, представлены в табл. 1.

Штамм *Escherichia coli* DH5α использовали для клонирования плазмидных конструкций. Бактерии культивировали при 37 °С и 200 об./мин в среде LB [19]. Для селекции плазмид вносили канамицин (50 мкг/мл), гигромицин (50 мкг/мл) или ампициллин (100 мкг/мл). Для приготовления плотных сред добавляли агар до 20 г/литр.

Культуру *M. smegmatis* BD выращивали при 37 °С и 200 об./мин в среде M3 [15]. Для создания селективных условий в среду добавляли гигромицин (50–75 мкг/мл). Плотные среды получали добавлением 20 г/литр агара.

Синтетические последовательности и сайт-направленный мутагенез. Нуклеотидная последовательность гена *cyp102A1* дикого типа была взята из баз данных KEGG (BG04_163; *Bacillus megaterium* NBRC 15308) и GenBank (ACCESSION J04832, VERSION J04832.1), белковая последовательность фрагмента гема *CYP102A1-LG23* – из базы данных RCSB PDB (PDB code 6LY4). Исходная нуклеотидная последовательность гена *gdh* взята из базы данных GenBank (ACCESSION AY930464, VERSION AY930464.1; *Bacillus megaterium* AS1.223).

Синтетические последовательности мутантного гена *cyp102A1-LG23* [13] и *gdh* были оп-

тимизированы для эффективной экспрессии в клетках гетерологического хозяина *M. smegmatis*, согласно алгоритму OptimumGene™. Оптимизированные последовательности указанных генов были синтезированы «GenScript» (США) и клонированы в векторе pBluescript II SK(+) с получением плазмид pSKLG23 и pSKGDH соответственно (табл. 1). Источником оптимизированной синтетической последовательности гена *zwf2*, кодирующего глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу (Г6ФД) 2-го типа из *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, служила плаزمида pNS25 [18].

Вектор pMyNTA был сконструирован на основе челночного экспрессионного вектора pMyNT [17] путем введения сайта NdeI в расположении стартового кодона ATG с помощью сайт-направленного мутагенеза в соответствии с протоколом QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis System (QCM) («Stratagene», США). Плазмиду pMyNT амплифицировали с использованием олигонуклеотидных праймеров NdeIF и NdeIR (табл. 1). Полученную смесь обрабатывали рестриктазой DpnI и клонировали в клетках *E. coli* DH5α.

Моноцистронные плазмидные конструкции для экспрессии гена *cyp102A1-LG23* в миколицибактериях. Клонирование ДНК проводили согласно стандартному протоколу [20]. В качестве основы был выбран экспрессионный челночный вектор pMyNT (рис. 2, а), а также производный от него вектор pMyNTA (рис. 2, б).

Плазмиду pSKLG23 гидролизовали с помощью эндонуклеаз рестрикции NcoI и BamHI. ДНК-фрагмент гена *cyp102A1-LG23* лигировали с линейаризованным по тем же сайтам рестрикции вектором pMyNT с образованием рекомбинантной плазмиды pNS38 (табл. 1, рис. 2, в), где целевой ген был слит с N-концевой нуклеотидной последовательностью, кодирующей 6-гистидиновую метку (6×His-tag).

Плазмиду pNS38 последовательно расщепляли рестриктазой NcoI, обрабатывали фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* и гидролизовали рестриктазой BamHI. Вектор pMyNTA последовательно обрабатывали рестриктазой NdeI, фрагментом Кленова и рестриктазой BamHI. ДНК-фрагмент гена *cyp102A1-LG23* клонировали в линейаризованном векторе pMyNTA с образованием рекомбинантной плазмиды pVP1 (табл. 1, рис. 2, г).

Бицистронные плазмидные конструкции для коэкспрессии генов *cyp102A1-LG23/gdh* и *cyp102A1-LG23/zwf2* в миколицибактериях. Плазмиду pSKGDH расщепляли эндонуклеазами рестрикции BamHI и HindIII, ДНК-фрагмент гена *gdh* лигировали с линейаризо-

Таблица 1. Праймеры, штаммы и плазмиды, использованные в работе

Название	Описание	Источник
Штаммы		
<i>Escherichia coli</i> DH 5 α	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>glnV44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>deoR</i> , <i>nupG</i> , <i>purB20</i> , ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>hsdR17</i> (<i>r_K⁻m_K⁺</i>), λ ⁻	Invitrogen
<i>Mycolicibacterium smegmatis</i> BD	mc ² 155 Δ (<i>kshB</i> , <i>kstD</i>), продуцирующий АД-мутант	[15]
Плазмиды		
pMyNT	реплицирующийся в <i>E. coli</i> и микобактериях экспрессионный челночный вектор, содержит Ami-промотор, N-концевой 6 \times His-tag, сайт расщепления TEV, Нуг ^R	[17]
pMyNTA	дериват вектора pMyNT, содержащий сайт рестрикции NdeI	данная работа
pNS25	плаزمид, содержащая синтетические оптимизированные гены глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы 2-го типа из <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv (<i>zwf2</i>) и 17 β -гидроксистероиддегидрогеназы из <i>Cohliobolus lunatus</i>	[18]
pSKLG23	вектор pBluescript II SK(+), содержащий синтетический оптимизированный мутантный вариант (LG23) гена <i>cyp102A1</i> из <i>Bacillus megaterium</i> NBRC 15308 (<i>cyp102A1-LG23</i>)	GenScript/ данная работа
pSKGDH	вектор pBluescript II SK(+), содержащий синтетический оптимизированный ген глюкозодегидрогеназы из <i>B. megaterium</i> AS1.223 (<i>gdh</i>)	GenScript/ данная работа
pNS38	вектор pMyNT, содержащий ген <i>cyp102A1-LG23</i>	данная работа
pVP1	вектор pMyNTA, содержащий ген <i>cyp102A1-LG23</i>	данная работа
pVP2	вектор pMyNTA, содержащий бицистронный оперон генов <i>cyp102A1-LG23</i> и <i>gdh</i>	данная работа
pVP3	вектор pMyNTA, содержащий бицистронный оперон генов <i>cyp102A1-LG23</i> и <i>zwf2</i>	данная работа
Праймеры (5'→3')		
NdeIIF	cgataagagaaaggagtgccaCATATGaagcaccaccaccaccacc	данная работа
NdeIIR	gggtggtggtggtggtgcttCATATGtgactcccttctctatcg	данная работа
ClaIzwf2F	tagacATCGAT aggagg taaggcgatgaaccggccacgccgcggc	данная работа
ClaIzwf2R	gccatATCGATcatggccgcccattcccggc	данная работа

Примечание. Прописными буквами в последовательностях праймеров выделены сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции (NdeI – CATATG, ClaI – ATCGAT). Полу жирным шрифтом выделена последовательность RBS (**aggagg** – сайт связывания рибосомы).

ванной по тем же сайтам рестрикции плазмидой pVP1 с образованием плазмиды pVP2 (табл. 1, рис. 2, д).

ДНК-фрагмент, кодирующий ген *zwf2*, был ПЦР-амплифицирован с использованием праймеров ClaIzwf2F и ClaIzwf2R (табл. 1) на матрице плазмиды pNS25 [18]. Амплифицированный ДНК-фрагмент гена *zwf2* обра-

батывали рестриктазой ClaI, инкубировали с фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*. Плазмиду pVP1 последовательно обрабатывали рестриктазой BamHI и фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*. Последовательность гена *zwf2* лигировали с линейаризованной pVP1 с получением плазмиды pVP3 (табл. 1, рис. 2, е).

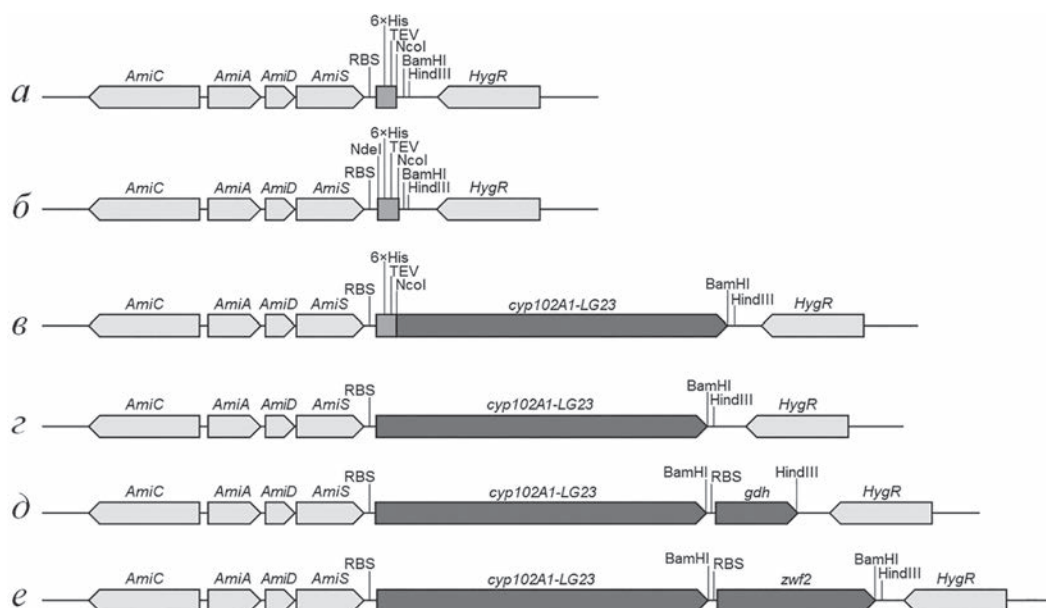


Рис. 2. Генетические элементы для моно- и бицистронных конструкций. *a* – Карта плазмидного экспрессионного вектора pMyNT. *б* – Карта плазмидного экспрессионного вектора pMyNTA. *в* – Плазмида pNS38, содержащая одиночный ген *cyp102A1-LG23*. *г* – Плазмида pVP1, содержащая одиночный ген *cyp102A1-LG23*. *д* – Плазмида pVP2, несущая бицистронную экспрессионную кассету генов *cyp102A1-LG23* и *gdh*. *е* – Плазмида pVP3, несущая бицистронную экспрессионную кассету генов *cyp102A1-LG23* и *zwf2*. *AmiC*, *AmiA*, *AmiD*, *AmiS* – компоненты ацетамидазного промотора; 6×His – 6-гистидиновая метка; *HygR* – маркер устойчивости к гигромицину; RBS – сайт связывания рибосомы

Экспрессия генов в рекомбинантных штаммах миколицибактерий. Электрокомпетентные клетки мутантного штамма *M. smegmatis* BD трансформировали методом электропорации [21] плазмидной ДНК вектора pMyNT, генетическими конструкциями pNS38 и pVP1–pVP3 и высевали на плотную питательную среду М3 с гигромицином (75 мкг/мл). Посевные культуры *M. smegmatis* BD, трансформированные сконструированными плазмидами, получали в 5 мл жидкой среды М3 в присутствии гигромицина (50 мкг/мл) при 37 °С и 200 об./мин в течение 12–15 ч. Инокуляты переносили в колбы объемом 750 мл, содержащие по 50 мл вышеуказанной среды, и выращивали до поглощения ОП₆₀₀ 0,8–1,0 на шейкере-инкубаторе при 37 °С и 200 об./мин. Экспрессию гетерологичных генов инициировали добавлением в среду раствора ацетамида (АсА) до конечной концентрации 2 г/литр. Культивирование индуцированных культур продолжали при 25 °С и 200 об./мин в течение 48 ч, центрифугировали при 5020 *g* и 4 °С в течение 15 мин и ресуспендировали в 20 мл буфера (50 мМ КН₂РО₄, 50 мМ NaCl, pH 7,4). Клетки разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора Q500 («Qsonica», США), согласно протоколу производителя. Клеточный дебрис отделяли центрифугированием при 27 300 *g* и 4 °С в течение 2,5 ч. Белки анализировали методом электрофореза в 10%-ном полиакриламидном геле (SDS-ПААГ) [22].

Биоконверсия АД рекомбинантными миколицибактериями. Получение посевных культур и индукцию осуществляли, как описано выше. Одновременно с ацетамидом вносили субстрат АД в виде водной суспензии с МЦД (1/1,5 моль/моль) до конечной концентрации 200 мг/литр. Культивировали при 25 °С и 200 об./мин в течение 4 суток. В момент внесения индуктора и ежедневно в ферментационную среду добавляли раствор глюкозы (до 10 г/литр). Пробы культуральной жидкости (0,5 мл) отбирали каждые 24 ч. Анализ стероидов осуществляли методами тонкослойной хроматографии (ТСХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Определение биомассы. Рост культур оценивали по увеличению ОП₆₀₀ на спектрофотометре Eppendorf BioSpectrometer Basic («Eppendorf», Германия). Штаммы культивировали в жидкой питательной среде М3 (среда для трансформантов дополнительно содержала 50 мкг/мл гигромицина) при 37 °С и 200 об./мин в течение 48 ч.

Тонкослойная хроматография (ТСХ). Стероиды экстрагировали двукратным объемом этилацетата, экстракты наносили на хроматографические пластинки ALUGRAM SIL G/UV254 («Macherey-Nagel», Германия) и разделяли в системе бензол/ацетон = 2/1 (v/v). Стероиды детектировали в УФ-свете при 254 нм на хемископе CN-15.LC UV Darkroom («Vilber Lourmat», Франция).

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Аликвоты культуральной жидкости разводили равным объемом ацетонитрила, выдерживали в течение 12 ч и центрифугировали 8 мин при 12 100 g. Надосадочную жидкость использовали для анализа на хроматографе Agilent Infinity 1260 («Agilent Technologies», США) с колонкой Symmetry RP-18 (5 мкм, 4,6 × 250 мм) и с предколонкой Symmetry RP-18 (5 мкм, 3,9 × 20 мм; «Waters», США). Состав мобильных фаз: А – ацетонитрил/ТГФ (тетрагидрофуран)/вода = 10/10/80 (v/v); Б – ацетонитрил 100%; скорость потока – 1 мл/мин; градиентное элюирование (1 ступень: элюент А 100%; 2 ступень: элюент А (40%)/элюент Б (60%); температура термостатирования колонки – 50 °С. Стероиды детектировали при 254 нм.

Выделение гидроксилированных производных АД и определение структуры гидроксипроизводных андростендиона. Культуральную жидкость после 48 ч инкубирования (~ 200 мл) центрифугировали при 4 °С и 27 300 g в течение 1 ч. Полученный супернатант трижды экстрагировали этилацетатом (по 70 мл). Объединенный этилацетатный экстракт упаривали при пониженном давлении. Стероиды разделяли колоночной хроматографией на силикагеле (Silica gel 90, 0,2–0,5 мм), продукты гидроксилирования АД выделяли ступенчатой элюцией с использованием смеси растворителей гексан/этилацетат/этанол:

- 1 ступень: гексан 70% + этилацетат 30%;
- 2 ступень: гексан 50% + этилацетат 50%;
- 3 ступень: гексан 30% + этилацетат 70%;
- 4 ступень: этилацетат 100%;
- 5 ступень: этилацетат 70% + этанол 30%;
- 6 ступень: этилацетат 50% + этанол 50%;
- 7 ступень: этилацетат 30% + этанол 70%;
- 8 ступень: этанол 100%.

Полученные фракции упаривали досуха, растворяли в 500 мкл этилацетата и проводили дополнительную очистку с помощью ТСХ на пластинках ALUGRAM SIL G/UV254. Хроматографию проводили в системе бензол/ацетон = 3/1 (v/v). Стероидные соединения детектировали в УФ-свете на хемископе CN-15.LC UV Darkroom при 254 нм.

Структуру стероидов подтверждали ¹H-ЯМР-спектроскопией. Спектры регистрировали на спектрометре Bruker Avance 400 («Bruker», Германия) при частотах 400 и 100,6 МГц соответственно. Химические сдвиги измеряли относительно тетраметилсилана (¹H-ЯМР).

Статистическая обработка данных. Экспериментальные данные получены в трех неза-

висимых биологических повторах. Результаты представлены в виде среднего значения, погрешности – в виде стандартного отклонения по выборке.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве платформы для создания рекомбинантных продуцентов был использован мутантный штамм *M. smegmatis* BD (табл. 1) [15]. Сконструирован набор плазмид, позволяющий осуществлять экспрессию синтетического гена *сyp102A1-LG23* как одиночно, так и в составе бицистронных оперонов совместно с генами *gdh* или *zwf2* (табл. 1). Искусственные опероны в вышеуказанных плаزمиде находились под контролем индуцибельного ацетамидазного (*Ami*) промотора.

Созданные рекомбинантные штаммы не различались по культурально-морфологическим свойствам при росте на плотной среде М3. В жидкой среде скорость роста трансформантов по сравнению с родительским штаммом *M. smegmatis* BD была несколько ниже (рис. 3).

Экспрессия CYP102A1-LG23 в клетках миколицибактерий, несущих плазмиду pNS38, отличалась наиболее высоким уровнем (рис. 4, а; дорожка 2). Фракционирование клеточного гомогената показало, что почти весь белок локализован в «тельцах включения» (рис. 4, б; дорожка 2d). Удаление полигистидиновой метки с N-конца мутантного цитохрома позволило перевести до 40–50% белка в растворимую форму (рис. 4, б; дорожки 3d и 3e).

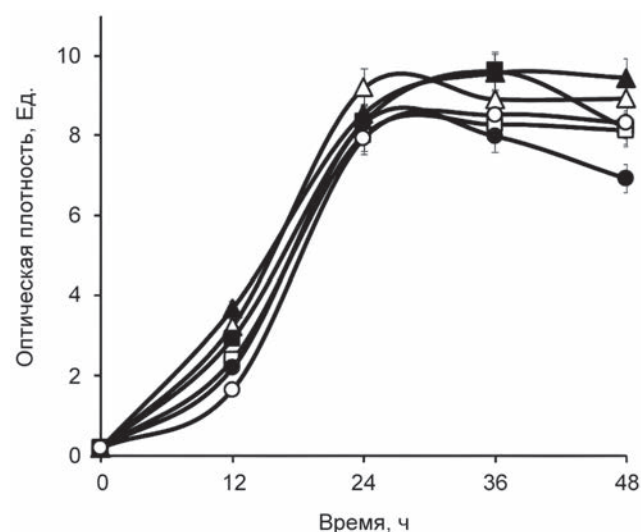


Рис. 3. Динамика роста штамма *M. smegmatis* BD и рекомбинантов на его основе: (–Δ–) – родительский штамм, (–▲–) – pMyNT, (–■–) – pNS38, (–□–) – pVP1, (–●–) – pVP2, (–○–) – pVP3

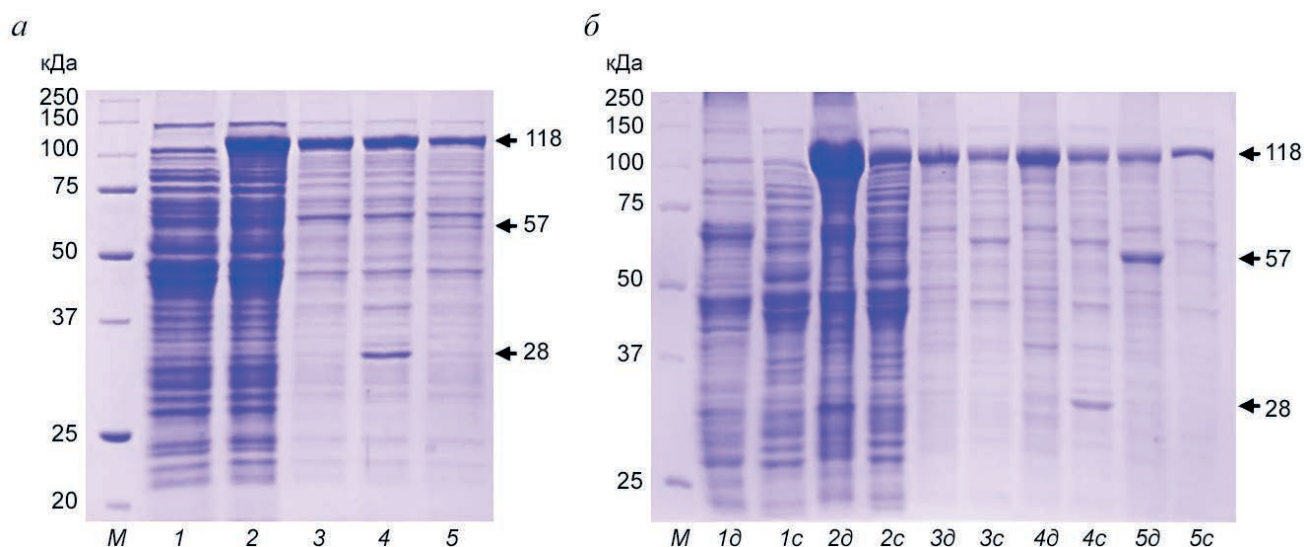


Рис. 4. Анализ экспрессии гетерологичных генов (*a*) и растворимости целевых белков (*б*) в АсА-индуцированных культурах рекомбинантных штаммов *M. smegmatis* ВД методом электрофореза в SDS-ПААГ. *M* – Маркер молекулярных масс («Bio-Rad», США), *c* – супернатант, *д* – клеточный дебрис. Плазмиды: 1 – pMyNT (контроль), 2 – pNS38, 3 – pVP1, 4 – pVP2, 5 – pVP3. Стрелками указаны белки: CYP102A1-LG23 (118 кДа), ГДГ (28 кДа), Г6ФД (57 кДа)

Показано наличие глюкозодегидрогеназы (ГДГ) в растворимой фракции бактериальной клетки (рис. 4, *б*; дорожка 4*c*), тогда как глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа была представлена в мембранной фракции (рис. 4, *б*; дорожка 5*д*). В условиях индукции ацетамидом синтезирующиеся целевые белки соответствовали ожидаемым значениям молекулярной массы: CYP102A1-LG23 – 118 кДа; Г6ФД – 57 кДа; ГДГ – 28 кДа. Во всех рекомбинантных штаммах, несущих бицистронные конструкции, продукция второго белка (ГДГ или Г6ФД) была значительно ниже, чем первого (рис. 4, *a*; дорожки 4 и 5).

В реакции *in vivo* для штамма с плазмидой pNS38 наблюдали низкий уровень образования 7β-ОН-АД, составивший 15,56% мольн. (рис. 5), свидетельствующий о том, что нерастворимая форма белка является малоактивной. Подавление экспрессии гена *sup102A1-LG23* за счет снижения количества индуктора не привело к значимому положительному результату (данные не приведены). Повышение растворимости P450 BM3-LG23 за счет удаления гистидиновой метки (плазмида pVP1) ожидаемо увеличило эффективность биоконверсии вдвое, составив 32,75% мольн. (рис. 5).

Однако и в этом случае полной биоконверсии АД в 7β-ОН-АД не наблюдалось. С целью дальнейшего повышения эффективности биоконверсии оценивали возможность увеличения активности CYP102A1-LG23 за счет обеспечения необходимого уровня восстановленных кофакторов путем коэкспрессии генов *gdh* (плазмида pVP2) или *zwf2* (плазмида pVP3).

Во всех случаях 7β-ОН-АД накапливался в качестве основного метаболита, содержание 7α-ОН-АД не превышало 1,5% мольн. 7β-Гидроксилирование АД рекомбинантными штаммами с бицистронными конструкциями pVP2 и pVP3 происходило на 9–15% эффективнее (37,68 и 35,63% мольн. соответственно), чем вариантом с моноцистронной конструкцией pVP1 (рис. 5). Максимальный выход 7β-ОН-АД достигался за 48 ч, далее отмечали снижение концентрации целевого продукта (рис. 5) на фоне продолжающейся убыли АД.

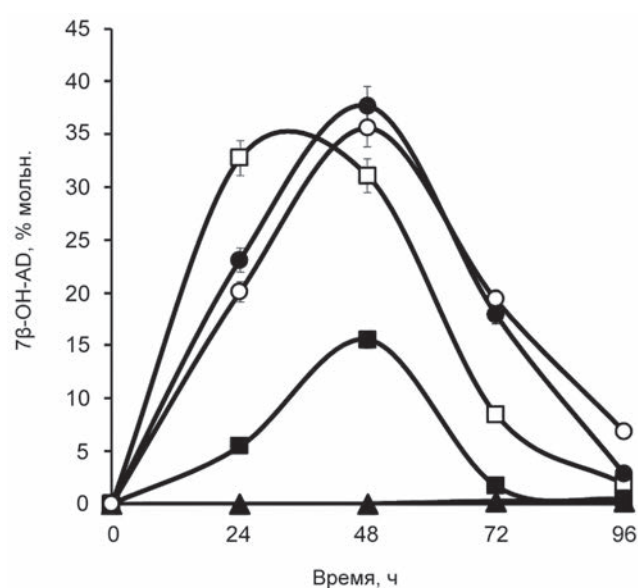


Рис. 5. Накопление 7β-ОН-АД в культурах рекомбинантных штаммов *M. smegmatis* ВД: (▲) – pMyNT, (■) – pNS38, (□) – pVP1, (●) – pVP2, (○) – pVP3

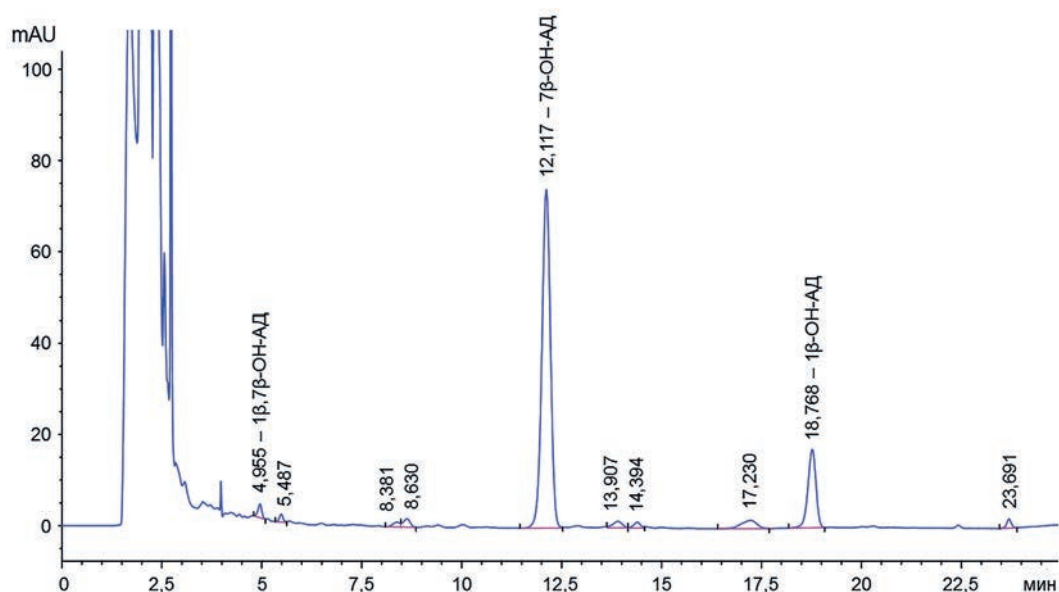
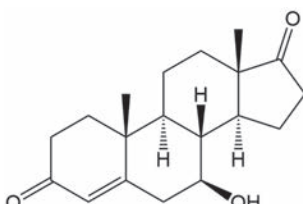
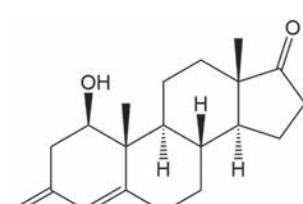
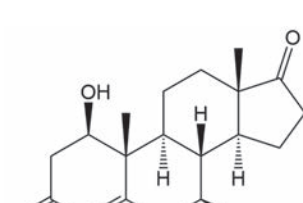


Рис. 6. ВЭЖХ-профиль разделения продуктов гидроксилирования АД рекомбинантными штаммами *M. smegmatis* BD

Таблица 2. Характеристика продуктов биоконверсии АД рекомбинантными штаммами *M. smegmatis* BD

Продукт	Химическая формула	RT, мин (ВЭЖХ)	¹ H-ЯМР (CDCl ₃ , δ, м.д.)
7β-Гидрокси-андрост-4-ен-3,17-дион (7β-OH-AD)		12,19 ± 0,13	5,78 (s, 1H, H-4) 3,60 (dt, <i>J</i> = 10,3, 5,2 Hz, 1H, H-7α) 1,24 (s, 3H, H-19) 0,95 (s, 3H, H-18)
1β-Гидрокси-андрост-4-ен-3,17-дион (1β-OH-AD)		18,15 ± 0,88	5,82 (d, <i>J</i> = 1,1 Hz, 1H, H-4) 4,06 (dd, <i>J</i> = 8,2, 7,6 Hz, 1H, H-1α) 1,27 (s, 3H, H-19) 0,93 (s, 3H, H-18)
1β,7β-Дигидрокси-андрост-4-ен-3,17-дион (1β,7β-диОН-AD)		4,97 ± 0,02	5,83 (br. s, 1H, H-4) 4,03 (dd, <i>J</i> = 9,2, 6,2 Hz, 1H, H-1α) 3,63–3,55 (m, 1H, H-7α) 1,30 (s, 3H, H-19) 0,95 (s, 3H, H-18)

Следует отметить, что совместно с С7β-гидроксилированием (рис. 1) рекомбинантные штаммы осуществляли введение OH-группы в положение С1β (рис. 6; табл. 2). Образование 1β-OH- и 1β,7β-диОН-стероидов с участием мутантных вариантов Р450 ВМ3 ранее не было описано.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Введение кислородсодержащих функциональных групп в циклоалкановое ядро остается одной из наиболее важных и сложных задач в синтезе терапевтических стероидов. Новые возможности в этой области связаны с созда-

нием и применением рекомбинантных бактериальных цитохромов P450, отличающихся от большинства эукариотических цитохромов растворимостью и высокой активностью [5]. Наиболее перспективным направлением представляется применение бациллярного цитохрома P450 BM3 с уникальными биокаталитическими возможностями [9, 11]. Выдающимся достижением является создание его мутантного варианта – *CYP102A1 BM3-LG23*, отличающегося способностью к гидроксированию стероидов при $C7\beta$ [13]. В данной работе нуклеотидная последовательность гена, кодирующего этот мутант, была оптимизирована для экспрессии в миколицибактериях. На основе полученного синтетического гена были созданы плазмидные конструкции, позволяющие гетерологически экспрессировать *sup102A1-LG23* в составе моно- и бицистронных оперонов совместно с генами *gdh* или *zwf2*, кодирующими глюкозодегидрогеназу и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу соответственно в клетках *M. smegmatis* BD.

Выбор в качестве хозяйского организма штамма *M. smegmatis* BD обусловлен, с одной стороны, наличием у миколицибактерий систем эффективного транспорта стероидов [15], с другой стороны, открывающимися в перспективе возможностями одностадийного получения 7β -гидроксиандростанов из фитостеринов [23]. Ранее этот штамм был успешно апробирован для экспрессии генов бациллярных цитохромов *CYP106A1* и *CYP106A2*. Рекомбинантный штамм, экспрессирующий ген *sup106A2*, селективно гидроксировал АД при $C15\beta$ [15].

В реакции *in vivo* наблюдали суперэкспрессию *sup102A1-LG23*, приводившую к образованию белка в преимущественно нерастворимой форме и, как следствие, низкой эффективности $C7\beta$ -гидроксилирования. Предположительно, причиной этого является присутствие полигистидиновой метки на *N*-конце полипептидной последовательности, оказывающее негативное влияние на растворимость, структуру и/или сворачивание P450 BM-LG23. Известно, что His-метка способна влиять на функционирование и стабильность белков. В последнее время увеличивается число сообщений, свидетельствующих об отрицательном влиянии His-метки на структуру, олигомерное состояние, кинетические свойства или каталитическую активность белков [24]. Удаление гистидиновой метки на *N*-конце белковой последовательности *CYP102A1-LG23* позволило перевести до 50% фермента в функциональную растворимую форму при этом без значитель-

ных потерь в его количестве, что, в свою очередь, приводило к двукратному увеличению выхода 7β -ОН-АД.

Эффективным подходом к повышению производительности процессов получения ценных метаболитов является кофакторная инженерия. Так, за счет сверхэкспрессии NADPH-регенерирующей глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы удалось увеличить производство ϵ -капролактона в *E. coli* [25], также баланс между $NADP^+$ и NADPH был ключевым фактором в регуляции процесса превращения фитостерина в 7β -гидроксиандрост-4-ен-3,17-дион (7β -ОН-АД) в *Mycobacterium neoaurum* [23]. Для поддержания пула восстановленного NADPH в *M. smegmatis* BD совместно с *CYP102A1-LG23* были экспрессированы ГДГ или Г6ФД. В качестве косубстрата для регенерации NADPH в ферментационную среду добавляли глюкозу [23, 26]. Введение дополнительных ферментов рециркуляции кофакторов позволило увеличить активность рекомбинантной системы на 15%. Во всех случаях 7β -ОН-АД накапливался в качестве основного метаболита, 7α -ОН-АД обнаруживался в следовых количествах, что согласуется с известными литературными данными [13, 23]. Интересным фактом является обнаружение среди метаболитов 1β -ОН-АД и $1\beta,7\beta$ -диОН-АД, ранее не детектируемых в качестве возможных продуктов реакции гидроксирования АД мутантными вариантами P450 BM3. Микробиологическое 1β -гидроксилирование является крайне редкой реакцией [27], которая, несомненно, представляет особый интерес для дальнейшего изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании впервые реализована гетерологическая экспрессия гена уникального мутантного цитохрома *CYP102A1-LG23* в клетках *M. smegmatis* BD для осуществления синтеза 7β -ОН-АД из АД. Ферментативная активность рекомбинантных миколицибактерий была увеличена за счет повышения количества активной формы фермента и конструирования системы регенерации кофакторов, ставших ключевыми факторами, ограничивающими превращение АД в 7β -ОН-АД в *M. smegmatis*. Максимальный выход целевого продукта достигнут в культуре клеток *M. smegmatis* BD (pVP2), коэкспрессирующих гены *sup102A1-LG23* и *gdh*. Полученные результаты вносят вклад в понимание каталитических особенностей рекомбинантных цитохромов P450

и могут служить отправной точкой для разработки биотехнологий производства ценных С7 β -гидроксистероидов из фитостеринов.

Вклад авторов. В.Ю. Пошехонцева – планирование и проведение экспериментов, обсуждение результатов исследования и написание текста; Н.И. Стрижов – концепция работы и дизайн генетических конструкций; М.В. Карпов – планирование экспериментов, обсуждение результатов исследования и написание текста; В.М. Николаева – выделение и очистка стероидов; А.В. Казанцев – ЯМР-анализ;

О.И. Сазонова – проведение экспериментов; А.А. Шутов – ВЭЖХ-анализ; М.В. Донова – руководство работой и редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-64-00024).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Donova, M. V. (2017) Steroid Bioconversions, *Methods Mol. Biol.*, **1645**, 1-13, doi: 10.1007/978-1-4939-7183-1_1.
2. Wojtal, K., Trojnar, M. K., and Czuczwar, S. J. (2006) Endogenous neuroprotective factors: neurosteroids, *Pharmacol. Rep.*, **58**, 335-340.
3. Fegan, K. S., Rae, M. T., Critchley, H. O. D., and Hillier, S. G. (2008) Anti-inflammatory steroid signalling in the human peritoneum, *J. Endocrinol.*, **196**, 369-376, doi: 10.1677/joe-07-0419.
4. Ali Shah, S. A., Sultan, S., and Adnan, H. S. (2013) A whole-cell biocatalysis application of steroidal drugs, *Orient. J. Chem.*, **29**, 389-403, doi: 10.13005/ojc/290201.
5. Szaleniec, M., Wojtkiewicz, A. M., Borowski, T., Bernhardt, R., and Donova, M. (2018) Bacterial steroid hydroxylases: enzyme classes, their functions and comparison of their catalytic mechanisms, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **102**, 8153-8171, doi: 10.1007/s00253-018-9239-3.
6. Julsing, M. K., Cornelissen, S., Bühler, B., and Schmid, A. (2008) Heme-iron oxygenases: powerful industrial biocatalysts? *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **12**, 177-186, doi: 10.1016/j.cbpa.2008.01.029.
7. Bureik, M., and Bernhardt, R. (2007) in *Modern Biooxidation. Enzymes, Reactions and Applications* (Schmid, R. D., and Urlacher, V. B., eds) Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp. 155-176.
8. Fernández-Cabezón, L., Galán, B., and García, J. L. (2018) New insights on steroid biotechnology, *Front. Microbiol.*, **9**, 958, doi: 10.3389/fmicb.2018.00958.
9. Munro, A. W., Leys, D. G., McLean, K. J., Marshall, K. R., Ost, T. W. B., Daff, S., Miles, C. S., Chapman, S. K., Lysek, D. A., Moser, C. C., Page, C. C., and Dutton, P. L. (2002) P450 BM3: the very model of a modern flavocytochrome, *Trends Biochem. Sci.*, **27**, 250-257, doi: 10.1016/s0968-0004(02)02086-8.
10. Guengerich, F. P. (1991) Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes, *J. Biol. Chem.*, **266**, 10019-10022, doi: 10.1016/S0021-9258(18)99177-5.
11. Munro, A. W., Daff, S., Coggins, J. R., Lindsay, J. G., and Chapman, S. K. (1996) Probing electron transfer in flavocytochrome P-450 BM3 and its component domains, *Eur. J. Biochem.*, **239**, 403-409, doi: 10.1111/j.1432-1033.1996.0403u.x.
12. Finnigan, J. D., Young, C., Cook, D. J., Charnock, S. J., and Black, G. W. (2020) Cytochromes P450 (P450s): A review of the class system with a focus on prokaryotic P450s, *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.*, **122**, 289-320, doi: 10.1016/bs.apcsb.2020.06.005.
13. Li, A., Acevedo-Rocha, C. G., D'Amore, L., Chen, J., Peng, Y., Garcia-Borràs, M., Gao, C., Zhu, J., Rickerby, H., Osuna, S., Zhou, J., and Reetz, M. T. (2020) Regio- and stereoselective steroid hydroxylation at C7 by cytochrome P450 monooxygenase mutants, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **59**, 12499-12505, doi: 10.1002/ange.202003139.
14. Tang, R., Ren, X., Xia, M., Shen, Y., Tu, L., Luo, J., Zhang, Q., Wang, Y., Ji, P., and Wang, M. (2021) Efficient one-step biocatalytic multienzyme cascade strategy for direct conversion of phytosterol to C-17-hydroxylated steroids, *Appl. Environ. Microbiol.*, **87**, e0032121, doi: 10.1128/AEM.00321-21.
15. Karpov, M. V., Nikolaeva, V. M., Fokina, V. V., Shutov, A. A., Kazantsev, A. V., Strizhov, N. I., and Donova, M. V. (2022) Creation and functional analysis of *Mycolicibacterium smegmatis* recombinant strains carrying the bacillary cytochromes CYP106A1 and CYP106A2 genes, *Appl. Biochem. Microbiol.*, **58**, 947-957, doi: 10.1134/S0003683822090058.
16. Snapper, S. B., Melton, R. E., Mustafa, S., Kieser, T., and Jacobs, W. R. Jr. (1990) Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*, *Mol. Microbiol.*, **4**, 1911-1919, doi: 10.1111/j.1365-2958.1990.tb02040.x.

17. Poulsen, C., Holton, S., Geerlof, A., Wilmanns, M., and Song, Y.-H. (2010) Stoichiometric protein complex formation and over expression using the prokaryotic native operon structure, *FEBS Lett.*, **584**, 669-674, doi: 10.1016/j.febslet.2009.12.057.
18. Strizhov, N., Karpov, M., Sukhodolskaya, G., Nikolaeva, V., Fokina, V., Shutov, A. A., and Donova, M. V. (2016) Development of mycobacterial strains producing testosterone, *Proc. Nat. Acad. Sci. Belarus, Chem. Series*, **3**, 57-58.
19. Bertani, G. (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **62**, 293-300, doi: 10.1128/jb.62.3.293-300.1951.
20. Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
21. Daugelat, S., Kowall, J., Mattow, J., Bumann, D., Winter, R., Hurwitz, R., and Kaufmann, S. H. E. (2003) The RD1 proteins of *Mycobacterium tuberculosis*: expression in *Mycobacterium smegmatis* and biochemical characterization, *Microbes Infect.*, **5**, 1082-1095, doi: 10.1016/s1286-4579(03)00205-3.
22. 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.
23. Zhao, Y.-Q., Liu, Y.-J., Ji, W.-T., Liu, K., Gao, B., Tao, X.-Y., Zhao, M., Wang, F.-Q., and Wei, D.-Z. (2022) One-pot biosynthesis of 7 β -hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione from phytosterols by cofactor regeneration system in engineered *Mycobacterium neoaurum*, *Microb. Cell Fact.*, **21**, 59, doi: 10.1186/s12934-022-01786-5.
24. Booth, W. T., Schlachter, C. R., Pote, S., Ussin, N., Mank, N. J., Klapper, V., Offermann, L. R., Tang, C., Hurlburt, B. K., and Chruszcz, M. (2018) Impact of an N-terminal polyhistidine tag on protein thermal stability, *ACS Omega*, **3**, 760-768, doi: 10.1021/acsomega.7b01598.
25. Lee, W.-H., Park, J.-B., Park, K., Kim, M.-D., and Seo, J.-H. (2007) Enhanced production of ϵ -caprolactone by overexpression of NADPH-regenerating glucose 6-phosphate dehydrogenase in recombinant *Escherichia coli* harboring cyclohexanone onooxygenase gene, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **76**, 329-338, doi: 10.1007/s00253-007-1016-7.
26. Wu, Y., Li, H., Zhang, X. M., Gong, J. S., Li, H., Rao, Z. M., Shi, J. S., and Xu, Z. H. (2015) Improvement of NADPH-dependent P450-mediated biotransformation of 7 α , 15 α -diOH-DHEA from DHEA by a dual cosubstrate-coupled system, *Steroids*, **101**, 15-20, doi: 10.1016/j.steroids.2015.05.005.
27. Dodson, R. M., Kraychy, S., Nicholson, R. T., and Mizuba, S. (1962) Microbiological transformations. IX. The 1 β -hydroxylation of androstenedione, *J. Org. Chem.*, **27**, 3159-3164, doi: 10.1021/jo10156a043.

EXPRESSION OF THE SYNTHETIC CYP102A1-LG23 GENE AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF RECOMBINANT P450 BM3-LG23 CYTOCHROME IN ACTINOBACTERIA *Mycobacterium smegmatis*

V. Y. Poshekhontseva^{1*}, N. I. Strizhov¹, M. V. Karpov¹, V. M. Nikolaeva¹, A. V. Kazantsev², O. I. Sazonova¹, A. A. Shutov¹, and M. V. Donova¹

¹ G. K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences; Federal Research Center "Pushchino Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences", 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: rikahameleon@mail.ru

² Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

Cytochrome CYP102A1 (P450 BM3) from *Priestia megaterium* (bas. *Bacillus megaterium*) has a number of specific features making it an ideal target for directed evolution and other synthetic applications. Previously, the CYP102A1-LG23 mutant with 14 mutations in the heme was obtained providing 7 β -hydroxylation of steroid substrates of the androstane series with the formation of products possessing anti-inflammatory and neuroprotective activity. In this study, the synthetic *cyp102A1-LG23* gene encoding the P450 BM3 mutant variant was expressed in *Mycobacterium smegmatis* cells as part of mono- and bicistronic operons together with the synthetic *gdh* or *zwf2* genes encoding glucose dehydrogenase (GDH) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), respectively. The functional activity of the recombinant enzymes was shown *in vivo* by the example of hydroxylation of androst-4-ene-3,17-dione (AD) to 7 β -OH-AD in growing cultures of mycolicibacteria. Biocatalytic activity was doubled by increasing the CYP102A1-LG23 protein solubility in the cell and organizing the cofactor regeneration additional system by introducing GDH and G6PD. The maximum level of 7 β -OH-AD amounting 37,68 mol % was achieved by co-expression of the *cyp102A1-LG23* and *gdh* genes in *M. smegmatis*. The results evidence to the perspective of using synthetic genes to obtain recombinant enzymes, expand the understanding of the hydroxylation of steroid compounds by bacterial cytochromes and can be demand for the methods of microbiological production of 7 β -hydroxylated steroids by genetically modified mycolicibacteria.

Keywords: cytochrome CYP102A1 (P450 BM3), heterologous expression, hydroxylation, 7 β -hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione, *Mycobacterium smegmatis*, bioconversion, steroids

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ФОТОРИНА, НОВОГО БЕЛКОВОГО ИНГИБИТОРА ПРОТЕАЗ ИЗ ЭНТОМОПАТОГЕННОЙ БАКТЕРИИ *Photorhabdus laumondii*

© 2023 И.М. Бердышев^{1#}, А.О. Светлова^{1#}, К.Н. Чухонцева¹, М.А. Карасева¹,
А.М. Варижук², В.В. Филатов³, С.Ю. Клеймёнов^{4,5}, С.В. Костров¹, И.В. Демидюк^{1*}

¹ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
123182 Москва, Россия; электронная почта: ilyaduk@yandex.ru

² Московский физико-технический институт, 141701 Долгопрудный, Московская обл., Россия

³ Институт проблем химической физики РАН, 142432 Черноголовка, Московская обл., Россия

⁴ ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт биохимии имени А.Н. Баха,
119071 Москва, Россия

⁵ Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН,
119334 Москва, Россия

Поступила в редакцию 13.04.2023

После доработки 27.05.2023

Принята к публикации 17.06.2023

Энтомопатогенные бактерии рода *Photorhabdus* секретируют протеазу S (PrtS), которая рассматривается как фактор вирулентности. Нами обнаружено, что в геномах *Photorhabdus* непосредственно за генами *prtS* расположены гены, которые кодируют небольшие гипотетические белки, гомологичные эмфорино, открытому недавно белковому ингибитору металлопротеаз. Ген эмфориноподобного ингибитора из *Photorhabdus laumondii* subsp. *laumondii* TT01 был клонирован и экспрессирован в клетках *Escherichia coli*. Рекомбинантный белок, названный фоторином (Phin), очищен с помощью металл-хелатной аффинной и гельпроникающей хроматографии и охарактеризован. Установлено, что Phin является мономером и ингибирует активность протеализина и термолизина, относящихся, как и PrtS, к семейству пептидаз M4. Константы ингибирования составили $1,0 \pm 0,3$ и 10 ± 2 мкМ соответственно. Продемонстрировано также, что Phin способен подавлять протеолитическую активность культуральной жидкости *P. laumondii* (концентрация полумаксимального ингибирования $3,9 \pm 0,3$ нМ). Получены поликлональные антитела к Phin, и методом иммуноблоттинга показано, что Phin продуцируется клетками *P. laumondii*. Таким образом, гены *prtS* у энтомопатогенных бактерий рода *Photorhabdus* колокализуются с генами эмфориноподобных ингибиторов, которые, вероятно, регулируют активность фермента при инфекции. Строгая регуляция активности протеолитических ферментов является критической для функционирования всех живых систем. В то же время принципы регуляции активности протеаз белковыми ингибиторами остаются малоизученными. Бактериальные пары протеаза–ингибитор, такие как пара PrtS и Phin, являются многообещающей моделью для *in vivo* исследований этих принципов. Бактерии рода *Photorhabdus* имеют сложный жизненный цикл с несколькими хозяевами, являясь симбионтами нематод и мощными патогенами насекомых. Это даёт уникальную возможность использовать пару PrtS и Phin в качестве модели для изучения принципов регуляции активности протеаз белковыми ингибиторами в контексте взаимодействия бактерий с разными типами хозяев.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: белковый ингибитор протеаз, *Photorhabdus*, энтомопатогенная бактерия, протеализин, эмфорин, фоторин.

