

*На правах рукописи*

**ЮРКОВА Мария Сергеевна**

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ СВОЙСТВ ШАПЕРОНА  
GroEL из *Thermus thermophilus***

**Специальность 1.5.6. Биотехнология**

**АВТОРЕФЕРАТ**  
**диссертации на соискание ученой степени**  
**доктора биологических наук**

**Москва – 2026**

Работа выполнена в Институте биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН).

**Научный консультант:** **Федоров Алексей Николаевич**, доктор биологических наук, директор ФИЦ Биотехнологии РАН

**Официальные оппоненты:** **Лунин Владимир Глебович**, доктор биологических наук, руководитель лаборатории биологически активных наноструктур Федерального государственного бюджетного учреждения "Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи" Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Муронец Владимир Израилевич**, доктор биологических наук, профессор, руководитель отдела биохимии животной клетки НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова

**Покровский Вадим Сергеевич**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией биохимических основ фармакологии НИИ экспериментальной онкологии и канцерогенеза, Федеральное государственное бюджетное учреждение Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

Защита состоится «08» октября 2026 года в 14 ч на заседании диссертационного совета 24.1.233.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября, д.7, корп.2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке ИММИ РАН по адресу 117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября, д.7, корп.2 и на сайте <http://fbras.ru/>.

Автореферат разослан «\_ \_» ... 2026 года

Ученый секретарь диссертационного совета  
доктор биологических наук

Т.В. Хижняк

# ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

## Актуальность работы

Развитие современной биотехнологии, молекулярной биологии и фармацевтики во многом определяется возможностями получения рекомбинантных белков и пептидов с заданными свойствами. Такие молекулы широко используются в фундаментальных исследованиях, медицине, диагностике и промышленности – в качестве терапевтических препаратов, вакцин, ферментов и биологически активных пептидов. Однако эффективный биосинтез, очистка и получение функционально активных полипептидов остаются сложной задачей, особенно в случае токсичных, нестабильных или плохо растворимых полипептидов. Многие белки при продукции в бактериальных системах образуют агрегаты, подвергаются протеолизу или оказывают токсическое воздействие на клетку-продуцент, что существенно снижает выход целевого продукта и усложняет его последующую очистку и использование.

Одним из наиболее распространённых подходов к решению этих проблем является применение систем слитых белков, в которых целевой полипептид продуцируется в составе более крупного белкового конструктора. Такие системы могут способствовать повышению растворимости и стабильности целевого белка, а в некоторых случаях облегчить его очистку. Описаны белки-носители, такие, как тиоредоксин, мальтозосвязывающий белок, глутатион-S трансфераза и т.д., в составе слитых конструкторов с которыми повышается уровень экспрессии многих белков (Bell et al., 2013; Kapust & Waugh, 1999; Riggs et al., 2001; Terpe, 2003); для некоторых целевых белков наблюдается также повышение растворимости (Esposito & Chatterjee, 2006; Fox et al., 2001; Kapust & Waugh, 1999; Panavas et al., 2009; Sun et al., 2011). Тем не менее, существующие системы слитых белков не являются универсальными и в некоторых случаях обладают ограничениями: они не всегда обеспечивают достаточную стабилизацию целевого полипептида, могут затруднять правильное сворачивание белка или требуют дополнительных этапов удаления белка-носителя. В связи с этим актуальной задачей современной белковой инженерии является разработка новых широко применимых платформ для продукции и стабилизации рекомбинантных белков.

Перспективным направлением в данной области является использование молекулярных