DOI: 10.31857/S0320972523090154, **EDN:** WVEBDF

Принятые сокращения: БИП – белковые ингибиторы протеаз; ГПХ – гельпроникающая хроматография; ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия; КД – круговой дихроизм; МХАХ – металл-хелатная аффинная хроматография; ППП – протеализинподобные протеазы; ЭПИ – эмфориноподобные ингибиторы; Abz-RSVIK(Dnp) – 2-аминобензоил-L-аргинил-L-серил-L-валил-L-изолейсил-L-(ε-2,4-динитрофенил)лизин; M4in – эмфорин; Phin – фоторин; Pln – протеализин, PrtS – протеаза S; Tln – термолизин; TT01 – *Photorhabdus laumondii* subsp. *laumondii* TT01.

* Адресат для корреспонденции.

Авторы, внёсшие равный вклад в работу.

ВВЕДЕНИЕ

Протеолитические ферменты играют принципиальную роль в функционировании всех живых систем. Активность протеаз в живых системах находится под строгим контролем, что обеспечивает высокую избирательность действия этих ферментов и предотвращает аберрантный протеолиз. Одним из факторов, регулирующих активность протеолитических ферментов, являются эндогенные селективные белковые ингибиторы протеаз (БИП). В некоторых важных случаях о функциях БИП имеется достаточно много информации [1–5], однако общие принципы регуляции активности протеаз БИП в живых системах остаются малоизученными.

Перспективной моделью для изучения *in vivo* принципов регуляции белковыми ингибиторами, на наш взгляд, могут стать бактериальные пары протеаза–ингибитор. Основным достоинством такой модели является доступность биологической системы, как в плане её меньшей сложности, так и с точки зрения удобства экспериментальной работы. Кроме того, наличие большого количества ортологичных пар протеаза–ингибитор у бактерий из разных таксонов позволяет рассматривать регуляцию в эволюционном аспекте. Однако о бактериальных БИП по сравнению с эукариотическими известно очень мало. Так, например, база данных пептидаз и их белковых ингибиторов MEROPS (www.ebi.ac.uk/merops/) [6] включает в настоящее время лишь около 18 000 последовательностей бактериальных и более 155 000 последовательностей эукариотических БИП (данные на 22.03.2023). Для большинства бактериальных БИП природные мишени и биологические функции не установлены. В то же время в некоторых случаях вывод о функциональной связи между бактериальными протеазами и их ингибиторами может быть сделан из локализации их генов в одном опероне [7].

Недавно мы обнаружили новое семейство белковых ингибиторов металлопротеаз, семейство I104 в базе данных MEROPS (www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/famsum?family=I104), и охарактеризовали прототип семейства эмфорин (M4in) из *Serratia proteamaculans*. Гены эмфориноподобных ингибиторов (ЭПИ) у бактерий и архей колокализуются с генами гомологов протеализина (PIn) из *S. proteamaculans* [8, 9], протеализинподобных протеаз (ППП), которые относятся к семейству пептидаз M4 (www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/famsum?family=M4). У *S. proteamaculans* гены ЭПИ и ППП форми-

руют бицистронный оперон, однако у многих других видов бактерий – это, по-видимому, два независимых, но расположенных друг за другом гена. Для M4in продемонстрировано, что он является сильным ингибитором PIn. Таким образом, природными мишенями ЭПИ, очевидно, являются ППП, и эти белки, вероятно, связаны общей биологической функцией [7].

Биологическая роль ЭПИ и ППП не вполне понятна. Однако есть данные, указывающие на участие ППП в проникновении бактерий в клетки человека [10–14], подавлении иммунной защиты насекомых [15, 16] и рыб [17], а также в разрушении белков клеточной стенки растений [18, 19]. Кроме того, предполагается, что ЭПИ и ППП являются элементами неустановленной системы межбактериальной конкуренции [7, 20]. Таким образом, ППП, вероятно, являются мультифункциональными белками, вовлечёнными во взаимодействие бактерий с высшими организмами и, в частности, в патогенез, а также во взаимодействие бактерий между собой, в то время как ЭПИ регулируют активность ППП во всех упомянутых контекстах. Исходя из этого, пара ЭПИ–ППП могла бы стать моделью для исследований принципов регуляции активности протеаз белковыми ингибиторами. При этом успешность таких исследований, очевидно, будет в значительной степени зависеть от выбора модельного организма.

В качестве модельного организма многообещающе выглядят энтомопатогенные бактерии рода *Photorhabdus*, наиболее изученным представителем которого является *Photorhabdus laumondii* subsp. *laumondii* TT01 (TT01) (прежнее название *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* TT01). Эти бактерии имеют сложный жизненный цикл, в котором они выступают то в качестве симбионтов нематод семейства Heterorhabditidae, то как мощные инсектопатогены, что даёт уникальную возможность для исследования различных типов взаимодействий бактерий с хозяином [21]. В контексте нашего обсуждения следует отметить, что *Photorhabdus* инвазируют клетки ректальной железы нематод [22] и манипулируют иммунной системой инфицированных насекомых [21]. Кроме того, бактерии рода *Photorhabdus* проявляют противобактериальную и противогрибковую активность [23, 24]. ППП нескольких штаммов *Photorhabdus* (протеазы S, PrtS) в разной степени охарактеризованы [15, 16, 25, 26].

Опубликованные данные позволяют заключить, что PrtS, по-видимому, не является основным инсектотоксином бактерий, но при этом,

вероятно, участвует во взаимодействии бактерий с иммунной системой насекомых, действуя на антибактериальные пептиды и индуцируя процесс меланизации [15, 16]. Однако эти данные фрагментарны, и биологические функции *PrtS*, как и других ППП, требуют дальнейшего изучения. Многие предполагаемые функции ППП, по-видимому, реализуются у *Photorhabdus*, и данная модель представляется перспективной для изучения этих ферментов. В частности, она может быть использована для изучения регуляции активности ППП с помощью ЭПИ. Однако никаких данных об ЭПИ у бактерий рода *Photorhabdus* в настоящее время нет.

В геномах *Photorhabdus* непосредственно за генами *prtS* расположены гены, кодирующие гипотетические белки, гомологичные M4in. В этой работе один из таких генов (из TT01) был впервые клонирован и экспрессирован в клетках *Escherichia coli*. Рекомбинантный белок, названный фоторином (Phin), был очищен и охарактеризован. Было показано, что Phin ингибирует ППП и продуцируется клетками TT01. Полученные данные указывают на то, что пара ППП–ЭПИ функциональна у бактерий рода *Photorhabdus*, и эти организмы могут быть использованы в качестве модели для изучения принципов регуляции активности протеаз белковыми ингибиторами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Общие методы. Концентрацию белка определяли по модифицированному методу Брэдфорда, используя IgG в качестве стандарта [27, 28].

Концентрацию очищенных белков в растворе определяли по поглощению при 280 нм, используя коэффициенты экстинкции, рассчитанные с помощью сервера ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>): $\epsilon_{280} = 52\,370 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ – для PIn, $\epsilon_{280} = 58\,200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ – для термолизина (TIn) и $\epsilon_{280} = 11\,460 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ – для Phin.

Белки анализировали электрофорезом в 15%-ном полиакриламидном геле, содержащем 0,1% додецилсульфата натрия, по Лэммли [29]. Зоны белков окрашивали Кумасси бриллиантовым синим R-250 («Reanal», Венгрия). В качестве маркера молекулярных масс использовали набор Precision Plus Protein Unstained Standards («Bio-Rad», США).

Трансформацию клеток *E. coli* плазмидной ДНК проводили, как описано ранее [30]. Для получения плазмид использовали штамм

E. coli TG1. Для очистки ДНК применяли наборы Plasmid Miniprep или Cleanup Standard («Евроген», Россия).

Гельпроникающую хроматографию проводили на колонке Superdex 75 10/300 GL («GE Healthcare», Швеция). Для калибровки колонки использовали набор Gel Filtration Markers Kit for Protein Molecular Weights 6500–66 000 Da («Sigma», США).

Секвенирование полученных генетических конструкций, а также синтез всех использованных олигонуклеотидов проводили в компании «Евроген».

Клонирование гена фоторина и конструирование экспрессионного вектора. Штамм *P. laumondii* subsp. *laumondii* TT01 (TT01) был получен из Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (штамм DSM 15139, номер доступа в RefSeq NC_005126.1). TT01 культивировали в течение ночи с аэрацией при 30 °С в среде LB по Ленноксу [31]. Клетки из 1 мл бактериальной суспензии осаждали центрифугированием (4000 g, 10 мин), ресуспендировали в 100 мкл деионизированной воды, прогревали при 95 °С в течение 10 мин и центрифугировали (13 000 g, 10 мин). Супернатант (1 мкл) использовали для ПЦР с Pfu ДНК-полимеразой («СибЭнзайм», Россия) и парами олигонуклеотидных праймеров EcoRI_D1 и TT01_R1 или TT01_D2 и HindIII_R2 (табл. 1). Продукты ПЦР после очистки использовали вместе с праймерами EcoRI_D1 и HindIII_R2 для ПЦР с достройкой перекрывания. Полученный фрагмент генома TT01, содержащий гены *prtS* (PLU_RS06905) и *phin* (PLU_RS06900), а также фланкирующие участки, очищали, обрабатывали рестриктазами EcoRI и HindIII («New England Biolabs», США) и использовали для клонирования. В качестве клонирующего вектора использовали фрагмент плазмиды pBR322, который амплифицировали с использованием праймеров HindIII_R3 и EcoRI_D3 (табл. 1), очищали, расщепляли теми же ферментами и лигировали с использованием Quick-TA T4 ДНК-лигазы («Евроген») с указанным выше фрагментом генома TT01. Полученная плаزمид была названа pTT01.

Для конструирования экспрессионной плазмиды pET-Phin ген *phin* амплифицировали, используя в качестве матрицы pTT01 и праймеры FauNDI_D4 и XhoI_R4 (табл. 1). Для клонирования в праймерах были предусмотрены сайты *FauNDI* и *XhoI*. Кроме того, в праймере XhoI_R4 был предусмотрен участок, обеспечивающий введение в ген *phin* дополнительной последовательности, кодирующей 6 остатков гистидина перед стоп-кодоном

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных в работе

Обозначение праймера	Последовательность
EcoRI_D1	TCAAGAATTCGCAAAAACTGGATATGATTTTCCATC
TT01_R1	TCATTGAACGAATCCCTAC
TT01_D2	GTAGGGATTTCGTTCAATGA
HindIII_R2	CTCGAAGCTTTAATCCGCCAATTGTTGTGATCCACG
HindIII_R3	ACTCAAGCTTCCGGATCTGCATCGCAGGATG
EcoRI_D3	ATGAGAATTCCTGAAGACGAAAGGGGGCCTCGT
FauNDI_D4	GGAACATATGAATAATAAACGCTCAA
XhoI_R4	GAATCTCGAGTTAATGGTGATGGTGATGGTGACCACCSTTTTGTGCGGT

Примечание. Сайты *EcoRI*, *HindIII*, *FauNDI* и *XhoI* подчёркнуты. Участок, обеспечивающий введение в ген *phin* дополнительной последовательности, кодирующей 6 остатков гистидина перед стоп-кодоном, выделен жирным шрифтом.

(выделена жирным шрифтом в последовательности праймера в табл. 1). Продукты ПЦР очищали, обрабатывали рестриктазами *FauNDI* («СибЭнзайм») и *XhoI* («New England Biolabs») и лигировали с вектором рЕТ-23а, расщепленным теми же ферментами.

Структура всех клонированных фрагментов была подтверждена секвенированием.

Получение фоторина. Клетки *E. coli* BL21 (DE3) («Novagen», США), трансформированные плазмидой рЕТ-*Phin*, культивировали при перемешивании в 250 мл среды, содержащей (в расчёте на литр) 7,1 г Na₂HPO₄, 6,8 г KH₂PO₄, 3,3 г (NH₄)₂SO₄, 3,3 г MgCl₂·6H₂O, 5 г глицерина, 10 г пептона, 5 г дрожжевого экстракта, 25 г глюкозы, 50 г лактозы и 100 мг ампициллина, при 37 °С в течение 3 ч, а затем при 16 °С – в течение 72 ч. Клетки осаждали центрифугированием (4000 g, 4 °С, 10 мин), ресуспендировали в 25 мл 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0) и обрабатывали ультразвуком при 4 °С два раза в течение 5 мин с импульсом 1 с и паузой 2 с. Лизат клеток центрифугировали (9000 g, 4 °С, 10 мин), и супернатант наносили на колонку с 1 мл Nickel XPure Agarose Resin («UBPBio», США), уравновешенную 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0). Колонку промывали тем же буфером, а затем элюировали *Phin* линейным градиентом концентрации имидазола (0–250 мМ) в том же буфере. Фракции, содержащие *Phin* по результатам электрофоретического анализа, объединяли и концентрировали ультрафильтрацией на Vivaspin Turbo 15,5 kDa MWCO («Sartorius», Германия). Полученный образец наносили на колонку Superdex 75 10/300 GL, уравновешенную 50 мМ Tris-HCl (pH 7,4), содержащим

150 мМ NaCl, и элюировали тем же буфером со скоростью потока 0,5 мл/мин. Фракции, содержащие наибольшее количество *Phin* по результатам электрофоретического анализа, объединяли и дважды диализовали (6 и 16 ч) против 100 объёмов 50 мМ NH₄HCO₃ с использованием диализной трубки SnakeSkin, 3.5 kDa MWCO («Thermo Fisher Scientific», США) при 4 °С. После диализа раствор *Phin* центрифугировали (8600 g, 4 °С, 15 мин) и лиофилизовали супернатант.

Масс-спектрометрический анализ. Лиофилизированный очищенный *Phin* растворяли в концентрации 5 мкМ в смеси вода/метанол/муравьиная кислота = 50/49,5/0,5 (v/v). Масс-спектрометрический анализ проводили на приборе Exactive Orbitrap («Thermo Fisher Scientific»), оснащённом специальным источником ионов [32]. Расчёт молекулярной массы белка проводили по набору пиков, соответствующих многократно протонированным молекулам белка в полученных электроспрейных масс-спектрах.

Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК). Измерения проводили при концентрации *Phin* 4,2 мг/мл на приборе MicroCal VP-Capillary DSC («Malvern Instruments», США). Эксперименты по ДСК и обработку данных осуществляли, как описано ранее [7].

Спектроскопия кругового дихроизма (КД). Спектры КД регистрировали на спектрофотометре Chirascan VX («Applied Photophysics», Великобритания) при комнатной температуре в кювете с длиной оптического пути 0,05 см. Для получения спектров *Phin* растворяли в концентрации 0,15 мг/мл в 10 мМ Tris-HCl (pH 7,4)

и центрифугировали при 8600 g в течение 5 мин при 4 °С. Спектры анализировали с помощью программы DichroWeb с использованием метода CDSSTR и эталонного набора данных 4 [33]. Значения стандартного отклонения для каждого типа структуры рассчитывались только для предсказаний DichroWeb с общей суммой долей вторичных структур – 100%. Для предсказания спектров КД и расчёта долей вторичных структур по пространственным структурам использовали сервер PDBMD2CD [34].

Иммуноблоттинг. Электрофоретически гомогенный Phin был передан в НПО «БиоТест Системы» (Россия) для иммунизации кроликов по стандартному протоколу. Полученную антисыворотку использовали для проведения иммуноблоттинга по описанной ранее методике [35]. Для подтверждения специфичности полученных антител использовали очищенный Phin.

Для проведения анализа ТТ01 культивировали в течение 48 ч с аэрацией при 30 °С в среде LB по Ленноксу [31]. Через 16, 24, 30 и 48 ч после начала культивирования отбирали по 100 мкл бактериальной суспензии. Клетки осаждали центрифугированием (6000 g, 10 мин) и суспендировали в 100 мкл буфера, содержащего 125 мМ Tris-HCl (pH 6,8), 2% Ds-Na, 5% β-меркаптоэтанол, 2 мМ 1,10-фенантролина, 0,01% бромфенолового синего и 20% глицерина. К супернатанту (культуральной среде) добавляли 100 мкл 50%-ной ТХУ, центрифугировали (10 000 g, 10 мин), осадок промывали ацетоном для удаления ТХУ и добавляли 100 мкл того же буфера. Образцы клеток и культуральной среды инкубировали 5 мин при 95 °С. После инкубации, основываясь на различиях в оптической плотности исходной бактериальной суспензии, образцы разбавляли тем же буфером так, чтобы 15 мкл полученного раствора (количество, которое использовали для электрофоретического анализа) содержали материал, соответствующий 100 мкл бактериальной суспензии с оптической плотностью 1 о.е. Белки разделяли с помощью электрофореза с додецилсульфатом натрия в 16%-ном полиакриламидном геле в буферной системе Tris-Tricine [36].

Определение констант ингибирования протеазина и термолизина фоторином. Анализ ингибирующего действия Phin на Pln и Tln проводили с использованием пептидного субстрата с внутренним тушением флуоресценции, 2-аминобензоил-L-аргинил-L-серил-L-валил-L-изолейцил-L-(ε-2,4-динитрофенил)лизин (Abz-RSVIK(Dnp)) («Peptide 2.0», США) [37], как описано ранее [38]. Для реги-

страции флуоресценции (длина волны возбуждения – 320 нм; длина волны испускания – 420 нм) использовали прибор CLARIOstar Plus («BMG», Германия). Реакцию проводили в 50 мМ Tris-HCl (pH 7,4). Концентрации Pln и Tln в реакционной смеси составляли 50 пМ, Abz-RSVIK(Dnp) – 30 или 90 мкМ. Концентрации Phin в случае Pln были 0,5; 1; 2; 4; 6 и 8 мкМ, а в случае Tln – 1; 5; 10; 20; 30 и 40 мкМ. При каждом экспериментальном условии проводили три независимых измерения.

При медленном связывании ингибитора с ферментом кинетические кривые аппроксимировали интегральным уравнением скорости и рассчитывали константы ингибирования, как описано ранее [39]. Константы ингибирования K_i как для Pln, так и для Tln были получены по методу Диксона [40, 41]. Константу изомеризации K_i^* для Pln рассчитывали в два этапа с использованием уравнений (1) и (2):

$$k_a = k_{-4} + \frac{k_{+4}[I]}{K_i(1 + [S]/K_M) + [I]}, \quad (1)$$

$$K_i^* = K_i \frac{k_{-4}}{(k_{+4} - k_{-4})}. \quad (2)$$

Для Pln в расчётах использовали константу Михаэлиса $K_M = 35$ мкМ [37]. Анализ данных проводили при помощи программы GraphPad Prism версии 8.0 («GraphPad Software», США).

Ингибирование активности культуральной среды *P. laumondii* subsp. *laumondii* ТТ01 фоторином. ТТ01 культивировали в течение 24 ч с аэрацией при 30 °С в среде LB по Ленноксу [31]. Клетки осаждали центрифугированием при 4000 g в течение 10 мин. Супернатант разводили в 1000 раз, используя 50 мМ Tris-HCl (pH 7,4), и 10 мкл полученного раствора использовали для измерения активности, как описано выше для Pln и Tln. Концентрация Abz-RSVIK(Dnp) в реакционной смеси составляла 30 мкМ, концентрации Phin – 1; 2,5; 5; 7,5 и 10 нМ. Скорость гидролиза субстрата в присутствии ингибитора определяли на линейном участке кинетических кривых, соответствующем диапазону 150–300 с после начала регистрации флуоресценции. IC_{50} рассчитывали с использованием нелинейной регрессии при помощи GraphPad Prism.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение фоторина. Ген предполагаемого эмфориноподобного ингибитора был клонирован из генома *P. laumondii* subsp. *laumondii* ТТ01, модифицирован для введения

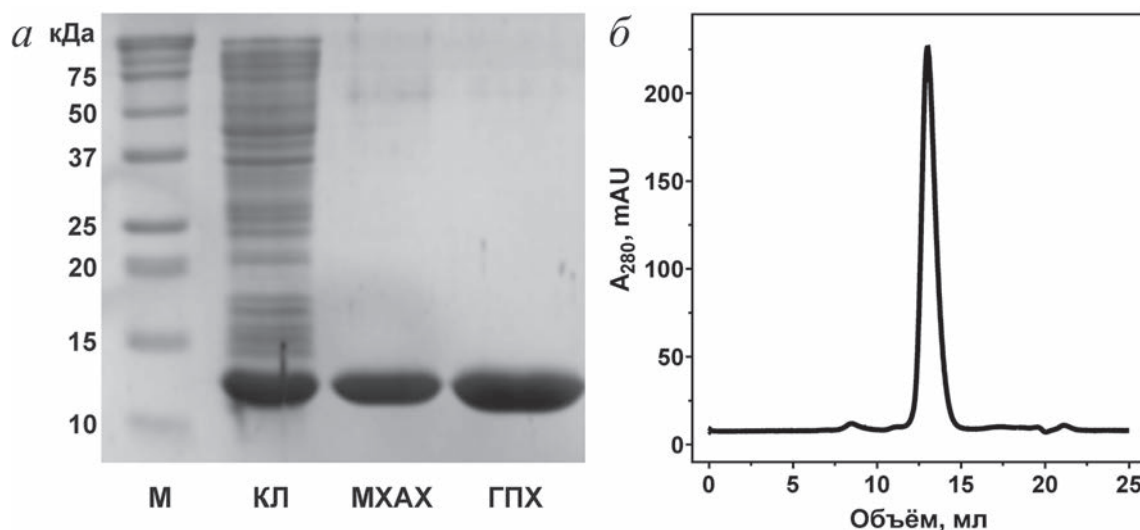


Рис. 1. Очистка рекомбинантного фоторина (Phin) и анализ очищенного белка. *a* – Электрофоретический анализ препарата Phin на разных стадиях очистки; *b* – анализ очищенного Phin с помощью гельпроникающей хроматографии на колонке Superdex 75 10/300 GL. М – Стандарты молекулярных масс; КЛ – супернатант клеточного лизата; МХАХ и ГПХ – образцы после металл-хелатной аффинной хроматографии и гельпроникающей хроматографии соответственно

Таблица 2. Ход очистки рекомбинантного фоторина (Phin)

Стадия очистки ^a	Общий белок (мг)	Содержание Phin (%) ^b	Выход (%)	Степень очистки
Клеточный лизат	138	38	100	1,0
МХАХ	48	86	80	2,3
ГПХ	10	98	20	2,6

Примечание. ^a МХАХ – металл-хелатная аффинная хроматография; ГПХ – гельпроникающая хроматография.

^b Содержание Phin оценивали с помощью денситометрии электрофоретических гелей, окрашенных Кумасси бриллиантовым синим R-250.

His₆-последовательности на C-конце белка и экспрессирован в клетках *E. coli*. Рекомбинантный белок, названный фоторином (Phin), был очищен до электрофоретической гомогенности с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии (МХАХ) и гельпроникающей хроматографии (ГПХ); ход очистки представлен на рис. 1, *a* и в табл. 2.

Определённая экспериментально методом масс-спектрометрии средняя молекулярная масса очищенного Phin (12 517,1 Да) хорошо соответствует теоретической молекулярной массе белка (12 517,81 Да), рассчитанной по выведенной из гена аминокислотной последовательности, которая включает N-концевой метионин и C-концевую His₆-последовательность.

По результатам ГПХ молекулярная масса очищенного Phin составила около 15,4 кДа (рис. 1, *b*). Это значение несколько выше расчётного, вероятно, из-за структурных особенностей белка. В то же время этот результат позволяет сделать вывод о том, что основной формой Phin в растворе является мономер.

Фоторин обнаруживается в клетках и культуральной жидкости *P. laumondii*. С использованием полученных нами кроличьих поликлональных антител к Phin методом иммуноблоттинга было продемонстрировано, что Phin накапливается в клетках и культуральной жидкости ТТ01 при периодическом культивировании (рис. 2). Количество детектируемого белка меняется в ходе культивирования. Максимальное количество Phin регистрируется через 24–30 ч после инокуляции, что соответствует началу стационарной фазы роста бактерий.

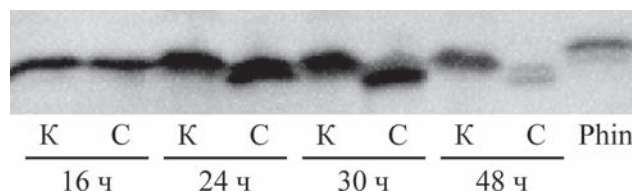


Рис. 2. Анализ накопления фоторина в клетках и культуральной среде *P. laumondii* subsp. *laumondii* TT01 методом иммуноблоттинга. К – клетки ТТ01; С – культуральная среда; Phin – рекомбинантный Phin (0,5 нг)

В поздней стационарной фазе (48 ч) количество Phin заметно снижается, что, возможно, связано с регуляцией активности гена *phin* с участием системы Quorum Sensing.

Неожиданным оказалось то, что ингибитор детектируется в клетках и культуральной среде *P. laumondii* в примерно равных количествах. Ранее для M4in была продемонстрирована локализация внутри клеток, что коррелирует с отсутствием известных сигналов сортировки в последовательностях ЭПИ (в том числе в последовательности Phin) [7]. Возможно, выход Phin из клеток является неспецифическим и обусловлен особенностями ТТ01. Кроме того, иммуноблоттинг показывает, что после завершения логарифмической фазы роста (24, 36 и 48 ч) вне клеток детектируется белок с молекулярной массой ниже, чем у внутриклеточного, а также значительно большее снижение количества внеклеточного Phin, чем внутриклеточного, в поздней стационарной фазе (48 ч). Это может свидетельствовать о нестабильности Phin во внеклеточной среде, но в то же время может отражать работу неизвестных регуляторных систем. Так или иначе полученные данные указывают на то, что вопрос о клеточной локализации ЭПИ остаётся открытым. Это, однако, не влияет на основной вывод из описываемого эксперимента: ген *phin* экспрессируется в клетках природного продуцента ингибитора *P. laumondii* subsp. *laumondii* ТТ01.

Вторичная структура фоторина. Вторичную структуру Phin оценивали с помощью КД-спектроскопии. Анализ спектра (рис. 3) показал, что относительный вклад α -спиралей, β -листов, поворотов и областей, не формирующих регулярных вторичных структур, составляет 14 ± 5 , 34 ± 2 , 23 ± 3 и 30 ± 2 % соответственно. Аналогичные значения, рассчитанные по пространственной структуре M4in [42, 43], прототипа семейства ингибиторов I104, к которому относится Phin, составляют 32 ± 3 , 23 ± 9 , 19 ± 5 и 27 ± 3 %.

Таким образом, вторичные структуры Phin и M4in заметно различаются, что неудивительно, учитывая существенные различия в последовательностях белков (25% идентичности и 47% сходства). В то же время, несмотря на примерно двукратную разницу в количестве α -спиралей, обе молекулы характеризуются высокой долей α - и β -структур. Это свидетельствует о том, что оба белка относятся к одному структурному классу $\alpha + \beta$ и могут иметь общий тип укладки.

Термостабильность фоторина. Тепловая денатурация Phin была изучена методом ДСК (рис. 4).

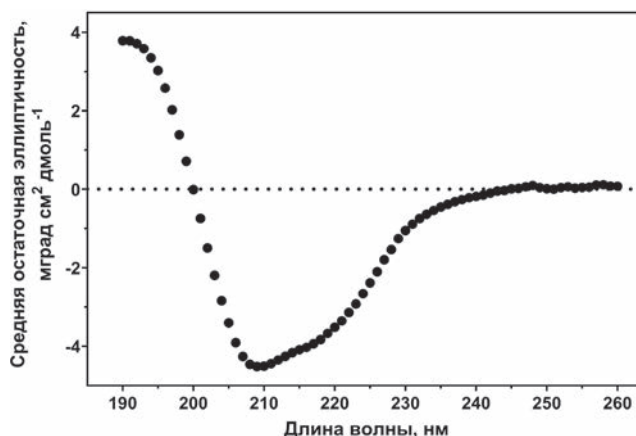


Рис. 3. КД-спектр фоторина

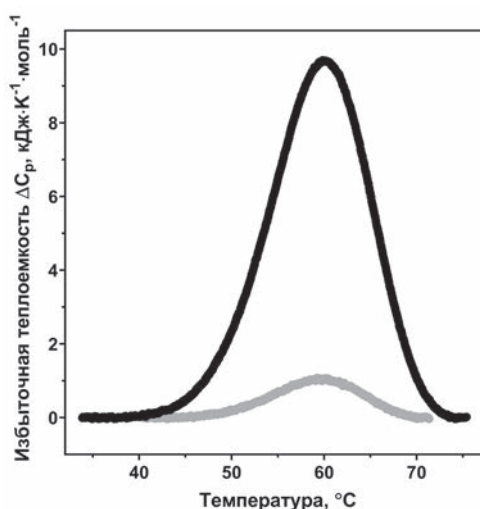


Рис. 4. Термограмма дифференциальной сканирующей калориметрии фоторина. Чёрная и серая кривые – первый и второй нагрев образца соответственно

Phin демонстрировал одиночный тепловой переход с максимумом (T_{max}) при $60,2$ °C. Суммарная калориметрическая энтальпия (ΔH_{cal}) Phin составляла $130,7$ кДж/моль. Тепловая денатурация Phin была почти полностью необратима, так как при втором нагреве образца наблюдалась $\Delta H_{cal} = 12,2$ кДж/моль, что соответствует всего ~ 9 % начальной калориметрической энтальпии. При третьем и четвёртом нагревании энтальпия падала до 6% и 5% от исходного значения, что соответствует стандартному падению энтальпии обратимой тепловой денатурации при каждом последующем нагреве.

Термостабильность Phin близка к термостабильности M4in, прототипа семейства I104, для которого $T_{max} = 61,2$ °C. Однако, в отличие от Phin, денатурация M4in полностью необратима, демонстрирует 3 тепловых перехода и характеризуется $\Delta H_{cal} = 62,8$ кДж/моль [7].

Энтальпия денатурации определяется общим числом нековалентных взаимодействий,

стабилизирующих белковую глобулу [44]. Увеличение энтальпии в случае Phin можно объяснить меньшей, по сравнению с M4in, долей областей с нерегулярной вторичной структурой и наличием более плотно упакованных областей, где могут реализовываться более сильные стабилизирующие взаимодействия. При этом T_{max} определяется не только количеством связей, но и их силой, локализацией и другими факторами. Таким образом, результаты ДСК, а также результаты спектроскопии КД указывают на заметные структурные различия Phin и M4in, которые, однако, не приводят к существенной разнице в их термостабильности.

Фоторин ингибирует протеализин и термолизин по различным механизмам. Ингибирующее действие Phin было изучено по отношению к Pln и Tln. Кинетические кривые, полученные при действии Phin на Pln, имели форму, характерную для медленно связывающихся ингибиторов, и соответствовали интегральному уравнению скорости [39] для этого типа ингибирования (во всех случаях R^2 выше 0,98). Значения начальной скорости реакции (v_0) и кажущейся константы скорости первого порядка (k_a), полученные нелинейной регрессией, использовали для построения диагностических диаграмм (рис. 5, Pln + Phin). Гиперболический характер зависимостей v_0 и k_a от концентрации Phin указывает на двухстадийный механизм (уравнение (3)), при котором быстрообразующийся исходный комплекс фермент–ингибитор (EI) подвергается медленному конформационному переходу в изомеризованный комплекс EI*:



Таблица 3. Константы ингибирования протеализина (Pln) и термолизина (Tln) фоторином (Phin)^a

Константы для Phin	Pln	Tln
K_i (мкМ)	$1,0 \pm 0,3$	$10,2 \pm 1,9$
k_{-4} ($10^{-4} \cdot c^{-1}$)	$3,5 \pm 0,6$	н/п
k_{+4} ($10^{-3} \cdot c^{-1}$)	$2,0 \pm 0,4$	н/п
K_i^* (нМ)	153 ± 46	н/п

Примечание. ^a Значения представлены как среднее \pm стандартная ошибка; н/п – неприменимо.

Исходя из этого, равновесная константа ингибирования ($K_i = k_{-3}/k_{+3}$) была определена методом Диксона на основе набора значений v_0 . Для расчёта констант скоростей k_{-4} и k_{+4} зависимость k_a от концентрации Phin аппроксимировали уравнением (1) (рис. 5, Pln + Phin). Равновесную константу изомеризации (K_i^*) рассчитывали по уравнению (2). Полученные значения констант представлены в табл. 3.

В принципе, конформационные изменения при взаимодействии ингибитора с ферментом могут происходить как до первоначального столкновения их молекул (конформационный отбор, conformational selection), так и после (индуцированная подстройка, induced-fit) [45, 46]. Двухстадийный механизм, описываемый уравнением (3) и характерный для взаимодействия Phin и Pln, представляет собой простейший случай, когда связывание ингибитора проходит быстро по сравнению с дальнейшими конформационными изменениями. Этот механизм реализуется при наличии большого избытка ингибитора по отношению к ферменту

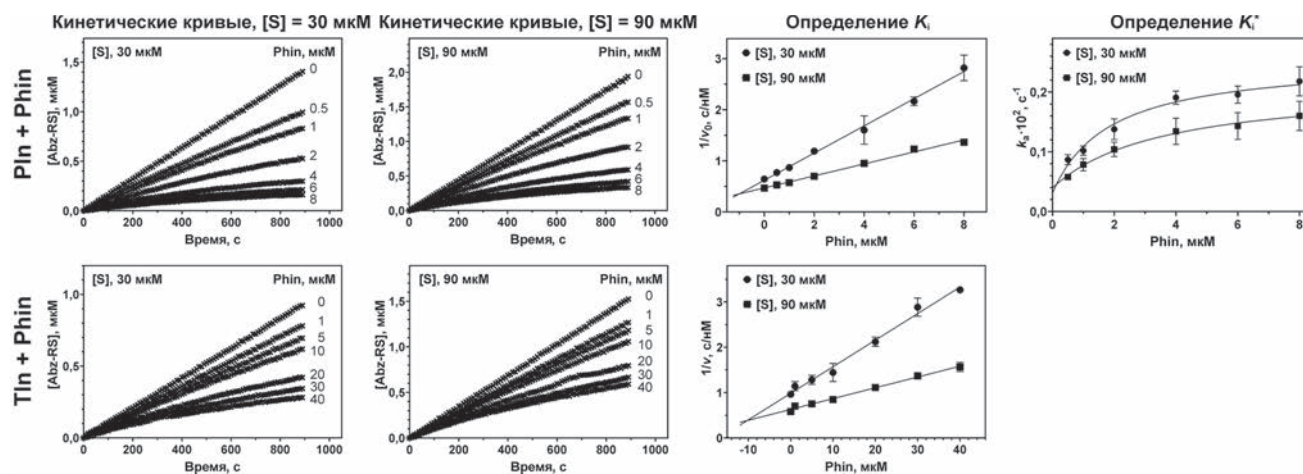


Рис. 5. Кинетические кривые гидролиза субстрата Abz-RSVIK(Dnp) протеализином (Pln) и термолизинном (Tln) в присутствии фоторина (Phin), и определение констант ингибирования. Кинетические кривые были получены для различных концентраций ингибитора и двух концентраций субстрата (30 и 90 мкМ). Abz-RS является продуктом гидролиза субстрата. Зависимость значений $1/v_0$ и k_a для Pln и зависимость величины $1/v$ для Tln от концентрации Phin использовали для расчёта констант ингибирования. Значения представлены как среднее \pm стандартная ошибка

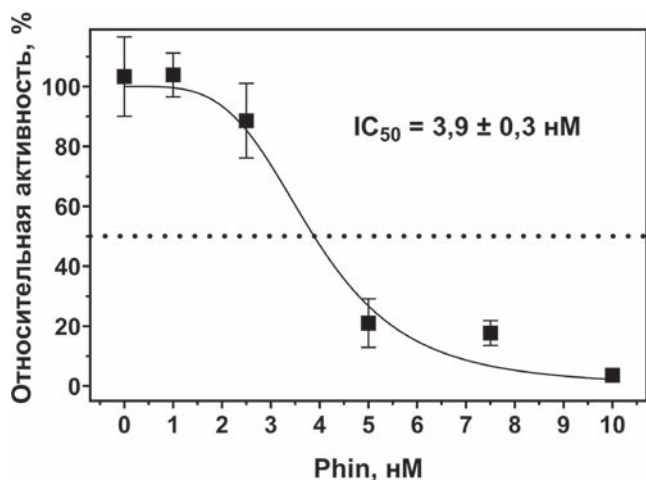


Рис. 6. Ингибирование фоторином (Phin) активности культуральной среды *P. laumondii* subsp. *laumondii* TT01. IC_{50} — концентрация полуингибирования

(в наших экспериментах концентрация Phin была как минимум на 4 порядка выше концентрации Pln). Таким образом, этот механизм можно рассматривать как индуцированную подстройку — конформационную адаптацию фермента к ингибитору или наоборот [47].

Таким образом, Phin, подобно M4in, является медленно связывающимся конкурентным ингибитором Pln, но ингибирует этот фермент значительно слабее. Мы обнаружили также, что Phin взаимодействует с Pln по двухстадийному механизму, в отличие от M4in, который действует по одностадийному механизму с медленным формированием комплекса фермент–ингибитор [7]. Однако различия в механизмах, вероятно, обусловлены в первую очередь различиями в условиях эксперимента, которые диктуются драматическими различиями в эффективности связывания.

Кинетические кривые при действии Phin на Tln выглядят слегка изогнутыми (рис. 5, Tln + Phin). В то же время они плохо аппроксимируются интегральным уравнением скорости для медленно связывающихся ингибиторов [39], но хорошо описываются линейной регрессионной моделью ($R^2 > 0,98$). Поэтому в данном случае K_i рассчитывали по методу Диксона, как для классического ингибирования (табл. 3).

Таким образом, Phin является классическим ингибитором Tln, что, вероятно, определяется структурными различиями в области активного центра Tln и Pln [48] — двух ферментов, относящихся к одному структурному семейству пептидаз, а не структурными различиями ингибиторов. К сожалению, данных о механизме ингибирования Tln эмфорином в настоящее время нет.

Способность культуральной среды *P. laumondii* гидролизовать Abz-RSVIK(Dnp) ингибируется фоторином. Культуральная среда *P. laumondii* subsp. *laumondii* TT01 через 24 ч роста проявляет существенную активность в отношении субстрата Abz-RSVIK(Dnp) (~4000 мкмоль/(мин мл)). Эта активность эффективно подавляется Phin, концентрация полуингибирования IC_{50} составляет $3,9 \pm 0,3$ нМ (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В представленной работе мы впервые получили данные, позволяющие предположить, что у протеазы S из *P. laumondii* subsp. *laumondii* TT01 (TT01) есть специфический ингибитор — фоторин. Phin является вторым охарактеризованным ингибитором из семейства I104 (по классификации базы данных MEROPS). Сравнение Phin с другим известным представителем этого семейства, его прототипом эмфорином (M4in), показывает, что эти два белка заметно различаются. По последовательности они имеют лишь четверть идентичных и около половины сходных аминокислотных остатков, что обуславливает зарегистрированные нами с помощью КД-спектроскопии различия во вторичной структуре. Структурные различия влекут за собой различия в характере плавления белков и, что более важно, различия в их ингибирующей способности.

Ингибирующее действие Phin было изучено по отношению к Pln и Tln, металлопротеазам из различных эволюционных групп семейства M4 (по классификации MEROPS). Оказалось, что ингибирование Pln фоторином происходит по-иному, чем в случае M4in, механизму, а константы ингибирования на 3 (K_i^*) и 4 (K_i) порядка выше (K_i для M4in составляет 52 пМ [7]). Такой результат не кажется неожиданным, так как Pln является природной мишенью M4in, а Phin должен быть оптимизирован для взаимодействия с PrtS. В пользу такой оптимизации свидетельствует эффективное подавление Phin гидролиза пептидного субстрата для протеализинподобных протеаз [37] культуральной жидкостью TT01, одной из основных протеаз в которой является PrtS [49]. Концентрация полуингибирования (IC_{50}) при этом находится в наномолярном диапазоне, то есть примерно в 40 раз ниже K_i^* , наблюдаемой в случае действия Phin на Pln. Активность Tln, в отличие от Pln и PrtS, не являющегося ППП [50], Phin подавляет ещё на порядок хуже, чем активность Pln (табл. 3).

Таким образом, сопоставление имеющихся данных об ингибирующей способности Phin и M4in указывает на эволюционную адаптацию ингибиторов семейства M104 к являющимся их природными мишенями ППП из тех же организмов.

Возвращаясь к ассоциации Phin и PrtS, следует обратить внимание на то, что организация их генов у *P. laumondii* отличается от того, как организованы соответствующие гены ингибитора и протеазы у *S. proteamaculans*. У этой бактерии гены *pln* и *m4in*, как упоминалось выше, формируют бицистронный оперон, причём стоп-кодон гена протеазы перекрывается со стартовым кодоном гена ингибитора, что указывает на трансляционное сопряжение [7]. В случае генов *prtS* и *phin* анализ последовательности генома TT01 показывает, что в межгенном промежутке протяжённостью 160 п.н. перед геном ингибитора расположен промотор. Таким образом, в случае *P. laumondii* протеаза и ингибитор кодируются следующими друг за другом, но автономными генами, что указывает на дифференциальную регуляцию транскрипции этих генов.

Различия в регуляции экспрессии пар генов протеаза–ингибитор, вероятно, отражают различия в функциях, которые кодируемые этими генами белки выполняют у разных бактерий. Независимый контроль на уровне транскрипции даёт возможность гибко менять соотношение ЭПИ/ППП в клетке, в то время как интеграция генов в одном опероне с трансляционным сопряжением, напротив, жёстко фиксирует этот параметр. Принимая во внимание вероятную мультифункциональность ППП, можно предположить, что независимая регуляция является необходимым условием для реализации одних функций этих протеаз, но избыточна для выполнения других. Так, снижение соотношения ЭПИ/ППП, что требует независимой регуляции, может быть триггером, например, для начала атаки на иммунную систему хозяина. А в том случае, когда ингибитор играет роль антитоксина в системе межбактериальной конкуренции, достаточно, чтобы его концентрация в клетке была пропорциональна концентрации протеазы. Впрочем, независимая регуляция позволяет реализовать оба варианта и в целом, несомненно, имеет больший потенциал. В этом контексте независимая регуляция генов, вероятно, возникает при увеличении числа функций пары ЭПИ–ППП.

Наличие Phin в культуральной среде, в отличие от M4in, наблюдаемого только внутри клеток, также указывает на вероятные различия в функциях этих ингибиторов. Действие Phin, находящегося вне клеток, может быть направлено на регуляцию активности PrtS в среде. В то же время мишенью Phin могут быть и другие ферменты. Это могут быть, например, термолизинподобные протеазы, продуцируемые микроорганизмами-конкурентами, или протеазы организма-хозяина. Таким образом, нельзя исключить, что Phin имеет биологические функции, не связанные с работой PrtS.

Заканчивая обсуждение, следует подчеркнуть, что пара Phin и PrtS у бактерий рода *Photorhabdus* представляется многообещающей моделью для исследований фундаментальных принципов регуляции протеолиза. Однако таким исследованиям должно предшествовать выяснение функции этих белков у *Photorhabdus* и детальная характеристика взаимодействия Phin и PrtS.

Вклад авторов. И.В. Демидюк – концепция и руководство работой; И.М. Бердышев, А.О. Светлова, К.Н. Чухонцева, М.А. Карасева, А.М. Варижук, В.В. Филатов, С.Ю. Клеймёнов – проведение экспериментов; И.М. Бердышев, А.О. Светлова, С.В. Костров, И.В. Демидюк – обсуждение результатов исследования; И.М. Бердышев, А.О. Светлова, И.В. Демидюк – написание текста; И.М. Бердышев, А.О. Светлова, К.Н. Чухонцева, М.А. Карасева, А.М. Варижук, В.В. Филатов, С.Ю. Клеймёнов, С.В. Костров, И.В. Демидюк – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00135).

Благодарности. В работе использовали оборудование Центра клеточных и геномных технологий Института молекулярной генетики НИЦ «Курчатовский институт». Авторы благодарят Д.И. Левицкого (Институт биохимии имени А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН) за помощь в проведении экспериментов по дифференциальной сканирующей калориметрии.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Cabral-Pacheco, G. A., Garza-Veloz, I., Castruita-De la Rosa, C., Ramirez-Acuna, J. M., Perez-Romero, B. A., Guerrero-Rodriguez, J. F., Martinez-Avila, N., and Martinez-Fierro, M. L. (2020) The roles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human diseases, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 9739, doi: 10.3390/ijms21249739.
- D'Acunto, E., Fra, A., Visentin, C., Manno, M., Ricagno, S., Galliciotti, G., and Miranda, E. (2021) Neuroserpin: structure, function, physiology and pathology, *Cell. Mol. Life Sci.*, **78**, 6409-6430, doi: 10.1007/s00018-021-03907-6.
- Kelly-Robinson, G. A., Reihill, J. A., Lundy, F. T., McGarvey, L. P., Lockhart, J. C., Litherland, G. J., Thornbury, K. D., and Martin, S. L. (2021) The serpin superfamily and their role in the regulation and dysfunction of serine protease activity in COPD and other chronic lung diseases, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 6351, doi: 10.3390/ijms22126351.
- Sillen, M., and Declerck, P. J. (2021) A narrative review on plasminogen activator inhibitor-1 and its (patho)physiological role: to target or not to target? *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 2721, doi: 10.3390/ijms22052721.
- Wilkinson, D. J. (2021) Serpins in cartilage and osteoarthritis: what do we know? *Biochem. Soc. Trans.*, **49**, 1013-1026, doi: 10.1042/BST20201231.
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J., Thomas, P. D., Huang, X., Bateman, A., and Finn, R. D. (2018) The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database, *Nucleic Acids Res.*, **46**, D624-D632, doi: 10.1093/nar/gkx1134.
- Chukhontseva, K. N., Berdyshev, I. M., Safina, D. R., Karaseva, M. A., Bozin, T. N., Salnikov, V. V., Konarev, P. V., Volkov, V. V., Grishin, A. V., Kozlovskiy, V. I., Kostrov, S. V., and Demidyuk, I. V. (2021) The protealysin operon encodes emfourin, a prototype of a novel family of protein metalloprotease inhibitors, *Int. J. Biol. Macromol.*, **169**, 583-596, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.12.170.
- Demidyuk, I. V., Gromova, T. Y., and Kostrov, S. V. (2013) *Protealysin*. in *Handbook of Proteolytic Enzymes* (Rawlings, N. D., and Salvesen, G., eds.), 3 Ed., Academic Press, Oxford, pp. 507-602.
- Demidyuk, I. V., Kalashnikov, A. E., Gromova, T. Y., Gasanov, E. V., Safina, D. R., Zabolotskaya, M. V., Rudenskaya, G. N., and Kostrov, S. V. (2006) Cloning, sequencing, expression, and characterization of protealysin, a novel neutral proteinase from *Serratia proteamaculans* representing a new group of thermolysin-like proteases with short N-terminal region of precursor, *Protein Express. Purif.*, **47**, 551-561, doi: 10.1016/j.pep.2005.12.005.
- Bozhokina, E. S., Tsaplina, O. A., Efremova, T. N., Kever, L. V., Demidyuk, I. V., Kostrov, S. V., Adam, T., Komissarchik, Y. Y., and Khaitlina, S. Y. (2011) Bacterial invasion of eukaryotic cells can be mediated by actin-hydrolysing metalloproteases grimelysin and protealysin, *Cell Biol. Int.*, **35**, 111-118, doi: 10.1042/CBI20100314.
- Tsaplina, O. A., Demidyuk, I., Artamonova, T., Khodorkovsky, M., and Khaitlina, S. (2020) Cleavage of the outer membrane protein OmpX by protealysin regulates *Serratia proteamaculans* invasion, *FEBS Lett.*, **594**, 3095-3107, doi: 10.1002/1873-3468.13897.
- Tsaplina, O. A., Efremova, T., Demidyuk, I., and Khaitlina, S. (2012) Filamentous actin is a substrate for protealysin, a metalloprotease of invasive *Serratia proteamaculans*, *FEBS J.*, **279**, 264-274, doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08420.x.
- Цаплина О. А., Ефремова Т. Н., Кевер Л. В., Комиссарчик Я. Ю., Демидюк И. В., Костров С. В., Хайтлина С. Ю. (2009) Выявление актиназной активности протеализина, *Биохимия*, **74**, 797-804.
- Khaitlina, S., Bozhokina, E., Tsaplina, O., and Efremova, T. (2020) Bacterial actin-specific endoproteases grimelysin and protealysin as virulence factors contributing to the invasive activities of *Serratia*, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 4025, doi: 10.3390/ijms21114025.
- Cabral, C. M., Cherqui, A., Pereira, A., and Simoes, N. (2004) Purification and characterization of two distinct metalloproteases secreted by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus* sp. Strain Az29, *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 3831-3838, doi: 10.1128/aem.70.7.3831-3838.2004.
- Held, K. G., LaRock, C. N., D'Argenio, D. A., Berg, C. A., and Collins, C. M. (2007) A metalloprotease secreted by the insect pathogen *Photorhabdus luminescens* induces melanization, *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 7622-7628, doi: 10.1128/aem.01000-07.
- Eshwar, A. K., Wolfrum, N., Stephan, R., Fanning, S., and Lehner, A. (2018) Interaction of matrix metalloproteinase-9 and Zpx in *Cronobacter turicensis* LMG 23827(T) mediated infections in the zebrafish model, *Cell. Microbiol.*, **20**, e12888, doi: 10.1111/cmi.12888.
- Feng, T., Nyffenegger, C., Hojrup, P., Vidal-Melgosa, S., Yan, K. P., Fangel, J. U., Meyer, A. S., Kirpekar, F., Willats, W. G., and Mikkelsen, J. D. (2014) Characterization of an extensin-modifying metalloprotease: N-terminal processing and substrate cleavage pattern of *Pectobacterium carotovorum* Prt1, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 10077-10089, doi: 10.1007/s00253-014-5877-2.
- Kyöstiö, S. R., Cramer, C. L., and Lacy, G. H. (1991) *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* extracellular protease: characterization and nucleotide sequence of the gene, *J. Bacteriol.*, **173**, 6537-6546, doi: 10.1128/jb.173.20.6537-6546.1991.

20. Tsaplina, O., Khaitlina, S., Chukhontseva, K., Karaseva, M., Demidyuk, I., Bakhlanova, I., Baitin, D., Artamonova, T., Vedyaykin, A., Khodorkovskii, M., and Vishnyakov, I. (2022) Protealysin targets the bacterial housekeeping proteins FtsZ and RecA, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 10787, doi: 10.3390/ijms231810787.
21. Clarke, D. J. (2008) *Photorhabdus*: a model for the analysis of pathogenicity and mutualism, *Cell. Microbiol.*, **10**, 2159-2167, doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01209.x.
22. Ciche, T. A., Kim, K. S., Kaufmann-Daszczuk, B., Nguyen, K. C., and Hall, D. H. (2008) Cell invasion and matricide during *Photorhabdus luminescens* transmission by heterorhabditis bacteriophora nematodes, *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 2275-2287, doi: 10.1128/AEM.02646-07.
23. Cimen, H., Touray, M., Gulsen, S. H., Erincik, O., Wenski, S. L., Bode, H. B., Shapiro-Ilan, D., and Hazir, S. (2021) Antifungal activity of different *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species against various fungal phytopathogens and identification of the antifungal compounds from *X. szentirmaii*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **105**, 5517-5528, doi: 10.1007/s00253-021-11435-3.
24. Muangpat, P., Suwannaroj, M., Yimthin, T., Fukrukha, C., Sitthisak, S., Chantratita, N., Vitta, A., and Thanwisai, A. (2020) Antibacterial activity of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* isolated from entomopathogenic nematodes against antibiotic-resistant bacteria, *PLoS One*, **15**, e0234129, doi: 10.1371/journal.pone.0234129.
25. Bowen, D., Blackburn, M., Rocheleau, T., Grutzmacher, C., and French-Constant, R. H. (2000) Secreted proteases from *Photorhabdus luminescens*: separation of the extracellular proteases from the insecticidal Tc toxin complexes, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **30**, 69-74, doi: 10.1016/s0965-1748(99)00098-3.
26. Marokházi, J., Kóczán, G., Hudecz, F., Gráf, L., Fodor, A., and Venekei, I. (2004) Enzymic characterization with progress curve analysis of a collagen peptidase from an entomopathogenic bacterium, *Photorhabdus luminescens*, *Biochem. J.*, **379**, 633-640, doi: 10.1042/bj20031116.
27. 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.
28. Гаспаров В. С., Дегтярь В. Г. (1994) Определение белка по связыванию с красителем кумасси бриллиантовым голубым G-250, *Биохимия*, **59**, 763-777.
29. 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.
30. Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J., and Engel, J. (1985) Molecular cloning – A laboratory manual, in *Acta Biotechnologica*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory, **5**, 104-104, doi: 10.1016/0307-4412(83)90068-7.
31. Lennox, E. S. (1955) Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1, *Virology*, **1**, 190-206, doi: 10.1016/0042-6822(55)90016-7.
32. Kozlovski, V., Brusov, V., Sulimenkov, I., Pikhtelev, A., and Dodonov, A. (2004) Novel experimental arrangement developed for direct fullerene analysis by electrospray time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **18**, 780-786, doi: 10.1002/rcm.1405.
33. Sreerama, N., and Woody, R. W. (2000) Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set, *Anal. Biochem.*, **287**, 252-260, doi: 10.1006/abio.2000.4880.
34. Drew, E. D., and Janes, R. W. (2020) PDBMD2CD: providing predicted protein circular dichroism spectra from multiple molecular dynamics-generated protein structures, *Nucleic Acids Res.*, **48**, W17-W24, doi: 10.1093/nar/gkaa296.
35. Chukhontseva, K. N., Salnikov, V. V., Morenkov, O. S., Kostrov, S. V., and Demidyuk, I. V. (2019) Protealysin is not secreted constitutively, *Protein Peptide Lett.*, **26**, 221-226, doi: 10.2174/0929866526666181212114907.
36. Schagger, H. (2006) Tricine-SDS-PAGE, *Nat. Protoc.*, **1**, 16-22, doi: 10.1038/nprot.2006.4.
37. Karaseva, M. A., Chukhontseva, K. N., Lemeskina, I. S., Pridatchenko, M. L., Kostrov, S. V., and Demidyuk, I. V. (2019) An internally quenched fluorescent peptide substrate for protealysin, *Sci. Rep.*, **9**, 14352, doi: 10.1038/s41598-019-50764-2.
38. Berdyshev, I. M., Karaseva, M. A., and Demidyuk, I. V. (2022) Assay for protealysin-like protease inhibitor activity, *Bio Protoc.*, **12**, e4528, doi: 10.21769/BioProtoc.4528.
39. Goličnik, M., and Stojan, J. (2004) Slow-binding inhibition: A theoretical and practical course for students, *Biochem. Mol. Biol. Educat.*, **32**, 228-235, doi: 10.1002/bmb.2004.494032040358.
40. Butterworth, P. J. (1972) The use of Dixon plots to study enzyme inhibition, *Biochim. Biophys Acta*, **289**, 251-253, doi: 10.1016/0005-2744(72)90074-5.
41. Dixon, M. (1953) The determination of enzyme inhibitor constants, *Biochem. J.*, **55**, 170-171, doi: 10.1042/bj0550170.
42. Bozin, T. N., Berdyshev, I. M., Chukhontseva, K. N., Karaseva, M. A., Konarev, P. V., Varizhuk, A. M., Lesovoy, D. M., Arseniev, A. S., Kostrov, S. V., Bocharov, E. V., and Demidyuk, I. V. (2023) NMR structure of emfourin, a novel protein metalloprotease inhibitor: insights into the mechanism of action, *J. Biol. Chem.*, **299**, 104585, doi: 10.1016/j.jbc.2023.104585.
43. Bozin, T. N., Chukhontseva, K. N., Lesovoy, D. M., Filatov, V. V., Kozlovskiy, V. I., Demidyuk, I. V.,

- and Bocharov, E. V. (2021) NMR assignments and secondary structure distribution of emfourin, a novel proteinaceous protease inhibitor, *Biomol. NMR Assign.*, **15**, 361-366, doi: 10.1007/s12104-021-10030-x.
44. Chiu, M. H., and Prenner, E. J. (2011) Differential scanning calorimetry: An invaluable tool for a detailed thermodynamic characterization of macromolecules and their interactions, *J. Pharm. Bioallied Sci.*, **3**, 39-59, doi: 10.4103/0975-7406.76463.
45. Gianni, S., Dogan, J., and Jemth, P. (2014) Distinguishing induced fit from conformational selection, *Biophys. Chem.*, **189**, 33-39, doi: 10.1016/j.bpc.2014.03.003.
46. Hammes, G. G., Chang, Y. C., and Oas, T. G. (2009) Conformational selection or induced fit: a flux description of reaction mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 13737-13741, doi: 10.1073/pnas.0907195106.
47. Masson, P., and Lushchekina, S. V. (2016) Slow-binding inhibition of cholinesterases, pharmacological and toxicological relevance, *Arch. Biochem. Biophys.*, **593**, 60-68, doi: 10.1016/j.abb.2016.02.010.
48. Demidyuk, I. V., Gromova, T. Y., Polyakov, K. M., Melik-Adamyana, W. R., Kuranova, I. P., and Kostrov, S. V. (2010) Crystal structure of the protealysin precursor: insights into propeptide function, *J. Biol. Chem.*, **285**, 2003-2013, doi: 10.1074/jbc.M109.015396.
49. Marokházi, J., Lengyel, K., Pekár, S., Felföldi, G., Patthy, A., Gráf, L., Fodor, A., and Venekei, I. (2004) Comparison of proteolytic activities produced by entomopathogenic *Photorhabdus* bacteria: strain- and phase-dependent heterogeneity in composition and activity of four enzymes, *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 7311-7320, doi: 10.1128/aem.70.12.7311-7320.2004.
50. Demidyuk, I. V., Gasanov, E. V., Safina, D. R., and Kostrov, S. V. (2008) Structural organization of precursors of thermolysin-like proteinases, *Protein J.*, **27**, 343-354, doi: 10.1007/s10930-008-9143-2.

PRODUCTION AND CHARACTERISATION OF PHOTORIN, A NEW PROTEIN PROTEASE INHIBITOR FROM THE ENTOMOPATHOGENIC BACTERIA *Photorhabdus laumondii*

I. M. Berdyshev^{1#}, A. O. Svetlova^{1#}, K. N. Chukhontseva¹, M. A. Karaseva¹,
A. M. Varizhuk², V. V. Filatov³, S. Y. Klyemenov^{4,5}, S. V. Kostrov¹, and I. V. Demidyuk^{1*}

¹ National Research Centre "Kurchatov Institute", 123182 Moscow, Russia; e-mail: ilyaduk@yandex.ru

² Moscow Institute of Physics and Technology, State University, 141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia

³ Chernogolovka Branch of the N. N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics,
Russian Academy of Sciences, 142432 Chernogolovka, Moscow Region, Russia

⁴ Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences,
119071 Moscow, Russia

⁵ Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia

Entomopathogenic bacteria of the genus *Photorhabdus* secrete protease S (PrtS), which is considered as a virulence factor. We found that in *Photorhabdus* genomes, immediately after the *prtS* genes, there are genes that encode small hypothetical proteins homologous to emfourin, a recently discovered protein inhibitor of metalloproteases. Emfourin-like inhibitor gene from *Photorhabdus laumondii* subsp. *laumondii* TT01 was cloned and expressed in *Escherichia coli* cells. The recombinant protein, named photorin (Phin), was purified by metal chelate affinity and gel permeation chromatography and characterized. It has been established that Phin is a monomer and inhibits the activity of protealysin and thermolysin, which, like PrtS, belong to the M4 peptidase family. The inhibition constants were 1.0 ± 0.3 and 10 ± 2 μ M, respectively. It was also demonstrated that Phin is able to suppress the proteolytic activity of *P. laumondii* culture broth (half-maximal inhibition concentration 3.9 ± 0.3 nM). Polyclonal antibodies to Phin were obtained, and it was shown by immunoblotting that *P. laumondii* cells produce Phin. Thus, the *prtS* genes in entomopathogenic bacteria of the genus *Photorhabdus* are colocalized with the genes of emphorin-like inhibitors, which probably regulate the activity of the enzyme during infection. Strict regulation of the activity of proteolytic enzymes is essential for the functioning of all living systems. At the same time, the principles of regulation of protease activity by protein inhibitors remain poorly understood. Bacterial protease-inhibitor pairs, such as the PrtS and Phin pair, are a promising model for *in vivo* studies of these principles. Bacteria of the genus *Photorhabdus* have a complex life cycle with multiple hosts, being both nematode symbionts and powerful insect pathogens. This provides a unique opportunity to use the PrtS and Phin pair as a model for studying the principles of regulation of protease activity by proteinaceous inhibitors in the context of bacterial interactions with different types of hosts.

Keywords: proteinaceous protease inhibitor, *Photorhabdus*, entomopathogenic bacteria, protealysin, emfourin, photorin

ВЛИЯНИЕ ДЕФИЦИТА БИОТИНА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ *Komagataella phaffii*

© 2023 А.С. Макеева, А.В. Сидорин, В.В. Иштуганова,
М.В. Падкина, А.М. Румянцев*

Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и биотехнологии,
199034 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: rutyantsev-am@mail.ru

Поступила в редакцию 16.05.2023

После доработки 26.07.2023

Принята к публикации 31.07.2023

Метилотрофные дрожжи *Komagataella phaffii* активно используются в биотехнологии для синтеза рекомбинантных белков. В связи с высокой практической значимостью этих дрожжей необычайно важным является тщательный подбор условий культивирования и оптимизация состава сред. В данной работе на уровне транскриптома было изучено влияние дефицита биотина на экспрессию генов у этих дрожжей. Было показано, что ответ клеток *K. phaffii* на недостаток биотина сильно зависит от источника углерода в среде. В средах, содержащих глицерин, дефицит биотина приводил к активации генов метаболизма биотина, глиоксилатного цикла и синтеза ацетил-СоА в цитоплазме, а также подавлению генов глюконо- и липогенеза. В средах, содержащих метанол, дефицит биотина в первую очередь приводил к подавлению генов, вовлеченных в синтез белков, и активации ответа клетки на окислительный стресс.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *Komagataella phaffii*, биотин, глицерин, метанол, транскриптомный анализ, дифференцированная экспрессия генов.

DOI: 10.31857/S0320972523090166, EDN: WVQDFI

ВВЕДЕНИЕ

Дрожжи *Komagataella phaffii* (также известные как *Pichia pastoris*) – высокоэффективный продуцент рекомбинантных белков. Они используются для синтеза интерлейкинов, интерферонов, антимикробных пептидов, ферментов и множества других белков, а также пищевых добавок [1].

Благодаря особенностям физиологии и метаболизма *K. phaffii* обладают рядом преимуществ в качестве системы экспрессии. Эти дрожжи обеспечивают правильную укладку гетерологичных эукариотических белков и их посттрансляционные модификации, такие как гликозилирование и формирование дисульфидных связей. Недавно для *K. phaffii* были также разработаны методы модификации систем гликозилирования, которые позволяют синтезировать в этих дрожжах белки, гликозилированные по типу белков млекопитающих

и человека [1]. Из-за низкого уровня секреции собственных эндогенных белков *K. phaffii* привлекательны в качестве системы для синтеза секреторных белков. Эти дрожжи относятся к так называемым «Крэбтри-негативным» дрожжам, которые характеризуются дыхательным типом метаболизма. В связи с этим *K. phaffii* демонстрируют большую скорость роста и высокую плотность клеток при культивировании на сравнительно простых и дешевых средах [2, 3].

K. phaffii способны утилизировать различные источники углерода, в частности, глицерин и метанол. В ходе окислительного метаболизма глицерин фосфорилируется с образованием глицерин-3-фосфата, который затем окисляется до дигидроксиацетонфосфата (DHAP). DHAP преобразуется в глицеральдегид-3-фосфат (GAP) и вступает в путь гликолиза. В качестве альтернативы GAP может вступать в реакции глюконеогенеза за счет ак-

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; ЦТК – цикл трикарбоновых кислот; DAPA – 7,8-диаминопеларгонат; DHAP – дигидроксиацетонфосфат; GAP – глицеральдегид-3-фосфат; KAPA – 8-амино-7-оксонаноат; ОхАс – оксалоацетат; РЕР – фосфоенолпируват; РЕРСК – фосфоенолпируваткарбоксикиназа.

* Адресат для корреспонденции.

тивности цитозольных альдозаз, которые катализируют обратимое преобразование ДНАР и GAP в фруктозо-1,6-бисфосфат (F-1,6-БФ). F-1,6-БФ превращается в фруктозо-6-фосфат, который может вступать в реакции пентозо-фосфатного пути [4].

Утилизация метанола в клетках *K. phaffii* начинается с окисления метанола до формальдегида под действием алкогольоксидазы. Этот процесс происходит в пероксисомах. Затем формальдегид может быть окислен в пути диссимиляции либо ассимилирован клеткой за счет конденсации с ксилулозо-5-фосфатом (Xu5P). В результате последней реакции Xu5P и формальдегид преобразуются в дигидроксиацетон и GAP, которые далее метаболизируются в цитоплазме [5].

Экспрессия генов метаболизма метанола (*MUT*-генов) строго регулируется в зависимости от источника углерода: она подавляется в присутствии глюкозы или глицерина в среде и индуцируется в присутствии метанола. Сильные метанол-индуцируемые промоторы *MUT*-генов, такие как промотор гена алкогольоксидазы 1 (*AOX1*), широко используются для экспрессии гетерологичных генов в *K. phaffii*.

Производство белков в *K. phaffii* обычно происходит с использованием двухстадийной схемы культивирования, чтобы разобщить процессы накопления биомассы и синтеза белка. На первой стадии дрожжевые клетки выращивают в среде с глицерином. В таких условиях экспрессия гетерологичных генов под контролем промотора *AOX1* подавлена. После переноса клеток в среду, содержащую метанол, происходит индукция синтеза белка. В связи с важностью *K. phaffii* как объекта биотехнологии в настоящее время активно изучается влияние состава культивационной среды на физиологию этих дрожжей [6–11].

Биотин (или витамин Н) является важным компонентом, необходимым для роста разных организмов. Он играет значительную роль как кофактор ферментов, катализирующих реакции карбоксилирования в процессах липогенеза, глюконеогенеза и метаболизма аминокислот. Было также показано, что биотин участвует в контроле метаболизма углерода и адаптации к изменениям в содержании источника углерода в среде [12].

Бактерии, растения и некоторые низшие грибы способны синтезировать биотин *de novo*. Многие другие организмы вынуждены получать этот витамин из пищи. В отличие от большинства микроорганизмов, некоторые виды дрожжей, включая *K. phaffii* и большинство штаммов *Saccharomyces cerevisiae*, потеряли

способность синтезировать биотин самостоятельно. Метаболизм биотина и последствия биотинового голодания изучались в основном у дрожжей *S. cerevisiae*, и очень мало известно об этих процессах у *K. phaffii*.

Дрожжи *S. cerevisiae* имеют 6 биотин-зависимых ферментов, вовлеченных в метаболизм сахаров, жиров и аминокислот: цитоплазматическая (*Acc1*) и митохондриальная (*Hfa1*) ацетил-СоА карбоксилазы; пируваткарбоксилазы *Puc1*, *Puc2*; амидолиаза мочевины *Dur1,2* и кофактор аминокислотирования тРНК *Arg1*. Ковалентное присоединение биотина к белкам *Puc1,2* и *Acc1* осуществляется биотин-протеинлигазой *Vpl1* [13]. Несмотря на то что большинство штаммов *S. cerevisiae* являются ауксотрофами по биотину, они способны синтезировать биотин из таких предшественников, как 8-амино-7-оксонаноат (КАРА), 7,8-диаминопеларгонат (ДАРА) и детиобиотин. Ферменты, обеспечивающие превращение КАРА через ДАРА и детиобиотин в биотин кодируются генами *BIO3*, *BIO4*, *BIO2*. Транспортёр биотина *Vht1* обеспечивает поглощение экзогенного биотина, а его предшественники транспортируются через мембранный белок *Bio5* [13]. Некоторые штаммы *S. cerevisiae* также располагают генами *BIO1* и *BIO6*, чьи продукты участвуют в вышележащих этапах биосинтеза биотина. Они обеспечивают образование КАРА из пимелиновой кислоты, что позволяет клеткам медленно расти на среде без биотина [14].

Дрожжи *K. phaffii* имеют только ортолог гена *BIO2*, позволяющего расти на среде с детиобиотином, тогда как остальные гены биосинтеза биотина у них отсутствуют. Было показано, что *K. phaffii* способны расти на среде с КАРА и ДАРА или на среде без биотина только после интеграции и сверхэкспрессии соответствующих генов *S. cerevisiae*. Таким образом, штаммы *K. phaffii*, используемые для производства белков, нуждаются в добавлении большого количества этого витамина в среду [15].

Целью данного исследования является изучение влияния дефицита биотина на экспрессию генов в клетках *K. phaffii* на уровне транскриптома.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы и условия культивирования. В работе использовался штамм дрожжей *K. phaffii* X-33 («Thermo Fisher Scientific», США).

Модификации стандартных сред BMG (buffered minimal glycerol) и ВММ (buffered minimal methanol) с разными концентрациями

Биотин использовались для культивирования *K. phaffii* и транскриптомного анализа. Сначала приготовили исходные растворы сред BMG и BMM без биотина. Они содержали 100 мМ фосфата калия (рН 6,0), 1% глицерина (для сред BMG) или 0,5% метанола (для сред BMM), а вместо коммерческой смеси YNB (содержащей биотин) была использована соответствующая смесь витаминов (за исключением биотина), солей, источников азота и микроэлементов (таблица). Смесь была составлена на основе рецепта коммерческой YNB без аминокислот, содержащей сульфат аммония («Sigma-Aldrich», США; #Y0626 KG).

Среды BMG и BMM без биотина обозначены как BMG(B–) и BMM(B–). BMG(B+) и BMM(B+) содержали биотин в концентрации 2 мкг/литр ($2 \times 10^{-7}\%$). BMG(B++) и BMM(B++) содержали 400 мкг/литр ($4 \times 10^{-5}\%$) биотина.

Клетки дрожжей культивировались при 30 °С.

Культивирование клеток *K. phaffii* для транскриптомного анализа. В 300 мл среды BMG(B+) с глицерином и BMM(B+) с метанолом вносили клетки штамма X-33. После 22 ч культивирования из каждой культуры отбирали 2 равных объема (по 90 мл). Клетки из этих объемов собирали с помощью центрифугирования (10 мин при 3000 g). Для каждого варианта источника углерода клетки из одной пробы разводили в 90 мл среды с соответствующим источником углерода и без биотина. Клетки из второй пробы разводили в 90 мл соответствующей среды с концентрацией биотина 400 мкг/литр. Из каждой пробы отбирали по 3 объема по 20 мл и культивировали их отдельно в течение 24 ч.

Выделение РНК и приготовление библиотек.

Тотальная РНК была выделена из клеток с использованием набора YeaStar RNA Kit («Zymo Research», США; #R1002). После выделения пробы обрабатывали ДНКазой («Thermo Fisher Scientific»; #EN0525) и очищали с помощью набора CleanRNA Standard («Евроген», Россия; #BC033). Качество выделенной РНК оценивали с помощью агарозного гель-электрофореза.

300 нг тотальной РНК каждого образца использовали для приготовления библиотек с помощью набора QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit FWD for Illumina («Lexogen», Австрия; #015.96). Качественный и количественный анализ образцов производили с помощью флуориметра Qubit и капиллярного электрофореза в системе Agilent 2200 TapeStation System («Agilent Technologies», США). Секвенирование производили с помощью набора MiSeq Reagent Kit v2 (1 × 300; «Illumina»,

Состав смеси витаминов, солей и микроэлементов

Компонент	Концентрация
Витамины	
Пантотенат кальция	0,8 мг/литр
Фолиевая кислота	4 мкг/литр
Инозитол	4 мг/литр
Никотиновая кислота	0,8 мг/литр
4-Аминобензойная кислота	0,4 мг/литр
Пиридоксин HCl	0,8 мг/литр
Рибофлавин	0,4 мг/литр
Тиамин HCl	0,8 мг/литр
Микроэлементы	
Борная кислота	1 мг/литр
Сульфат меди	0,08 мг/литр
Йодид калия	0,2 мг/литр
Хлорид железа (III)	0,4 мг/литр
Сульфат марганца	0,8 мг/литр
Молибдат натрия	0,4 мг/литр
Сульфат цинка	0,8 мг/литр
Соли	
Одноосновный фосфат калия	1 г/литр
Сульфат магния	0,5 г/литр
Хлорид натрия	0,1 г/литр
Хлорид кальция	0,1 г/литр
Сульфат аммония	5 г/литр

США; #MS-102-2002) на секвенаторе MiSeq («Illumina»).

Биоинформатический анализ. С помощью программы Trimmomatic [16] были удалены адаптеры и индексы и отфильтрованы прочтения. Качество прочтений проверяли с помощью программы FastQC [17]. Для выравнивания использовали геном дрожжей *K. phaffii*

(ASM2700v1) и аннотацию из базы данных NCBI (National Center for Biotechnology Information). Прочтения выравнивали с помощью hisat-2 [18] со стандартными параметрами. После выравнивания прочтения отсортировали и проиндексировали с помощью samtools [19]. Для подсчета количества выровненных прочтений использовали программу featureCounts [20]. Анализ дифференциальной экспрессии генов проводили при помощи языка программирования R (версия 3.6.3) и библиотеки DESeq2 (версия 1.24.0) [21]. Для дальнейшего анализа использовались гены, скорректированное значение p -value которых было меньше 0,05 и значение логарифма изменения экспрессии ($\log_2\text{FoldChange}$) было больше 0,5 по модулю.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Культивирование клеток *K. phaffii* для транскриптомного анализа. Биотин в концентрации 2 мкг/литр часто используется для культивирования дрожжей *S. cerevisiae*, тогда как гораздо более высокие концентрации рекомендуется использовать для *K. phaffii*. В нашем исследовании мы культивировали клетки *K. phaffii* в 2 этапа. Сначала мы растили штамм X-33 в средах BMG(B+) и BMM(B+). На этом этапе мы использовали концентрацию биотина 2 мкг/литр, чтобы на последующих этапах культивирования эффекты голодания по биотину проявились быстрее и ярче. При культивировании *K. phaffii* для производства рекомбинантных белков используются разные ис-

точники углерода. Поэтому мы исследовали влияние недостатка биотина при росте этих дрожжей на средах с глицерином и метанолом в качестве источников углерода и энергии.

На втором этапе клетки собирали с помощью центрифугирования и переносили на среды с соответствующим источником углерода и разными концентрациями биотина: BMG(B-) и BMM(B-) без биотина; BMG(B++) и BMM(B++) – с биотином в концентрации 400 мкг/литр. После 24 ч культивирования из клеток выделяли тотальную РНК для последующего транскриптомного анализа. Схема культивирования представлена на рис. 1.

Чтобы показать, что полученные результаты достоверно отражают изменения в экспрессии генов, мы сравнили транскриптомные данные, полученные из культур, выращенных на средах с высоким содержанием биотина и разными источниками углерода – метанолом и глицерином (BMG(B++) против BMM(B++)). Аналогичный анализ ранее проводился и в других исследованиях [22–24]. Рост клеток *K. phaffii* на таких разных источниках углерода приводит к значительным изменениям в экспрессии генов. Среди 1607 генов, продемонстрировавших изменение экспрессии, мы проанализировали те, которые вовлечены в метаболизм метанола. Как и ожидалось, гены алкогольоксидазы (PAS_chr4_0821, PAS_chr4_0152), гены, вовлеченные в диссимиляционный (PAS_chr3_1028, PAS_chr3_0867, PAS_chr3_0932) и ассимиляционный (PAS_chr3_0832, PAS_chr3_0834, PAS_chr3_0841, PAS_chr3_0951) пути метаболизма метанола, а также гены биогенеза пероксисом (PAS_chr2-2_0186,

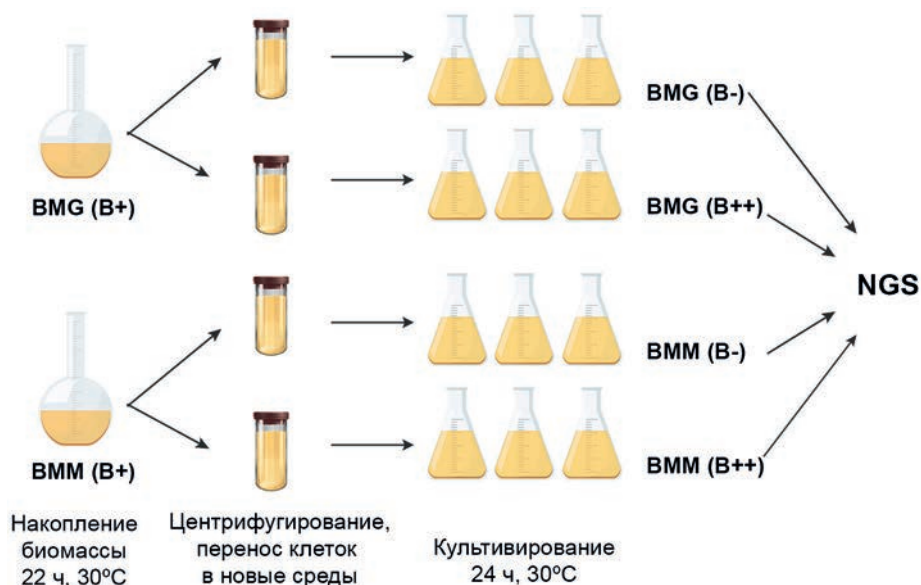


Рис. 1. Схема культивирования. NGS – секвенирование нового поколения (next generation sequencing)

PAS_chr4_0794) были индуцированы в присутствии метанола и репрессированы на глицерине. Эти результаты, а также данные по другим генам, которые далее будут обсуждаться в этой работе, приведены в табл. П1 в Приложении.

Далее мы сосредоточились на изучении влияния биотинового голодания на клетки *K. phaffii*, выращенные в средах с различными источниками углерода. Для этого транскриптомные данные, полученные после культивирования в среде с глицерином и высоким содержанием биотина, сравнивали с аналогичной средой без биотина (BMG(B++) против BMG(B-)). Такой же анализ проводили для среды с метанолом в качестве источника углерода (BMM(B++) против BMM(B-)). Результаты анализа с использованием DESeq2 для генов, характеризующихся дифференциальной экспрессией при голодании по биотину, приведены в табл. П2 в Приложении для сред с глицерином (BMG(B++) против BMG(B-)) и в табл. П3 в Приложении – для сред с метанолом (BMM(B++) против BMM(B-)).

Влияние дефицита биотина на экспрессию генов в клетках *K. phaffii*, выращенных на глицерине. Транскриптомный анализ показал, что голодание по биотину оказывает сравнительно слабое влияние на экспрессию генов в клетках *K. phaffii*, использующих глицерин в качестве источника углерода. Заметное изменение активности было отмечено только для 22 генов (табл. П4 в Приложении). Среди них экспрессия 14 генов была повышена, а 8 – понижена в условиях голодания по биотину. Гены, продемонстрировавшие повышенную экспрессию, вовлечены в метаболизм биотина и тиамина, глиоксилатный цикл, транспорт мочевины, окисление ацетальдегида, синтез ацетил-СоА и его карнитин-опосредованный транспорт.

Среди активированных генов первую группу составляют гены метаболизма биотина, кодирующие биотинпермеазу (PAS_FragB_0023), биотинсинтазу Bio2 (PAS_chr1-3_0052) и биотин-протеинлигазу (PAS_chr3_0569). Таким образом, недостаток биотина приводит к повышению экспрессии генов, обеспечивающих транспорт биотина, биосинтез биотина из его предшественника дитиобиотина и ковалентное присоединение биотина к апоферментам. Эти результаты согласуются с более ранними работами, посвященными регуляции метаболизма биотина в *S. cerevisiae*. В этих дрожжах недостаток биотина приводил к повышению экспрессии генов пермеазы биотина (*VHT1*), биотинсинтазы (*BIO2*) и биотин-протеинлигазы (*BPL1*). Регуляция этих генов зависит от транскрипционного фактора Vhr1, который является сенсором

биотина и связывается с регуляторными участками BRE (biotin response element), расположенными в промоторах регулируемых генов [25, 26].

В клетках, выращенных в условиях недостатка биотина, помимо генов биотинового метаболизма, была отмечена активация генов, вовлеченных в синтез тиамина. Тиамин является важным соединением для клеточного энергетического метаболизма, поскольку его производные служат кофакторами для различных ферментов, таких как транскетолазы, пируватдекарбоксилазы, пируватдегидрогеназы и оксоглутаратдегидрогеназы. Таким образом, тиамин необходим для реакций окислительного декарбоксилирования пирувата, цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) и пентозофосфатного пути. У *S. cerevisiae* синтез тиамина *de novo* является энергетически затратным процессом. Поэтому он запускается только при очень низком внутриклеточном уровне тиаминпирофосфата [13]. Помимо роли тиамина в качестве кофактора ферментов, показано, что он также задействован в ответе клеток на абиотический стресс. В частности, экспрессия генов синтеза тиамина активировалась при окислительном и осмотическом стрессе [27, 28]. Таким образом, активация генов, вовлеченных в синтез тиамина, в голодающих по биотину дрожжах *K. phaffii* может указывать на то, что в таких условиях в клетках возникает повышенная потребность в тиамине.

Экспрессия генов, кодирующих ключевые ферменты глиоксилатного цикла, изоцитратлиазу (PAS_chr1-4_0338) и малатсинтазу (PAS_chr4_0191) возрастала в условиях голодания по биотину (рис. 2). Глиоксилатный цикл протекает в пероксисомах и превращает двухуглеродные соединения в четырехуглеродную молекулу – сукцинат, который затем входит в ЦТК. У *S. cerevisiae* глиоксилатный цикл позволяет использовать двухуглеродные субстраты (такие как ацетат или этанол) для генерации предшественников для синтеза сахаров и других органических соединений. Глиоксилатный цикл также играет важную роль в преобразовании ацетил-СоА, образованного в результате β -окисления жирных кислот. Регуляция генов изоцитратлиазы и малатсинтазы осуществляется в зависимости от источника углерода в среде. Синтез этих ферментов репрессирован в клетках *S. cerevisiae*, выращенных на глюкозе, и дерепрессирован в среде без глюкозы [29]. Повышенная экспрессия генов, кодирующих эти ферменты у *K. phaffii*, испытывающих дефицит биотина, свидетельствует об участии биотина в адаптации клеток к различным источникам углерода.

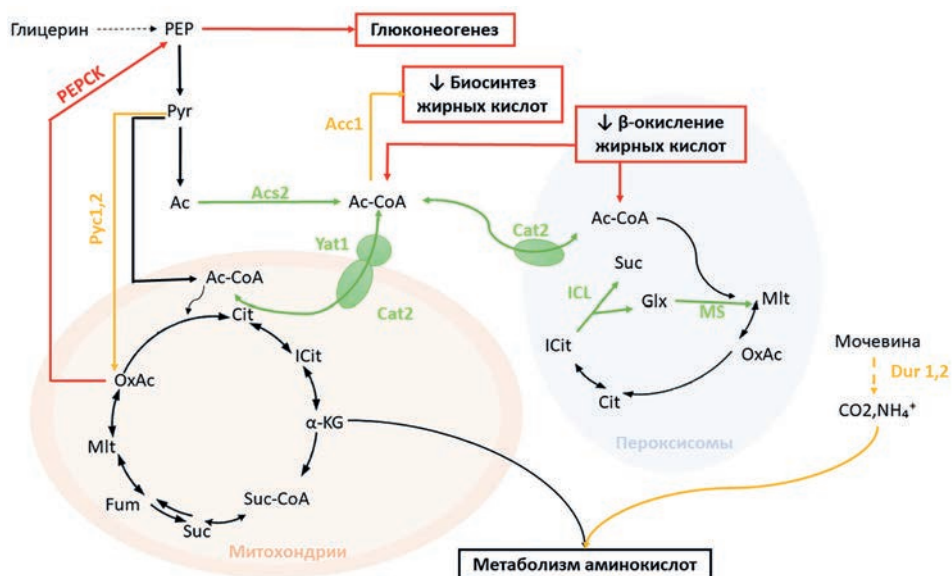


Рис. 2. Предполагаемая схема влияния дефицита биотина на метаболизм в клетках *K. phaffii* при росте на глицерине. Зеленым цветом отмечены белки и процессы, которые активируются при дефиците биотина; красным – репрессируются. Оранжевым обозначены процессы, в которых задействованы биотинзависимые ферменты. α -KG – α -кетоглутарат; Ac – ацетат; Ac-CoA – ацетил-CoA; Acc1 – ацетил-CoA карбоксилаза; Acs2 – ацетил-CoA синтетазы 2 (ортолог гена *S. cerevisiae ACS2*; PAS_chr3_0403); Cat2 – карнитин-ацетилтрансфераза (ортолог гена *S. cerevisiae CAT1*; PAS_chr3_0069); Cit – цитрат; Dur1,2 – амидолиаза мочевины; Fum – фумарат; Glx – глиоксилат; ICit – изоцитрат; ICL – изоцитратлиаза (ген PAS_chr1-4_0338); Mlt – малат; MS – малатсинтаза (ортолог гена *S. cerevisiae DAL7*; PAS_chr4_0191); OxAc – оксалоацетат; PEP – фосфоенолпируват; PEPCK – фосфоенолпируваткарбоксикиназа (ген PAS_FragB_0061); Pyc1,2 – пируваткарбоксилаза; Pyr – пируват; Suc – сукцинат; Suc-CoA – сукцинил-CoA; Yat1 – карнитин-ацетилтрансфераза (ортолог гена *S. cerevisiae YAT1*; PAS_chr1-4_0074)

Некоторые гены, участвующие в синтезе ацетил-CoA в цитоплазме (PAS_chr3_0403; ортолог гена *S. cerevisiae ACS2*) и карнитин-опосредованном транспорте ацетил-CoA (PAS_chr3_0069, PAS_chr1-4_0074), активировались в клетках, культивируемых в среде с дефицитом биотина (рис. 2). В дрожжах ацетил-CoA может образовываться: в митохондриях во время окисления пирувата; в пероксисомах – через окисление жирных кислот; в цитоплазме – посредством деградации неферментируемых источников углерода. *ACS2* – это ацетил-CoA синтетазы 2 (ацетат-CoA лигаза 2) *S. cerevisiae*, которая обеспечивает превращение пирувата в ацетил-CoA в цитоплазме (PDH bypass). Известно, что этот фермент является поставщиком ацетил-CoA для ацетилирования гистонов [30, 31]. Ацетил-CoA, образованный в цитоплазме или пероксисомах, транспортируется в митохондрии, чтобы вступить в ЦТК, с помощью системы карнитин-опосредованного транспорта [32]. Было показано, что при голодании по биотину в *S. cerevisiae* ацетил-CoA активно транспортировался в митохондрии. Это приводило к гиперацетилированию митохондриальных белков, что, в свою очередь, влияло на окислительно-восстановительный баланс клетки [33]. Активация экспрессии генов компонентов карнитиновой челночной системы

у *K. phaffii*, предназначенных для транспорта ацетил-CoA в митохондрии, указывает на то, что подобные процессы могут иметь место и в клетках этих дрожжей при дефиците биотина.

Активация гена митохондриальной альдегиддегидрогеназы (PAS_chr3_0987) во время биотинового голодания у *K. phaffii* согласуется с действием биотина на митохондрии. Активированный ген *K. phaffii* является ортологом митохондриальной альдегиддегидрогеназы (*ALD5*) *S. cerevisiae*. Известно, что этот фермент играет скорее регулируемую роль в митохондриальном дыхании, чем метаболическую. Повышение его активности связано со снижением дыхательной способности, которая зависит от работы митохондриального комплекса переноса электронов [34].

Среди генов, репрессированных в средах с дефицитом биотина, были гены, участвующие в глюконеогенезе, транспорте меди, детоксикации формиата, синтезе жирных кислот и их β -окислении, регуляции клеточного цикла, образовании почек и репарации ДНК.

Экспрессия фосфоенолпируваткарбоксикиназы (PEPCK; ген PAS_FragB_0061) подавлялась в средах с дефицитом биотина. PEPCK катализирует превращение оксалоацетата (OxAc) в фосфоенолпируват (PEP), который вступает в путь глюконеогенеза. Обратное

превращение PEP в OхAc катализируется биотинзависимой пируваткарбоксилазой. В условиях дефицита биотина этот путь синтеза OхAc подавляется. Однако OхAc также может быть синтезирован через глиоксилатный цикл с помощью изоцитратлиазы и малатсинтазы. Согласно нашим результатам, гены этих ферментов действительно активировались у голодающих по биотину *K. phaffii* (рис. 2).

Наблюдаемое подавление PEPCK также согласуется с результатами работы Kumar и Rangarajan [35]. В этом исследовании сообщалось о регуляции экспрессии PEPCK в зависимости от концентрации биотина. Экспрессия PEPCK регулируется белком ROP (репрессор PEPCK), который обеспечивает катаболитную репрессию PEPCK в клетках *K. phaffii*, выращенных в среде с избытком глюкозы и дефицитом биотина. ROP также участвует в регуляции метаболизма метанола в качестве репрессора гена *AOX1* [36].

При недостатке биотина в дрожжах *K. phaffii* также понижалась экспрессия гена альтернативной оксидазы. Она осуществляет перенос электронов от убихинона напрямую на кислород, значительно сокращая стандартный путь транспорта электронов. Функции альтернативной оксидазы разнообразны. Она может участвовать в защите клетки от активных форм кислорода (АФК), осмотического стресса, воздействия H₂O₂ или ингибиторов основной дыхательной цепи. У *K. phaffii* альтернативная оксидаза, вероятно, вносит большой вклад в жизнеспособность клеток. Было показано, что сверхэкспрессия ее гена немного увеличивает скорость роста, в то время как его удаление приводит к усилению окислительного стресса и гибели клеток. Также сообщалось, что его экспрессия зависит от уровня глюкозы в среде и снижается при истощении источника углерода [37]. Такая взаимосвязь экспрессии гена альтернативной оксидазы и доступности источника углерода также согласуется с представлением о том, что биотиновое голодание нарушает углеродный метаболизм в клетках *K. phaffii*.

Обобщая результаты транскрипционного анализа экспрессии генов дрожжей *K. phaffii*, выращенных на средах с глицерином при дефиците биотина, можно сделать вывод, что биотин играет важную роль в углеродном обмене. Недостаток биотина провоцировал перестройку клеточного метаболизма, сопровождающуюся усилением активности глиоксилатного цикла и синтеза ацетил-СоА в цитоплазме; в то же время глюконеогенез и липогенез были репрессированы. Сходные результаты были

получены Ortega-Cuellar et al. [12] на дрожжах *S. cerevisiae*. Показано, что у этих дрожжей, выращенных на средах без биотина в условиях избытка глюкозы, активно экспрессируются гены, обеспечивающие высокоаффинный транспорт глюкозы, карнитин-опосредованный транспорт ацетил-СоА, работу ЦТК, окисление жирных кислот и прохождение глиоксилатного цикла. При этом экспрессия генов липогенеза репрессирована. Таким образом, экспрессия генов в клетках *S. cerevisiae*, испытывающих недостаток биотина, соответствовала условиям дефицита глюкозы, что указывает на то, что у дрожжей биотин играет важную роль в углеродном метаболизме и адаптации к разным источникам углерода.

Влияние дефицита биотина на экспрессию генов в клетках *K. phaffii*, выращенных на метаноле. Более заметные изменения экспрессии генов при биотиновом голодании наблюдались на среде с метанолом по сравнению с глицерином. Среди 153 дифференциально экспрессируемых генов 91 активировался на среде без биотина, а 62 были подавлены (табл. П5 в Приложении). Интересно, что только ген фосфоенолпируваткарбоксикиназы (PAS_FragB_0061) демонстрировал одинаковый характер экспрессии на средах с глицерином и метанолом. Ген изоцитратлиазы (PAS_chr1-4_0338) активировался при дефиците биотина в среде с глицерином, но репрессировался на среде с метанолом (рис. 3). Все остальные гены, демонстрирующие разную экспрессию в зависимости от биотина, были разными в условиях метанола и глицерина.

В среде с глицерином при дефиците биотина активировались гены метаболизма биотина. Однако в среде с метанолом их уровень экспрессии существенно не изменялся. Сравнение профилей экспрессии генов на средах с разными источниками углерода (табл. П1 в Приложении) показывает, что ген биотинпермеазы (PAS_FragB_0023) активируется в средах с метанолом даже в присутствии высокой концентрации биотина. Помимо гена биотинпермеазы, среди 13 генов, которые активировались при недостатке биотина на средах с глицерином, 2 гена также активировались на средах с метанолом и высокой концентрацией биотина (ген митохондриальной альдегиддегидрогеназы (PAS_chr3_0987) и ген ацетат-СоА-лигазы (PAS_chr3_0403)). Среди 8 генов, экспрессия которых была снижена при биотиновом голодании на средах с глицерином, 7 генов также репрессировались на средах с метанолом и высокой концентрацией биотина (PAS_FragB_0061, PAS_chr4_0181,

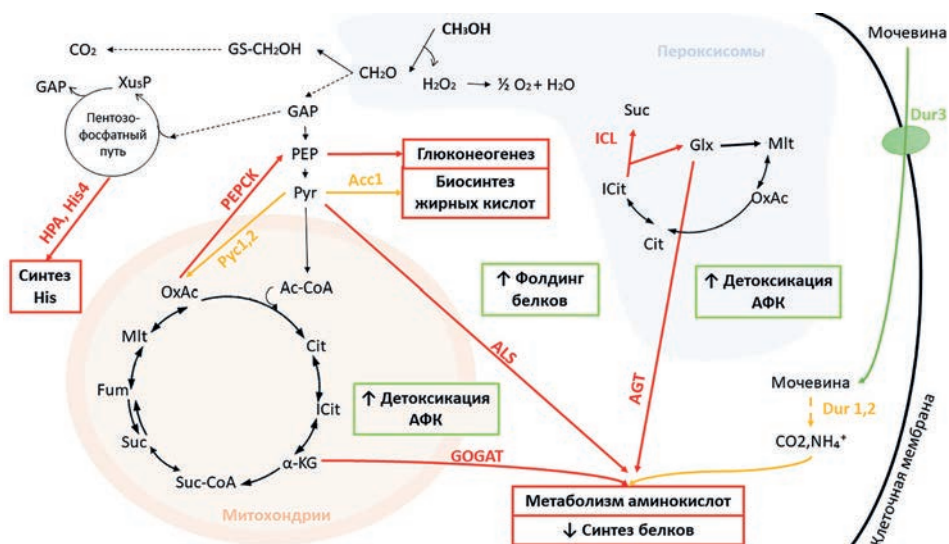


Рис. 3. Предполагаемая схема влияния дефицита биотина на метаболизм в клетках *K. phaffii* при росте на метаноле. Зеленым цветом отмечены белки и процессы, которые активируются при дефиците биотина; красным – репрессируются. Оранжевым обозначены процессы, в которых задействованы биотинзависимые ферменты. α -KG – α -кетоглутарат; Ac – ацетат; Ac-CoA – ацетил-CoA; Acc1 – ацетил-CoA карбоксилаза; AGT – аланин-глиоксилат аминокислот-трансфераза (ген PAS_chr4_0416); ALS – ацетоллактатсинтаза (ген PAS_chr4_0228); Cit – цитрат; Dur1,2 – амилолиаза мочевины; Dur3 – транспортер мочевины (ортолог гена *S. cerevisiae* DUR3; PAS_chr4_0439); Fum – фумарат; Glx – глиоксилат; GOGAT – глутаматсинтаза (ген PAS_chr3_1024); His4 – гистидиол-дегидрогеназа (ген PAS_chr1-4_0160); HPA – гистидиол-фосфат-аминотрансфераза (ген PAS_chr2-1_0684); ICit – изоцитрат; ICL – изоцитратлиаза (ген PAS_chr1-4_0338); Mlt – малат; OxAc – оксалоацетат; PEP – фосфоенолпируват; PEPCK – фосфоенолпируват-карбоксикиназа (ген PAS_FragB_0061); Pyc1,2 – пируваткарбоксилаза; Pyc – пируват; Suc – сукцинат; Suc-CoA – сукцинил-CoA

PAS_chr3_0408, PAS_chr2-2_0267, PAS_chr1-1_0108, PAS_chr2-2_0484, PAS_chr4_0352).

Можно предположить, что в том случае, когда клетки *K. phaffii* растут на среде с метанолом в качестве источника углерода, им требуется больше биотина, чем при росте на среде с глицерином. Таким образом, в среде с метанолом процессы, несколько сходные с биотиновым голоданием, наблюдаются даже при высокой концентрации биотина. Это частично объясняет различие между группами дифференциально экспрессируемых генов в средах с разными источниками углерода. На средах с метанолом и высокой концентрацией биотина некоторые гены уже демонстрируют уровни экспрессии, сходные с наблюдаемыми на средах с глицерином и без биотина (например, ген пермеазы биотина PAS_FragB_0023). При переносе клеток на среды с метанолом и без биотина эти гены сохраняют свой уровень экспрессии.

Самую большую группу генов, экспрессия которых снижается при биотиновом голодании на средах с метанолом, составляют гены, связанные с синтезом белков. Шесть из этих генов кодируют белки малой субъединицы рибосомы (PAS_chr4_0247, PAS_chr1-1_0077, PAS_FragD_0015, PAS_chr1-4_0423, PAS_chr2-1_0784, PAS_chr2-1_0482); 8 генов кодируют белки большой субъединицы рибосомы

(PAS_chr1-1_0345, PAS_chr4_0814, PAS_chr1-4_0352, PAS_chr4_0208, PAS_chr1-4_0412, PAS_chr4_0107, PAS_chr1-1_0337, PAS_chr1-4_0275). Другие гены участвуют в процессинге рРНК и биогенезе 60S-субъединицы рибосомы (PAS_chr4_0464, PAS_chr1-1_0446), процессинге тРНК (PAS_chr1-4_0457) и аминокислотирования (PAS_chr3_0949, PAS_chr2-1_0346).

При дефиците биотина на среде с метанолом подавляются гены, вовлеченные в биосинтез аминокислот. К ним относятся гены, кодирующие аланин-глиоксилат аминокислот-трансферазу (PAS_chr4_0416), ацетоллактатсинтазу (PAS_chr4_0228), глутаматсинтазу (PAS_chr3_1024), гамма-глутамилфосфатредуктазу (PAS_chr4_0665), гистидиол-фосфат-аминотрансферазу (PAS_chr2-1_0684), треониндезаминазу (PAS_chr1-4_0243) и гистидиол-дегидрогеназу (PAS_chr1-4_0160) (рис. 3).

Эти результаты показывают, что на средах с метанолом при дефиците биотина подавляется синтез белка. Похожие эффекты наблюдались в клетках *S. cerevisiae* в условиях ограничения питательных веществ, включая голодание по углероду и азоту [38–40]. Интересно, что в среде с глицерином при дефиците биотина не наблюдалось значительное снижение экспрессии генов, связанных с синтезом белков. Это можно объяснить тем, что метаболизм метанола требует синтеза большого количества

ферментов для его утилизации, например, алкогольоксидазы. Эти ферменты могут составлять до 30% общего содержания белка в клетках *K. phaffii* [41]. По всей видимости, при росте на метаноле в условиях недостатка биотина клетки *K. phaffii* не могут поддерживать такой активный синтез белка и репрессируют соответствующие гены.

Большая группа генов, активированных в условиях дефицита биотина на метаноле, включает в себя гены, связанные с обезвреживанием АФК и окислительно-восстановительными реакциями клетки. Эти гены кодируют тиол-специфические пероксиредоксины (PAS_chr1-4_0659, PAS_chr2-1_0502), тиоредоксин (PAS_chr4_0284), тиоредоксинпероксидазу (PAS_chr2-2_0220), супероксиддисмутазу (PAS_chr4_0786), митохондриальный пероксиредоксин (PAS_chr1-1_0433). Среди них также можно отметить ген PAS_chr2-2_0382, который является ортологом гена *S. cerevisiae* *HYR1*, кодирующего глутатионпероксидазу, также функционирующую как рецептор перекиси водорода [42]. Ранее для клеток *S. cerevisiae* также была показана активация генов, участвующих в детоксикации АФК и клеточных окислительно-восстановительных реакциях в условиях недостатка аминокислот или азотного голодания [39, 40].

Интересно, что в условиях дефицита биотина в среде с глицерином нами не было отмечено значительной активации этих генов. Известно, что утилизация метанола сама по себе провоцирует окислительный стресс в клетках *K. phaffii*, и в условиях роста на метаноле клеткам необходимо бороться с большим количеством АФК [43]. Предположительно, дефицит биотина может вызывать окислительный стресс в клетках *K. phaffii*. И в среде с метанолом, где клетки уже испытывают окислительный стресс, это приводит к дальнейшей активации генов, участвующих в детоксикации АФК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании впервые на уровне транскриптома было изучено влияние дефицита биотина на экспрессию генов в клетках биотехнологически значимых дрожжей *K. phaffii*. Голодание по биотину приводило к изменению экспрессии разных групп генов. Ряд эффектов, в частности, активация генов метаболизма биотина, глиоксилатного цикла и синтеза ацетил-СоА в цитоплазме, а также подавление генов глюко- и липогенеза ранее также наблюдались у модельных дрожжей *S. cerevisiae* [12]. Некото-

рые эффекты, в частности подавление активности генов, участвующих в синтезе белков, и активация генов, связанных с ответом клетки на окислительный стресс, ранее обнаруживались у *S. cerevisiae* в ответ на различные лимитирующие факторы [38–40].

В нашей работе было впервые продемонстрировано, что у дрожжей *K. phaffii* проявление и набор наблюдаемых эффектов, вызванных дефицитом биотина, необычайно зависит от доступного источника углерода: глицерина или метанола. Дефицит биотина вызывал более заметные изменения в экспрессии генов дрожжей *K. phaffii*, культивируемых в средах с метанолом, по сравнению со средами с глицерином. Активация гена биотинпермеазы и репрессия ряда генов, наблюдаемые в ответ на недостаток биотина при росте в средах с глицерином, происходят в средах с метанолом даже при высокой концентрации биотина. Это может быть связано с различной потребностью клеток *K. phaffii* в биотине в зависимости от доступного источника углерода.

Полученные результаты важны для оптимизации условий культивирования при синтезе рекомбинантных белков с помощью дрожжей *K. phaffii* с использованием систем культивирования со сменой источника углерода.

Вклад авторов. А.М. Румянцев, М.В. Падкина – концепция и руководство работой; А.С. Макеева, В.В. Иштуганова – проведение экспериментов; А.В. Сидорин – проведение биоинформатического анализа; А.С. Макеева, А.М. Румянцев – обсуждение результатов исследования; А.С. Макеева, А.М. Румянцев – написание текста; А.М. Румянцев, М.В. Падкина – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа проведена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в соответствии с соглашением № 075-15-2022-322 от 22.04.2022 о предоставлении гранта в виде субсидии из Федерального бюджета Российской Федерации. Грант предоставлен в рамках государственной поддержки создания и развития Научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Karbalaei, M., Rezaee, S. A., and Farsiani, H. (2020) *Pichia pastoris*: a highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins, *J. Cell. Physiol.*, **235**, 5867-5881, doi: 10.1002/jcp.29583.
- Cregg J. M. (2007) Introduction: distinctions between *Pichia pastoris* and other expression systems, *Methods Mol. Biol.*, **389**, 1-10, doi: 10.1007/978-1-59745-456-8_1.
- Heisteringer, L., Gasser, B., and Mattanovich, D. (2020) Microbe profile: *Komagataella phaffii*: a methanol devouring biotech yeast formerly known as *Pichia pastoris*, *Microbiology*, **166**, 614-616, doi: 10.1099/mic.0.000958.
- Carneiro, C. V. G. C., Serra, L. A., Pacheco, T. F., Ferreira, L. M. M., Brandão, L. T. D., de Moura Freitas, M. N., Trichez, D., and Almeida, J. R. M. (2022) Advances in *Komagataella phaffii* engineering for the production of renewable chemicals and proteins, *Fermentation*, **8**, 575, doi: 10.3390/fermentation8110575.
- Hartner, F. S., and Glieder, A. (2006) Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts, *Microb. Cell Fact.*, **5**, 1-21, doi: 10.1186/1475-2859-5-39.
- Ergün, B. G., Berrios, J., Binay, B., and Fickers, P. (2021) Recombinant protein production in *Pichia pastoris*: from transcriptionally redesigned strains to bioprocess optimization and metabolic modelling, *FEMS Yeast Res.*, **21**, foab057, doi: 10.1093/femsyr/foab057.
- Ghosalkar, A., Sahai, V., and Srivastava, A. (2008) Optimization of chemically defined medium for recombinant *Pichia pastoris* for biomass production, *Bioresour. Technol.*, **99**, 7906-7910, doi: 10.1016/j.biortech.2008.01.059.
- Joseph, J. A., Akkermans, S., Cornillie, E., Deberlanger, J., and Van Impe, J. F. M. (2023) Optimal culture medium selection and supplementation for recombinant thaumatin II production by *Komagataella phaffii*, *Food Bioprod. Process*, **139**, 190-203, doi: 10.1016/j.fbp.2023.04.001.
- Matthews, C. B., Kuo, A., Love, K. R., and Love, J. C. (2018) Development of a general defined medium for *Pichia pastoris*, *Biotechnol. Bioeng.*, **115**, 103-113, doi: 10.1002/bit.26440.
- Rumiantsev, A. M., Padkina, M. V., and Sambuk, E. V. (2013) Effect of nitrogen source on gene expression of first steps of methanol utilization pathway in *Pichia pastoris*, *Genetika*, **49**, 454-460, doi: 10.7868/S0016675813040115.
- Rumjantsev, A. M., Bondareva, O. V., Padkina, M. V., and Sambuk, E. V. (2014) Effect of nitrogen source and inorganic phosphate concentration on methanol utilization and *PEX* genes expression in *Pichia pastoris*, *ScientificWorldJournal*, **2014**, 1-9, doi: 10.1155/2014/743615.
- Ortega-Cuellar, D., Hernandez-Mendoza, A., Moreno-Arriola, E., Carvajal-Aguilera, K., Perez-Vazquez, V., Gonzalez-Alvarez, R., and Velazquez-Arellano, A. (2010) Biotin starvation with adequate glucose provision causes paradoxical changes in fuel metabolism gene expression similar in rat (*Rattus norvegicus*), nematode (*Caenorhabditis elegans*) and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), *J. Nutrigenet. Nutrigenomics*, **3**, 18-30, doi: 10.1159/000318054.
- Perli, T., Wronska, A. K., Ortiz-Merino, R. A., Pronk, J. T., and Daran, J. M. (2020) Vitamin requirements and biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, **37**, 283-304, doi: 10.1002/yea.3461.
- Hall, C., and Dietrich, F. S. (2007) The reacquisition of biotin prototrophy in *Saccharomyces cerevisiae* involved horizontal gene transfer, gene duplication and gene clustering, *Genetics*, **177**, 2293-2307, doi: 10.1534/genetics.107.074963.
- Gasser, B., Dragosits, M., and Mattanovich, D. (2010) Engineering of biotin-prototrophy in *Pichia pastoris* for robust production processes, *Metab. Eng.*, **12**, 573-580, doi: 10.1016/j.ymben.2010.07.002.
- Bolger, A. M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data, *Bioinformatics*, **30**, 2114-2120, doi: 10.1093/bioinformatics/btu170.
- Leggett, R. M., Ramirez-Gonzalez, R. H., Clavijo, B. J., Waite, D., and Davey, R. P. (2013) Sequencing quality assessment tools to enable data-driven informatics for high throughput genomics, *Front. Genet.*, **4**, 288, doi: 10.3389/fgene.2013.00288.
- Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., Bennett, C., and Salzberg, S. L. (2019) Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype, *Nat. Biotechnol.*, **37**, 907-915, doi: 10.1038/s41587-019-0201-4.
- Danecek, P., Bonfield, J. K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M. O., Whitwham, A., Keane, T., McCarthy, S. A., Davies, R. M., and Li, H. (2021) Twelve years of SAMtools and BCFtools, *GigaScience*, **10**, giab008, doi: 10.1093/gigascience/giab008.
- Liao, Y., Smyth, G. K., and Shi, W. (2014) featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features, *Bioinformatics*, **30**, 923-930, doi: 10.1093/bioinformatics/btt656.
- Love, M. I., Huber, W., and Anders, S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2, *Genome Biol.*, **15**, 550, doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.
- Zhang, C., Ma, Y., Miao, H., Tang, X., Xu, B., Wu, Q., Mu, Y., and Huang, Z. (2020) Transcriptomic analysis of *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) GS115 during heterologous protein production using a high-cell-density fed-batch cultivation strategy,

- Front. Microbiol.*, **11**, 463, doi: 10.3389/fmicb.2020.00463.
23. Brady, J. R., Whittaker, C. A., Tan, M. C., Kristensen, D. L., 2nd, Ma, D., Dalvie, N. C., Love, K. R., and Love, J. C. (2020) Comparative genome-scale analysis of *Pichia pastoris* variants informs selection of an optimal base strain, *Biotechnol. Bioeng.*, **117**, 543-555, doi: 10.1002/bit.27209.
 24. Love, K. R., Shah, K. A., Whittaker, C. A., Wu, J., Bartlett, M. C., Ma, D., Leeson, R. L., Priest, M., Borowsky, J., Young, S. K., and Love, J. C. (2016) Comparative genomics and transcriptomics of *Pichia pastoris*, *BMC Genomics*, **17**, 550, doi: 10.1186/s12864-016-2876-y.
 25. Pirner, H. M., and Stolz, J. (2006) Biotin sensing in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by a conserved DNA element and requires the activity of biotin-protein ligase, *J. Biol. Chem.*, **281**, 12381-12389, doi: 10.1074/jbc.M511075200.
 26. Weider, M., Machnik, A., Klebl, F., and Sauer, N. (2006) Vhr1p, a new transcription factor from budding yeast, regulates biotin-dependent expression of *VHT1* and *BIO5*, *J. Biol. Chem.*, **281**, 13513-13524, doi: 10.1074/jbc.M512158200.
 27. Kowalska, E., Kujda, M., Wolak, N., and Kozik, A. (2012) Altered expression and activities of enzymes involved in thiamine diphosphate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* under oxidative and osmotic stress, *FEMS Yeast Res.*, **12**, 534-546, doi: 10.1111/j.1567-1364.2012.00804.x.
 28. Wolak, N., Kowalska, E., Kozik, A., and Rapala-Kozik, M. (2014) Thiamine increases the resistance of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* against oxidative, osmotic and thermal stress, through mechanisms partly independent of thiamine diphosphate-bound enzymes, *FEMS Yeast Res.*, **14**, 1249-1262, doi: 10.1111/1567-1364.12218.
 29. Duntze, W., Neumann, D., Gancedo, J. M., Atzpodien, W., and Holzer, H. (1969) Studies on the regulation and localization of the glyoxylate cycle enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*, *Eur. J. Biochem.*, **10**, 83-89, doi: 10.1111/j.1432-1033.1969.tb00658.x.
 30. Berg, M. A., and Steensma, H. Y. (1995) *ACS2*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding acetyl-coenzyme A synthetase, essential for growth on glucose, *Eur. J. Biochem.*, **231**, 704-713, doi: 10.1111/j.1432-1033.1995.tb20751.x.
 31. Takahashi, H., McCaffery, J. M., Irizarry, R. A., and Boeke, J. D. (2006) Nucleocytosolic acetyl-coenzyme A synthetase is required for histone acetylation and global transcription, *Mol. Cell*, **23**, 207-217, doi: 10.1016/j.molcel.2006.05.040.
 32. Strijbis, K., and Distel, B. (2010) Intracellular acetyl unit transport in fungal carbon metabolism, *Eukaryot. Cell*, **9**, 1809-1815, doi: 10.1128/EC.00172-10.
 33. Madsen, C. T., Sylvestersen, K. B., Young, C., Larsen, S. C., Poulsen, J. W., Andersen, M. A., Palmqvist, E. A., Hey-Mogensen, M., Jensen, P. B., Treebak, J. T., Lisby, M., and Nielsen, M. L. (2015) Biotin starvation causes mitochondrial protein hyperacetylation and partial rescue by the SIRT3-like deacetylase Hst4p, *Nat. Commun.*, **6**, 7726, doi: 10.1038/ncomms8726.
 34. Kurita, O., and Nishida, Y. (1999) Involvement of mitochondrial aldehyde dehydrogenase *ALD5* in maintenance of the mitochondrial electron transport chain in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **181**, 281-287, doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb08856.x.
 35. Kumar, N. V., and Rangarajan, P. N. (2011) Catabolite repression of phosphoenolpyruvate carboxykinase by a zinc finger protein under biotin and pyruvate carboxylase-deficient conditions in *Pichia pastoris*, *Microbiology*, **157**, 3361-3369, doi: 10.1099/mic.0.053488-0.
 36. Kumar, N. V., and Rangarajan, P. N. (2012) The zinc finger proteins Mxr1p and repressor of phosphoenolpyruvate carboxykinase (ROP) have the same DNA binding specificity but regulate methanol metabolism antagonistically in *Pichia pastoris*, *J. Biol. Chem.*, **287**, 34465-34473, doi: 10.1074/jbc.M112.365304.
 37. Kern, A., Hartner, F. S., Freigassner, M., Spielhofer, J., Rumpf, C., Leitner, L., Fröhlich, K. U., and Glieder, A. (2007) *Pichia pastoris* 'just in time' alternative respiration, *Microbiology*, **153**, 1250-1260, doi: 10.1099/mic.0.2006/001404-0.
 38. DeRisi, J. L., Iyer, V. R., and Brown, P. O. (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale, *Science*, **278**, 680-686, doi: 10.1126/science.278.5338.680.
 39. Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D., and Brown, P. O. (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes, *Mol. Biol. Cell*, **11**, 4241-4257, doi: 10.1091/mbc.11.12.4241.
 40. Gasch, A. P. (2003) "The environmental stress response: a common yeast response to environmental stresses", in *Yeast Stress Responses* (Hohmann, S., and Mager, W. H., eds) Vol. 1, Springer, Berlin, pp. 11-70.
 41. Couderc, R., and Barette, J. (1980) Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*. Purification and properties of alcohol oxidase, *Agrie. Biol. Chem.*, **44**, 2279-2289, doi: 10.1080/00021369.1980.10864320.
 42. Avery, A. M., and Avery, S. V. (2001) *Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases, *J. Biol. Chem.*, **276**, 33730-33735, doi: 10.1074/jbc.M105672200.
 43. Lin, N. X., He, R. Z., Xu, Y., and Yu, X. W. (2021) Oxidative stress tolerance contributes to heterologous protein production in *Pichia pastoris*, *Biotechnol. Biofuels*, **14**, 160, doi: 10.1186/s13068-021-02013-w.

EFFECT OF BIOTIN STARVATION ON GENE EXPRESSION IN *Komagataella phaffii* CELLS

A. S. Makeeva, A. V. Sidorin, V. V. Ishtuganova, M. V. Padkina, and A. M. Rumyantsev*

*Department of Genetics and Biotechnology, St. Petersburg State University,
199034 Saint Petersburg, Russia; e-mail: rumyantsev-am@mail.ru*

Methylotrophic yeast *Komagataella phaffii* are widely used in biotechnology as a host for recombinant protein production. Due to the practical significance of this yeast, it is extremely important to properly select the cultivation conditions and optimize the media composition. In this study the effect of biotin starvation on *K. phaffii* gene expression was investigated at transcriptomic level. It was demonstrated, that *K. phaffii* cell response to biotin deficiency strongly depends on the carbon source in the medium. In media containing glycerol, biotin deficiency led to activation of genes involved in biotin metabolism, glyoxylate cycle and synthesis of acetyl-CoA in cytoplasm, as well as repression of genes, involved in lipo- and gluconeogenesis. In methanol containing media, biotin deficiency primarily led to repression of genes, involved in protein synthesis, and activation of cell response to oxidative stress.

Keywords: *Komagataella phaffii*, biotin, glycerol, methanol, transcriptomic analysis, differential gene expression

**NAD⁺-ЗАВИСИМАЯ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗА
ИЗ ТЕРМОТОЛЕРАНТНЫХ ДРОЖЖЕЙ *Ogataea parapolymorpha*:
СВОЙСТВА И БЕЛКОВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ
N-КОНЦЕВОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ**

© 2023 А.А. Пометун^{1,2*}, Л.А. Шапошников^{1,2}, С.А. Зубанова²,
Р.П. Ковалевский², Д.Л. Агрошенко^{1,2}, Е.В. Пометун³, С.С. Савин^{1,2}, В.И. Тишков^{1,2*}

¹ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,
Институт биохимии им. А.Н. Баха, 119071 Москва, Россия;
электронная почта: aapometun@gmail.com, vitishkov@gmail.com

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет,
119991 Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет),
119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 12.06.2023

После доработки 07.07.2023

Принята к публикации 12.07.2023

Ранее в нашей лаборатории был клонирован ген формиатдегидрогеназы (ФДГ, КФ 1.2.1.2) из термотолерантных метилотрофных дрожжей *Ogataea parapolymorpha* DL-1 (ОраFDH). Рекомбинантный фермент с дополнительным аминокислотным остатком глицина (ОраFDH_GK) был получен в клетках *Escherichia coli* в активной и растворимой форме с выходом более 1 г с одного литра среды. В настоящей работе проведено подробное сравнение этого фермента с ФДГ из других источников. Среди формиатдегидрогеназ из эукариот ОраFDH имеет самую высокую термостабильность. Для выяснения влияния N-концевого остатка на свойства фермента также были получены варианты ОраFDH_K (идентичный природному) и ОраFDH_AK, содержащий на N-конце дополнительный остаток аланина. Показано, что добавление к N-концу остатка Ala уменьшает в 4 раза константу скорости термоинактивации по сравнению с добавлением остатка Gly. Добавление еще 6 остатков гистидина на N-конец ОраFDH_AK приводит к ускорению очистки, практически не влияет на кинетические параметры, но несколько снижает температурную стабильность, которая, однако, может быть восстановлена до уровня ОраFDH_AK добавлением 0,5 М NaCl.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: формиатдегидрогеназа, *Ogataea parapolymorpha* DL-1, термотолерантные дрожжи, экспрессия в *E. coli*, каталитические свойства, очистка, температурная стабильность, сайт-направленный мутагенез.

DOI: 10.31857/S0320972523090178, EDN: WVQLMP

ВВЕДЕНИЕ

Формиатдегидрогеназа (ФДГ, КФ 1.2.1.2.) катализирует реакцию восстановления кофермента NAD(P)⁺ до NAD(P)H. ФДГ найдена как в прокариотических, так и в эукариотических организмах (растениях, дрожжах и микроскопических грибах), где играет важную физиологическую роль в обеспечении клетки энергией [1–4]. Формиатдегидрогеназа является

высокоэффективным биокатализатором для регенерации кофермента NADH или NADPH в процессах синтеза оптически активных соединений [1]. Преимуществами ФДГ являются: 1) практически полная необратимость катализируемой реакции, 2) продукт реакции CO₂ не загрязняет целевой продукт, 3) невысокая стоимость субстрата – формиат-иона и 4) широкий pH-оптимум активности и стабильности фермента. Примером практического процесса

Принятые сокращения: ФДГ – формиатдегидрогеназа; СboFDH – формиатдегидрогеназа из дрожжей *Candida boidinii*; ОраFDH – формиатдегидрогеназа из дрожжей *Ogataea parapolymorpha* DL-1; PseFDH – формиатдегидрогеназа из бактерий *Pseudomonas* sp. 101.

* Адресат для корреспонденции.

хирального синтеза является разработанный и реализованный компанией «Evonik» (ранее «Degussa») еще в середине 90-х гг. прошлого века процесс получения L-трет-лейцина – прекурсора при получении пептидов, которые используются в качестве ингибиторов протеазы ВИЧ и антираковых агентов [5]. Регенерация восстановленного NADH в этом процессе осуществляется с помощью ФДГ из дрожжей *Candida boidinii* (CboFDH). Вплоть до настоящего времени данный процесс является самым крупномасштабным процессом хирального синтеза с использованием индивидуальных ферментов [1]. Эффективность процесса могла бы быть значительно выше при использовании более стабильной ФДГ. Поэтому создание фермента с оптимальными свойствами для промышленного использования является важной биотехнологической задачей. На настоящий момент проведено клонирование множества генов формиатдегидрогеназы. Одним из наиболее изученных ферментов является ФДГ из метилотрофных бактерий *Pseudomonas* sp. 101 (PseFDH), ген которой был клонирован в 1993 г. [6]. PseFDH до сих пор является наиболее термостабильным ферментом среди всех исследованных формиатдегидрогеназ.

Термотолерантные организмы представляют особый интерес для промышленного производства, поскольку продуцируют, как правило, термостабильные ферменты. Большое внимание уделяется метилотрофным дрожжам *Ogataea parapolyomorpha* DL-1 (прежнее название *Hansenula polymorpha*), которые широко используются для получения различных рекомбинантных белков. Геном этих дрожжей был секвенирован в 2012 г. (идентификатор в базе данных GenBank: GCA_000187245.3). В 2014 г. китайскими исследователями был получен синтетический ген ФДГ из *O. parapolyomorpha* DL-1 [7]. Ключевой особенностью генно-инженерной конструкции для получения рекомбинантного фермента было добавление на C-конец 6 остатков гистидина (далее OpaFDH_HisC), однако авторы не учли тот факт, что C-конец фермента участвует в формировании кофермент-связывающего домена активного центра, и это существенно повлияло на кинетические параметры. $K_M^{\text{NAD}^+}$ OpaFDH с His-tag на C-конец составлял 83 мкМ, а каталитическая константа $k_{\text{cat}} - 2,7 \text{ с}^{-1}$ [7]. Нами ген ФДГ из *O. parapolyomorpha* DL-1 (OpaFDH) был клонирован с использованием хромосомной ДНК без введения дополнительной последовательности His-tag [8]. $K_M^{\text{NAD}^+}$ и каталитическая константа k_{cat} для этого фермента составили 14 мкМ и $4,5 \text{ с}^{-1}$ соответственно [8].

При клонировании гена *opafdh* в его нуклеотидную последовательность после стартового триплета остатка Met нами был добавлен кодон остатка Gly. Полученная конструкция получила обозначение OpaFDH_GK [8]. Термостабильность фермента была исследована с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии и было показано, что OpaFDH_GK является ферментом, обладающим самой высокой термостабильностью среди ФДГ эукариот [9]. Кроме того, по своей температурной стабильности OpaFDH совсем немного уступает наиболее стабильным ФДГ из бактерий. Для OpaFDH_GK была проведена успешная кристаллизация [10].

В настоящей работе описана функциональная характеристика рекомбинантной OpaFDH_GK и проведено подробное сравнение с другими ФДГ. Проведен анализ N-концевой аминокислотной последовательности, получены несколько мутантных форм с измененной структурой N-конца. Для этих ферментов проведена экспрессия, очистка, определение их свойств. Выбрана наиболее интересная мутантная форма с модификациями N-конца, и на ее основе сделан фермент, содержащий последовательность из 6 остатков гистидина и изучены его основные свойства.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Для генно-инженерных экспериментов использовали реактивы марки «Molecular Biology Grade». В микробиологических экспериментах применяли бактотриптон, дрожжевой экстракт и агар («Difco», США); глицерин (99,9%) и хлорид кальция («ultrapure»), гидрофосфат калия, дигидрофосфат натрия («pure for analysis»), лизоцим («Fluka/BioChemika», Швейцария); лактозу «analytical grade», канамицин и хлорамфеникол («Sigma», США); хлорид натрия («pure for analysis»; «Хеликон», Россия). Эндонуклеазы рестрикции, ДНК-лигазу фага T4 и *Pfu*-ДНК-полимеразу фирмы «Thermo» (США) использовали для направленного мутагенеза и клонирования фрагментов ДНК. Для очистки ДНК из агарозного геля и выделения плазмид из клеток *Escherichia coli* использовали наборы реагентов фирмы «Thermo». Олигонуклеотиды для проведения полимеразной цепной реакции были синтезированы фирмой «Синтол» (Россия); секвенирование нуклеотидных последовательностей проводили в ЦКП Геном института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН.

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных в работе

Название праймеров	Последовательность праймеров (5'→3')
ОраFOR_GK	C ATC AAT CAC <u>CAT ATG</u> GGC AAG GTT GTA CTA GTT CTC
ОраREV	CAG CTC CTT <u>AAG CTT</u> TTA TTA TTT GTC GGC ACC GTA C
ОраFOR_K	GAA GGA GAT ATA <u>CAT ATG</u> AAG GTT GTA CTA GTT C
ОраFOR_AK	C ATC AAT CAC <u>CAT ATG</u> GCG AAG GTT GTA CTA GTT CTC
ОраFOR_AK	C ATC AAT CAC <u>CAT ATG</u> GCG AAG GTT GTA CTA GTT CTC
ОраFOR_HIS_AK	GAA GGA GAT ATA <u>CAT ATG</u> CAC CAC CAC CAC CAC GCC AAG GTT GTA CTA GTT C

Примечание. Подчеркиванием выделены сайты рестрикции – *NdeI* (CATATG; ОраFOR) и *HindIII* (AAGCTT; ОраREV).

Все реактивы, использованные для электрофореза белков, произведены фирмой «BioRad» (США). Для очистки и изучения свойств фермента применяли сульфат аммония и имидазол марки «х.ч.» («ДиаМ», Россия), мочевины марки «ч.д.а.» («РеаХим», Россия), NAD⁺ с чистотой не менее 99% фирмы «AppliChem» (Германия), ЭДТА «pure for analysis» и родонит аммония фирмы «Merck» (Германия), формиат натрия и дигидрофосфат натрия «ч.д.а.» («РеаХим», Россия), азид натрия («Serva», Германия) и нитрит калия («PanReas», Испания).

Методы исследования. Получение генетических конструкций. Ген формиатдегидрогеназы *O. parapolymorpha* (ОраFDH) клонировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). В качестве матрицы использовали хромосомную ДНК *O. parapolymorpha*, которая была любезно предоставлена профессором О.А. Донцовой (НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ). Для получения генетических конструкций были синтезированы праймеры на начало и конец гена (ОраREV и ОраFOR_GK). Вначале проводили клонирование гена с дополнительным триплетом, кодирующим остаток глицина. Далее, с использованием праймеров ОраFOR_K, ОраFOR_AK и ОраFOR_HIS_AK и праймера ОраREV были получены конструкции, кодирующие ОраFDH, аналогичную природной и с модификациями N-концевой последовательности. Последовательности праймеров, использованных в работе приведены в табл. 1.

Реакционная смесь для проведения ПЦР содержала 2,5 мкл 10-кратного буфера для *Pfu*-ДНК-полимеразы с магнием, поставляемого фирмой-производителем вместе с ферментом; 2,5 мкл смеси dNTP (2,5 мМ каждого); 1 мкл ДНК-матрицы (~10 нг/мкл); по 2 мкл праймеров (10 нмоль/мл); 0,5 мкл *Pfu*-ДНК-полиме-

разы (2,5 Ед./мкл) и деионизованную воду до общего объема смеси 25 мкл. Пробирку прогревали в течение 5 мин при 95 °С, и затем проводили ПЦР по следующей программе: 95 °С – 30 с, 62 °С – 60 с, 72 °С – 2 мин, всего 25–35 циклов. После этого реакцию смесь выдерживали еще 10 мин при 72 °С. В качестве матрицы для получения генов, кодирующих другие последовательности N-конца фермента, была использована плазмидная ДНК, содержащая ген *opafdh_GK*. ПЦР проводили аналогично.

Полученные ПЦР-продукты обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *NdeI/HindIII* и очищали электрофоретически в 1%-ном агарозном геле. Рестриктонные фрагменты лигировали с использованием ДНК-лигазы фага T4 с обработанным теми же эндонуклеазами рестрикции вектором pET24a+ («Novagen», США). Реакционной смесью после лигирования трансформировали клетки *E. coli* DH5α и высевали их на чашки Петри с агаризованной средой, содержащей канамицин (30 мкг/мл), и выдерживали 12 ч при 37 °С. Для каждого клонна ОраFDH с чашки брали по 2 колонии и из них выделяли плазмиды. Для контроля последовательности получаемого ДНК-материала проводили секвенирование плазмидных ДНК. Полученные нуклеотидные последовательности анализировали с помощью программы ClustlX 1.83.

Экспрессия формиатдегидрогеназ в клетках *E. coli*. Экспрессию генов целевых ФДГ проводили в клетках *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS по стандартной методике, разработанной в нашей лаборатории с использованием музейных культур. Для получения музейной культуры штамм *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS трансформировали плазмидной ДНК с подтвержденной последовательностью целевого гена.

Полученную после трансформации смесь высевали на чашки с агаризованной средой 2YT, содержащей антибиотика канамицин и хлорамфеникол, чашки инкубировали в течение ночи при 30 °С. Затем с чашки Петри брали единичную колонию и помещали в 2 мл среды 2YT, содержащей антибиотика хлорамфеникол (25 мкг/мл) и канамицин (30 мкг/мл). Клетки культивировали при 37 °С до достижения поглощения среды при 600 нм (A_{600}) величины 0,7–0,8. Из пробирки стерильно отбирали 150 мкл суспензии и помещали в стерильные контейнеры для хранения музейных культур с 50 мкл стерильного 50% (v/v) раствора глицерина. Полученную музейную культуру хранили при –85 °С и использовали по мере надобности. Собственно процесс экспрессии включал несколько стадий. 1) 10 мкл музейной культуры культивировали в 4 мл среды с антибиотиками хлорамфеникол (25 мкг/мл) и канамицин (30 мкг/мл) в течение ночи при 37 °С и 180 об./мин в течение 12–14 ч. 2) 20 мкл ночной культуры пересевали в 100 мл колбы с отбойниками, содержащими 20 мл среды 2YT с вышеуказанными антибиотиками, и культивировали на качалке при 37 °С и 120 об./мин. 3) По достижении культуральной средой значений поглощения при 600 нм 0,6–0,8 полученный раствор из колбы на 100 мл переносили в качалочную колбу с отбойниками объемом 1 литр, с 200 мл среды 2YT с 1% (v/v) глицерином и культивировали при 30 °С и 120 об./мин. После достижения значения поглощения $A_{600} = 0,6–0,8$ проводили индукцию клеток, добавляя 0,1 М раствор изопропилтиогалактозида (IPTG) до конечной концентрации индуктора 0,1 мМ. Через 2 ч после индукции в колбы добавляли раствор формиата натрия (200 г/литр) до конечной концентрации 1 г/литр и продолжали культивирование еще 12–14 ч (20 °С, 120 об./мин). 4) Через 14 ч клетки осаждали на центрифуге Eppendorf 5804R («Eppendorf», Германия) в течение 30 мин при 6000 об./мин и 4 °С. Полученный осадок ресуспендировали (концентрация клеток – 20% по массе) в 0,1 М Na-фосфатном буфере, pH 8,0 (для очистки ферментов ОраFDH_K, ОраFDH_GK, ОраFDH_AK) и в 50 мМ Tris-HCl-буфере, содержащем 0,5 М NaCl, 20 мМ имидазол, pH 7,5 (для фермента, содержащего гистидиновою метку), и подвергали заморозке при –20 °С.

Выделение и очистка. Очистка ферментов без His-tag. Для очистки ферментов без His-tag использовали методику, разработанную для получения рекомбинантной PseFDH дикого типа [11]. Полученную на предыдущем этапе

суспензию подвергали двум циклам заморозки-разморозки, и затем клетки разрушали с использованием ультразвукового дезинтегратора («Branson Sonifier 250», Германия) при постоянном охлаждении. Осадок удаляли центрифугированием на центрифуге Eppendorf 5804 R (11 000 об./мин, 30 мин), а к супернатанту добавляли по каплям насыщенный раствор сульфата аммония до концентрации, равной 30% от насыщения. Полученный раствор инкубировали несколько часов при 4 °С. Осадок отделяли с помощью центрифугирования на центрифуге Beckman J21 («Beckman Coulter», США) при 20 000 об./мин (30 мин, 4 °С), супернатант использовали для гидрофобной хроматографии на Phenyl Sepharose Fast Flow («Pharmacia Biotech», Швеция) в нисходящем градиенте (30–0%) концентрации сульфата аммония в 0,1 М натрий-фосфатном буфере (pH 7,0). Собирали активные фракции, содержащие искомым фермент в растворе сульфата аммония. Далее, препарат фермента обессоливали на колонке с Sephadex G25 («Pharmacia Fine Chemicals», Швеция) в том же буферном растворе. Контроль чистоты полученных препаратов осуществлялся с помощью аналитического электрофореза в 12%-ном полиакриламидном геле в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия на приборе для электрофореза MiniProtean II («Bio-Rad», США).

Очистка фермента, содержащего гистидиновою метку. Клетки разрушали ультразвуком как описано выше. Полученный раствор фермента после экспрессии (50 мМ Tris-HCl, 0,5 М NaCl, 20 мМ имидазол, pH 7,5) наносили на колонку объемом 1 мл HisTrap FF Ni Sepharose 6 Fast Flow («Cytiva», США), уравновешенную раствором, содержащим 50 мМ Tris-HCl, 0,5 М NaCl, 20 мМ имидазол, pH 7,5 (раствор А). После нанесения фермента колонку промывали раствором А в течение 30 мин до исчезновения поглощения при 280 нм. Фермент элюировали с колонки восходящим линейным градиентом раствора Б, содержащего 50 мМ Tris-HCl, 0,5 М NaCl, 0,5 М имидазол, pH 7,5. Начальная точка градиента – 0% раствора Б, конечная точка градиента – 60% раствора Б. Объем градиента – 10 мл. Во время проведения хроматографии собирали фракции по 2 мл и измеряли поглощение при 280 нм (A_{280}) и ферментативную активность (A_{340}). Фракции с максимальным соотношением (A_{340}/A_{280}) объемом ~2 мл для обессоливания наносили на колонку 1 × 10 см (объем – 10 мл) с Sephadex G25. Для обессоливания использовали раствор, содержащий 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5).

Измерение активности формиатдегидрогеназы. Активность ФДГ определяли спектрофотометрически по накоплению NADH (NADPH) при длине волны 340 нм ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) на спектрофотометре Shimadzu UV 1800 PC («Shimadzu», Япония) при 30 °C в 0,1 М натрий-фосфатном буфере (pH 7,0). Концентрации формиата натрия и NAD^+ в кювете составляли 0,6 М и 0,6 мМ соответственно. Одна единица активности – это количество мкмоль субстрата, превращаемое одним мкмоль фермента в мин.

Определение кинетических параметров формиатдегидрогеназы. Константы Михаэлиса по NAD^+ и формиату определяли из зависимостей активности фермента от концентрации (K_M 0,4–6) соответствующего субстрата. Концентрация второго субстрата была насыщающей ($K_M > 15$). Точные концентрации исходных растворов NAD^+ определяли спектрофотометрически при длине волны 260 нм ($\epsilon_{260} = 17\,800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$). Раствор формиата натрия с заданной концентрацией готовили, растворяя нужное количество субстрата в 0,1 М натрий-фосфатном буфере (pH 7,0). Объем раствора доводили в мерной колбе. Значения K_M и V_{\max} были рассчитаны из экспериментальных зависимостей методом нелинейной регрессии с помощью программы Origin Pro 8.5. Значения каталитических констант определяли из уравнения $V_{\max} = k_{\text{cat}} \cdot [E]$. Концентрацию белка определяли по формуле Калькара ($C(\text{г/литр}) = 1,45 \cdot A_{280} - 0,74 \cdot A_{260}$) [12].

Определение параметров кинетики термостабильности. Термостабильность ферментов измеряли в 0,1 М натрий-фосфатном буфере (pH 7,0) при нескольких температурах. Для каждого эксперимента готовили серию из пластиковых пробирок объемом 0,5 мл, содержащих по 100 мкл раствора фермента (0,2 мг/мл) в каждой. Пробирки помещали в предваритель-

но прогретый до необходимой температуры водный термостат (точность термостатирования – $\pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$). В определенные моменты времени отбирали по одной пробирке и переносили в лед на 5 мин, после чего пробирку центрифугировали в течение 3 мин при 12 000 об./мин на центрифуге Eppendorf 5430. Остаточную активность ФДГ измеряли, как описано выше. Константу скорости термостабилизации k_{in} определяли как тангенс угла наклона прямой на графике зависимости натурального логарифма величины остаточной активности от времени (полулогарифмические координаты $\ln(A/A_0) - t$) методом линейной регрессии, используя программу Origin Pro 8.5.

Моделирование структуры OpaFDH с различным расположением последовательности His-tag. Моделирование проводилось в бесплатной версии AlphaFold2 на базе Google Colab. В степени олигомеризации устанавливали димер. В качестве модели для msa (multiple sequence alignment, множественное выравнивание последовательностей) использовали mmseqs2_uniref_env. В режиме моделирования выбирали alphafold2_multimer_v3, количество циклов на одну модель – 6. Всего для каждого фермента было построено 5 моделей. Из этих моделей была выбрана лучшая по параметру pLDDT.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор аминокислотных замен. На рис. 1 представлено выравнивание N-концевой части аминокислотных последовательностей некоторых ФДГ из дрожжей, растений и бактерий. Видно, что N-конец ФДГ из всех митотрофных дрожжей (в том числе и нативной OpaFDH) начинается с остатка лизина. У некоторых бактериальных ФДГ на N-конце

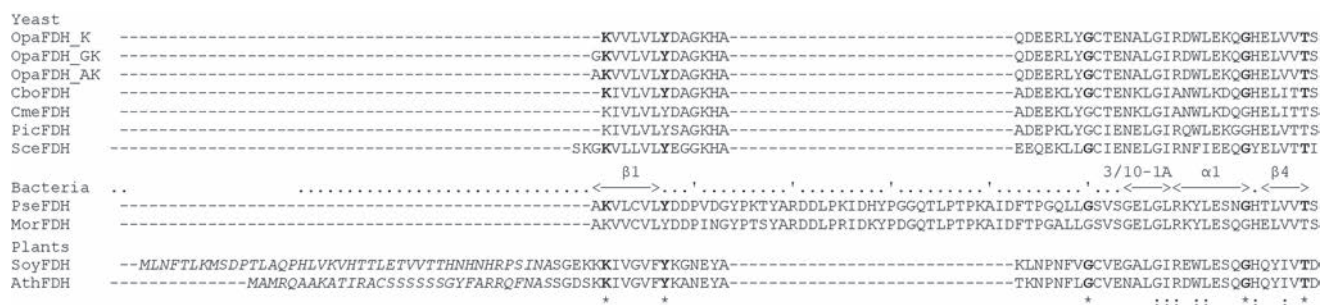


Рис. 1. Сравнение N-концевой части аминокислотных последовательностей ФДГ из различных источников. Дрожжи: OpaFDH – *O. parapolyomorpha*, CboFDH – *Candida boidinii*, CmeFDH – *Candida methylica*, PicFDH – *Pichia pastoris*, SceFDH – *Saccharomyces cerevisiae*; растения: SoyFDH – *Glycine max* (soya), AthFDH – *Arabidopsis thaliana*; бактерии: PseFDH – *Pseudomonas* sp. 101, MorFDH – *Moraxella* sp. C1. Консервативные остатки отмечены полужирным шрифтом и звездой (*). Структурные элементы указаны для PseFDH (PDB: 2NAC). В последовательностях растительных ФДГ курсивом выделена сигнальная последовательность для транспорта фермента в митохондрии

имеется остаток Ala, однако, как следует из рис. 1, структура *N*-конца бактериальных ферментов кардинально отличается от таковой у ФДГ из дрожжей и растений. Согласно «правилу Варшавского», наличие на *N*-конце белка остатка Lys может неблагоприятно сказываться на стабильности фермента при его экспрессии [13]. Например, ФДГ из дрожжей *C. boidinii* при экспрессии в клетках *E. coli* расщепляется протеазами клетки намного быстрее, чем фермент из бактерий *Pseudomonas* sp. 101 [14]. В связи с вышесказанным для повышения стабильности рекомбинантной ОраFDH при ее экспрессии в клетках *E. coli* было решено в ген фермента после стартового триплета Met вставить дополнительный триплет, кодирующий остаток глицина [8]. В рамках данной работы был получен фермент, соответствующий природному варианту, а также было решено получить вариант фермента с дополнительным остатком аланина на *N*-конце. Все возможные варианты *N*-концевой последовательности ФДГ представлены на рис. 1.

Моделирование структур различных форм ОраFDH с His-tag на *N*- и *C*-конце. Для выбора положения His-tag было проведено моделирование пространственной структуры ОраFDH с помощью алгоритма AlphaFold2. На рис. 2, *a* и *б* представлены модельные структуры с различным расположением остатков гистидина. Вид-

но, что при расположении His-tag на *N*-конце ОраFDH остатки гистидина не затрагивают полость активного центра, где должны связываться кофермент и субстрат. При расположении His-tag на *C*-конце фермента (рис. 2, *б*) видно, что происходит изменение конформации кофермент-связывающего домена. С этим, возможно, и связано значительное увеличение K_M по NAD^+ для ОраFDH_HisC, полученного китайскими коллегами в 2014 г. [7]. Ранее нами были проанализированы структуры ФДГ из бактерий [15] и растений [16] и было показано, что для этих ФДГ более предпочтительным является расположение His-tag на *N*-конце. Результаты анализа были подтверждены экспериментально. Таким образом, учитывая результаты моделирования для ОраFDH, а также экспериментальные данные, полученные для других ФДГ, было принято решение добавлять последовательность из 6 остатков гистидина на *N*-конец ОраFDH.

Создание генно-инженерных конструкций.

Клонирование гена было проведено с помощью полимеразной цепной реакции с соответствующими праймерами на начало и конец гена вначале без добавления His-tag [8]. Для клонирования гена, кодирующего ОраFDH, прямой праймер сконструирован таким образом, что синтез фермента начинается с остатка глицина.

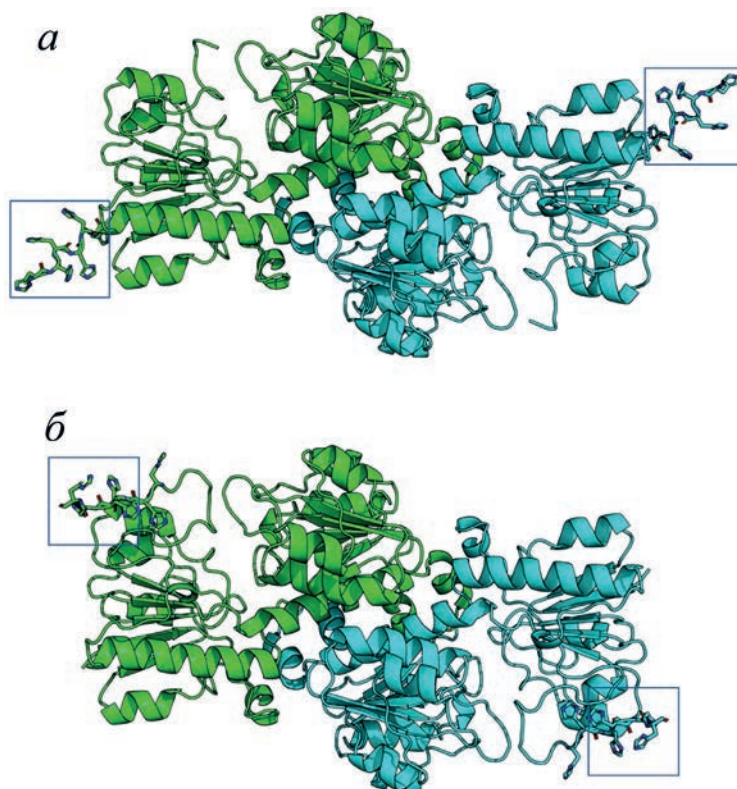


Рис. 2. Модельные структуры ОраFDH с His-tag на *N*-конце (*a*) и на *C*-конце (*б*)

Таблица 2. Данные по экспрессии различных форм ОраFDH

Фермент	Выход фермента по активности, Ед./литр среды	Выход биомассы, г/литр среды	Выход фермента по массе, мг/литр среды	Содержание фермента в клетках, Ед./г клеток
ОраFDH_K	6030	15,4	1005	390
ОраFDH_GK	6744	18,8	1124	360
ОраFDH_AK	6100	17,2	1017	355
ОраFDH_HisN_AK	6500	14,6	1084	445

Обратный праймер был комплементарен 3'-концу гена. Кроме того, на С-конец гена вместо стоп-кодона TGA было вставлено два стоп-кодона (TAATAA) для более эффективной терминации синтеза белка. Также в праймеры были дополнительно введены сайты рестрикции – *NdeI* (CATATG; ОраFOR) и *HindIII* (AAGCTT; ОраREV).

В качестве матрицы для клонирования использовали хромосомную ДНК дрожжей *O. parapolymorpha* DL-1. В результате с помощью ПЦР был получен фрагмент, содержащий ген, кодирующий ОраFDH с дополнительным триплетом остатка глицина. Анализ последовательностей показал, что клонированные фрагменты содержат открытые рамки считывания, соответствующие последовательности гена, кодирующего ОраFDH_GK, и состоят из 1089 пар нуклеотидов, кодирующих полипептид из 363 аминокислотных остатков с молекулярной массой 40 051 Да.

Далее, были получены следующие конструкции: 1) содержащая ген, кодирующий ОраFDH, полностью аналогичный природному – ОраFDH_K, 2) содержащая ген, коди-

рующий ОраFDH с дополнительным триплетом, кодирующим дополнительный остаток аланина на N-конце белка – ОраFDH_AK, и 3) содержащая ген, кодирующий ОраFDH_AK с дополнительной последовательностью, кодирующей 6 остатков гистидина на N-конце – ОраFDH_HisN_AK.

Экспрессия и очистка ОраFDH. Полученные плазмиды с генами, кодирующими ОраFDH, экспрессировали в клетках *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS, используя в качестве индуктора IPTG. Данные по экспрессии ферментов представлены в табл. 2.

Выходы целевых белков составили около 1 г с одного литра среды, что является очень высоким показателем. Для сравнения, экспрессия FDH из бактерий *Pseudomonas* sp. 101 и дрожжей *C. boidinii* в таких же условиях составляет 0,6 и 0,4 г с одного литра среды соответственно. Очистку ОраFDH_K, ОраFDH_GK и ОраFDH_AK проводили с использованием гидрофобной хроматографии по методике, описанной в разделе «Материалы и методы». На рис. 3 представлены данные аналитического SDS-Na-электрофореза в ПААГ для

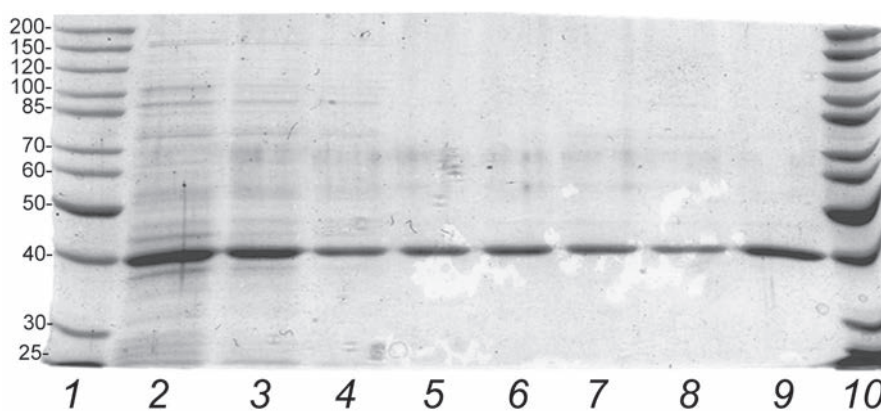


Рис. 3. Аналитический SDS-Na-электрофорез в 12%-ном ПААГ препаратов ОраFDH_GK на различных стадиях очистки. Дорожки: 1 и 10 – маркеры молекулярной массы; 2 – бесклеточный экстракт; 3 – бесклеточный экстракт после термообработки 55 °С, 10 мин; 4 – фракционирование в 30%-ном сульфате аммония фракции перед гидрофобной хроматографией; 5–8 – фракции, собранные после гидрофобной хроматографии; 9 – фракция после обессоливания

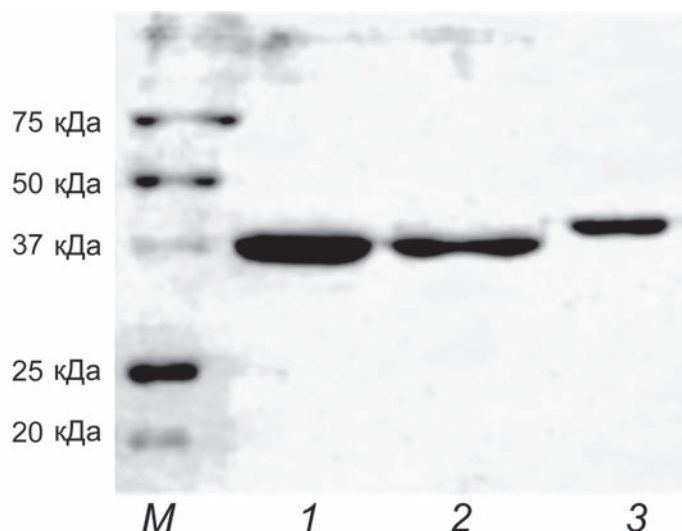


Рис. 4. Аналитический SDS-Na-электрофорез в 12%-ном ПААГ очищенных препаратов ОpaFDH. Дорожки: М – маркер, 1 – ОpaFDH_AK, 2 – ОpaFDH_K, 3 – ОpaFDH_HisN_AK

ОpaFDH_GK на разных стадиях очистки. Видно, что субъединица полученного рекомбинантного белка имеет молекулярную массу ~ 40 кДа и чистота препарата составляет не менее 95%. Очистку ОpaFDH_His_AK проводили с использованием металл-хелатной хроматографии. На рис. 4 представлены данные SDS-электрофореза в ПААГ для препаратов ферментов ОpaFDH_AK, ОpaFDH_K и ОpaFDH_His_AK. Видно, что все ферменты имеют высокую степень чистоты.

Кинетические параметры ОpaFDH. В табл. 3 представлены значения кинетических параметров для ОpaFDH и мутантных форм с модификациями *N*-концевой последовательности в сравнении с ФДГ из других источников. Кинетические параметры были измерены при pH 7,0 и 30 °С с использованием различных концентраций NAD^+ и HCOO^- .

Как видно из табл. 3, ОpaFDH по своим значениям K_M сравнима с растительной ФДГ из *Glycine max*. Однако за счет высокой каталитической константы каталитическая эффективность по NAD^+ исследуемого фермента имеет максимальное значение. Именно кинетические параметры по NAD^+ важны для применения ФДГ на практике, поскольку чем меньше K_M по NAD^+ , тем меньшее количество кофермента необходимо использовать в реальном процессе. Из табл. 3 также видно, что ОpaFDH с His-tag на *C*-конце, полученная в работе Yu et al. [7], имеет гораздо большее значение $K_M^{\text{NAD}^+}$. Изменения последовательности *N*-конца ОpaFDH, а также введенная нами гистидиновая метка на *N*-конец фермента практически не оказывают влияния на кинетические параметры. Таким образом,

наши предположения о том, что наиболее предпочтительным для введения His-tag в последовательность ОpaFDH является *N*-конец фермента, выдвинутые после моделирования соответствующих структур, являются верными. Также нами были проведены измерения кинетических параметров в присутствии 0,5 М NaCl (добавление NaCl положительно сказывается на стабильности белка – см. выше) и оказалось, что добавление 0,5 М NaCl практически не оказывает влияния на кинетические параметры.

Температурная стабильность ОpaFDH. Термоинактивация ОpaFDH_K, ОpaFDH_GK, ОpaFDH_AK и ОpaFDH_HisN_AK была изучена в диапазоне температур 61–66 °С при pH 7,0. На рис. 5 в качестве примера представлены зависимости величин остаточной активности ОpaFDH_GK от времени при различных температурах, а на рис. 6 представлено сравнение зависимостей остаточной активности ФДГ из различных источников при одной температуре. Константа скорости инактивации для ОpaFDH_GK в 2,7, 5,7 и 24,1 раза выше, чем соответственно для ФДГ из *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* sp. 101 и самого стабильного мутанта PseFDH SM4. ОpaFDH_GK сравнима по термостабильности с ФДГ из других бактериальных источников. Это хорошо согласуется с нашими результатами изучения температурной стабильности методом дифференциальной сканирующей калориметрии [10]. В работе Yu et al. [7] термостабильность ОpaFDH_HisC была измерена при температурах 50, 55, 60 и 65 °С при pH 6,5. Константы скорости инактивации не определяли, но в статье приведен график остаточной активности

Таблица 3. Кинетические свойства различных форм ОраFDH*

Фермент	k_{cat} , с ⁻¹	$K_M^{HCOO^-}$, мМ	$K_M^{NAD^+}$, мкМ	$k_{cat}/K_M^{HCOO^-}$, мМ ⁻¹ ·с ⁻¹	$k_{cat}/K_M^{NAD^+}$, мкМ ⁻¹ ·с ⁻¹
PseFDH [1]	7,3	6,5	65	1,1	0,11
SauFDH [8]	25	130	220	0,2	0,11
MorFDH [1]	7,3	7,5	80	1,0	0,09
MycFDH [1]	7,3	6,0	89	1,2	0,08
BstFDH [17]	1,7	55	1430	0,03	0,001
BacFDH [18]	6,7	19,6	91	0,3	0,07
CboFDH [1]	3,7	5,9	37	0,6	0,10
ОраFDH_GK [8]	4,6 ± 0,4	1,3 ± 0,1	14,0 ± 0,6	3,5	0,33
ОраFDH_AK**	4,3 ± 0,3	2,2 ± 0,1	20,5 ± 0,7	2,0	0,21
ОраFDH_K**	4,4 ± 0,6	2,0 ± 0,1	13,0 ± 1,0	2,2	0,34
ОраFDH_HisN_AK**	4,3 ± 0,2	2,2 ± 0,2	17,0 ± 1,0	2,0	0,25
ОраFDH_HisN_AK***	4,5 ± 0,3	2,5 ± 0,3	20,0 ± 1,0	1,8	0,23
ОраFDH_HisC [7]	2,3	0,8	83	2,8	0,03
SceFDH [8]	6,5	5,5	36	1,2	0,18
AthFDH [8]	3,8	2,8	50	1,4	0,08
SoyFDH [8]	2,9	1,5	13	1,9	0,22
PpaFDH [8]	3,4	2,6	39	1,3	0,09
LjaFDH [19]	1,2	6,1	26	0,2	0,05

Примечание. * Сокращения: PseFDH – ФДГ из бактерий *Pseudomonas* sp 101; SauFDH – ФДГ из золотистого стафилококка *Staphylococcus aureus*; MorFDH – ФДГ из бактерий *Moraxella* sp. C2; MycFDH – ФДГ из бактерий *Mycobacterium vaccae*; BstFDH – ФДГ из бактерий *Burkholderia stabilis* (проявляет активность с NADP⁺); BacFDH – ФДГ из бактерий *Bacillus* sp. F1; CboFDH – ФДГ из дрожжей *C. boidinii*; ОраFDH_HisC – ФДГ из дрожжей *O. parapolyomorpha*; SceFDH – ФДГ из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*; AthFDH – ФДГ из растения *A. thaliana*; SoyFDH – ФДГ из сои *Glycine max*; PpaFDH – ФДГ из мха *Physcomitrella patens*; LjaFDH – ФДГ из *Lotus japonicus*.

** Данная работа.

*** + 0,5 М NaCl.

от времени, на основании которого можно оценить остаточную активность. Действительно, через 2 ч термообработки при 60 °С у ОраFDH_HisC остается менее 20% исходной активности, что в пределах ошибки согласуется с нашими данными.

На рис. 7 представлены зависимости остаточной активности от времени для мутантных ферментов при 64 °С. Видно, что добавление остатка аланина на N-конец ОраFDH приводит к увеличению температурной стабильности фермента. Поэтому было решено добавлять гистидиновую метку именно к этой мутантной форме. Из рис. 7 видно, что добав-

ление His-tag снижает стабильность белка и приводит этот параметр примерно на уровень фермента без дополнительного остатка или же со вставкой остатка глицина. Увеличение ионной силы за счет добавления 0,5 М NaCl увеличивает стабильность фермента с His-tag до уровня ОраFDH_AK без гистидиновой метки. Таким образом, определение температурной стабильности ферментов показало, что добавление His-tag на N-конец ОраFDH_AK несколько снижает стабильность, но добавление NaCl нивелирует этот эффект. Стабилизующий эффект ионной силы в случае ОраFDH хорошо согласуется с данными

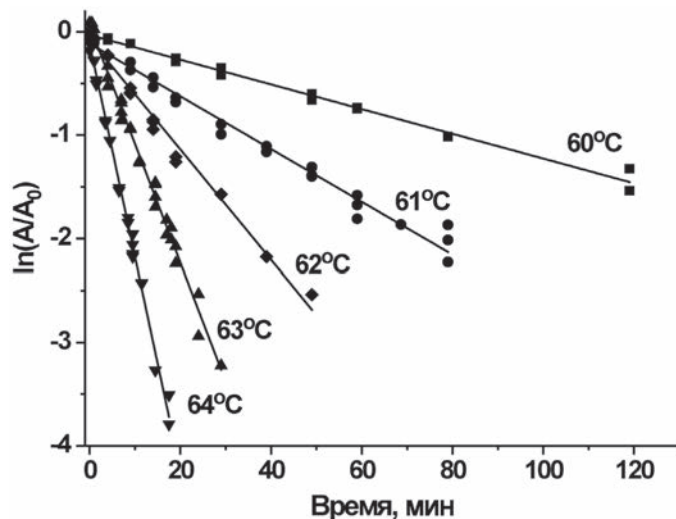


Рис. 5. Зависимость логарифма остаточной активности ОраFDH_GK от времени при нескольких температурах; 0,1 М натрий-фосфатный буфер (pH 7,0)

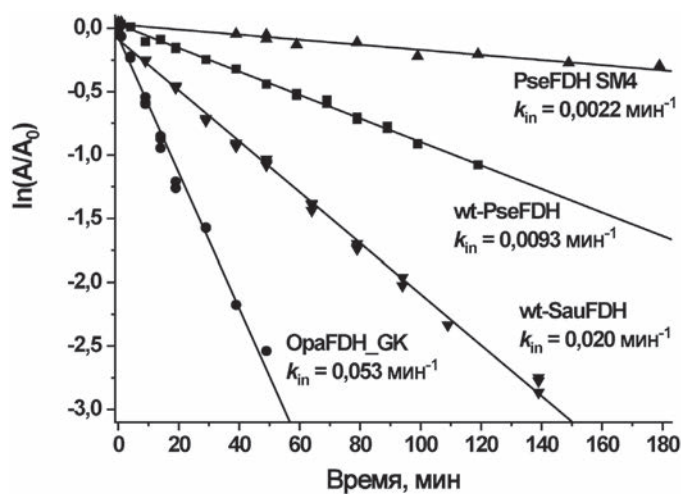


Рис. 6. Зависимость логарифма остаточной активности FDH из различных источников при 62 °С; 0,1 М натрий-фосфатный буфер (pH 7,0)

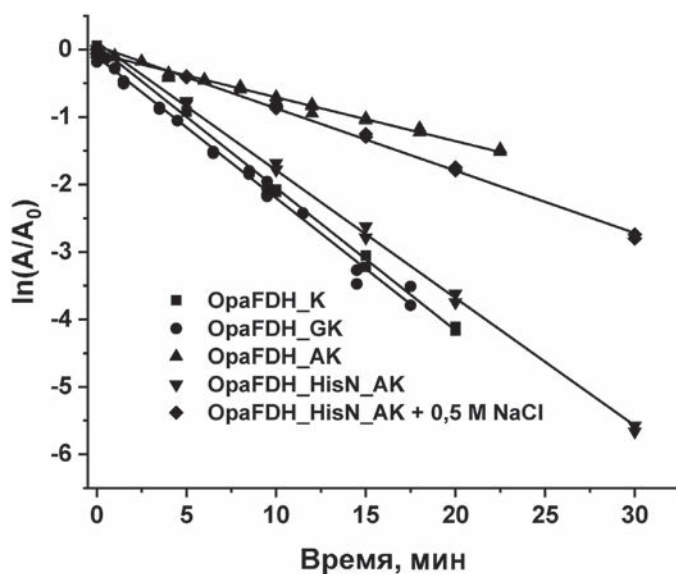


Рис. 7. Зависимость остаточной активности мутантных ОраFDH и фермента дикого типа ОраFDH_K от времени инкубирования при 64 °С в полулогарифмических координатах (0,1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,0)

по эффекту стабилизации для растительных ФДГ при повышении ионной силы за счет увеличения концентрации фосфат-иона. Так, для рекомбинантных SoyFDH и AthFDH эффект стабилизации за счет увеличения концентрации фосфатного буфера был более чем 5-кратным [20]. Следует отметить, что в отличие от фосфат-иона хлорид-ион снижает температурную стабильность других исследованных формиатдегидрогеназ (собственные неопубликованные данные). Данный случай является первым, когда увеличение концентрации NaCl привело к стабилизации ФДГ.

Зависимости величин остаточной ферментативной активности от времени, полученные при различных температурах, были линейны в полулогарифмических координатах $\ln(A/A_0)$ от времени. Из тангенса угла наклона прямых рассчитываются константы скорости инактивации (k_{in}) первого порядка. Изменение концентрации белка в широком диапазоне (0,1–2,5 мг/мл) не влияет на величину k_{in} , т.е. инактивация всех четырех наших вариантов ОраFDH при повышенных температурах является истинно мономолекулярным процессом. Мономолекулярный механизм термоинактивации свидетельствует, что разворачивание белковой глобулы происходит без предварительной диссоциации димерной молекулы фермента на отдельные субъединицы. Полученные значения констант скорости термоинактивации при различных температурах представлены в табл. 4.

В случае истинной мономолекулярности процесса зависимость константы скорости инактивации от температуры может быть описана с помощью уравнения теории активированного комплекса [21]. Линейная форма этого уравнения имеет следующий вид:

$$\ln\left(\frac{k_{in}}{T}\right) = \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} = \text{const} - \frac{\Delta H^\ddagger}{R} \frac{1}{T},$$

$$\text{const} = \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R},$$

где k_B и h – это константы Больцмана и Планка соответственно, R – универсальная газовая постоянная, а ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger – активационные параметры. Нами были изучены соответствующие зависимости константы скорости термоинактивации от температуры для всех мутантов при pH 7. Из них были рассчитаны активационные параметры, которые суммированы в табл. 5.

Согласно данным табл. 5, высокие значения активационных параметров для ОраFDH говорят о значительном изменении температурной стабильности с температурой: при высоких температурах белок будет менее стабилен, при низких температурах – более стабилен. В реальном биотехнологическом процессе температуры выше 50 °С не используются, поэтому белок будет активен более 4–5 ч. Максимальные значения активационных параметров наблюдаются для фермента с дополнительным остатком аланина. При этом добавление His-tag на N-конец белка приводит к снижению активационных параметров до уровня ОраFDH_K и ОраFDH_GK. Добавление 0,5 М NaCl приводит к значительному изменению характера зависимости константы скорости инактивации от температуры – активационные параметры снижаются до уровня SoyFDH, т.е. увеличение ионной силы приводит к снижению влияния температуры на константу скорости термоинактивации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе проведено моделирование структуры ОраFDH с различным расположением гистидиновой метки и показано, что наиболее перспективным для ее

Таблица 4. Константы скорости инактивации различных форм ОраFDH

Фермент	$k_{in}^{61\text{ }^\circ\text{C}},$ мин ⁻¹	$k_{in}^{62\text{ }^\circ\text{C}},$ мин ⁻¹	$k_{in}^{63\text{ }^\circ\text{C}},$ мин ⁻¹	$k_{in}^{64\text{ }^\circ\text{C}},$ мин ⁻¹	$k_{in}^{65\text{ }^\circ\text{C}},$ мин ⁻¹
ОраFDH_K	0,0258	0,0524	0,1169	0,2110	–
ОраFDH_GK	0,0261	0,0533	0,1147	0,2060	–
ОраFDH_AK	0,005	0,009	0,03	0,07	0,13
ОраFDH_HisN_AK	0,0239	0,0483	0,0951	0,1894	0,3351
ОраFDH_HisN_AK + 0,5 М NaCl	0,0298	0,0433	0,0633	0,0924	0,1451

Таблица 5. Значения активационных параметров процесса термоинактивации ФДГ из различных источников

Фермент	ΔH^\ddagger , кДж/моль	ΔS^\ddagger , Дж/(моль·К)
PseFDH [22]	540 ± 20	1320 ± 40
CboFDH [22]	480 ± 30	1250 ± 80
AthFDH [22]	490 ± 30	1200 ± 70
SoyFDH [22]	370 ± 20	830 ± 60
OpaFDH_GK	670 ± 20	1690 ± 50
OpaFDH_K	660 ± 30	1670 ± 80
OpaFDH_AK	800 ± 40	2070 ± 90
OpaFDH_HisN_AK	620 ± 10	1550 ± 40
OpaFDH_HisN_AK + 0,5 M NaCl	370 ± 10	790 ± 30

введения является *N*-концевая последовательность. Получены рекомбинантные OpaFDH с измененной последовательностью на *N*-конце. Все ферменты получены в активной и растворимой форме с выходом более чем 1 г с одного литра среды. Показано, что изменение *N*-конца, в том числе введение гистидиновой метки, не оказывает значительного влияния на кинетические параметры OpaFDH. При этом введение остатка аланина на *N*-конце приводит к увеличению температурной стабильности фермента. His-tag на *N*-конце OpaFDH_His_AK негативно влияет на температурную стабильность, но этот эффект можно скомпенсировать увеличением ионной силы. Фермент, полученный в рамках данной работы, демонстрирует высокую температурную стабильность, превосходя все известные в настоящее время эукариотические ФДГ. OpaFDH может быть эффективно использована в качестве биокатализатора в процессах регенерации кофактора,

а также для детекции NAD^+ в биологических жидкостях за счет своих высоких значений каталитической эффективности и температурной стабильности.

Вклад авторов. А.А.П., В.И.Т. – концепция и руководство работой; С.А.З., Р.П.К., Л.А.Ш., Д.Л.А., Е.В.П., С.С.С. – проведение экспериментов; А.А.П., Л.А.Ш., В.И.Т. – обсуждение результатов исследования; А.А.П. и Л.А.Ш. – написание текста; А.А.П., С.С.С., В.И.Т. – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена частично в рамках государственного научного задания.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tishkov, V. I., and Popov, V. O. (2004) Catalytic mechanism and application of formate dehydrogenase, *Biochemistry (Moscow)*, **69**, 1252-1267, doi: 10.1007/s105410050071x.
2. Tishkov, V. I., and Popov, V. O. (2006) Protein engineering of formate dehydrogenase, *Biomol. Eng.*, **23**, 89-110, doi: 10.1016/j.bioeng.2006.02.003.
3. Alekseeva, A. A., Savin, S. S., and Tishkov, V. I. (2011) NAD^+ -dependent formate dehydrogenase from plants, *Acta Naturae*, **3**, 38-54, doi: 10.32607/20758251-2011-3-4-38-54.
4. Tishkov, V. I., Pometun, A. A., and Savin, S. S. (2023) Formate dehydrogenase: from NAD(P)H re-generation to targeting pathogen biofilms, composing highly efficient hybrid biocatalysts and atmospheric CO_2 fixation, *Moscow Univ. Chem. Bull.*, **78**, 151-169, doi: 10.3103/S0027131423040077.
5. Kragl, U., Kruse, W., Hummel, W., and Wandrey, C. (1996) Enzyme engineering aspects of biocatalysis: cofactor regeneration as example, *Biotechnol. Bioeng.*, **52**, 309-319, doi: 10.1002/(SICI)1097-0290.
6. Tishkov, V. I., Galkin, A. G., Marchenko, G. N., Tsygankov, Y. D., and Egorov, A. M. (1993) Formate dehydrogenase from methylotrophic bacterium *Pseudomonas* sp. 101: gene cloning and expression in *Escherichia coli*, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **18**, 201-207.

7. Yu, S., Zhu, L., Zhou, C., An, T., Zhang, T., Jiang, B., and Mu, W. (2014) Promising properties of a formate dehydrogenase from a methanol-assimilating yeast *Ogataea parapolymorpha* DL-1 in His-tagged form, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 1621-1630, doi: 10.1007/s00253-013-4996-5.
8. Tishkov, V. I., Pometun, A. A., Stepashkina, A. V., Fedorchuk, V. V., Zarubina, S. A., Kargov, I. S., Atroshenko, D. L., Parshin, P. D., Kovalevski, R. P., Boiko, K. M., Eldarov, M. A., D'Oronzio, E., Fachris, S., Secundo, F., and Savin, S. S. (2018) Rational design of practically important enzymes, *Moscow Univ. Chem. Bull.*, **73**, 1-6, doi: 10.3103/S0027131418020153.
9. Pometun, A. A., Kleymenov, S. Y., Zarubina, S. A., Kargov, I. S., Parshin, P. D., Sadykhov, E. G., Savin, S. S., and Tishkov, V. I. (2018) Comparison of thermal stability of new formate dehydrogenases by differential scanning calorimetry, *Moscow Univ. Chem. Bull.*, **73**, 80-84, doi: 10.3103/S002713141802013X.
10. Pometun, A. A., Boyko, K. M., Zubanova, S. A., Nikolaeva, A. Yu., Atroshenko, D. L., Savin, S. S., and Tishkov, V. I. (2021) Preparation of recombinant formate dehydrogenase from thermotolerant yeast *Ogataea parapolymorpha* and crystallization of its apo- and holo-forms, *Moscow Univ. Chem. Bull.*, **76**, 49-55, doi: 10.3103/S0027131421010120.
11. Rojkova, A. M., Galkin, A. G., Kulakova, L. B., Serov, A. E., Savitsky, P. A., Fedorchuk, V. V., and Tishkov, V. I. (1999) Bacterial formate dehydrogenase. Increasing the enzyme thermal stability by hydrophobization of alpha-helices, *FEBS Lett.*, **445**, 183-188, doi: 10.1016/S0014-5793(99)00127-1.
12. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. (1991) *Справочник биохимика*, Мир, Москва, ISBN 5-03-001032-7.
13. Varshavsky, A. (2011) The N-end rule pathway and regulation by proteolysis, *Protein Sci.*, **20**, 1298-1345, doi: 10.1002/pro.666.
14. Klyushnichenko, V., Tishkov, V., and Kula, M.-R. (1997) Rapid SDS-gel capillary electrophoresis for the analysis of recombinant NADP⁺-dependent formate dehydrogenase during expression in *E. coli* cells and purification, *J. Biotechnol.*, **58**, 187-195, doi: 10.1016/S0168-1656(97)00149-1.
15. Pometun, A. A., Parshin, P. D., Galanicheva, N. P., Uporov, I. V., Atroshenko, D. L., Savin, S. S., and Tishkov, V. I. (2020) Influence of His6 sequence on the properties of formate dehydrogenase from bacterium *Pseudomonas* sp. 101, *Moscow Univ. Chem. Bull.*, **75**, 250-257, doi: 10.3103/S0027131420040057.
16. Shaposhnikov, L. A., Savin, S. S., Atroshenko, D. L., Chubar, T. A., Pometun, E. V., Tishkov, V. I., and Pometun, A. A. (2023) Engineering the N-terminal sequence of *Glycine max* soybean formate dehydrogenase, *Moscow Univ. Chem. Bull.*, **78**, 220-230, doi: 10.3103/S0027131423040053.
17. Hatrongjit, R., and Packdibamrung, K. (2010) A novel NADP⁻-dependent formate dehydrogenase from *Burkholderia stabilis* 15516: Screening, purification and characterization, *Enzyme Microb. Technol.*, **46**, 557-561, doi: 10.1016/j.enzmictec.2010.03.002.
18. Ding, H. T., Liu, D. F., Li, Z. L., Du, Y. Q., Xu, X. H., and Zhao, Y. H. (2011) Characterization of a thermally stable and organic solvent-adaptative NAD⁺-dependent formate dehydrogenase from *Bacillus* sp. F1, *J. Appl. Microbiol.*, **111**, 1075-1085, doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05124.x.
19. Andreadeli, A., Flemetakis, E., Axarli, I., Dimou, M., Udvardi, M. K., Katinakis, P., and Labrou, N. E. (2009) Cloning and characterization of *Lotus japonicus* formate dehydrogenase: a possible correlation with hypoxia, *Biochim. Biophys. Acta*, **1794**, 976-984, doi: 10.1016/j.bbapap.2009.02.009.
20. Pometun, A. A., Voinova, N. S., Pometun, E. V., Savin, S. S., and Tishkov, V. I. (2018) Effect of medium pH and ion strength on the thermal stability of plant formate dehydrogenases, *Moscow Univ. Chem. Bull.*, **73**, 199-203, doi: 10.3103/S0027131418040077.
21. Cornish-Bowden, A. (2012) in *Fundamentals of Enzyme Kinetic* 4th Ed., Wiley-Blackwell, Singapore, p. 18-20.
22. Tishkov, V. I., Goncharenko, K. V., Alekseeva, A. A., Kleymenov, S. Yu., and Savin, S. S. (2015) Role of a structurally equivalent phenylalanine residue in catalysis and thermal stability of formate dehydrogenases from different sources, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 1690-1700, doi: 10.1134/S0006297915130052.

**NAD⁺-DEPENDENT FORMATE DEHYDROGENASE
FROM THE THERMOTOLERANT YEAST *Ogataea parapolymorpha*:
PROPERTIES AND PROTEIN ENGINEERING
OF THE N-TERMINAL SEQUENCE**

A. A. Pometun^{1,2*}, L. A. Shaposhnikov^{1,2}, S. A. Zubanova², R. P. Kovalevskii²,
D. L. Atroshenko^{1,2}, E. V. Pometun³, S. S. Savin², and V. I. Tishkov^{1,2*}

¹ *Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia;
e-mail: aapometun@gmail.com, vitishkov@gmail.com*

² *Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

³ *Sechenov First Moscow State Medical University, 119991 Moscow, Russia*

Previously, the gene of formate dehydrogenase (FDH, EC 1.2.1.2) from the thermotolerant methylotrophic yeast *Ogataea parapolymorpha* DL 1 (OpaFDH) was cloned in our laboratory. The recombinant enzyme with an additional glycine amino acid residue (OpaFDH_GK) was obtained in *Escherichia coli* cells in an active and soluble form with a yield of more than 1 g per liter of medium. In the present work, a detailed comparison of this enzyme with FDH from other sources was carried out. Among eukaryotic formate dehydrogenases, OpaFDH has the highest thermal stability. To elucidate the effect of the N-terminal residue on the properties of the enzyme, OpaFDH_K (identical to natural) and OpaFDH_AK variants containing an additional Ala residue at the N-terminus were also obtained. It was shown that the addition of an Ala residue to the N-terminus reduces the rate constant of thermal inactivation four times compared with the addition of a Gly residue. The addition of six more histidine residues to the N-terminus of OpaFDH_AK leads to an acceleration of purification, practically does not affect the kinetic parameters, but somewhat reduces the temperature stability, which, however, can be restored to the level of OpaFDH_AK by adding 0.5 M NaCl.

Keywords: formate dehydrogenase, *Ogataea parapolymorpha* DL 1, thermotolerant yeast, expression in *E. coli*, catalytic properties, purification, temperature stability, site-directed mutagenesis

СВЕРХБЫСТРАЯ ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ В БИОХИМИИ РАСТЕНИЙ: ПРОТЕОМНЫЙ ОТВЕТ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ НА ПРЕДПОСЕВНУЮ ОБРАБОТКУ ПРЕПАРАТАМИ ЖЕЛЕЗА

© 2023 Т.Т. Кусаинова^{1,2}, Д.Д. Емекеева^{1,2}, Е.М. Казакова^{1,2}, В.А. Горшков³,
Ф. Кьелдсен³, М.Л. Кусков¹, А.Н. Жигач¹, И.П. Ольховская¹,
О.А. Богословская¹, Н.Н. Глущенко¹, И.А. Тарасова^{1*}

¹ Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН,
Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе,
119334 Москва, Россия; электронный адрес: iatarasova@yandex.ru

² Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
141700 Долгопрудный, Московская обл., Россия

³ Университет Южной Дании, кафедра биохимии и молекулярной биологии, 5230 Оденсе, Дания

Поступила в редакцию 05.05.2023

После доработки 06.08.2023

Принята к публикации 09.08.2023

В последние годы для биохимических исследований активно разрабатываются методы ультрабыстрого хроматомасс-спектрометрического профилирования протеомов. Данные методы предназначены для экспресс-мониторинга ответа клеток на биотический стимул, соотношения молекулярных изменений с биологическими процессами и изменениями фенотипа. Для повышения рентабельности сельского хозяйства внедряют новые биотехнологии, в том числе с применением наноматериалов. При этом необходимы комплексные испытания новых препаратов и исследование механизмов биотического действия на показатели всхожести, роста и развития растений. Целью данной работы являлась адаптация разработанного нами метода ультрабыстрой хроматомасс-спектрометрии DirectMS1 для быстрого количественного профилирования молекулярных изменений в 7-дневных проростках пшеницы, возникающих в ответ на обработку семян препаратами железа. Экспериментальный метод позволяет анализировать до 200 образцов в сутки, его практическая ценность заключается в возможности осуществлять протеомную экспресс-диагностику биотического действия новых препаратов, в том числе и для нужд сельского хозяйства. При обработке семян препаратами, содержащими полимерный пленкообразователь (ПЭГ-400, Na-КМЦ, Na2-ЭДТА), наночастицы железа (II, III) или сульфат железа (II), показаны изменения в процессах фотосинтеза, биосинтеза хлорофилла, порфиринов- и тетрапиррол-содержащих соединений, расщепления глюкозы в тканях побегов и метаболизма полисахаридов в тканях корней. Наблюдения на уровне протеома согласуются с результатами морфометрии и подтверждены измерениями активности супероксиддисмутазы и микроэлементным анализом проросших семян и тканей побегов и корней 7-дневных проростков. Предложена характеристическая молекулярная сигнатура для определения регуляции процессов фотосинтеза и расщепления глюкозы на уровне белков. Такая сигнатура рассматривается в качестве потенциального маркера биотического эффекта обработки семян препаратами железа и будет подтверждаться дальнейшими исследованиями.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: протеомика растений, наночастицы, биоинформатика, масс-спектрометрия.

DOI: 10.31857/S032097252309018X, **EDN:** WUBPDY

ВВЕДЕНИЕ

Последние разработки хроматомасс-спектрометрических методов для протеомных

исследований направлены на решение двух основных проблем: сокращение времени анализа образцов и увеличение покрытия протеома [1–5]. Часовое хроматографическое

Принятые сокращения: ГО – генные онтологии; НЧ – наночастицы; ПП – полимерный пленкообразователь; СОД – супероксиддисмутаза; FC – кратное изменение концентрации белка (англ. Fold Change); FDR – статистическая значимость с корректировкой на множественные сравнения методом Бенджамини–Хохберга (англ. false discovery rate); *p*-value – статистическая значимость с корректировкой на множественные значения методом Бонферрони.

* Адресат для корреспонденции.

разделение и сбор масс-спектрометрических данных, подразумевающий последовательную изоляцию и фрагментацию пептидов, накладывают существенные ограничения на производительность анализа (~10 образцов в сутки) и его чувствительность ($\frac{1}{2}$ или $\frac{1}{4}$ часть белок-кодирующего генома, для которого половина белков идентифицирована по одному аминокислотному фрагменту из 10–15 аминокислот). Одним из возможных подходов к решению обозначенных проблем является использование коротких хроматографических градиентов и измерение масс ионов пептидов без их фрагментации [2]. На основе этих принципов нами был разработан метод DirectMS1, в котором реализуется 5-минутное хроматографическое разделение и регистрация масс-спектров пептидов с высоким разрешением (120 000 при отношении массы к заряду (m/z), равном 200 томсон (Th)), а белки идентифицируются непосредственно в пространстве поиска (m/z ; хроматографическое время удерживания) с использованием алгоритмов машинного обучения [6]. На данный момент метод продемонстрировал возможность идентифицировать более 2000 белков протеома клеток человека в 5-минутных анализах [6] и высокую точность сравнительного количественного анализа, в том числе на примере клеточных моделей злокачественных заболеваний [7]. Важным преимуществом метода DirectMS1 является высокая производительность (~200 образцов в сутки) и высокое покрытие аминокислотных последовательностей идентифицированных белков (~10 фрагментов длиной 10–15 аминокислот на белок), что способствует более точным количественным оценкам по сравнению со стандартными подходами [7]. Метод представляется перспективным для протеомной экспресс-диагностики биоматериалов и может являться молекулярным базисом для контроля биохимических процессов при проведении биологических экспериментов. В данной работе DirectMS1 был впервые применен для протеомного анализа тканей растительного происхождения на примере лабораторного исследования эффектов от применения наночастиц железа (НЧ Fe) в составе биопрепарата для предпосевной обработки семян мягкой озимой пшеницы.

Озимая пшеница широко культивируется как ценный и основной продукт питания [8]. Основными дестабилизирующими факторами в производстве озимой пшеницы являются неблагоприятные погодные условия, потери урожая от вредителей и болезней, отсутствие полноценного питания, обеспечивающего нор-

мальный рост и развитие растений. Для решения этих проблем в сельском хозяйстве активно разрабатываются новые биотехнологии, в том числе на основе наноматериалов [9]. Основные области применения нанотехнологий в растениеводстве включают использование наноматериалов на основе пестицидов для защиты растений, создание наносенсоров для контроля роста растений и разработку удобрений с учетом потребностей растений [10]. Эффект от применения наноматериалов зависит от многих факторов, включая вид элемента, его концентрации, физико-химических параметров наночастиц (НЧ), биологических особенностей растений, фазы роста, почвенных и геофизических характеристик произрастания культур [9]. Многочисленные обзоры по лабораторным и полевым испытаниям наноматериалов в растениеводстве демонстрируют как положительное, так и отрицательное влияние НЧ на рост и развитие различных культур, вплоть до проявления фитотоксичности [9, 11–13]. Однако при тщательном исследовании концентрационных зависимостей, учете особенностей растения, фазы роста, элементного состава почв использование нанотехнологий способно обеспечить прогресс в защите растений [9].

Предпосевная обработка семян озимой пшеницы фунгицидами и стимуляторами роста является важным этапом ее производства [14]. Показано, что введение в препарат для обработки семян НЧ различных микроэлементов (TiO_2 , FeS_2 , CuO , коллоидного Ag , ZnO и др.) также способствует увеличению всхожести и активному росту растений [9, 15–16]. Наблюдаемые эффекты, как правило, коррелируют с особенностями строения НЧ и их физико-химическими характеристиками (размер, фазовый и элементный состав). Применение наноматериалов рассматривается как способ адресной и контролируемой доставки микроэлементов, необходимых для роста растений, соответственно, наиболее заметные эффекты можно ожидать в условиях, когда имеется недостаток макро- и микронутриентов. В связи с этим, разрабатывая состав нанобиопрепарата, необходимо учитывать не только свойства НЧ, но и микроэлементный состав почвы, особенности сорта и потребность в отдельных микроэлементах. Так, например, дефицит в почве железа приводит к развитию хлороза, который проявляется в пожелтении и опадании листьев, ухудшении состояния корневой системы, ослаблении роста растений и, как следствие, снижении урожая. Возникновение дефицита обусловлено тем, что биодоступной формой железа для растений является (Fe^{2+}),

в то время как сельскохозяйственные почвы содержат железо в форме (Fe^{3+}), которое требует либо химического восстановления, либо восстановления микробиотой почвы, либо ферментативными системами самого растения. Для предотвращения хлороза сельскохозяйственных растений применяют органические и минеральные удобрения, которые включают жизненно важные элементы, в том числе железо в ионной или хелатной формах. Было показано, что при корневой подкормке *Capsicum annuum* питательной средой с НЧ Fe в концентрации 0,05 мМ, содержащих α -Fe и магнетит $\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$, наблюдалось улучшение морфометрических и физиологических показателей по сравнению с применением Fe^{2+} в концентрации 0,1 мМ [17]. В связи с этим имеются экспериментальные основания предполагать, что при дефиците железа такой состав НЧ Fe может являться эффективным источником биодоступных форм железа, однако механизм высвобождения микроэлемента остается предметом дискуссии. Показано, что аккумуляция НЧ в тканях растений возможна и зависит от концентрации [17, 18]. Так, при корневой подкормке *C. annuum* питательной средой с НЧ Fe в концентрации 0,05 мМ единичные НЧ наблюдались в наружных слоях клеток эпидермиса, а высокие концентрации НЧ Fe (2 мМ) приводили к визуализации НЧ в клетках эпидермиса и в эндодерме [17].

Разработка новых комплексных препаратов требует наличия точных методик молекулярной экспресс-диагностики, способных в короткие сроки оценить по совокупности маркеров перспективность состава. Так, например, литературные данные об исследовании морфологических характеристик и протеомного ответа зерновых культур на обработку НЧ металлов в настоящий момент немногочисленны [19, 20]. Имеются работы, в которых исследовали протеомный ответ на обработку НЧ различных металлов в тканях пшеницы (корнях и листьях). Нанопрепарат в лабораторных или тепличных условиях либо вносится в почву после прорастания, либо наносится на зерна перед культивированием, либо на 5-дневные или 6-дневные проростки. Протеомный анализ разных сортов пшеницы, дополненный измерением морфометрических, физиологических показателей и ферментативной активности, показал, что при обработке препаратами НЧ различных металлов, как правило, наблюдается увеличение среднего количества зерен в колосе и массы 1000 зерен, увеличение содержания сахара, активности супероксиддисмутазы (СОД), пероксидазы и

каталазы, в то время как молекулярный ответ и регуляция белков, а также результаты микроэлементного анализа зависят от сорта пшеницы, вида элемента и способа применения. Показано, что в первую очередь на молекулярном уровне использование наночастиц железа при обработке пшеницы влияло на регуляцию белков, вовлеченных в фотосинтез, метаболизм белков [14], гликолиз, разложение крахмала и цикл трикарбоновых кислот [21].

Метод ультрабыстрой хроматомасс-спектрометрической идентификации и количественного анализа протеомов (экспресс-протеомика) [1, 6, 7] дает возможность в короткие сроки оценить по совокупности маркеров результат применения нового препарата для предпосевной обработки семян. В данной работе была продемонстрирована применимость метода для полуквантитативного профилирования протеомов растений. Также показано, что полученной информации достаточно для того, чтобы составить воспроизводимый молекулярный портрет, характеризующий изменения протеомного отклика в растительных клетках специфично внешнему стимулу, и проанализировать корреляцию этих изменений с внешним воздействием.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Синтез наночастиц железа. НЧ Fe получали левитационно-струйным методом [22]. Железная проволока чистотой 99,8% и диаметром 0,5 мм («Advent Research Materials Ltd», Англия) подавалась в кварцевую трубку со скоростью 5,88 г/ч к противоточному высокочастотному (440 кГц) индуктору, где она плавилась и испарялась в потоке инертного газа (аргон высокой чистоты при давлении 0,2 атм и расходе газа 3000 см³/мин). Затем пар охлаждался, конденсировался в наночастицы и при температуре ниже 150 °С обрабатывался кислородом высокой чистоты (расход газа – 118 см³/мин). Затем частицы охлаждали, упаковывали в контейнер и хранили при комнатных условиях до использования. Физико-химические свойства НЧ Fe характеризовали методами рентгенофазового анализа (РФА) и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), согласно которым частицы имели сферическую форму со средним диаметром 55 нм, структура представляла собой ядро из металлического железа α -Fe (70,1% вес.) с оболочкой из магнетита $\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ (29,9% вес), следовательно, массовые доли Fe^{2+} и Fe^{3+} в магнетите составляли приблизительно 24% и 48% соответственно.

Обработка семян. Семена пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт Тяня, Национальный зерновой центр им. П.П. Лукьяненко, Краснодар, Россия) обрабатывали раствором химически чистого сульфата железа (II) («Химмед», Россия) или суспензиями НЧ Fe. Пленкообразующий раствор А (0,56% натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ); 1,4% полиэтиленгликоля 400 (ПЭГ-400); 0,0037% динатриевой соли ЭДТА (Na₂-ЭДТА) и раствор Б (водная суспензия НЧ Fe или раствор FeSO₄) смешивали в соотношении 9/1 (v/v). Семена замачивали в смеси растворов А и Б (5 мл раствора на 10 г семян) на 10 мин, откидывали на сито, давая стечь избытку раствора в течение 10 мин, затем отправляли на проращивание. Контрольную группу семян обрабатывали раствором А и водой, смешанными в соотношении 9/1 (v/v) без добавления железа. Вторым контролем были необработанные семена. Всего для проращивания было подготовлено 5 групп (G1–G5) по 150 семян в каждой группе: G1 – необработанные семена; G2 – семена, обработанные раствором А с водой; G3 – семена, обработанные суспензией НЧ Fe 10⁻⁵% в растворе А; G4 – семена, обработанные суспензией НЧ Fe 10⁻⁷% в растворе А; G5 – семена, обработанные FeSO₄ 10⁻⁷% в растворе А.

Проращивание семян. Семена проращивали рулонным способом (ГОСТ 12038-84, РФ) в течение 7 дней. Пятьдесят семян располагали в линию на полоске стерилизованной фильтровальной бумаги размером 10 × 100 см на расстоянии 2–3 см от верхнего длинного края, накрывали влажной бумагой такого же размера, свободно скручивали и помещали вертикально в стерильные стаканы емкостью 0,5 литра. В стаканы наливали 70 мл дистиллированной воды и помещали в термостат ТС-1/80 ЦП («Смоленское СКТБ СПУ», Россия) при температуре 20 ° ± 1 °С на 7 суток.

Микроэлементный анализ. Концентрации химических элементов были проанализированы в проросших семенах на третьи сутки (по 100 штук в каждой группе); в корнях (от 500 проростков в каждой группе) – на 7-е сутки прорастания; в зеленых ростках (от 500 проростков в каждой группе) – на 7-е сутки прорастания. Всего для микроэлементного анализа было подготовлено 4 группы (G1, G2, G4 и G6) по 50 семян в каждой группе: G1 – необработанные семена; G2 – семена, обработанные раствором А с водой; G4 – семена, обработанные суспензией НЧ Fe 10⁻⁷% в растворе А; G6 – семена, обработанные пленкообразователем с НЧ Fe 10⁻⁶%. Измерения были выполнены ООО «Микронутриенты» (Россия) методом

масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой на квадрупольном масс-спектрометре Nexion 300D («Perkin Elmer», США), образцы проанализированы в двух повторах.

Измерение активности супероксиддисмутазы. Активность СОД была измерена при использовании гидроксиламинового метода (Hydroxylamine Method) с помощью коммерческого набора Total Superoxide Dismutase (T-SOD) Activity Assay Kit («Elabscience Biotechnology», США) в свежих тканях корней и побегов 7-дневных проростков пшеницы в не менее двух и не более четырех повторах. Всего для анализа активности СОД было подготовлено 5 групп (G1–G4 и G6) по 50 семян в каждой группе: G1 – необработанные семена; G2 – семена, обработанные раствором А с водой; G3 – семена, обработанные суспензией НЧ Fe 10⁻⁵% в растворе А; G4 – семена, обработанные суспензией НЧ Fe 10⁻⁷% в растворе А; G6 – семена, обработанные пленкообразователем с НЧ Fe 10⁻⁶%. Побеги и корни проростков замораживали в жидком азоте и измельчали в криомельнице CryoMill M-400, («Retsch», Германия) (3 криоцикла: 30 с – 30 Гц/30 с – 5 Гц). К навеске 200 мг размолотой ткани добавляли 1 мл натрий-фосфатного буфера (рН 7,4) и инкубировали при 30 °С в течение 30 мин. Затем смесь центрифугировали и отбирали супернатант, содержащий белки в нативной форме. Концентрации белков измеряли с помощью коммерческого набора Pierce BCA Protein Assay Kit («Thermo Scientific», Германия) и спектрофотометрии на SPECTROStar Omega microplate reader («BMG LABTECH», Германия).

Морфометрия. Семидневные проростки извлекали из рулонов и вручную измеряли длину побега, длину максимального корня и суммарную длину всех корней у 50 растений, выбранных случайным образом из каждой группы G1–G5. Статистический анализ выполнялся с помощью библиотеки функций SciPy языка программирования Python [23]. Для определения статистически значимых различий в средних значениях морфометрических параметров использовался критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони, порог отбора: *p*-value < 0,05. Нормальность распределения данных определяли с помощью критерия Шапиро–Уилка.

Экстракция и ферментативный гидролиз белков для протеомного анализа. На 7-е сутки проростки были заморожены в жидком азоте и подвержены диссекции на корни и побеги. Для масс-спектрометрического анализа было подготовлено по 6 проб для каждой группы G1–G5 (2 технических повтора подготовки

проб \times 3 биологических повтора). Биологическим повтором называем число бумажных рулонов с семенами для проращивания. В нашем случае в каждой группе было 3 рулона по 50 растений. Бумажный рулон с семенами рассматривается как сильно упрощенная лабораторная модель поля. Для экстракции белков отдельно корни и отдельно побеги каждого биоповтора измельчили в криомельнице. Из полученных гомогенатов приготовили навески по 200 мг. Аликвоты измельченной ткани лизировали в растворе 50 мМ аммония бикарбоната (pH 7,8), содержащем 8 М мочевины и 2% натрия додецилсульфата, с использованием ультразвуковой гомогенизации (40% амплитуда; 20 с ВКЛ. \times 10 с ВЫКЛ.; 2 мин рабочего времени) («QSonica Q125», США). Осаждение белков выполняли с использованием хлороформ-метанольной экстракции [21]. Концентрации белков измеряли колориметрическим методом, основанным на Биуретовой реакции, используя набор Pierce («Thermo Scientific», Германия). Белковый осадок растворяли в 50 мМ растворе аммония бикарбоната (pH 7,8); дисульфидные связи восстанавливали с помощью 10 мМ дитиотреитола и алкилировали с помощью 10 мМ йодацетамида, затем обрабатывали в течение 18 ч трипсином («Promega», США; для ВЭЖХ-МС), добавленным в соотношении 1/50 (w/v).

ВЭЖХ-МС1-анализ. Данные ВЭЖХ-МС1 были получены с использованием масс-спектрометра Orbitrap Fusion Lumos, оснащенного интерфейсом FAIMS Pro («Thermo Scientific», США), в сочетании с нанопоточной системой ВЭЖХ UltiMate 3000 («Thermo Fisher Scientific», Германия). Короткие хроматографические градиенты были реализованы, как описано ранее [6]. Для хроматографического разделения использовали предколонку μ -Precolumn C18 RepMap100 (неподвижная фаза диаметром 5 мкм и размером поры 100 Å, внутренний диаметр – 300 мкм, длина – 5 мм («Thermo Fisher Scientific»)) и самодельную аналитическую колонку (неподвижная фаза Reprosil-Pur диаметром 3 мкм, внутренний диаметр – 75 мкм, длина – 5 см). Подвижные фазы имели следующий состав: (А) – 0,1% муравьиной кислоты (МК) в воде; (В) – 80% ацетонитрила и 0,1% МК в воде. Для элюции пептидов использовали градиент В (5–35%) за 4,8 мин при скорости потока 1,5 мкл/мин. Общее время эксперимента, включая промывку колонки и уравнивание, составляло 7,5 мин. Сбор данных выполнялся в режиме сбора только MS1-спектров в диапазоне 375–1500 m/z при разрешении 120 000 (m/z = 200 Th), максималь-

ном значении накопленного заряда (Automatic Gain Control, AGC) $4 \cdot 10^5$ и максимальном времени накопления заряда 50 мс. Гидролизаты, растворенные в фазе А, вводили в хроматограф в количестве 1 мкг.

Обработка протеомных данных. Для обработки данных ВЭЖХ-МС1 использовали программу ms1searchpy [1] для идентификации и постпоисковой валидации белков. Поиск был выполнен с использованием канонической базы белков UniProt TrEMBL (организм *T. aestivum*, идентификатор 4565), соединенной с базой заведомо ложных белков, созданной путем случайной перестановки аминокислот в последовательностях белков из базы UniProt TrEMBL. Точность измерения массы иона в MS1 составляла ± 8 ppm, пропущенные сайты гидролиза не допускались, все цистеины предполагались карбоксиамидометилированными. Список идентифицированных белков был отфильтрован до 5% ложноположительных identifications методом «target-decoy» [24]. Программы Diffacto [25] и DirectMS1Quant [7] использовали для статистического анализа белков на основе интенсивностей ионов пептидов в масс-спектрах. Для результатов, полученных с помощью программы Diffacto, дифференциально регулированные белки отбирали согласно следующим критериям: $FDR < 10^{-10}$ и $|\log_2 FC| \geq 3,0$ (сравнение побеги/корни); $FDR < 5 \cdot 10^{-3}$ и $|\log_2 FC| \geq 1,32$ (сравнение побеги/побеги и корни/корни), где FDR – значение *p*-value с корректировкой на множественные сравнения методом Бенджамини–Хохберга [26], FC – кратное изменение концентрации белка. Для результатов, полученных с помощью DirectMS1Quant, дифференциально-регулируемыми считались белки, удовлетворяющие $|\log_2 FC| \geq 3,0$ и $FDR \leq 0,05$ (сравнение побеги/корни); $|\log_2 FC| \geq 0,6$ и $FDR \leq 0,05$ (сравнение побеги/побеги и корни/корни). Визуализацию результатов количественного анализа выполняли с помощью программы QRePS [27], расчет метрики активности биологических процессов, GO Score, на основе протеомных данных выполняли, как описано ранее [27]. Аннотация функций белков была выполнена с использованием DeepGOPlus [28]. Для анализа генных онтологий (ГО) с пользовательской базой аннотаций использовали программу GOATOOLS [29].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проростки из семян, обработанных НЧ Fe $10^{-5}\%$ в полимерном пленкообразователе, характеризовались уменьшением средней длины

стеблей и корней. На рис. 1, *а*, *в* и *д* показаны результаты измерения длины стебля, длины максимального корня и суммарной длины корней в контрольных группах (G1 – необработанное зерно, G2 – зерно, обработанное раствором А) и опытных группах растений (G3 – НЧ Fe в концентрации $10^{-5}\%$ в растворе А; G4 – НЧ Fe в концентрации $10^{-7}\%$ в растворе А; G5 – FeSO_4 в концентрации $10^{-7}\%$ в растворе А). Для начальной оценки статистически значимых различий между группами был применен многомерный ранговый тест Краскела–Уоллиса без поправки на множественные сравнения. Тест показал, что медианы выборок отличаются (статистическая значимость: побеги – $p_{KW} = 3,22 \cdot 10^{-5}$; максимальный корень – $p_{KW} = 2,95 \cdot 10^{-19}$; сумма корней – $p_{KW} = 1,39 \cdot 10^{-20}$). Далее было выполнено попарное сравнение выборок с помощью рангового теста Манна–Уитни с поправкой на множественные сравнения методом Бонферрони (рис. 1, *б*, *г* и *е*). Результаты попарного сравнения показали, что обработка зерна полимерным пленкообразователем (ПП) в составе ПЭГ-400, Na-КМЦ и Na2-ЭДТА привела к статистически значимому увеличению средней длины стебля, максимального корня и суммарной длины корней по сравнению с необработанным зерном (G1). Добавление FeSO_4 в ПП для обработки зерна не сказалось на изменении длин стеблей и корней 7-дневных проростков (G5 по сравнению с контролем G2). При этом обработка зерна суспензией НЧ Fe в составе ПП показала статистически значимое уменьшение средней длины стебля, максимального корня и суммарной длины корней (G3 и G4 по сравнению с контролем G2).

Молекулярная диагностика задержки роста проростков, по данным ультрабыстрой хроматомасс-спектрометрии DirectMS1. Определение маркерных процессов биотического действия препаратов железа. Маркерными будем называть обогащения воспроизводимо регистрируемых биологических процессов, для которых, по возможности, наблюдается зависимость от концентрации железа в препарате и обогащение которого не зависит от метода анализа данных. В данной работе количественный анализ был выполнен двумя вычислительными алгоритмами: DirectMS1Quant [7] и Diffacto [25], чтобы убедиться в воспроизводимости результатов. DirectMS1Quant разработан специально для работы с данными ультрабыстрой хроматомасс-спектрометрии DirectMS1 и рекомендовал себя как точный метод оценки кратных изменений концентраций белков. Алгоритм Diffacto отличается высокой чувствительностью к изменениям в протеомах, но за

счет более высокой доли ложноположительных результатов [30].

DirectMS1Quant: сравнение протеомов побегов относительно корней. На рис. 2 показаны результаты сравнения протеомов побегов относительно корней 7-дневных проростков пшеницы из одной и той же опытной группы. Данное сравнение выявило существенные отличия в регуляции белков, что является закономерным при сравнении тканей разных органов. Протеомные отличия между двумя типами тканей описывались дифференциальной регуляцией примерно 700 белков. Среди белков с повышенной регуляцией были найдены шаперонины, рибосомальные белки и АТР-синтазы хлоропластов, субъединицы митохондриальных АТР-синтаз, АТР-зависимые цинк-металлопротеазы, хлорофилл-связывающие белки, факторы элонгации митохондрий и хлоропластов, ферредоксины и многие другие. Белки с пониженной регуляцией были представлены альфа- и бета-амилазами, ингибиторами амилаз, различными белками защитного ответа на патогены, пероксидазами и др.

Анализ ГО для белков с повышенной регуляцией ($\log_2\text{FC} \geq 3$ и $\text{FDR} < 0,05$) не выявил зависимости обогащений биологических процессов от состава препарата для обработки семян, в том числе от концентрации железа (рис. 3, *а*). Рис. 3, *а* показывает, что в побегах обогащены процессы, связанные с фотосинтезом, регуляцией активности СОД, биосинтезом хлорофила, образованием соединений железа в комплексе с порфириновым (тетрапиррольным) кольцом из менее сложных предшественников, а также гликолиз и процессы из цикла трикарбоновых кислот. Обработка семян препаратом с FeSO_4 (G5) соответствует наибольшим значениям GO Score для процессов, связанных с фотосинтезом и регуляцией активности СОД, образованием хлорофила и соединений с порфириновым/тетрапиррольным кольцом, однако примерно на том же уровне это обогащение видно и в контрольных группах (G1 и G2). Для процессов, связанных с поглощением света фотосистемами I и II, наибольшими значениями GO Score характеризуется обработка НЧ Fe $10^{-5}\%$ (G3) и необработанный контроль (G1).

На рис. 3, *б* показаны биологические процессы, обогащенные на белках, чья регуляция в корнях выше, чем в побегах ($\log_2\text{FC} \leq -3,0$ и $\text{FDR} < 0,05$ на рис. 2). Среди них можно выделить группы процессов, связанные с ответом на токсичные вещества и метаболизм дисахаридов и полисахаридов (сахароза, крахмал и др.).

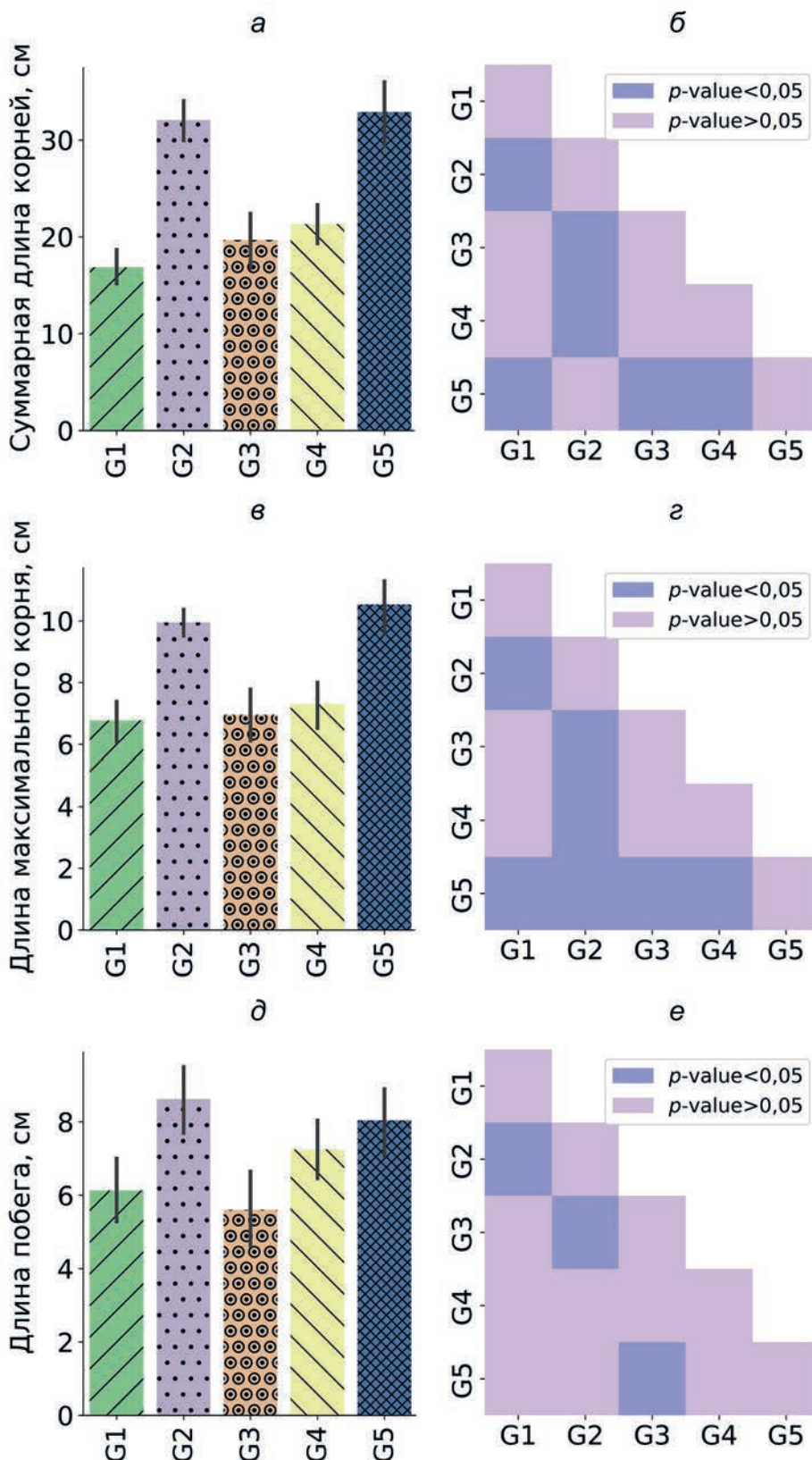


Рис. 1. Отличия морфометрических показателей (средние значения длины побега, длины максимального корня и суммарной длины корней) в 7-дневных проростках озимой пшеницы вследствие обработки препаратами железа. Средние значения и значения стандартных отклонений рассчитаны для значений из середины распределения, с 25-го по 75-й процентиль включительно (панели а, в и д). Статистический анализ выполняли с использованием критерия Манна–Уитни с поправкой Бонферрони, *p*-value (панели б, г и е). Обозначения: G1 – необработанное зерно; G2 – зерно, обработанное раствором А; G3 – НЧ Fe в концентрации 10⁻⁵% в растворе А; G4 – НЧ Fe в концентрации 10⁻⁷% в растворе А; G5 – FeSO₄ в концентрации 10⁻⁷% в растворе А

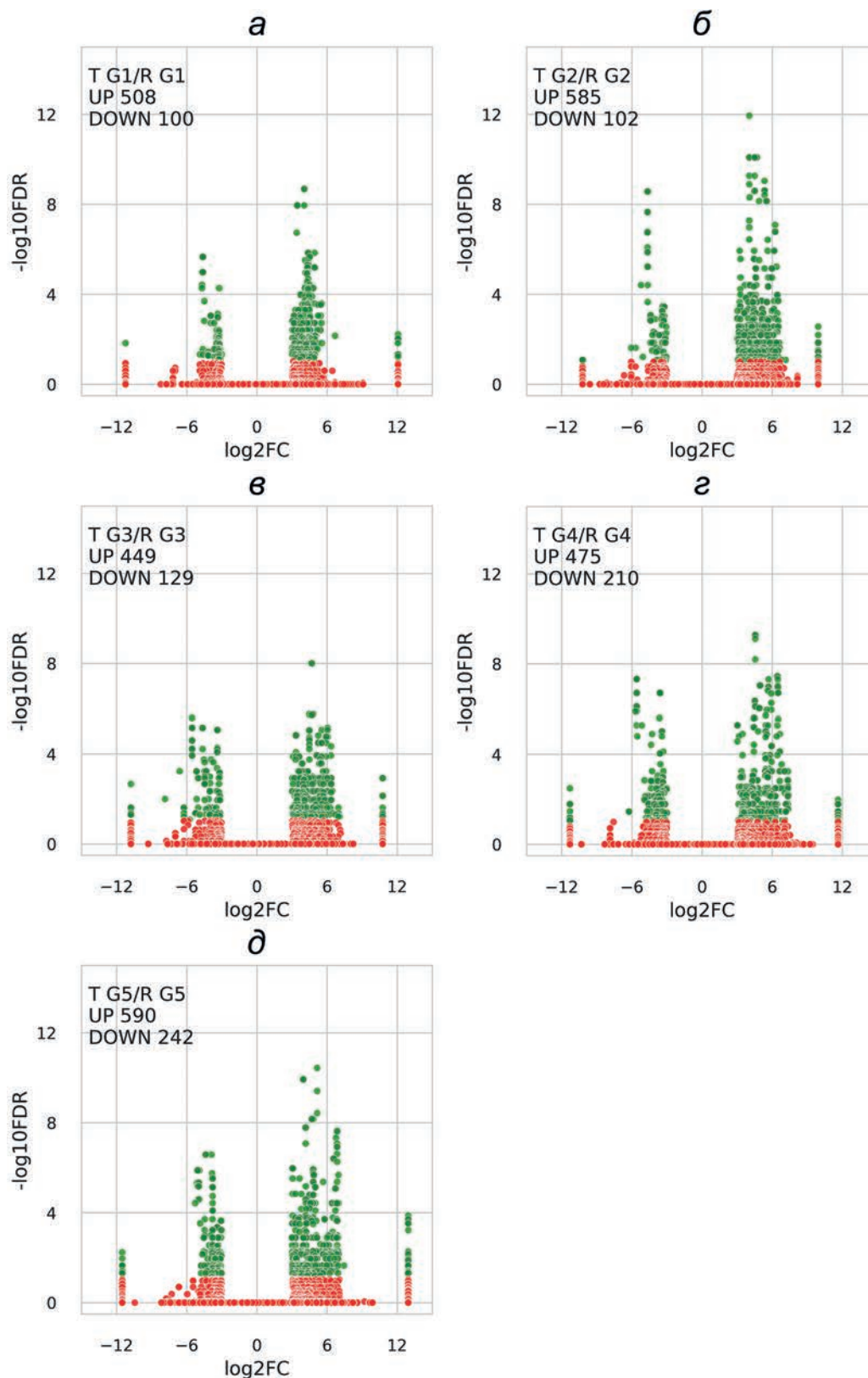


Рис. 2. Диаграммы рассеивания для попарных сравнений протеомов 7-дневных проростков озимой пшеницы при обработке семян препаратами на основе наночастиц и сульфата железа (обработка данных методом DirectMS1Quant [7]). Дифференциально регулированные белки удовлетворяют критериям $|\log_2FC| \geq 3,0$ и $FDR < 0,05$. Обозначения: G1 – необработанное зерно; G2 – зерно, обработанное раствором А; G3 – НЧ Fe в концентрации $10^{-5}\%$ в растворе А; G4 – НЧ Fe в концентрации $10^{-7}\%$ в растворе А; G5 – $FeSO_4$ в концентрации $10^{-7}\%$ в растворе А; FDR – статистическая значимость с корректировкой на множественные сравнения методом Бенджамини–Хохберга, рассчитанная DirectMS1Quant; FC = T/R, где FC – кратное изменение количественного содержания белка в побегах (T) относительно корней (R)

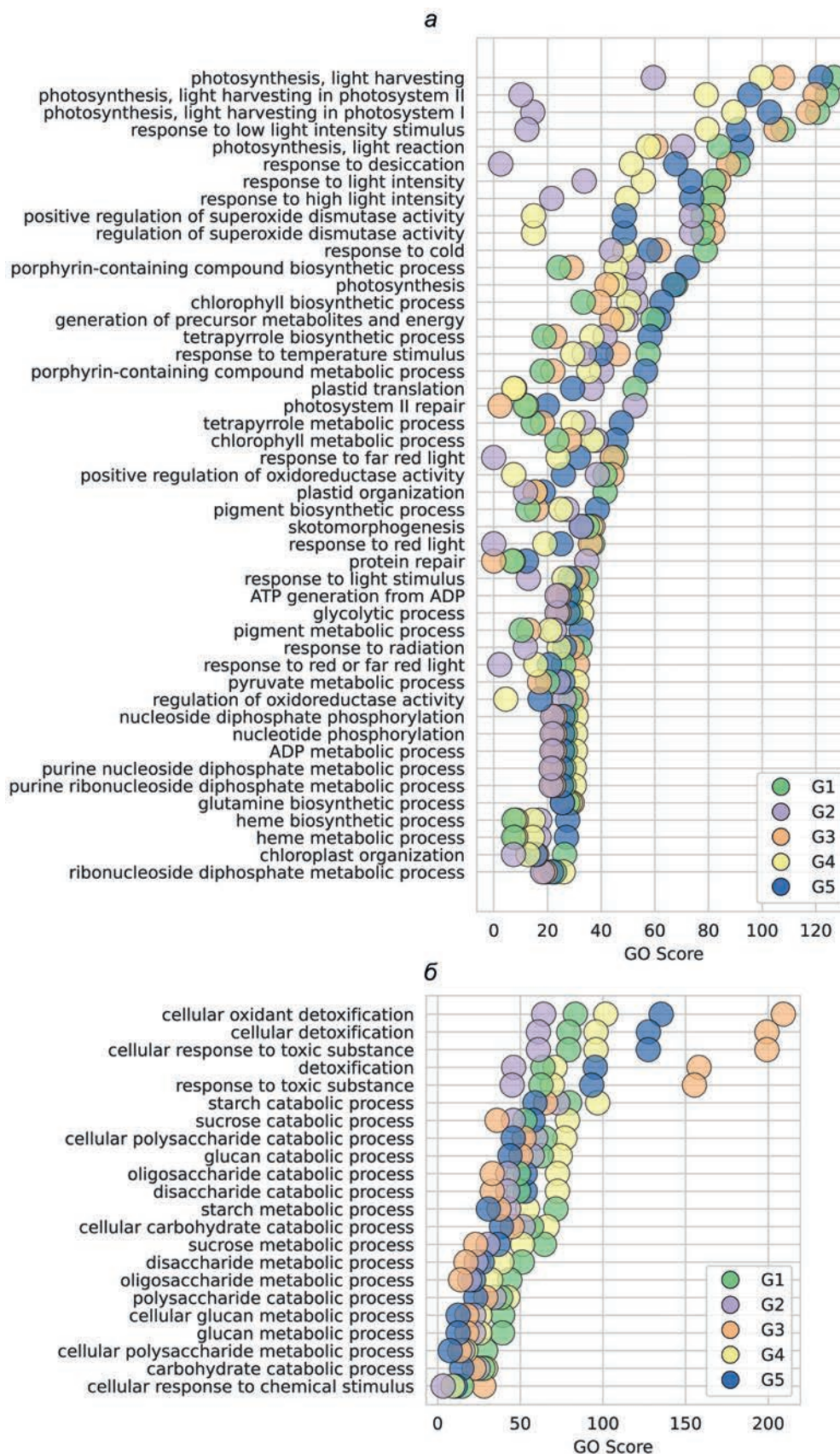


Рис. 3. Результаты анализа обогащений биологических процессов при различных типах обработки семян для генов, кодирующих дифференциально регулированные белки (метод DirectMS1Quant): *а* – процессы, обогащенные в побегах; *б* – процессы, обогащенные в корнях. $GO\ Score = \log_{10}(E) \times |\log_{10}(FDR)|$, где *E* – обогащение биологического процесса, *FDR* – статистическая значимость обогащения с коррекцией на множественные сравнения методом Бенджамини–Хохберга

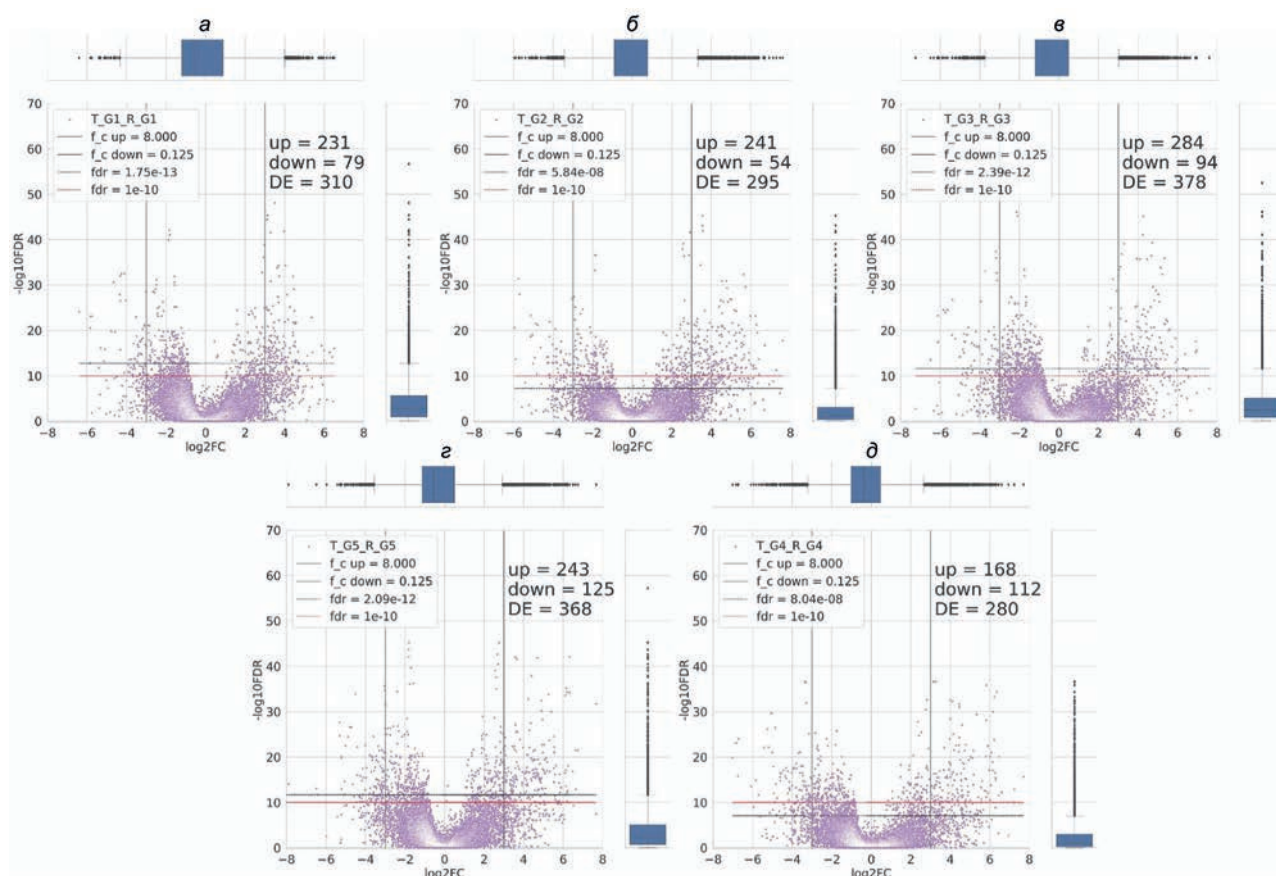


Рис. 4. Диаграммы рассеивания для попарных сравнений протеомов 7-дневных проростков озимой пшеницы при обработке семян препаратами на основе наночастиц и сульфата железа (обработка данных методом Diffacto). Дифференциально регулированные белки удовлетворяют критериям: $FDR < 10^{-10}$ и $|\log_2 FC| \geq 3,0$. Обозначения: G1 – необработанное зерно; G2 – зерно, обработанное раствором А; G3 – НЧ Fe в концентрации $10^{-5}\%$ в растворе А; G4 – НЧ Fe в концентрации $10^{-7}\%$ в растворе А; G5 – $FeSO_4$ в концентрации $10^{-7}\%$ в растворе А; FDR – статистическая значимость (рассчитано программой Diffacto [25]) с корректировкой на множественные сравнения методом Бенджамини–Хохберга [26]; FC = T/R, где FC – кратное изменение количественного содержания белка в побегах (Т) относительно корей (R)

Для обработки НЧ Fe $10^{-5}\%$ (G3) обогащение процесса, снижающего токсичность вещества (*detoxification* на рис. 3, б) оказалось на порядок выше, чем в контрольных группах (G1 и G2). Кроме того, для этого процесса наблюдалась концентрационная зависимость от процентного содержания железа в препарате от максимальной к минимальной (НЧ $10^{-5}\%$, соль $10^{-7}\%$, НЧ $10^{-7}\%$, 0%, 0%). По обогащению метаболизма полисахаридов в опытных и контрольных группах концентрационной зависимости не наблюдалось.

DirectMS1Quant: побеги и корни с обработкой НЧ и сульфатом железа относительно необработанного контроля. Попарное сравнение протеомов побегов, принадлежавших растениям из опытных групп G2, G3, G4 и G5, с контрольной группой G1 показало полное отсутствие статистически значимых отличий (рис. П1, а–г в Приложении). Малый отклик был зарегистрирован при сравнении протеомов корней из опытных групп G2, G3, G4 и G5

с контрольной группой G1: 3↑ и 32↓ (G2/G1), 9↓ (G3/G1), 7↓ (G4/G1), 55↑ и 8↓ (G5/G1), где ↑ и ↓ обозначают повышенную и пониженную регуляцию соответственно (рис. П1, д–з в Приложении). Среди дифференциально регулированных белков были представлены альфа- и бета-амилазы, субъединицы ингибиторов амилаз, регуляторы активности ферментов, пероксиредоксины, белки теплового шока и стресса. Анализ ГО выявил обогащение метаболизма дисахаридов и полисахаридов, в том числе крахмала, для белков с повышенной регуляцией в сравнении G5/G1 и G2/G1 (рис. П1, и в Приложении). Данный результат может свидетельствовать о том, что отклик на предпосевную обработку препаратами железа в 7-дневных проростках достаточно слабый, чтобы при таком выборе относительного контроля применяемый экспериментальный комплекс (DirectMS1 [1]) или метод количественного анализа интенсивностей ионов пептидов (DirectMS1Quant [7]) могли зарегистрировать

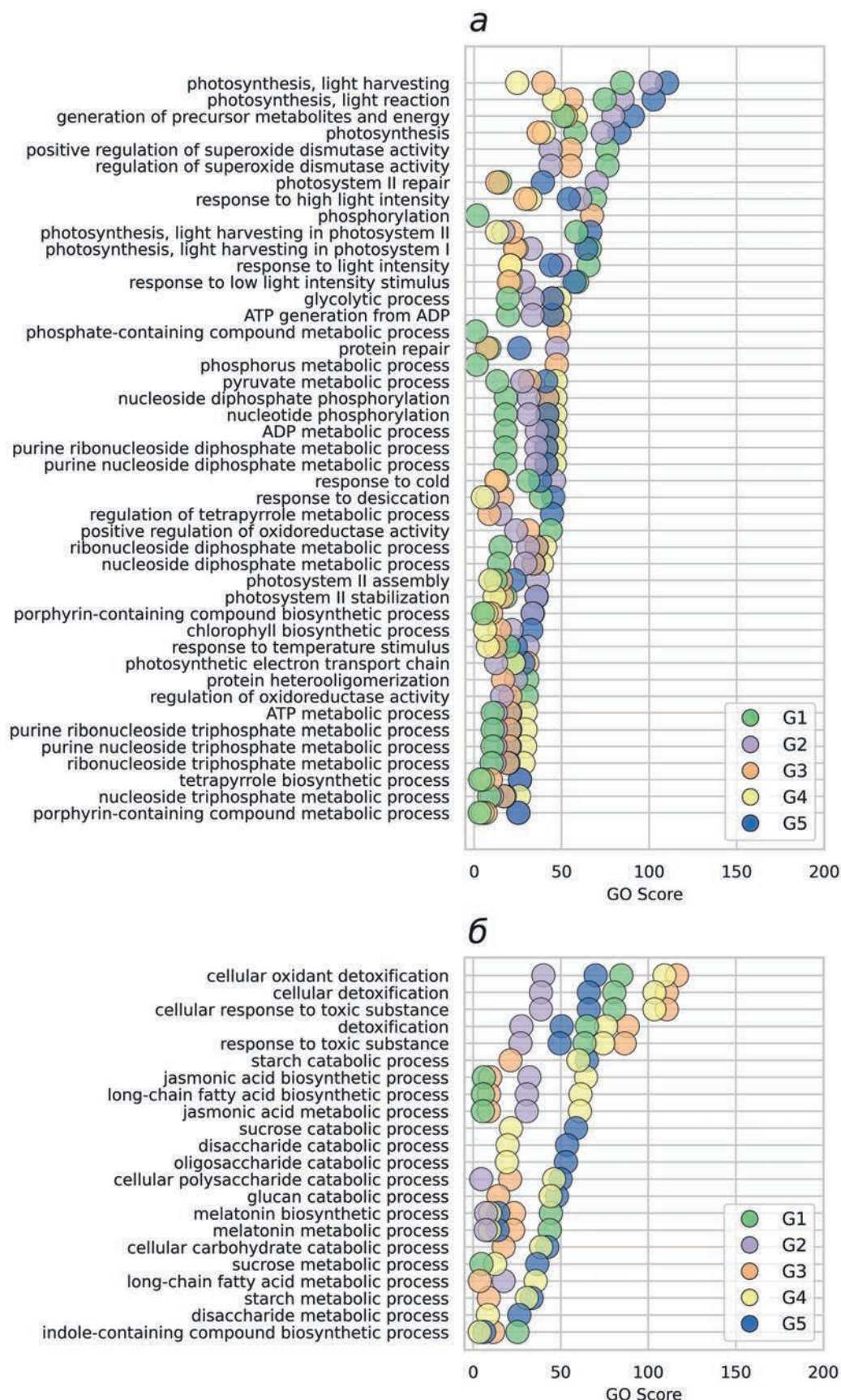


Рис. 5. Результаты анализа обогащений биологических процессов при различных типах обработки семян для генов, кодирующих дифференциально регулированные белки (метод Diffacto): *а* - побеги, *б* - корни. $GO\ Score = \log_{10}(E) \times |\log_{10}(FDR)|$, где E – обогащение биологического процесса, FDR – статистическая значимость обогащения с корректировкой на множественные сравнения методом Бенджамини–Хохберга

изменения в числе молекул белков. По этой причине количественный анализ интенсивностей также был выполнен более чувствительным методом: Diffacto [25].

Diffacto: сравнение протеомов побегов относительно корней. На рис. 4 и рис. 5 показаны результаты обработки данных ультрабыстрого хроматомасс-спектрометрического профилирования протеомов побегов относительно корней 7-дневных проростков пшеницы методом Diffacto. Диаграммы рассеивания, построенные для попарных сравнений протеомов побегов относительно корней 7-дневных проростков пшеницы из одной и той же опытной группы (рис. 4), также показали существенную разницу в протеомах, что соответствует сравнению разных типов тканей. Анализ ГО для белков с $\log_2FC \geq 3,0$ и $FDR < 10^{-10}$ показал обогащение таких же процессов, как и в случае с DirectMS1Quant: фотосинтез, регуляция активности СОД, синтез хлорофила и соединений с порфириновым/тетрапиррольным кольцом и др. (рис. 5, а). При этом топовые обогащения процессов, отсортированные по значениям GO Score, совпадали для разных типов обработки семян (*photosynthesis, regulation of superoxide dismutase activity, chlorophyll biosynthetic process* и др.). Вероятную зависимость от концентрации железа можно отметить только для гликолиза и родственных ему процессов (G5 – FeSO₄ 10⁻⁷%, G4 – НЧ 10⁻⁷%, G2 – 0%, G1 – 0%), однако для G3 – НЧ 10⁻⁵% обогащение не обнаружилось. При этом в группах с обработкой НЧ Fe (G3 и G4) по сравнению с контролями (G2 и G1) и FeSO₄ (G5) процессы фотосинтеза имеют меньшие значения GO Score, что трактуется, скорее, как «негативный» эффект.

На рис. 5, б показаны результаты анализа обогащений биологических процессов, в которые вовлечены белки, чья регуляция в корнях выше, чем в побегах ($\log_2FC \leq -3,0$ на рис. 4). Здесь также, как и на рис. 3, б, отметим воспроизводимость обогащения метаболизма полисахаридов и ответа на токсичные вещества, для которого наблюдается зависимость от состава препарата и концентрации железа (НЧ 10⁻⁵%, НЧ 10⁻⁷%, 0%, FeSO₄ 10⁻⁷%, 0%).

Diffacto: сравнение протеомов побегов относительно необработанного контроля. Сравнение протеомов побегов с помощью Diffacto выявило следующее число дифференциально регулированных белков: 21↑ (G2/G1), 35↑ и 23↓ (G4/G1), 213↑ и 48↓ (G5/G1), где ↑ и ↓ обозначают повышение и понижение относительной концентрации белков соответственно (рис. П2, а–г в Приложении). Анализ ГО показал отсутствие пересекающихся обога-

щений между опытными и контрольными группами растений, а значения GO Score у обогащений не превышали 20, что трактуется как слабое обогащение, похожее на случайный шум (рис. П3, а и б в Приложении). Единственным значимым обогащением может считаться защитный отклик в побегах группы G5 на присутствие грамположительных бактерий (рис. П3, а в Приложении). В целом, данный результат хорошо согласуется с результатами анализа методом DirectMS1Quant (рис. П2 в Приложении).

Diffacto: сравнение протеомов корней относительно необработанного контроля. Сравнение протеомов корней выявило следующее число дифференциально регулированных белков: 54↑ и 83↓ (G2/G1), 169↑ и 291↓ (G3/G1), 225↑ и 158↓ (G4/G1), 532↑ и 278↓ (G5/G1), где ↑ и ↓ обозначают повышенную и пониженную регуляцию соответственно (рис. П2, д–з в Приложении). Анализ ГО на белках с повышенной регуляцией показал для корней обогащение биологических процессов, связанных с метаболизмом полисахаридов и дисахаридов (G4/G1, G5/G1 и G3/G1), регуляцией активности эндопептидазы (G2/G1, G5/G1, G4/G1) и ответом на воспаление и цитокины (G2/G1, G4/G1) (рис. П3, в в Приложении). На белках с пониженной регуляцией был зарегистрирован защитный отклик на бактерии и фосфорилирование белков (G3/G1) (рис. П3, г в Приложении). Данный результат согласуется с результатами, представленными на рис. 3, б и рис. 5, б. При этом метаболизм полисахаридов в корнях может быть рассмотрен как маркер биотического действия предпосевной обработки зерна препаратами железа в рамках введенных ранее определений. Отметим также, что, по совокупности полученных данных, ответ на токсичные вещества, наиболее ярко выраженный в группе с обработкой НЧ Fe 10⁻⁵% (рис. 3, б и рис. 5, б), может быть связан с прорастанием колоний микроорганизмов в субстрате для проращивания семян, что требует дополнительных исследований.

Реакция на токсины в корнях подтверждается измерением активности СОД. Из протеомных данных следует, что эффекты от обработки семян могут быть связаны с изменениями ферментативных систем, участвующих в поддержании окислительно-восстановительного статуса клетки. Для независимого подтверждения этого наблюдения в побегах и корнях 7-дневных проростков пшеницы была измерена активность СОД, ферментного антиоксиданта, обеспечивающего защиту растения от повреждающего действия активных форм кисло-

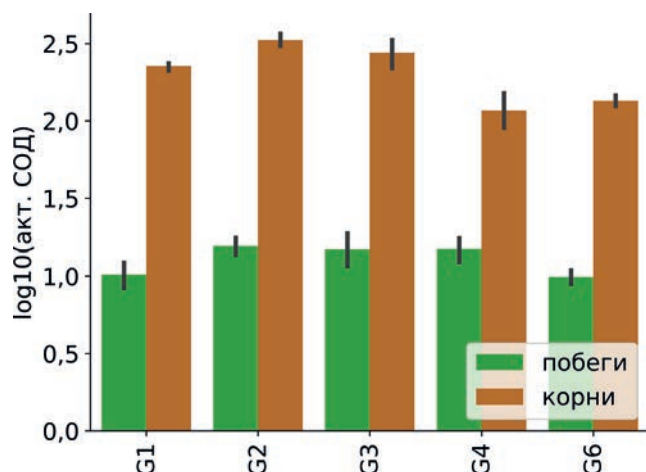


Рис. 6. Активность СОД в свежих побегах и корнях 7-дневных проростков пшеницы. Обозначения: G1 – необработанное зерно; G2 – зерно, обработанное раствором А; G3 – НЧ Fe в концентрации $10^{-3}\%$ в растворе А; G4 – НЧ Fe в концентрации $10^{-7}\%$ в растворе А; G6 – НЧ Fe в концентрации $10^{-6}\%$ в растворе А. Активность СОД (в отн. ед. на мг белка) вычисляли, согласно рекомендациям производителя (T-SOD activity assay, «Elabsience»)

рода (АФК), которые, в том числе, образуются в результате работы фотосистем I и II и неблагоприятных факторов окружающей среды. Измерения показали, что независимо от обработки семян активность СОД в корнях выше, чем в побегах, как минимум на один порядок. При этом в проростках, полученных из семян, обработанных ПП и НЧ Fe, активность СОД увеличилась относительно необработанного контроля G1 (побеги G2–G4; корни G2–G3 на рис. 6). Снижение активности СОД по сравнению с контролем G1 наблюдалось в тканях корней, проростков из семян, обработанных более низкими концентрациями НЧ Fe $10^{-6}\%$ и НЧ Fe $10^{-7}\%$ (корни G4 и G6 на рис. 6).

По совокупности данных мы полагаем, что высокие значения активности СОД в корнях и разброс значений относительно контрольной группы (отсутствие корреляции с типом обработки семян) могут быть связаны с окислительным стрессом в корнях, который возник в результате действия неблагоприятных факторов внешней среды.

Обработка семян препаратами с НЧ Fe не влияла на содержание железа в растительных тканях. Сравнительный анализ концентраций микроэлементов в растительных тканях (проросшее зерно на третьи сутки, побеги и корни 7-дневных проростков) показал, что с течением времени наблюдается увеличение содержания микроэлементов (проанализировано 25 элементов, в том числе железа) (табл. П1, а в Приложении). По количественным показателям такое накопление микроэлементов воз-

можно только из окружающей среды (субстрат, использованный для проращивания, и вода для полива) и не коррелирует с обработкой семян. При сравнении разных типов обработки для одного и того же типа ткани (табл. П1, а в Приложении) видно, что введение НЧ Fe в полимерный пленкообразователь для обработки семян перед проращиванием не приводило к достоверному увеличению содержания железа по сравнению с необработанным контролем ни в проросших семенах, ни в побегах и корнях 7-дневных проростков. Обратим внимание, что средние концентрации микроэлементов Na, Pb, Cd, Co, Sn, Hg, As увеличились в 12 и более раз в корнях по сравнению с содержанием этих элементов в проросших семенах. Сравнение концентраций Pb, Cd и Hg (среднее по G1–G6 для каждого типа ткани) с гигиеническими требованиями СанПин 2.3.2.1078-01 (табл. П1, б в Приложении) дает основание предполагать, что накопленные в корнях концентрации токсичных элементов могли стать причиной окислительного стресса. Отметим, что это наблюдение коррелирует с высокими значениями активности СОД, которые в корнях на один порядок выше, чем в побегах, и с обогащением процессов детоксикации в корнях, согласно протеомным данным.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В работе был апробирован метод ультра-быстрого хроматомасс-спектрометрического профилирования [1, 6, 7] для количественного анализа протеомов растительных тканей. Объектами исследования были побеги и корни 7-дневных проростков мягкой озимой пшеницы, семена которой были обработаны перед проращиванием препаратами наночастиц железа (II, III) или сульфата железа (II). В тканях побегов была показана дифференциальная регуляция белков, вовлеченных в процессы фотосинтеза, регуляции активности СОД, гликолиза, биосинтеза хлорофилла, а также процессов из цикла трикарбоновых кислот. Полученные результаты согласуются с ранее опубликованными данными. В частности, в недавнем исследовании влияния наночастиц железа на рост побегов засухоустойчивых и солеустойчивых сортов было показано, что при однократном внесении в почву раствора наночастиц дифференциальная экспрессия белков в побегах обоих сортов в основном связана с фотосинтезом и зависела от сорта культуры [14]. Также было показано увеличение количества белков, связанных с деградацией

крахмала, гликолизом и циклом трикарбонных кислот при корневой подкормке [21]. По нашим данным, увеличение количества белков, вовлеченных в метаболизм дисахаридов и полисахаридов, в том числе крахмала, наблюдалось в тканях корней.

Результаты морфометрии показали, что группы с обработкой ПП, FeSO_4 10⁻⁷% и НЧ Fe 10⁻⁷% характеризовались одинаковой средней длиной стебля и максимального корня по сравнению с необработанным контролем и обработкой препаратом с НЧ Fe 10⁻⁵% (рис. 1, в–е). Соответственно, группа с обработкой ПП в среднем выросла лучше, чем необработанный контроль, а добавление соединений железа в ПП для обработки семян либо не сказывалось на росте растений (FeSO_4 10⁻⁷% и НЧ Fe 10⁻⁷%), либо способствовало уменьшению длины стеблей и корней (НЧ Fe 10⁻⁵%). Возможно, имеются другие причины, повлиявшие на развитие проростков. Так, протеомный анализ не выявил зависимость обогащения биологических процессов от содержания железа в составе препаратов, за исключением ответа на токсичные вещества в корнях. Однако остальные процессы регистрировались воспроизводимым образом (рис. 3, б и рис. 5, б), что дает основание предположить наличие слабых эффектов от обработки, на грани чувствительности метода. Обработка семян препаратами железа в составе ПП потенциально способствует фотосинтезу, регуляции активности СОД и гликолизу в побегах и метаболизму дисахаридов и полисахаридов в корнях. Протеомный анализ также выявил, что при сравнении НЧ Fe 10⁻⁵% относительно необработанного контроля наблюдался защитный ответ на присутствие микроорганизмов (рис. П3, д в Приложении). Защитный ответ представлен сигнатурой белков-гомологов, среди которых Powdery mildew resistance protein и Rx N-terminal domain-containing protein, контролирующие распознавание патогенов и защитный отклик на них. В группах с обработкой ПП и НЧ Fe 10⁻⁷% при сравнении с необработанным контролем наблюдался ответ на воспаление, представленный сигнатурами авенин-подобных белков, обладающих антигрибковой активностью [31]. При этом защитный ответ на токсичные вещества сильнее всего был выражен в группах с обработкой НЧ Fe 10⁻⁵% и НЧ Fe 10⁻⁷%, что на данный момент не поддается однозначной трактовке и требует дополнительных экспериментов. Например, необходимо сравнение с 7-дневными проростками из семян, подвергшихся обработке противогрибковыми препаратами, так как не исключено,

что малый эффект от обработки мог быть скрыт влиянием фитопатогенов. С этой точки зрения интерес также представляет протеомный анализ семян на третьи сутки прорастания, так как такой эксперимент даст представление о биологических процессах при прорастании корешка, когда с момента обработки семян пройдет меньше времени и будет минимизировано возможное влияние фитопатогенов, даже если полностью от них избавиться не удастся. Отметим, что измерения активности СОД подтверждают наличие в корнях окислительного стресса для всех контрольных и тестовых групп растений, а анализ общего содержания микроэлементов в тканях растений выявил вероятную контаминацию токсичными элементами (Cd, Pb, Hg среди наиболее вероятных кандидатов) как еще одну возможную причину активации в корнях процессов детоксикации, представленных гомологами пероксидаз.

Тем не менее воспроизводимое детектирование белков, вовлеченных в обогащенные процессы, предполагает, что их можно использовать в качестве молекулярных маркеров при тестировании новых составов препаратов для обработки семян, листовой и корневой подкормки. Мы проанализировали совокупности белков, на которых, по нашим данным, наблюдалось обогащение процессов фотосинтеза, биосинтеза порфирина-содержащих соединений и хлорофилла, регуляции активности СОД, гликолиза, метаболизма полисахаридов и др. (табл. П2 в Приложении). Совокупности белков, зарегистрированные хотя бы в трех из пяти групп образцов, рассматриваются нами как потенциальная молекулярная сигнатура, по экспрессии которой возможно отслеживать влияние состава препарата на фотосинтез, гликолиз и регуляцию активности СОД в побегах (табл. П2 в Приложении). Также хотелось бы обратить внимание на белки, вовлеченные в процессы биосинтеза соединений с порфириновым/тетрапирольным кольцом. Обогащению данных процессов сопутствовало также обогащение процессов, связанных с биосинтезом гема (<https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0006783>). Биосинтез гема был зарегистрирован слабо, зависимости от концентрации железа не наблюдалось (рис. 3, б), однако процесс имеет непосредственное отношение к составу испытываемых препаратов и может представлять собой интерес. Терминальным ферментом пути биосинтеза гема является феррохелатаза, широко распространенная в природе, в том числе в хлоропластах и митохондриях высших растений (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/InterPro/IPR019772/>) [32–34]. Фермент

катализирует присоединение двухвалентного железа в кольцо протопорфирина с образованием протогема. Целенаправленное исследование активности феррохелатазы в зависимости от особенностей сорта злаковой культуры, условий роста и состава препарата для предпосевной обработки также представляется интересным направлением. В дальнейших исследованиях планируется расширить коллекцию протеомных данных по различным сортам пшеницы и типам обработки семян, чтобы проверить и подтвердить результаты текущего исследования, а также дополнить молекулярные данные для биосинтеза хлорофилла, гема, тетрапиррол- и порфиринов-содержащих соединений.

Метод ультрабыстрого протеомного профилирования DirectMS1 продемонстрировал высокий потенциал для молекулярной диагностики процессов, происходящих в растительных тканях, включая не только влияние обработки препаратами, но и определение возможной контаминации. В комбинации с другими методами исследования предложенный подход является важным источником информации при исследовании молекулярных механизмов действия препаратов и факторов внешней среды на живые системы.

Вклад авторов. И.А. Тарасова – концепция и руководство работой; Т. Кусаинова, Д.Д. Емеева, Е.М. Казакова, И.П. Ольховская, О.А. Богословская, М.Л. Кусков, В.А. Горшков – проведение экспериментов; Ф. Кьелдсен, А.Н. Жигач, Н.Н. Глущенко, И.А. Тарасова – обсуждение результатов исследования; И.А. Тарасова, И.П. Ольховская, Н.Н. Глущенко – написание и редактирование текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-26-00109).

Благодарности. Авторы выражают благодарность к.ф.-м.н. Ольге Жигалиной и Дмитрию Хмеленину (Институт кристаллографии им. Шубникова ФНЦ «Кристаллография и фотоника» РАН) за сбор высококачественных ПЭМ-изображений наночастиц железа, а также к.т.н. Надежде Березкиной (ФИЦ ХФ им. Н.Н. Семенова РАН) за профессиональную работу и выдающееся усердие при обработке и измерении более 5000 ПЭМ-изображений частиц. И.А.Т. благодарит к.ф.-м.н. Марку Иванова и к.ф.-м.н. Михаила Горшкова за дискуссии в области прикладных аспектов метода DirectMS1 и всех волонтеров за неоценимую помощь в извлечении проростков пшеницы из субстрата и проведении ручных морфометрических измерений: к.ф.-м.н. Марина Придатченко, к.ф.-м.н. Максим Бражников, Артур Яблоков, Валерий Постоенко, Иван Федоров, Лейла Гарибова, Иван Емеев и Леонид Бражников. Научный коллектив выражает глубокую признательность проф. Виктору Згоде за реализацию метода ультрабыстрой хроматомасс-спектрометрии на оборудовании ЦКП «Протеом человека» в ИБМХ им. В.Н. Ореховича.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistry.moscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ivanov, M. V., Bubis, J. A., Gorshkov, V., Tarasova, I. A., Levitsky, L. I., Lobas, A. A., Solovyeva, E. M., Pridatchenko, M. L., Kjeldsen, F., and Gorshkov, M. V. (2020) DirectMS1: MS/MS-Free identification of 1000 proteins of cellular proteomes in 5 minutes, *Anal. Chem.*, **92**, 4326-4333, doi: 10.1021/acs.analchem.9b05095.
2. Ivanov, M. V., Tarasova, I. A., Levitsky, L. I., Solovyeva, E. M., Pridatchenko, M. L., Lobas, A. A., Bubis, J. A., and Gorshkov, M. V. (2017) MS/MS-free protein identification in complex mixtures using multiple enzymes with complementary specificity, *J. Proteome Res.*, **16**, 3989-3999, doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00365.
3. Wang, X., Shen, S., Rasam, S. S., and Qu, J. (2019) MS1 ion current-based quantitative proteomics: a promising solution for reliable analysis of large biological cohorts, *Mass Spectrom. Rev.*, **38**, 461-482, doi: 10.1002/mas.21595.
4. Meyer, J. G., Niemi, N. M., Pagliarini, D. J., and Coon, J. J. (2020) Quantitative shotgun proteome analysis by direct infusion, *Nat. Methods*, **17**, 1222-1228, doi: 10.1038/s41592-020-00999-z.
5. Demichev, V., Messner, C. B., Vernardis, S. I., Lilley, K. S., and Ralser, M. (2020) DIA-NN: neural networks and interference correction enable deep proteome coverage in high throughput, *Nat. Methods*, **17**, 41-44, doi: 10.1038/s41592-019-0638-x.
6. Ivanov, M. V., Bubis, J. A., Gorshkov, V., Abdrakhimov, D. A., Kjeldsen, F., and Gorshkov, M. V. (2021) Boosting MS1-only proteomics with machine learning allows 2000 protein identifications in single-

- shot human proteome analysis using 5 min HPLC gradient, *J. Proteome Res.*, **20**, 1864-1873, doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00863.
7. Ivanov, M. V., Bubis, J. A., Gorshkov, V., Tarasova, I. A., Levitsky, L. I., Solovyeva, E. M., Lipatova, A. V., Kjeldsen, F., and Gorshkov, M. V. (2022) DirectMS1Quant: ultrafast quantitative proteomics with MS/MS-free mass spectrometry, *Anal. Chem.*, **94**, 13068-13075, doi: 10.1021/acs.analchem.2c02255.
 8. Kashyap, P. L., Kumar, S., Jasrotia, P., Singh, D. P., and Singh, G. P. (2020) Nanotechnology in Wheat Production and Protection, in *Environmental Nanotechnology Volume 4* (Dasgupta, N., Ranjan, S., and Lichtfouse, E., eds) Springer International Publishing, Cham, pp. 165-194, doi: 10.1007/978-3-030-26668-4_5.
 9. Shang, Y., Hasan, M. K., Ahammed, G. J., Li, M., Yin, H., and Zhou, J. (2019) Applications of nanotechnology in plant growth and crop protection: a review, *Molecules*, **24**, 2558, doi: 10.3390/molecules24142558.
 10. Paramo, L. A., Feregrino-Pérez, A. A., Guevara, R., Mendoza, S., and Esquivel, K. (2020) Nanoparticles in agroindustry: applications, toxicity, challenges, and trends, *Nanomaterials*, **10**, 1654, doi: 10.3390/nano10091654.
 11. Zhao, L., Lu, L., Wang, A., Zhang, H., Huang, M., Wu, H., Xing, B., Wang, Z., and Ji, R. (2020) Nanobiotechnology in agriculture: use of nanomaterials to promote plant growth and stress tolerance, *J. Agric. Food Chem.*, **68**, 1935-1947, doi: 10.1021/acs.jafc.9b06615.
 12. Husen, A., and Siddiqi, K. S. (2014) Phytosynthesis of nanoparticles: concept, controversy and application, *Nanoscale Res. Lett.*, **9**, 229, doi: 10.1186/1556-276X-9-229.
 13. Khot, L. R., Sankaran, S., Maja, J. M., Ehsani, R., and Schuster, E. W. (2012) Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: a review, *Crop Prot.*, **35**, 64-70, doi: 10.1016/j.cropro.2012.01.007.
 14. Yasmeen, F., Raja, N. I., Razzaq, A., and Komatsu, S. (2016) Gel-free/label-free proteomic analysis of wheat shoot in stress tolerant varieties under iron nanoparticles exposure, *Biochim. Biophys. Acta*, **1864**, 1586-1598, doi: 10.1016/j.bbapap.2016.08.009.
 15. Du, W., Yang, J., Peng, Q., Liang, X., and Mao, H. (2019) Comparison study of zinc nanoparticles and zinc sulphate on wheat growth: from toxicity and zinc biofortification, *Chemosphere*, **227**, 109-116, doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.03.168.
 16. Das, C. K., Srivastava, G., Dubey, A., Roy, M., Jain, S., Sethy, N. K., Saxena, M., Harke, S., Sarkar, S., Misra, K., Singh, S. K., Bhargava, K., Philip, D., and Das, M. (2016) Nano-iron pyrite seed dressing: a sustainable intervention to reduce fertilizer consumption in vegetable (beetroot, carrot), spice (fenugreek), fodder (alfalfa), and oilseed (mustard, sesamum) crops, *Nanotechnol. Environ. Eng.*, **1**, 2, doi: 10.1007/s41204-016-0002-7.
 17. Yuan, J., Chen, Y., Li, H., Lu, J., Zhao, H., Liu, M., Nechitaylo, G. S., and Glushchenko, N. N. (2018) New insights into the cellular responses to iron nanoparticles in *Capsicum annuum*, *Sci. Rep.*, **8**, 3228, doi: 10.1038/s41598-017-18055-w.
 18. Yoon, H., Kang, Y.-G., Chang, Y.-S., and Kim, J.-H. (2019) Effects of zerovalent Iron nanoparticles on photosynthesis and biochemical adaptation of soil-grown *Arabidopsis thaliana*, *Nanomaterials (Basel)*, **9**, 1543, doi: 10.3390/nano9111543.
 19. Sharma, J. K., Sihmar, M., Santal, A. R., and Singh, N. P. (2019) Impact assessment of major abiotic stresses on the proteome profiling of some important crop plants: a current update, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, **35**, 126-160, doi: 10.1080/02648725.2019.1657682.
 20. Hossain, Z., Yasmeen, F., and Komatsu, S. (2020) Nanoparticles: synthesis, morphophysiological effects, and proteomic responses of crop plants, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 3056, doi: 10.3390/ijms21093056.
 21. Yasmeen, F., Raja, N. I., Razzaq, A., and Komatsu, S. (2017) Proteomic and physiological analyses of wheat seeds exposed to copper and iron nanoparticles, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.*, **1865**, 28-42, doi: 10.1016/j.bbapap.2016.10.001.
 22. Leipunsky, I. O., Zhigach, A. N., Kuskov, M. L., Berezkina, N. G., Afanasenkova, E. S., Kudrov, B. V., Lopez, G. W., Vorobjeva, G. A., and Naumkin, A. V. (2019) Synthesis of TiH₂ nanopowder via the Guen-Miller flow-levitation method and characterization, *J. Alloys Compd.*, **778**, 271-279, doi: 10.1016/j.jallcom.2018.11.088.
 23. Virtanen, P., Gommers, R., Oliphant, T. E., Haberland, M., Reddy, T., Cournapeau, D., Burovski, E., Peterson, P., Weckesser, W., Bright, J., van der Walt, S. J., Brett, M., Wilson, J., Millman, K. J., Mayorov, N., Nelson, A. R. J., Jones, E., Kern, R., Larson, E., et al. (2020) SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python, *Nat. Methods*, **17**, 261-272, doi: 10.1038/s41592-019-0686-2.
 24. Elias, J. E., and Gygi, S. P. (2010) Target-Decoy Search Strategy for Mass Spectrometry-Based Proteomics, in *Proteome Bioinformatics* (Hubbard, S. J., and Jones, A. R., eds) Humana Press, Totowa, NJ, pp. 55-71, doi: 10.1007/978-1-60761-444-9_5.
 25. Zhang, B., Pirmoradian, M., Zubarev, R., and Käll, L. (2017) Covariation of peptide abundances accurately reflects protein concentration differences, *Mol. Cell. Proteomics*, **16**, 936-948, doi: 10.1074/mcp.O117.067728.
 26. Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing, *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.*, **57**, 289-300, doi: 10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x.
 27. Kazakova, E. M., Solovyeva, E. M., Levitsky, L. I., Bubis, J. A., Emekeeva, D. D., Antonets, A. A., Nazarov, A. A., Gorshkov, M. V., and Tarasova, I. A. (2022) Proteomics-based scoring of cellular response to stimuli for improved characterization of signaling pathway activity, *Proteomics*, **23**, e2200275, doi: 10.1002/pmic.202200275.

28. Kulmanov, M., and Hoehndorf, R. (2020) DeepGOPlus: improved protein function prediction from sequence, *Bioinformatics*, **36**, 422-429, doi: 10.1093/bioinformatics/btz595.
29. Klopfenstein, D. V., Zhang, L., Pedersen, B. S., Ramírez, F., Warwick Vesztrocy, A., Naldi, A., Mungall, C. J., Yunes, J. M., Botvinnik, O., Weigel, M., Dampier, W., Dessimoz, C., Flick, P., and Tang, H. (2018) GOATOOLS: A python library for gene ontology analyses, *Sci. Rep.*, **8**, 10872, doi: 10.1038/s41598-018-28948-z.
30. Габдрахманов И. Т., Горшков М. В., Тарасова И. А. (2021) Клеточный ответ на стресс в панорамной протеомике: контроль ложноположительных результатов, *Биохимия*, **86**, 395-408, doi: 10.31857/S0320972521030088.
31. Zhang, Y., Hu, X., Islam, S., She, M., Peng, Y., Yu, Z., Wylie, S., Juhasz, A., Dowla, M., Yang, R., Zhang, J., Wang, X., Dell, B., Chen, X., Nevo, E., Sun, D., and Ma, W. (2018) New insights into the evolution of wheat avenin-like proteins in wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 13312-13317, doi: 10.1073/pnas.1812855115.
32. Nagahatenna, D. S. K., Parent, B., Edwards, E. J., Langridge, P., and Whitford, R. (2020) Barley plants overexpressing ferrochelatases (HvFC1 and HvFC2) show improved photosynthetic rates and have reduced photo-oxidative damage under drought stress than non-transgenic controls, *Agronomy*, **10**, 1351, doi: 10.3390/agronomy10091351.
33. Masuda, T., Suzuki, T., Shimada, H., Ohta, H., and Takamiya, K. (2003) Subcellular localization of two types of ferrochelatase in cucumber, *Planta*, **217**, 602-609, doi: 10.1007/s00425-003-1019-2.
34. Cornah, J. E., Roper, J. M., Singh, D. P., and Smith, A. G. (2002) Measurement of ferrochelatase activity using a novel assay suggests that plastids are the major site of haem biosynthesis in both photosynthetic and non-photosynthetic cells of pea (*Pisum sativum* L.), *Biochem. J.*, **362**, 423-432, doi: 10.1042/bj3620423.

ULTRA-FAST MASS SPECTROMETRY FOR PLANT BIOCHEMISTRY: PROTEOMICS RESPONSE OF WINTER WHEAT TO IRON PRE-SOWING TREATMENT

T. T. Kusainova^{1,2}, D. D. Emekeeva^{1,2}, E. M. Kazakova^{1,2}, V. A. Gorshkov³, F. Kjeldsen³, M. L. Kuskov¹, A. N. Zhigach¹, I. P. Olkhovskaya¹, O. A. Bogoslovskaya¹, N. N. Glushchenko¹, and I. A. Tarasova^{1*}

¹ V. L. Talrose Institute for Energy Problems of Chemical Physics, N. N. Semenov Federal Research Center of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia

² Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), 141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia

³ Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Southern Denmark, DK-5230 Odense M, Denmark

In recent years, ultrafast chromatography-mass spectrometry profiling of proteomes has been actively developed for biochemical studies. These methods are intended for fast/rapid monitoring of cell response to a biotic stimulus, correlation of molecular changes with biological processes and phenotype changes. To increase agricultural production, new biotechnologies are being introduced, including the use of nanomaterials. At the same time, thorough testing of new fertilizers and investigation of mechanisms of biotic effects on the germination, growth, and development of plants are required. The aim of this work was to adapt the method of ultrafast chromatography and mass spectrometry for rapid quantitative profiling of molecular changes in 7-day-old wheat seedlings that occur in response to pre-sowing seed treatment with iron compounds. The experimental method is capable of analyzing up to 200 samples per day; its practical value lies in carrying out the proteomic express diagnostics of the biotic action of new treatments, including those for agricultural needs. The regulation of photosynthesis, biosynthesis of chlorophyll, porphyrin- and tetrapyrrole-containing compounds, glycolysis in shoot tissues, and polysaccharide metabolism in root tissues were shown after seed treatments with suspensions containing a polymeric film former (PEG-400, Na-CMC, Na₂-EDTA), iron (II, III) nanoparticles or iron (II) sulfate. Observations at the protein level were consistent with the results of morphometry, measurements of superoxide dismutase activity and microelement analysis of 3-day-old germinated seeds and shoots and roots of 7-day-old seedlings. A characteristic molecular signature has been proposed to determine the regulation of photosynthesis and glycolytic process at the protein level. Such a signature is considered as a potential marker of the biotic effect of seed treatment with iron compounds and will be confirmed by further studies.

Keywords: plant proteomics, nanoparticles, bioinformatics, mass spectrometry

НАРУШЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОГО СТАТУСА В ЭРИТРОЦИТАХ КРЫС ПРИ АММОНИЙ-ИНДУЦИРОВАННОЙ ГЕПАТОЭНЦЕФАЛОПАТИИ: РОЛЬ NMDA-РЕЦЕПТОРОВ

© 2023 Е.А. Косенко*, Г.А. Алилова, Л.А. Тихонова

ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290 Пущино, Московская обл., Россия; электронная почта: eakos@rambler.ru

Поступила в редакцию 15.05.2023

После доработки 10.08.2023

Принята к публикации 11.08.2023

Гепатоэнцефалопатия (ГЭ) как медицинский термин нервно-психического расстройства, развивающегося у пациентов с тяжелым нарушением функции печени, известна уже более века, однако патогенетические механизмы дисфункции головного мозга при заболеваниях печени до сих пор полностью не выяснены. Концептуально, основной причиной ГЭ является накопление аммиака в головном мозге вследствие нарушения детоксикационной функции печени или возникновения портосистемного шунта. Доказано, что токсическое действие аммиака опосредовано гиперактивацией глутаматных NMDA-рецепторов (NMDA-R) и распространяется на многие процессы аэробного метаболизма, обеспечивающего энергией мириады специфических функций и жизнеспособность нервных клеток. Недавнее открытие функциональных NMDA-R в эритроцитах и отклонения от нормы многих гематологических параметров, свидетельствующих о нарушении гемодинамики и снижении кислородтранспортной функции эритроцитов у большинства пациентов с ГЭ, указывали на наличие взаимосвязи между повреждением эритроцитов и дисфункцией мозга. Чтобы понять, как в условиях гипераммониемии (ГА) прогрессирует аэробный энергетический кризис мозга приводит к энцефалопатии, необходимо определить вклад в эту патологию аммоний-индуцированного окислительного стресса в эритроцитах, приводящего к нарушению их кислородтранспортной функции. Для обнаружения вышеуказанного недостающего звена активность антиокислительных ферментов и концентрация GSH, GSSG и H₂O₂ были измерены в эритроцитах животных с ГА в присутствии неконкурентного антагониста NMDA-R, МК-801. Было выявлено, что аммиак, содержащийся в крови гипераммониемированных животных, накапливается в значительном количестве в эритроцитах крыс и делает эти клетки, лишенные аммиак-обезвреживающих ферментов, наиболее восприимчивыми к его проокислительному действию, проявляющемуся по развитию окислительного стресса, показатели которого полностью или частично восстанавливаются МК-801. Полученные данные обеспечивают основу для выявления дополнительных факторов риска в развитии когнитивных нарушений и неблагоприятного прогноза, связанного с гипоперфузией у пациентов с повышенной концентрацией аммиака в крови.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гипераммониемия, гепатоэнцефалопатия, эритроциты, NMDA-рецепторы, окислительный стресс.

DOI: 10.31857/S0320972523090191, **EDN:** YADLJQ

ВВЕДЕНИЕ

Гепатоэнцефалопатия (ГЭ) – это нервно-психическое расстройство, развивающееся у пациентов с тяжелым нарушением функции печени. Клинические симптомы патологии варьируют от легких поведенческих нарушений до полного угнетения сознания, пере-

ходящего в кому, которая часто заканчивается смертью [1]. Хотя «гепатоэнцефалопатия» как медицинский термин заболевания известна уже более века [2] и концептуально отражает взаимосвязь между повреждением печени и патологией головного мозга, патогенетические механизмы дисфункции головного мозга при заболеваниях печени до сих пор полностью

Принятые сокращения: ГА – гипераммониемия; ГП – глутатионпероксидаза; ГР – глутатионредуктаза; ГТ – глутатионтрансфераза; ГЭ – гепатоэнцефалопатия; Г6ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа; СОД – супероксиддисмутаза; NMDA-R – глутаматные NMDA-рецепторы.

* Адресат для корреспонденции.

не выяснены. Общеизвестно, однако, что повышенный уровень аммиака в крови, вызванный нарушением детоксикационной функции печени или портокавальным шунтированием, позволяющим аммиаку, образуемому в желудочно-кишечном тракте (не обезвреживаясь в печени или минуя печень), беспрепятственно проникать в мозг, является основным фактором, способствующим накоплению аммиака в ЦНС, токсический эффект которого отвечает как за церебральную дисфункцию, так и за клинические симптомы ГЭ [3, 4].

Механизмы нейротоксичности аммиака до конца не ясны, но, согласно литературным данным, его токсическое действие распространяется на многие метаболические процессы, обеспечивающие специфические энергозависимые функции нервной ткани. Так, нами было показано, что аммиак нарушает энергетический обмен в клетках мозга животных, тормозит поток электронов в дыхательной цепи митохондрий, приводя к нарушению окислительного фосфорилирования, производства АТФ [5] и нарушению гомеостаза Ca^{2+} [6], значительному усилению образования активных форм кислорода и азота [7], подавлению активности антиоксидантных ферментов и активности глутаминсинтетазы, что является причинами возникновения окислительного стресса [8], уменьшения скорости детоксикации аммиака в мозге и быстрой гибели животных [9]. Наши исследования показали также, что глобальные нарушения жизненно важных биохимических процессов в головном мозге и гибель животных с острой гипераммониемией (ГА) почти полностью предотвращались различными антагонистами глутаматных NMDA-рецепторов (NMDA-R), действующими на разные центры рецепторов, и в частности, МК-801 – неконкурентным антагонистом рецепторов [10]. Эти данные убедительно подтвердили ключевую роль нейромедиатора глутамата как основного эффектора, вызывающего аммоний-индуцированный каскад патологических реакций, опосредованный гиперактивацией NMDA-R, приводящий к гибели нервных клеток и организма в целом.

Недавнее открытие функциональных NMDA-R вне ЦНС в различных периферических тканях, включая печень, сердце, поджелудочную железу, а также эритроциты [11], позволило предположить, что полиорганная недостаточность может быть неотъемлемой частью ГЭ [12], а токсические эффекты аммиака при ГЭ, опосредованные NMDA-R, могут быть более разрушительными и опасными, чем считалось ранее. Однако, несмотря на

то что концепция о ведущей роли аммиака в развитии полиорганной патологии далеко не нова [13], в настоящее время не известна ни степень накопления аммиака в периферических тканях (за исключением ранних единичных статей), ни роль NMDA-R в механизме его токсического действия, и сделать однозначный вывод о том, насколько не нейрональные периферические ткани восприимчивы к токсическому действию аммиака, также не предоставляется возможным.

Тем не менее отклонения от нормы многих гематологических параметров [14], наличие анемии у большинства пациентов [15], сопровождающейся появлением эритроцитов с атипичной морфологией [16], с измененным поверхностным зарядом [17] и другими аномалиями [18], приводящими к нарушению гемодинамики, снижению кислородтранспортной функции крови [19], дают возможность предположить, что ГЭ является системной патологией, при которой мультиорганная гипоксия и, в частности, гипоксия мозга может быть неотъемлемой частью заболевания и может играть важную роль в патогенезе ГЭ.

Эритроциты – единственные клетки в интегрированной системе транспорта кислорода (помимо сердечно-сосудистой и дыхательной систем), способные переносить кислород и поддерживать аэробное окисление глюкозы в тканях и жизнедеятельность организма в целом. Для мозга, в отличие от других органов, необходим достаточно высокий уровень окислительного метаболизма. При этом, как это ни парадоксально, мозг имеет ограниченные запасы кислорода [20] и поэтому нуждается в постоянном снабжении насыщенной кислородом кровью. Поэтому неудивительно, что нерегулярная подача кислорода даже на короткий период вызывает повреждение головного мозга [21], приводящее к потере сознания, а хроническая кислородная недостаточность (независимо от этиологии заболевания) может привести к гипоперфузии и необратимому повреждению клеток головного мозга и энцефалопатии [22, 23], что указывает на некоторую общую биохимическую основу неврологических симптомов при различных заболеваниях. Отсюда очевидно, что в условиях ГЭ, сопровождающейся ГА, помимо известной взаимосвязи «заболевания печени ↔ дисфункция мозга» [24], прослеживается дополнительная промежуточная причинно-следственная взаимосвязь «заболевания печени ↔ повреждение эритроцитов ↔ дисфункция мозга». Из чего следует, что для понимания того, как нарушения энергетиче-

ского обмена в мозге, имеющем ограниченные запасы кислорода и нуждающемся в постоянном снабжении насыщенной кислородом кровью, в условиях ГА приводят к энцефалопатии, крайне важно определить вклад в эту патологию аммоний-индуцированного окислительного стресса в эритроцитах, приводящего к повреждению их кислородтранспортной функции.

В свою очередь, кислородтранспортная функция эритроцитов регулируется их внутриклеточным метаболизмом в первую очередь за счет энергетического обмена и системы антиоксидантной защиты [25], метаболиты и ферменты которых контролируют сродство гемоглобина к кислороду [26], которое для связывания максимально возможного количества кислорода в легких должно быть высоким и низким — для беспрепятственного высвобождения необходимого количества кислорода в ткани. К сожалению, взаимосвязь между нарушением внутриклеточных биохимических процессов и кислородтранспортной функцией эритроцитов не вызывает особого интереса среди исследователей, а нормативная инерция замедляет включение имеющихся данных в повседневную клиническую практику, что, естественно, занижает и ценность исследований, направленных на выявление ранних маркеров, которые могут предшествовать гипоксическому повреждению мозга, наблюдаемому при ГЭ.

Поэтому в настоящее время все еще неизвестно, может ли токсический эффект аммиака, накопившегося в крови, распространяться на эритроциты и объяснять изменения, обнаруженные в гликолитической и антиоксидантной системах и лежащие в основе нарушения транспортной функции этих клеток и, как следствие этого, быть причиной гипоперфузии и энцефалопатии у пациентов с заболеваниями печени.

Для выявления вышеуказанного недостающего звена, принимая во внимание наличие глутаматных NMDA-R (характерных для ЦНС) в эритроцитах, мы провели специальные исследования. Учитывая то, что одним из ведущих звеньев патологического каскада, запускаемого гиперактивацией NMDA-R в головном мозге ГА-животных и пациентов с ГЭ [27], является окислительный стресс, активность антиокислительных ферментов, концентрация GSH и GSSG, а также концентрация H_2O_2 были измерены в эритроцитах ГА-животных в присутствии неконкурентного антагониста NMDA-R, МК-801.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В работе были использованы следующие реактивы: МК-801, ацетат аммония, NAD^+ , $NADH$, $NADP^+$, $NADPH$, Tris, ГЭА, АТР, ADP, фосфоенолпируват, фруктозо-6-фосфат, глюкозо-6-фосфат, глюкоза, пируват натрия, карбонат натрия, GSH, GSSG, ксантин, п-нитротетразолиевый синий, пируваткиназа, лактатдегидрогеназа, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, глутаматдегидрогеназа, каталаза, ксантиноксидаза, глутатионредуктаза, ЭГТА, ЭДТА, 1-хлор-2,4-динитробензол, 2-винилпиридин — фирмы «Sigma-Aldrich» (США). Все остальные реагенты были отечественного производства квалификации «особо чистые».

Животные. В экспериментах использовались крысы линии Wistar массой 210–230 г, содержащиеся в виварии при комнатной температуре, естественном режиме освещения и свободном доступе к корму и воде. Каждая экспериментальная группа состояла из 10 животных. Животным группы 1 («ацетат аммония») вводили ацетат аммония в виде однократной внутрибрюшинной инъекции (в/б) в сублетальной дозе 7 ммоль/кг, декапитацию производили, как и в ранее выполненных исследованиях, через 15 мин после инъекции, обычно после прохождения двух судорожных эпизодов [9]. Животным группы 2 («контроль») вводили в/б 0,9% (w/v) NaCl в том же объеме, что и ацетат аммония. Декапитацию животных производили через 15 мин после инъекции. Физиологический раствор в качестве контрольного раствора был выбран на основании наших предыдущих исследований, показавших, что введение ацетата натрия, так же, как и введение физиологического раствора, не оказывает влияния на измеряемые показатели. Животным группы 3 («группа МК-801») вводили МК-801 в дозе 2,0 мг/кг, необходимой для полной блокировки рецепторов; декапитацию животных проводили через 30 мин после инъекции [8]. Животным группы 4 («МК-801 + ацетат аммония») вначале вводили МК-801 в дозе 2,0 мг/кг и через 15 мин — раствор ацетата аммония в дозе 7 ммоль/кг. Декапитацию производили через 15 мин после введения ацетата аммония.

Получение плазмы крови и очищенных эритроцитов. Для получения плазмы и суспензии очищенных эритроцитов собранную при декапитации кровь (в качестве антикоагулянта использовали 130 мМ 3Na-цитрат, рН 7,4), делили на 2 части. Для получения плазмы крови форменные элементы удаляли

центрифугированием в течение 10 мин при 1000 g (+4 °C). Одна часть плазмы использовалась для определения активности ферментов, другая была депротеинизирована охлажденной смесью 6% HClO_4 /40% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ при -20°C и нейтрализована 30% (w/w) KOH (-20°C) до pH 6; после осаждения кристаллов KClO_4 (1000 g, 10 мин, +4 °C) полученный супернатант немедленно использовали для измерения концентрации аммиака.

Для очищения эритроцитов от лейкоцитов и тромбоцитов вторую часть крови пропускали через колонку, заполненную α -целлюлозой и гемикристаллинцеллюлозой тип 50 в соотношении 1 : 1 и уравновешенную 0,9% (w/v) NaCl [28]. Кровь элюировали (1 : 5) при комнатной температуре раствором, содержащим 10 мМ KH_2PO_4 (pH 7,4) и 150 мМ NaCl . Эритроциты осаждали центрифугированием при +4 °C в течение 10 мин при 1000 g и дважды промывали раствором, содержащим 10 мМ KH_2PO_4 (pH 7,4), 140 мМ NaCl , 5 мМ KCl , 2,8 мМ глюкозы, 0,5 мМ K-ЭДТА (10 мин, +4 °C, 1500 g, 2000 g) и суспендировали в этом же растворе в соотношении 1 : 5.

Получение лизатов эритроцитов для определения активности ферментов. Очищенные от тромбоцитов и лейкоцитов эритроциты (1 мл) лизировали 2 мл гипосмотического буфера (50 мМ ТЭА, pH 7,4/0,15 мМ K-ЭГТА , 3 мМ β -меркаптоэтанол), содержащего 0,2% сапонина.

Получение экстрактов эритроцитов для определения концентрации аммиака. Очищенные эритроциты смешивали с холодной смесью (-20°C) 6% HClO_4 /40% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ в соотношении 1 : 10. Центрифугировали 5 мин при температуре +4 °C при 10 000 g. Осадок удаляли, pH супернатанта доводили до значения 5–6, используя 30% (w/w) KOH и сухой KHCO_3 . Осадок перхлората калия удаляли центрифугированием при тех же режимах. Прозрачный супернатант немедленно использовали для определения концентрации аммиака (ммоль/литр) с помощью микрофлуориметрического метода, как описано Kosenko et al. [29]. Концентрация аммиака в плазме крови была измерена аналогичным способом и выражалась в ммоль/литр.

Определение пероксида водорода в эритроцитах. Концентрацию H_2O_2 в эритроцитах определяли спектрофотометрическим методом [30] в глутатионредуктазной (ГР) реакции по окислению NADPH при 340 нм в присутствии GSSG , образуемого из GSH под действием глутатионпероксидазы (ГП). Поскольку ГП является неспецифическим ферментом и взаимодействует как с перокси-

дом водорода, так и с гидропероксидами, в экстрактах первоначально измерялось суммарное содержание пероксида водорода и гидропероксида, а после добавления в реакционную среду каталазы отдельно измерялось содержание гидропероксида. Свободная концентрация пероксида водорода рассчитывалась вычитанием концентрации гидропероксидов из суммарного содержания пероксида водорода + гидропероксидов и выражалась в мкмоль/литр. Реакционная смесь (1 мл) состояла из 100 мМ Tris-HCl (pH 7,6); 0,2 мМ Na-ЭДТА ; 5 мМ GSH ; 25 мкл экстракта эритроцитов; 250 мкМ NADPH ; 0,3 ед. ГП; ± 28 ед. каталазы и 0,5 ед. ГР.

Определение восстановленного и окисленного глутатиона в эритроцитах. Для стабилизации GSH и GSSG кровь (20 мкл) быстро смешивали со 100 мкл 10 мМ HCl . После осаждения белков сульфосалициловой кислотой (конечная концентрация – 1%) пробы центрифугировали 5 мин, 10 000 g, +4 °C. Прозрачный супернатант использовали для определения суммарного глутатиона ($\text{GSH} + \text{GSSG}$) спектрофотометрическим методом, основанным на системе рециркуляции GSH , который в присутствии ГР образует комплекс с 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислотой, регистрируемый при 412 нм [31]. Расчет концентрации суммарного глутатиона проводили с использованием калибровочной кривой. Определение концентрации GSSG проводили в присутствии 2-винилпиридина, ингибитора, препятствующего окислению GSH в GSSG . Получение проб и измерение концентрации GSSG проводили вышеуказанным способом. Концентрацию выражали в мкмоль/литр. Концентрацию GSH рассчитывали путем вычитания GSSG из суммы $\text{GSH} + \text{GSSG}$.

Определение активности ферментов в эритроцитах. Активность супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1) определяли спектрофотометрически по снижению скорости восстановления красителя p -нитротетразолиевого синего (NTB) в ксантин-ксантиноксидазной системе при 550 нм и 25 °C [32]. За единицу активности принимали количество фермента, которое вызывало 50%-ное торможение реакции восстановления NTB. Активность глутатионпероксидазы (ГП, КФ 1.11.1.9) определяли спектрофотометрически по снижению светопоглощения при 340 нм и 25 °C при окислении NADPH окисленным глутатионом [33]. Активность фермента выражали в мкмоль/мин на 1 мл клеток. Активность глутатионредуктазы (ГР, КФ 1.6.4.2) определяли по скорости окисления NADPH при 340 нм под действием

окисленного глутатиона [34]. Активность фермента выражали в мкмоль/мин на 1 мл клеток. Активность каталазы (КФ 1.11.1.6) определяли по снижению величины поглощения при 240 нм в реакции с пероксидом водорода [35]. Активность фермента выражали в величинах константы скорости реакции первого порядка (s^{-1} на 1 мл клеток). Активность глутатионтрансферазы (ГТ, КФ 2.5.1.18) определяли по скорости связывания GSH с 1-хлор-2,4-динитробензолом при 340 нм [36]. Активность фермента выражали в мкмоль/мин на 1 мл клеток. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ, КФ 1.1.1.49) определяли спектрофотометрически по увеличению светопоглощения при восстановлении $NADP^+$ при 340 нм, 37 °С [37]. Активность фермента выражали в мкмоль/мин на 1 мл клеток.

Все показатели плазмы крови и эритроцитов были измерены на спектрофотометре СФ-2000 (Россия) и спектрофлуориметре Cary Eclipse («Varian», Австралия) с использованием стандартных методов, разработанных международным комитетом по стандартизации в гематологии [28], и при помощи методов, описанных в Methods of enzymatic analysis под ред. Bergmeyer [38].

Статистический анализ выполняли с помощью компьютерной программы Prizm 5.00 («GraphPad Software», США). Результаты выражали в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего. Нормальность распределения переменных подтвердили с помощью

критерия Колмогорова–Смирнова. Различия между группами анализировали с использованием *t*-теста Стьюдента, а при множественных сравнениях – метода ANOVA с поправкой Бонферрони.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние МК-801 на концентрацию аммиака в плазме и эритроцитах крыс с острой гипераммониемией. Мы показали ранее, что МК-801 в значительной степени снижал уровень аммиака в мозге крыс с аммиачной интоксикацией [39]. Для выявления аналогичной роли NMDA-R в циркулирующих эритроцитах мы исследовали влияние МК-801 на уровень аммиака в эритроцитах и в плазме животных всех исследуемых групп (рис. 1).

Как видно из рис. 1, *а*, содержание аммиака в плазме крыс контрольной группы составляло $0,166 \pm 0,021$ ммоль/литр, что входит в допустимый диапазон значений, соответствующих физиологической норме для этих животных [3, 4, 39]. После введения ацетата аммония концентрация аммиака в плазме крыс достоверно повышалась до $2,335 \pm 0,190$ мМ ($p < 0,001$), а у животных, получавших МК-801, – не отличалась от контрольных значений. При совместном введении МК-801 с ацетатом аммония концентрация аммиака уменьшалась до $1,875 \pm 0,019$ мМ ($p < 0,001$), то есть частично и всего лишь на 20% по сравнению

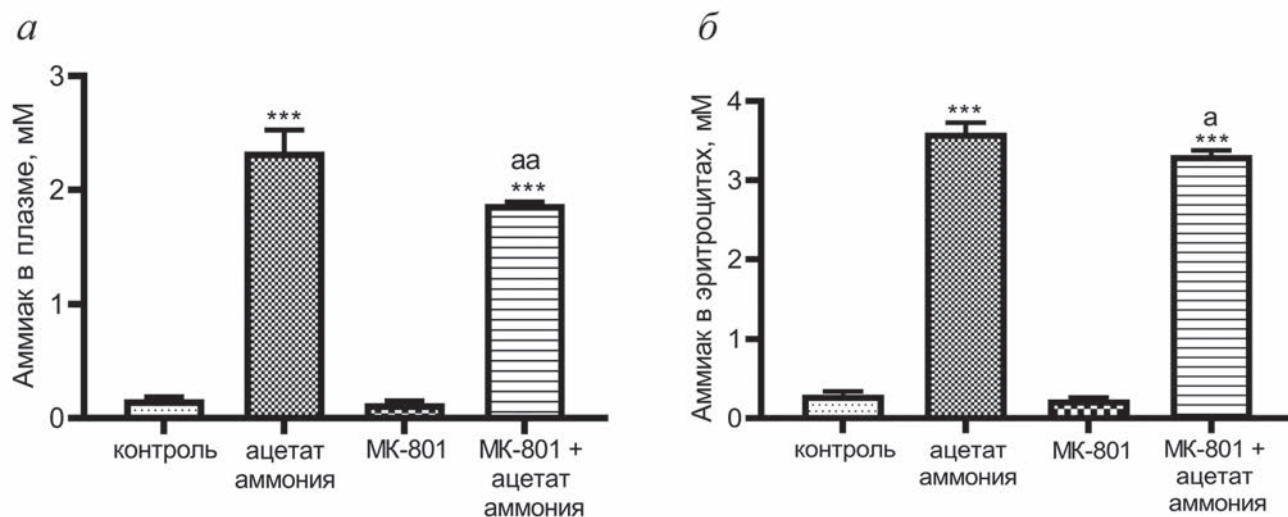


Рис. 1. Концентрация аммиака в плазме (*а*) и эритроцитах (*б*) животных из разных экспериментальных групп. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор. Животным группы «ацетат аммония» вводили ацетат аммония в дозе 7 ммоль/кг, животным группы «МК-801» вводили МК-801 в дозе 2,0 мг/кг. Животным группы «МК-801 + ацетат аммония» вводили МК-801 в дозе 2,0 мг/кг и через 15 мин – ацетат аммония в дозе 7 ммоль/кг. Все инъекции производили в/б. Декапитация животных, получение проб и метод определения концентрации аммиака указаны в разделе «Материалы и методы». Результаты представлены в виде «среднее \pm SEM». *** $p < 0,001$ – по сравнению с животными контрольной группы; а – $p < 0,05$, aa – $p < 0,01$ – по сравнению с животными группы «ацетат аммония»

с концентрацией, обнаруженной у ГА-животных (рис. 1, а). Из рис. 1, б видно, что концентрация аммиака в эритроцитах животных всех исследуемых групп выше, чем в плазме. В эритроцитах контрольных крыс содержание аммиака составляло $0,300 \pm 0,038$ ммоль/литр. После введения ацетата аммония уровень аммиака в эритроцитах возрос до $3,602 \pm 0,126$ мМ ($p < 0,001$), тогда как в эритроцитах животных, получавших МК-801, этот показатель не отличался от нормы ($0,237 \pm 0,023$ мМ), а после введения МК-801 в сочетании с ацетатом аммония концентрация аммиака незначительно, но достоверно ($p < 0,05$) снизилась до $3,320 \pm 0,06$ мМ. Полученные результаты свидетельствуют о том, что активация NMDA-R в эритроцитах или, точнее, активация путей передачи сигнала NMDA-R в незначительной степени влияет на накопление аммиака в эритроцитах. Это частично согласуется с литературными данными, указывающими на то, что внутриэритроцитарная концентрация аммиака зависит от многих факторов, в частности, от скорости его пассивной диффузии (NH_3 , незаряженная форма) [40], пропорциональной его концентрации в крови, активности специфических транспортеров аммиака, локализованных на мембране эритроцитов [41], рН, температуры [42], а также от активности ферментов, катализирующих эндогенные аммиак-образующие реакции [43]. Выявленное нами наличие градиента аммиака между плазмой и эритроцитами (концентрация аммиака в эритроцитах выше, чем в плазме) у контрольных животных (рис. 1) соответствует нормальному распределению аммиака в крови человека и крыс [44]. Сохранение же этого градиента при значительном накоплении аммиака в эритроцитах ГА-животных (рис. 1) свидетельствовало о том, что эритроциты являются временным депо аммиака [45], что может иметь ряд патологических последствий как для самих эритроцитов, так и для всего организма в целом. И в первую очередь из-за того, что эритроциты — это самые многочисленные клетки крови и высвобождение ими накопившегося аммиака, зависящее от многих факторов [43], непредсказуемым образом может увеличивать его концентрацию в крови и, соответственно, приводить к ошибочным выводам относительно степени его накопления в мозге и невозможности оказания своевременной лечебной помощи пациентам. Кроме того, эритроциты крыс и человека не содержат ни глутаминсинтетазу, ни глутаматдегидрогеназу (в отличие от других тканей), которые могли бы снизить аммиачную нагрузку на сами клетки, превра-

щая накопленный аммиак в глутамин и глутамат соответственно. И именно этим может объясняться особенная чувствительность эритроцитов к токсическому действию аммиака, которое проявляется в виде более серьезных функциональных нарушений, включая те, которые влияют на доставку кислорода в ткани, зависящую в первую очередь от энергетического обмена и системы антиоксидантной защиты [25], метаболиты и ферменты которых, как уже было сказано, контролируют сродство гемоглобина к кислороду [26]. Однако не исключено, что быстрое накопление NH_3 в эритроцитах, вызывающее защелачивание внутриклеточной среды [46], дополнительно может приводить к увеличению сродства гемоглобина к кислороду, что тоже будет способствовать ограниченному переходу кислорода в ткани [47].

Влияние аммиака и МК-801 на антиоксидантный статус эритроцитов крыс. Учитывая положительную корреляцию между накопившимся аммиаком в клетках мозга и окислительным стрессом, который полностью подавлялся МК-801 [48], в настоящем исследовании мы оценили, связано ли накопление аммиака в эритроцитах, имеющих NMDA-R на поверхности мембран, с нарушением антиоксидантной защиты клеток. Мы измерили активность антиоксидантных ферментов СОД, каталазы, ГР, ГП, ГТ, Г6ФДГ в эритроцитах крыс всех исследуемых групп. Кроме того, мы измерили содержание GSH и GSSG, а также пероксида водорода в эритроцитах и оценили действие МК-801 на эти показатели. Как показано на рис. 2 (а–в и д), введение ацетата аммония в разной степени снижало ферментативную активность антиоксидантных ферментов в эритроцитах животных. Так, активность СОД, каталазы, ГП, ГТ снижалась на 69% ($p < 0,001$), 25% ($p < 0,05$), 29% ($p < 0,05$) и 20% ($p < 0,01$) соответственно, тогда как активность ГР при аммиачной интоксикации не отличалась от контрольных значений (рис. 2, з).

Активность всех указанных ферментов, измеренная после введения МК-801, не отличалась от контрольных значений. При совместном введении МК-801 и ацетата аммония только активность СОД повышалась на 144% ($p < 0,001$) (рис. 2, а) при сравнении с активностью, обнаруженной в эритроцитах ГА-животных, но при этом не достигала контрольного значения. Полученные результаты свидетельствовали о том, что аммоний-индуцированное торможение указанных антиоксидантных ферментов не связано исключительно с эффектами, опосредованными активацией NMDA-R, хотя очевидно, что активация этих рецепторов

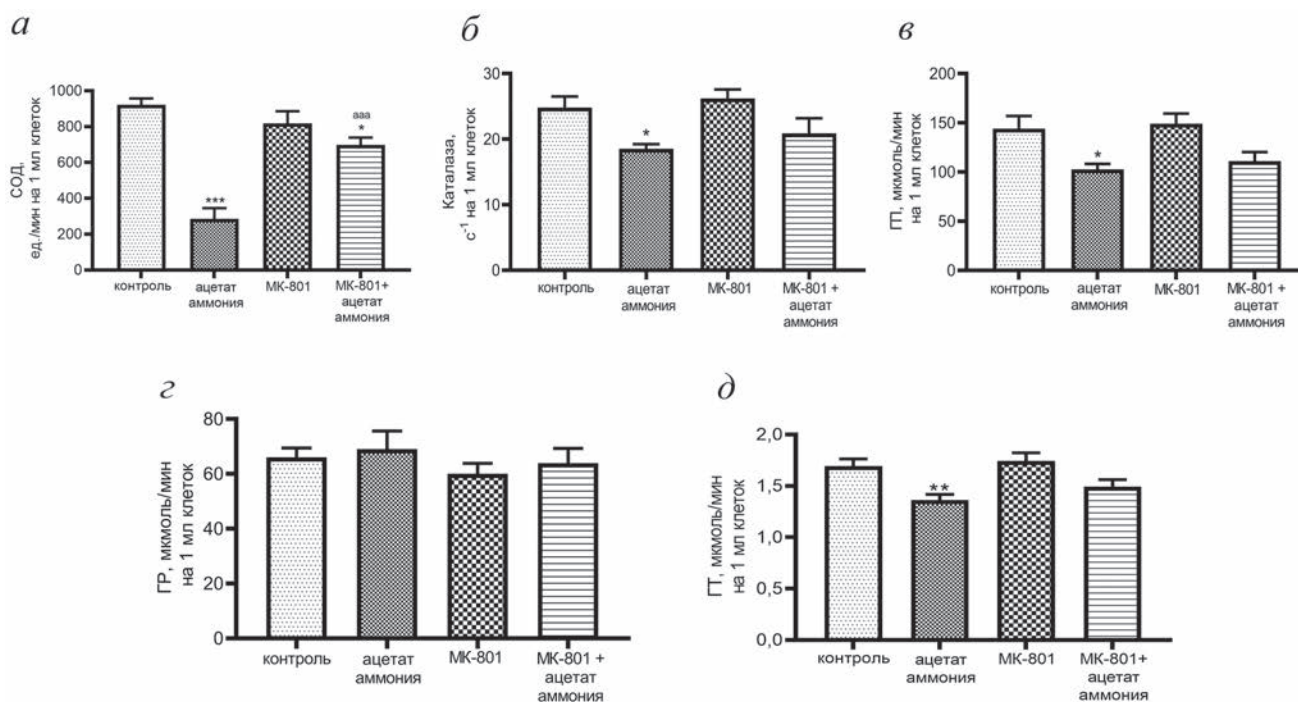


Рис. 2. Активность антиоксидантных ферментов СОД (а), каталазы (б), ГП (в), ГР (г) и ГТ (д) в эритроцитах животных из разных экспериментальных групп. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор. Животным группы «ацетат аммония» вводили ацетат аммония в дозе 7 ммоль/кг, животным группы «МК-801» вводили МК-801 в дозе 2,0 мг/кг. Животным группы «МК-801 + ацетат аммония» вводили МК-801 в дозе 2,0 мг/кг и через 15 мин – ацетат аммония в дозе 7 ммоль/кг. Все инъекции производили в/б. Декапитация животных, получение проб и методы определения активности антиоксидантных ферментов указаны в разделе «Материалы и методы». Результаты представлены в виде «среднее ± SEM». * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ – по сравнению с животными контрольной группы; aaaa – $p < 0,001$ – по сравнению с животными группы «ацетат аммония»

является важным этапом в развитии аммоний-индуцированного нарушения антиоксидантного статуса эритроцитов, предшествующего развитию окислительного стресса.

Ранее мы показали, что сниженная активность СОД, каталазы, ГП и ГТ в митохондриях, выделенных из неокортекса и печени крыс с ГА, восстанавливалась до контрольных значений ингибитором NO-синтазы, нитроаргинином, введенным совместно с ацетатом аммония [49]. Эти данные указывали на то, что главным ингибитором антиоксидантных ферментов в мозге и печени в условиях ГА является NO-радикал (NO^{\bullet}), образование которого усиливается в клетках в результате Ca^{2+} -зависимого сигнального каскада, запускаемого гиперактивированными NMDA-R [6]. Следует отметить, что патологическая роль NMDA-R эритроцитов полностью не определена, что частично объясняется наличием в крови множества агонистов и антагонистов, концентрация которых непредсказуемым образом может меняться при каждом конкретном заболевании. Однако если учесть наличие в эритроцитах взаимосвязи между активацией NMDA-R и Ca^{2+} -зависимым образованием NO^{\bullet} [11], то, согласно нашим данным, только сниженная

активность СОД в эритроцитах ГА-животных (которая восстанавливалась при совместном введении МК-801 и ацетата аммония) может объясняться указанным сигнальным каскадом, запускаемым активированными NMDA-R. Причины аммоний-индуцированного торможения эритроцитарных ГТ, ГП и каталазы (их активность не восстанавливалась сочетанным введением МК-801 и ацетата аммония) в настоящее время неизвестны, хотя не исключено, что их торможение тоже может быть Ca^{2+} /NO-зависимым, как, например, в случае разрушения тетрамерной структуры мембранного спектрина индукторами окислительного стресса, делающими мембрану эритроцитов проницаемой для Ca^{2+} [50]. Кроме того, учитывая потребность ГТ, ГП и каталазы в NADPH и в GSH [51], можно предположить, что именно недостаток этих факторов в эритроцитах ГА-животных (рис. 4, а и 5, б) лежит в основе торможения вышеуказанных ферментов, хотя очевидно, что причины торможения могут быть множественными и для их выявления требуются дополнительные исследования.

Изменение концентрации пероксида водорода в эритроцитах ГА-животных, влияние МК-801. При сниженной нейтрализующей активности

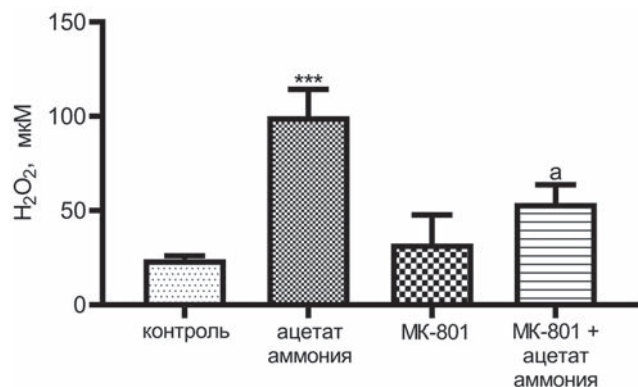


Рис. 3. Концентрация H₂O₂ в эритроцитах животных разных экспериментальных групп. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор. Животным группы «ацетат аммония» вводили ацетат аммония в дозе 7 ммоль/кг, животным группы «МК-801» вводили МК-801 в дозе 2,0 мг/кг. Животным группы «МК-801 + ацетат аммония» вводили МК-801 в дозе 2,0 мг/кг и через 15 мин – ацетат аммония в дозе 7 ммоль/кг. Все инъекции производили в/б. Декапитация животных, получение проб и метод определения концентрации H₂O₂ указаны в разделе «Материалы и методы». *** $p < 0,001$ – по сравнению с животными контрольной группы; а – $p < 0,05$ – по сравнению с животными группы «ацетат аммония»

внутриклеточных антиоксидантных ферментов пероксид водорода, поступающий в эритроциты из экзогенных источников [52] и образуемый в клетках эндогенно [53], является главным прооксидантом, который инициирует развитие окислительного стресса, приводящего к нарушению кислородтранспортной функции эритроцитов [54]. Обнаруженное нами достоверное уменьшение активности основных антиоксидантных ферментов, разрушающих пероксид водорода, каталазы и ГП (рис. 2, б и в) в эритроцитах крыс с ГА, указывало на возможность избыточного накопле-

ния пероксида водорода в эритроцитах этих животных.

Действительно, концентрация пероксида водорода резко возрастала в эритроцитах крыс с ГА ($100,1 \pm 14,23$ мкМ; $p < 0,001$) при сравнении с концентрацией, обнаруженной в эритроцитах животных контрольной группы ($24,19 \pm 1,801$ мкМ) (рис. 3).

Значения, полученные после введения МК-801, достоверно не отличались от контрольных, а при совместном введении МК-801 и ацетата аммония уровень пероксида водорода в эритроцитах животных снижался в 2 раза ($54,07 \pm 9,59$ мкМ) по сравнению с уровнем, измеренным в эритроцитах животных с аммонийной интоксикацией, но оставался в 2 раза завышенным по сравнению с контрольным значением ($24,19 \pm 1,801$ мкМ). Это указывало на то, что и нарушение гомеостаза пероксида водорода в эритроцитах ГА-животных, как и торможение активности антиоксидантных ферментов (рис. 2), частично зависит от гиперактивации NMDA-R, и подтверждало наличие других многочисленных факторов, регулирующих внутриклеточную концентрацию пероксида водорода в эритроцитах [53, 55].

Изменение концентрации восстановленного и окисленного глутатиона в эритроцитах ГА-животных, влияние МК-801. Поскольку одной из важных причин, приводящих к накоплению пероксида водорода в эритроцитах, является значительное истощение GSH и накопление GSSG [56], мы измерили концентрацию обеих форм глутатиона в эритроцитах животных всех исследуемых групп. Как видно из рис. 4, а, концентрация GSH в эритроцитах животных после введения им ацетата аммония

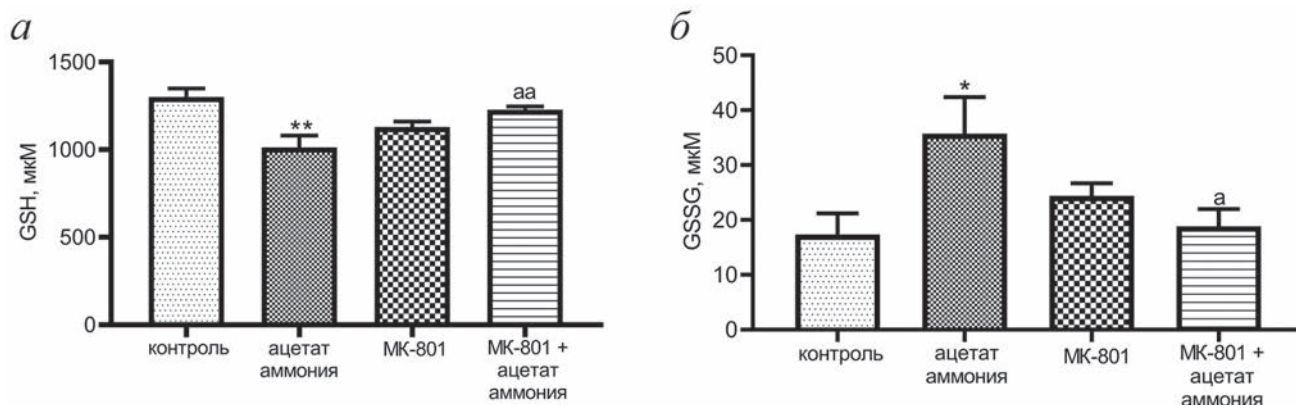


Рис. 4. Концентрация GSH (а) и GSSG (б) в эритроцитах животных разных экспериментальных групп. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор. Животным группы «ацетат аммония» вводили ацетат аммония в дозе 7 ммоль/кг; животным группы «МК-801» вводили МК-801 в дозе 2,0 мг/кг. Животным группы «МК-801 + ацетат аммония» вводили МК-801 в дозе 2,0 мг/кг и через 15 мин – ацетат аммония в дозе 7 ммоль/кг. Все инъекции производили в/б. Декапитация животных, получение проб и метод определения концентрации GSH и GSSG указаны в разделе «Материалы и методы». * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ – по сравнению с животными контрольной группы; а – $p < 0,05$, аа – $p < 0,01$ – по сравнению с животными группы «ацетат аммония»

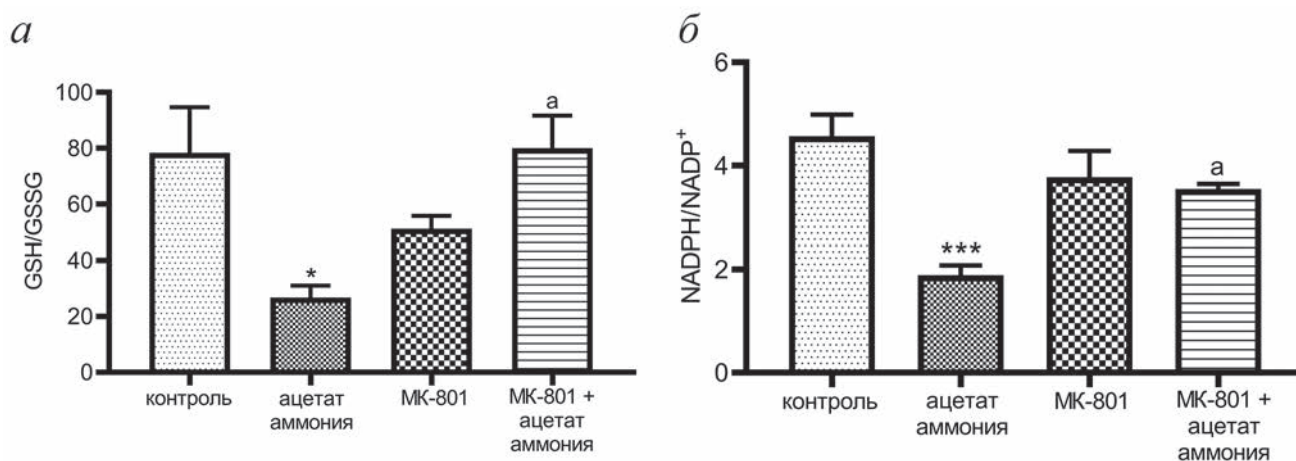


Рис. 5. Отношение GSH/GSSG (а) и отношение NADPH/NADP⁺ (б) в эритроцитах животных разных экспериментальных групп. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор. Животным группы «ацетат аммония» вводили ацетат аммония в дозе 7 ммоль/кг; животным группы «МК-801» вводили МК-801 в дозе 2,0 мг/кг. Животным группы «МК-801 + ацетат аммония» вводили МК-801 в дозе 2,0 мг/кг и через 15 мин – ацетат аммония в дозе 7 ммоль/кг. Все инъекции производили в/б. Декапитация животных и получение проб указаны в разделе «Материалы и методы». Отношение [NADPH]/[NADP⁺] рассчитывали по компонентам реакции, катализируемой Г6ФДГ ([NADPH]/[NADP⁺] = [глюкозо-6-фосфат]/[6-фосфоглюконолактон]) [58], константа равновесия которой равна 1,3 [59]. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ – по сравнению с животными контрольной группы; а – $p < 0,05$ – по сравнению с животными группы «ацетат аммония»

достоверно снижалась на 22% ($p < 0,01$) по сравнению с контролем. Показатели, полученные после инъекции МК-801, не отличались от контрольных значений, а при совместном введении МК-801 с ацетатом аммония концентрация GSH увеличивалась на 21% по отношению к значениям, измеренным в эритроцитах ГА-животных, и достоверно не отличалась от контрольного значения (рис. 4, а).

Концентрация GSSG в эритроцитах ГА-животных, напротив, достоверно увеличивалась в 2 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$; рис. 4, б), но после инъекции МК-801 – не отличалась от контрольных значений. Предварительная инъекция МК-801 достоверно снижала содержание GSSG ($18,86 \pm 3,111$ мкМ; $p < 0,05$), увеличенное введением ацетата аммония ($35,74 \pm 6,644$ мкМ) до контрольного значения ($17,37 \pm 3,815$ мкМ). В соответствии с этими показателями изменялось и отношение GSH/GSSG в эритроцитах животных всех исследуемых групп. Из рис. 5, а видно, что введение ацетата аммония животным уменьшало отношение GSH/GSSG почти в 3 раза, тогда как блокада NMDA-R с помощью МК-801 не только полностью и достоверно ($p < 0,05$) предотвращала аммоний-индуцированное снижение отношения, но и восстанавливала его значение до контрольного уровня (рис. 5, а). Из этого следует, что аммоний-индуцированное нарушение окислительно-восстановительного баланса эритроцитов, определяемого отношением GSH/GSSG, опосредованно активацией NMDA-R.

Окислительно-восстановительный статус эритроцитов, в свою очередь, зависит от доступности NADPH, регулирующего рециркуляцию GSH [57], необходимого для разрушения пероксида водорода в глутатионпероксидазной/редуктазной реакциях. Из рис. 5, б видно, что отношение NADPH/NADP⁺ в эритроцитах контрольных животных составляло $4,570 \pm 0,421$, а при введении животным ацетата аммония это отношение достоверно уменьшалось до $1,891 \pm 0,188$ ($p < 0,001$). Отношение, рассчитанное для эритроцитов крыс с инъекцией МК-801, не отличалось от контрольного значения, а при совместном введении МК-801 с ацетатом аммония это отношение повышалось до $3,774 \pm 0,513$ и достоверно не отличалось от отношения, рассчитанного для эритроцитов животных контрольной группы. Это свидетельствовало о том, что сниженное производство NADPH в эритроцитах животных с аммонийной интоксикацией полностью предотвращалось МК-801 и что стационарная концентрация главного кофактора, регулирующего доступность GSH, необходимого для разрушения H₂O₂ в глутатионпероксидазной/редуктазной реакциях, зависит от активации NMDA-R.

Влияние ацетата аммония на активность Г6ФДГ в эритроцитах крыс, роль МК-801. NADPH образуется в эритроцитах исключительно в пентозофосфатном пути, первую реакцию которого катализирует Г6ФДГ. Согласно литературным данным, снижение активности этого фермента в эритроцитах, причем независимо от степени его торможения,

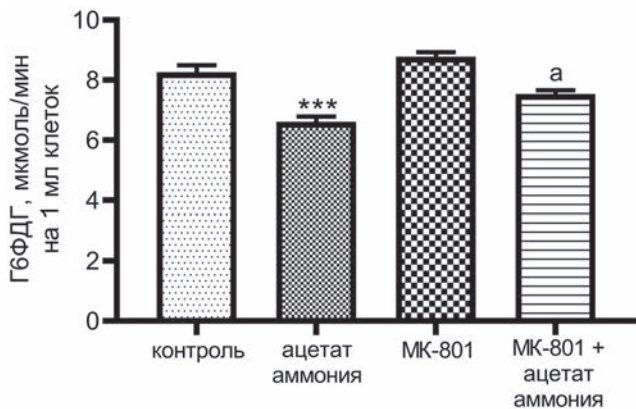


Рис. 6. Активность Г6ФДГ в эритроцитах животных из разных экспериментальных групп. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор. Животным группы «ацетат аммония» вводили ацетат аммония в дозе 7 ммоль/кг; животным группы «МК-801» вводили МК-801 в дозе 2,0 мг/кг. Животным группы «МК-801 + ацетат аммония» вводили МК-801 в дозе 2,0 мг/кг и через 15 мин – ацетат аммония в дозе 7 ммоль/кг. Все инъекции производили в/б. Декапитация животных, получение проб и метод определения активности Г6ФДГ указаны в разделе «Материалы и методы». Результаты представлены в виде «среднее \pm SEM». *** $p < 0,001$ – по сравнению с животными контрольной группы; а – $p < 0,05$ – по сравнению с животными группы «ацетат аммония»

приводит к развитию окислительного стресса из-за недостатка NADPH [60]. Для выявления подобной взаимосвязи в эритроцитах крыс с острой ГА мы измерили активность Г6ФДГ в эритроцитах животных всех экспериментальных групп (рис. 6).

Было обнаружено, что активность Г6ФДГ в эритроцитах животных с аммонийной интоксикацией достоверно уменьшалась (20%; $p < 0,001$) при сравнении с контрольными показателями (рис. 6). Значения, полученные после введения МК-801, не отличались от контроля, а при совместном введении МК-801 с ацетатом аммония активность фермента на 14% ($p < 0,05$) превысила активность, измеренную в эритроцитах крыс с ГА, и достоверно не отличалась от контрольных значений. Полученные результаты показали, что активность Г6ФДГ, главного фермента эритроцитов, определяющего чувствительность клеток к действию прооксидантов, зависит от функции NMDA-R и подтвердили известную точку зрения о том, что повышенная чувствительность эритроцитов к агентам-прооксидантам и, как в нашем исследовании, к прооксидантному действию аммиака, наблюдаемая даже при незначительном дефиците Г6ФДГ (20%) [61], возникает как прямое следствие снижения концентрации NADPH, которая, как было сказано выше, тоже регулируется активностью NMDA-R эритроцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты впервые показали, что при ГА большая часть аммиака накапливается не в плазме, а в эритроцитах, что делает эти клетки, лишённые аммиак-обезвреживающих ферментов, наиболее восприимчивыми к его прооксидантному действию. Аммиак-индуцированный окислительный стресс в эритроцитах животных с ГА, выявленный по повышенному содержанию пероксида водорода и сниженной активности антиоксидантных ферментов, частично или полностью предотвращался блокатором NMDA-R, МК-801 (рис. 7).

Полученные результаты дают возможность предположить, что патогенез ГЭ является многофакторным и что аммоний-индуцированный окислительный стресс в эритроцитах, лежащий в основе нарушения кислородтранспортной функции этих клеток [54] и приводящий к гипоксическому повреждению мозга [22, 62], может указывать на существование дополнительной причинно-следственной взаимосвязи: «заболевания печени \leftrightarrow повреждение эритроцитов \leftrightarrow дисфункция мозга».

Следовательно, можно ожидать, что токсические эффекты аммиака при ГЭ могут быть более глобальными, чем это считалось ранее. Мы уверены, что тщательное изучение показателей метаболических/энергетических путей в эритроцитах, модулирующих их кислородтранспортную функцию, помогут выявить дополнительный фактор риска в развитии когнитивных нарушений и неблагоприятного прогноза, связанного с гипоперфузией и энцефалопатией у пациентов с повышенной концентрацией аммиака в крови и особенно у людей старшего поколения, для эритроцитов которых характерны возрастные нарушения многих биохимических процессов, протекающих в мембранах и внутри клеток [23]. Кроме того, во избежание ошибок при постановке диагноза у пациентов с заболеваниями печени, уровень аммиака должен измеряться одновременно и в плазме крови, и в эритроцитах особенно в тех случаях, когда клинические симптомы заболевания не коррелируют с измеренной концентрацией аммиака в плазме [63, 64].

В целом, проведенные исследования расширяют наше понимание роли аммиака в патогенезе энцефалопатии, которая может быть гораздо шире (с вовлечением в патологический процесс эритроцитов, главных компонентов интегрированной системы транспорта кислорода), чем это прогнозируется на основании принятой в научном мире гипотезы, согласно

которой повышение концентрации аммиака в крови из-за неспособности печени выполнять детоксикационную функцию является основной причиной исключительно повреждения мозга.

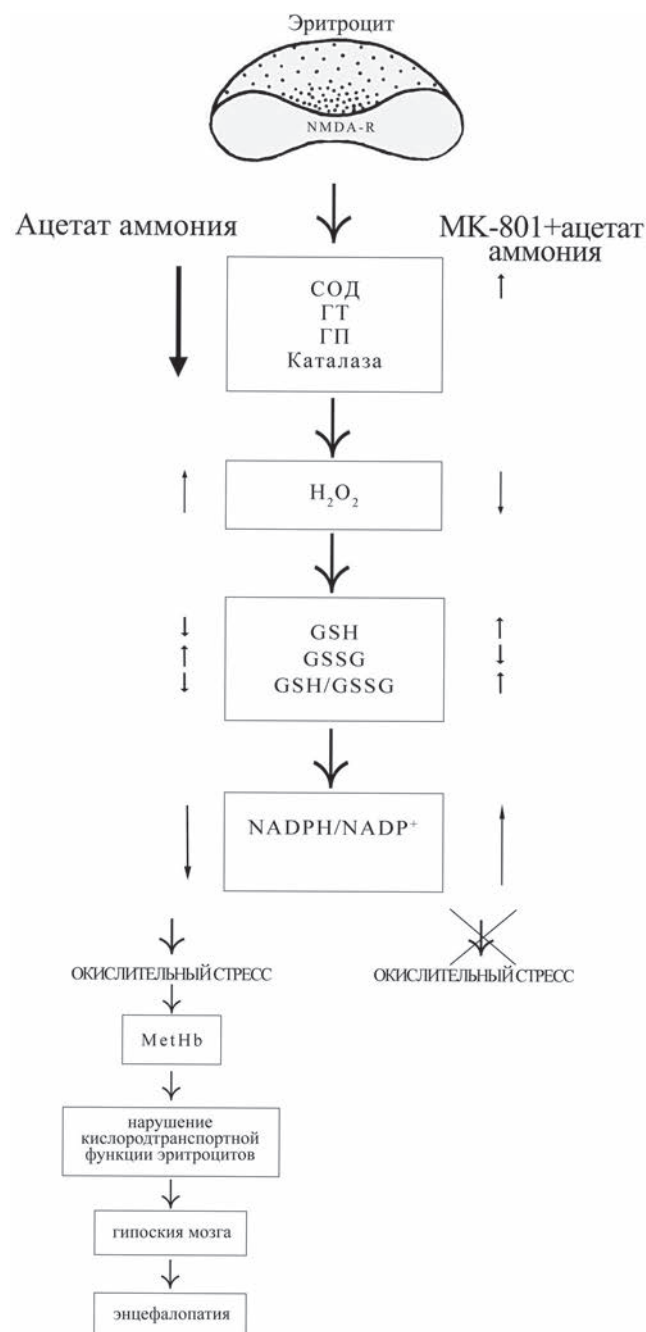


Рис. 7. Гипотетическая схема опосредованного NMDA-рецепторами аммоний-индуцированного нарушения антиоксидантного статуса в эритроцитах. При ГА аммиак накапливается в эритроцитах. Отсутствие аммиак-обезвреживающих ферментов в эритроцитах делает эти клетки наиболее восприимчивыми к прооксидантному действию аммиака, которое выявляется по повышенной содержанию пероксида водорода и сниженной активности антиоксидантных ферментов. Этот эффект частично или полностью предотвращается блокатором NMDA-R, МК-801

ОГРАНИЧЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Существует ряд ограничений нашего исследования, которые должны быть упомянуты. Во-первых, мы не провели корреляционный анализ между концентрацией аммиака в эритроцитах крыс с ГА и показателями антиоксидантной системы, что, очевидно, ограничивает получение более полной картины связей между анализируемыми метаболитами и ферментами в эритроцитах и аммиаком, накопившимся в этих клетках. Во-вторых, мы не провели сравнительный анализ Ca^{2+} -зависимого сигнального каскада, запускаемого гиперактивными NMDA-R в мозге и в эритроцитах, в результате чего роль NO-радикала в торможении ферментов антиоксидантной защиты в эритроцитах крыс с ГА осталась только предположительной. Мы полагаем, что исследования, проведенные *in vivo* и *in vitro* в присутствии ингибиторов NO-синтазы и генераторов NO[•], позволят получить более точную картину однотипности или различий между NMDA-R-зависимым каскадом в мозге и в не нейрональных тканях и, в частности, в эритроцитах. Очевидно, что для более полного понимания роли аммиака и NMDA-R в повреждении эритроцитов при ГА, приводящей к энцефалопатии, необходимо проведение дальнейших исследований.

Вклад авторов. Е.А. Косенко – концепция и руководство работой, написание текста статьи; Л.А. Тихонова и Г.А. Алилова – проведение экспериментов; Е.А. Косенко, Л.А. Тихонова и Г.А. Алилова – обсуждение результатов исследования и редактирование текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-25-00133); <https://rscf.ru/project/23-25-00133/>.

Благодарности. В работе использовали оборудование (спектрофлуориметр Cary Eclipse («Varian», Австралия)) центра коллективного пользования ИТЭБ РАН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Экспериментальные процедуры были выполнены с соблюдением правил гуманного обращения с животными в соответствии с Европейскими правилами по использованию лабораторных животных 1986 г. (пересмотренными в Директиве 2010/63/EU Совета Европы). Все протоколы были одобрены Комиссией по биологической безопасности и биоэтике ИТЭБ РАН (протокол № 31/2023 от 15.02.2023).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Butterworth, R. F. (1992) Pathogenesis and treatment of portal-systemic encephalopathy: An update, *Dig. Dis. Sci.*, **37**, 321-327, doi: 10.1007/BF01307722.
- Von Frerichs, F. T. (1860) *A Clinical Treatise on Diseases of the Liver by Dr Friedrich Theodor Frerichs*, The New Sydenham Society, London, **V1**, pp. 193-246.
- Butterworth, R. F., Giguère, J. F., Michaud, J., Lavoie, J., and Layrargues, G. P. (1987) Ammonia: key factor in the pathogenesis of hepatic encephalopathy, *Neurochem. Pathol.*, **6**, 1-12, doi: 10.1007/BF02833598.
- Cooper, A. J., and Plum, F. (1987) Biochemistry and physiology of brain ammonia, *Physiol. Rev.*, **67**, 440-519, doi: 10.1152/physrev.1987.67.2.440.
- Kosenko, E., Felipo, V., Montoliu, C., Grisolia, S., and Kaminsky, Y. (1997) Effects of acute hyperammonemia *in vivo* on oxidative metabolism in non-synaptic rat brain mitochondria, *Metab. Brain Dis.*, **12**, 69-82, doi: 10.1007/BF02676355.
- Kosenko, E., Kaminsky, Y., Stavroskaya, I. G., and Felipo, V. (2000) Alteration of mitochondrial calcium homeostasis by ammonia-induced activation of NMDA receptors in rat brain *in vivo*, *Brain Res.*, **880**, 139-146, doi: 10.1016/S0006-8993(00)02785-2.
- Kosenko, E. A., Tikhonova, L. A., Alilova, G. A., Montoliu, C., Barreto, G. E., Aliev, G., and Kaminsky, Y. G. (2017) Portacaval shunting causes differential mitochondrial superoxide production in brain regions, *Free Radic. Biol. Med.*, **113**, 109-118, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.09.023.
- Kosenko, E., Kaminski, Y., Lopata, O., Muravyov, N., and Felipo, V. (1999) Blocking NMDA receptors prevents the oxidative stress induced by acute ammonia intoxication, *Free Radic. Biol. Med.*, **26**, 1369-1374, doi: 10.1016/S0891-5849(98)00339-6.
- Kosenko, E., Kaminsky, Y., Grau, E., Miñana, M. D., Grisolia, S., and Felipo, V. (1995) Nitroarginine, an inhibitor of nitric oxide synthetase, attenuates ammonia toxicity and ammonia-induced alterations in brain metabolism, *Neurochem. Res.*, **20**, 451-456, doi: 10.1007/BF00973101.
- Monfort, P., Kosenko, E., Erceg, S., Canales, J.-J., and Felipo, V. (2002) Molecular mechanism of acute ammonia toxicity: role of NMDA receptors, *Neurochem. Int.*, **41**, 95-102, doi: 10.1016/S0197-0186(02)00029-3.
- Makhro, A., Wang, J., Vogel, J., Boldyrev, A. A., Gassmann, M., Kaestner, L., and Bogdanova, A. (2010) Functional NMDA receptors in rat erythrocytes, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **298**, C1315-C1325, doi: 10.1152/ajpcell.00407.2009.
- Perazzo, J. C., Tallis, S., Delfante, A., Souto, P. A., Lemberg, A., Eizayaga, F. X., and Romay, S. (2012) Hepatic encephalopathy: An approach to its multiple pathophysiological features, *World J. Hepatol.*, **4**, 50-65, doi: 10.4254/wjh.v4.i3.50.
- Sener, A., Hutton, J. C., Kawazu, S., Boschero, A. C., Somers, G., Devis, G., Herchuelz, A., and Malaisse, W. J. (1978) The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Metabolic and functional effects of NH₄⁺ in rat islets, *J. Clin. Invest.*, **62**, 868-878, doi: 10.1172/JCI109199.
- Gupte, P., and Nagral, A. (2009) Hematological problems and liver disease, *Trop. Gastroenterol.*, **30**, 65-70.
- Singh, S., Manrai, M., Parvathi, V. S., Kumar, D., Srivastava, S., and Pathak, B. (2020) Association of liver cirrhosis severity with anemia: does it matter? *Ann. Gastroenterol.*, **33**, 272-276, doi: 10.20524/aog.2020.0478.
- Owen, J. S., Brown, D. J., Harry, D. S., McIntyre, N., Beaven, G. H., Isenberg, H., and Gratzner, W. B. (1985) Erythrocyte echinocytosis in liver disease. Role of abnormal plasma high density lipoproteins, *J. Clin. Invest.*, **76**, 2275-2285, doi: 10.1172/JCI112237.
- Djiambou-Nganjeu, H. (2017) Hepatic encephalopathy in liver cirrhosis, *J. Transl. Int. Med.*, **5**, 64-67, doi: 10.1515/jtim-2017-0013.
- Senzolo, M., and Burroughs, A. K. (2007) Haematological abnormalities in liver disease, In *Textbook of Hepatology* (Rodés, J., Benhaumou, J. P., Blei, A. T., Reichen, J., and Rizzetto, M., eds) Oxford, Blackwell Sci. Pub., pp. 1767-1779, doi: 10.1002/9780470691861.ch21c.
- Moreau, R., Lee, S. S., Hadengue, A., Ozier, Y., Sicot, C., and Lebrec, D. (1989) Relationship between oxygen transport and oxygen uptake in patients with cirrhosis: effects of vasoactive drugs, *Hepatology*, **9**, 427-432, doi: 10.1002/hep.1840090314.
- Bailey, D. M., Willie, C. K., Hoiland, R. L., Bain, A. R., MacLeod, D. B., Santoro, M. A., DeMasi, D. K., Andrijanic, A., Mijacika, T., Barak, O. F., Dujic Z., and Ainslie P. N. (2017) Surviving without oxygen: how low can the human brain go? *High Alt. Med. Biol.*, **18**, 73-79, doi: 10.1089/ham.2016.0081.
- Leithner, C., and Royle, G. (2014) The oxygen paradox of neurovascular coupling, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **34**, 19-29, doi: 10.1038/jcbfm.2013.181.
- Bosman, G. J. C. G. M. (2018) Disturbed red blood cell structure and function: an exploration of the role of red blood cells in neurodegeneration, *Front. Med. (Lausanne)*, **5**, 198, doi: 10.3389/fmed.2018.00198.
- Kosenko, E. A., Tikhonova, L. A., Montoliu, C., Barreto, G. E., Aliev, G., and Kaminsky, Y. G. (2017) Metabolic abnormalities of erythrocytes as a risk factor for Alzheimer's disease, *Front. Neurosci.*, **11**, 728, doi: 10.3389/fnins.2017.00728.
- Kosenko, E., Tikhonova, L., Alilova, G., and Montoliu, C. (2020) A look into liver mitochondrial

- dysfunction as a hallmark in progression of brain energy crisis and development of neurologic symptoms in hepatic encephalopathy, *J. Clin. Med.*, **9**, 2259, doi: 10.3390/jcm9072259.
25. Brewer, G. J., and Eaton, J. W. (1971) Erythrocyte metabolism: interaction with oxygen transport, *Science*, **171**, 1205-1211, doi: 10.1126/science.171.3977.1205.
26. Van Wijk, R., and van Solinge, W. W. (2005) The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis, *Blood*, **106**, 4034-4042, doi: 10.1182/blood-2005-04-1622.
27. Kosenko, E., Tikhonova, L., Alilova, G., and Montoliu, C. (2022) Is NMDA-receptor-mediated oxidative stress in mitochondria of peripheral tissues the essential factor in the pathogenesis of hepatic encephalopathy? *J. Clin. Med.*, **11**, 827, doi: 10.3390/jcm11030827.
28. Beutler, E., Blume, K. G., Kaplan, J. C., Löhr, G. W., Ramot, B., and Valentine, W. N. (1977) International committee for standardization in haematology: recommended methods for red-cell enzyme analysis, *Br. J. Haematol.*, **35**, 331-340, doi: 10.1111/j.1365-2141.1977.tb00589.x.
29. Kosenko, E. A., Venediktova, N. I., Kudryavtsev, A. A., Ataulakhanov, F. I., Kaminsky, Y. G., Felipo, V., and Montoliu, C. (2008) Encapsulation of glutamine synthetase in mouse erythrocytes: a new procedure for ammonia detoxification, *Biochem. Cell. Biol.*, **86**, 469-476, doi: 10.1139/O08-134.
30. Tappel, A. L. (1978) Glutathione peroxidase and hydroperoxides, *Methods Enzymol.*, **52**, 506-513, doi: 10.1016/s0076-6879(78)52055-7.
31. Anderson, M. E. (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples, *Methods Enzymol.*, **113**, 548-555, doi: 10.1016/s0076-6879(85)13073-9.
32. Beauchamp, C., and Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels, *Anal. Biochem.*, **44**, 276-287, doi: 10.1016/0003-2697(71)90370-8.
33. Lawrence, R. A., and Burk, R. F. (1976) Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 952-958, doi: 10.1016/0006-291x(76)90747-6.
34. Kosenko, E., Venediktova, N., Kaminsky, Y., Montoliu, C., and Felipo, V. (2003) Sources of oxygen radicals in brain in acute ammonia intoxication *in vivo*, *Brain Res.*, **981**, 193-200, doi: 10.1016/s0006-8993(03)03035-x.
35. Aebi, H. E. (1984) Catalase, in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H. U., ed) Verlag Chemie, Weinheim, Germany, Vol. 3, pp. 273-286.
36. Warholm, M., Guthenberg, C., von Bahr, C., and Mannervik, B. (1985) Glutathione transferases from human liver, *Methods Enzymol.*, **113**, 499-504, doi: 10.1016/s0076-6879(85)13065-x.
37. Beutler, E. (1971) *Red Cell Metabolism: a Manual of Biochemical Methods*, Grune and Stratton, New York, pp. 62-64.
38. Bergmeyer, H.-U. (2012) *Methods of Enzymatic Analysis*, Elsevier, ISBN 978-0-323-14177-2.
39. Kosenko, E., Kaminsky, Y., Grau, E., Miñana, M. D., Marcaida, G., Grisolia, S., and Felipo, V. (1994) Brain ATP depletion induced by acute ammonia intoxication in rats is mediated by activation of the NMDA receptor and Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase, *J. Neurochem.*, **63**, 2172-2178, doi: 10.1046/j.1471-4159.1994.63062172.x.
40. Labotka, R. J., Lundberg, P., and Kuchel, P. W. (1995) Ammonia permeability of erythrocyte membrane studied by ¹⁴N and ¹⁵N saturation transfer NMR spectroscopy, *Am. J. Physiol.*, **268**, C686-C699, doi: 10.1152/ajpcell.1995.268.3.C686.
41. Westhoff, C. M., Ferreri-Jacobia, M., Mak, D. O., and Foskett, J. K. (2002) Identification of the erythrocyte Rh blood group glycoprotein as a mammalian ammonium transporter, *J. Biol. Chem.*, **277**, 12499-12502, doi: 10.1074/jbc.C200060200.
42. Reeves, R. B. (1976) Temperature-induced changes in blood acid-base status: Ph and PCO₂ in a binary buffer, *J. Appl. Physiol.*, **40**, 752-761, doi: 10.1152/jap.1976.40.5.752.
43. Nakamura, K., Yamane, K., Shinohara, K., Doi, K., Inokuchi, R., Hiruma, T., Nakajima, S., Noiri, E., and Yahagi, N. (2013) Hyperammonemia in idiopathic epileptic seizure, *Am. J. Emerg. Med.*, **31**, 1486-1489, doi: 10.1016/j.ajem.2013.08.003.
44. Huizenga, J. R., Tangerman, A., and Gips, C. H. (1994) Determination of ammonia in biological fluids, *Ann. Clin. Biochem.*, **31** (Pt 6), 529-543, doi: 10.1177/000456329403100602.
45. Huizenga, J. R., Gips, C. H., and Tangerman, A. (1996) The contribution of various organs to ammonia formation: a review of factors determining the arterial ammonia concentration, *Ann. Clin. Biochem.*, **33** (Pt 1), 23-30, doi: 10.1177/000456329603300103.
46. Klocke, R. A., Andersson, K. K., Rotman, H. H., and Forster, R. E. (1972) Permeability of human erythrocytes to ammonia and weak acids, *Am. J. Physiol.*, **222**, 1004-1013, doi: 10.1152/ajplegacy.1972.222.4.1004.
47. Soliani, F., Lusenti, T., Franco, V., Lindner, G., Davoli, V., Parisoli, A., Brini, M., and Borgatti, P. P. (1990) Intradialytic variations in hemoglobin affinity for oxygen during bicarbonate dialysis and hemodiafiltration, *Int. J. Artif. Organs*, **13**, 321-322.
48. Cichoż-Lach, H., and Michalak, A. (2014) Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases, *World J. Gastroenterol.*, **20**, 8082-8091, doi: 10.3748/wjg.v20.i25.8082.
49. Kosenko, E., Kaminsky, Y., Lopata, O., Muravyov, N., Kaminsky, A., Hermenegildo, C., and Felipo, V. (1998) Nitroarginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, prevents changes in superoxide radical and antioxidant

- enzymes induced by ammonia intoxication, *Metab. Brain Dis.*, **13**, 29-41, doi: 10.1023/a:1020626928259.
50. Kiefer, C. R., and Snyder, L. M. (2000) Oxidation and erythrocyte senescence, *Curr. Opin. Hematol.*, **7**, 113-116, doi: 10.1097/00062752-200003000-00007.
 51. Kirkman, H. N., and Gaetani, G. F. (1984) Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4343-4347, doi: 10.1073/pnas.81.14.4343.
 52. Test, S. T., and Weiss, S. J. (1984) Quantitative and temporal characterization of the extracellular H₂O₂ pool generated by human neutrophils, *J. Biol. Chem.*, **259**, 399-405, doi: 10.1016/S0021-9258(17)43674-X.
 53. Giulivi, C., Hochstein, P., and Davies, K. J. (1994) Hydrogen peroxide production by red blood cells, *Free Radic. Biol. Med.*, **16**, 123-129, doi: 10.1016/0891-5849(94)90249-6.
 54. Mohanty, J. G., Nagababu, E., and Rifkind, J. M. (2014) Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging, *Front. Physiol.*, **5**, 84, doi: 10.3389/fphys.2014.00084.
 55. Johnson, R. M., Goyette, G., Ravindranath, Y., and Ho, Y.-S. (2005) Hemoglobin autooxidation and regulation of endogenous H₂O₂ levels in erythrocytes, *Free Radic. Biol. Med.*, **39**, 1407-1417, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.07.002.
 56. Jones, D. P. (2006) Extracellular redox state: refining the definition of oxidative stress in aging, *Rejuvenation Res.*, **9**, 169-181, doi: 10.1089/rej.2006.9.169.
 57. Scott, M. D., Zuo, L., Lubin, B. H., and Chiu, D. T. (1991) NADPH, not glutathione, status modulates oxidant sensitivity in normal and glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient erythrocytes, *Blood*, **77**, 2059-2064, doi: 10.1182/blood.V77.9.2059.bloodjournal7792059.
 58. Veech, R. L., Eggleston, L. V., and Krebs, H. A. (1969) The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate in the cytoplasm of rat liver, *Biochem. J.*, **115**, 609-619, doi: 10.1042/bj1150609a.
 59. Wurster, B., and Hess, B. (1970) Kinetic analysis of the glucosephosphate isomerase-glucose-6-phosphate dehydrogenase system from yeast *in vitro*, *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.*, **351**, 1537-1544, doi: 10.1515/bchm2.1970.351.2.1537.
 60. Pandolfi, P. P., Sonati, F., Rivi, R., Mason, P., Grosveld, F., and Luzzatto, L. (1995) Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defense against oxidative stress, *EMBO J.*, **14**, 5209-5215, doi: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb00205.x.
 61. Arese, P., Gallo, V., Pantaleo, A., and Turrini, F. (2012) Life and death of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficient erythrocytes – role of redox stress and Band 3 modifications, *Transfus. Med. Hemother.*, **39**, 328-334, doi: 10.1159/000343123.
 62. Kosenko, E., Tikhonova, L., Alilova, G., Urios, A., and Montoliu, C. (2020) The erythrocytic hypothesis of brain energy crisis in sporadic Alzheimer disease: possible consequences and supporting evidence, *J. Clin. Med.*, **9**, 206, doi: 10.3390/jcm9010206.
 63. Romero-Gómez, M., Jover, M., Galán, J. J., and Ruiz, A. (2009) Gut ammonia production and its modulation, *Metab. Brain Dis.*, **24**, 147-157, doi: 10.1007/s11011-008-9124-3.
 64. Elgouhari, H. M., and O'Shea, R. (2009) What is the utility of measuring the serum ammonia level in patients with altered mental status? *Cleve Clin. J. Med.*, **76**, 252-254, doi: 10.3949/ccjm.76a.08072.

IMPAIRED ENZYMATIC ANTIOXIDANT DEFENSE IN ERYTHROCYTES OF RATS WITH AMMONIA-INDUCED ENCEPHALOPATHY: ROLE NMDA RECEPTORS

E. Kosenko*, G. Alilova, and L. Tikhonova

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Russia; e-mail: eakos@rambler.ru*

Hepatic encephalopathy (HE), a medical term that deals with a neuropsychiatric disorder seen in patients with severe hepatic dysfunction, has been known for more than a century, however, pathogenetic mechanisms underlying cerebral dysfunction during conditions of liver disease are still not entirely understood. There is a consensus that an accumulation of ammonia in brain as a result of impaired detoxification capacity of the liver or the appearance of a portosystemic shunt is a primary cause of HE. Current evidence suggests that ammonia toxicity is mediated by hyperactivation of glutamate receptors, mainly N-methyl-D-aspartate receptors (NMDA-R) and affects many processes of aerobic metabolism that provides energy for a myriad of specific functions and viability of nerve cells. Recent reports on the presence of functional NMDA receptors in erythrocytes and deviations from normal ranges in many blood test parameters that was indicative of impaired hemodynamics and reduced carrying capacity for oxygen in erythrocytes in most patients with HE

implicate the relationship between “erythrocyte damage” and cerebral dysfunction. In order to understand how, during hyperammonemia, disturbances in energy metabolism in brain that needs a constant supply of a high level of oxygen in the blood lead to encephalopathy, it is necessary to reveal ammonia-induced disorders in energy metabolism and antioxidant defense system of erythrocytes and explore the potential role of ammonia in reduced brain oxygenation. To detect the said missing link, the activities of erythrocyte antioxidant enzymes and concentrations of GSH, GSSG and H₂O₂ were measured in animals with hyperammonemia by using MK-801, a powerful noncompetitive NMDA receptor antagonist. It was found that the accumulation of ammonia in the blood of animals with hyperammonemia occurs within rat erythrocytes in large amounts and makes these cells which do not contain enzymes for the removal of ammonia, more susceptible to a prooxidant environment of ammonia created during oxidative stress that was completely or partially inhibited with the help of MK-801. Data obtained provide a support to identification of extra risk factors in cognitive disorders and in the prediction of unfavorable outcome with hypoperfusion in patients with elevated concentrations of ammonia in the blood.

Keywords: hyperammonemia, hepatoencephalopathy, erythrocytes, NMDA receptors, oxidative stress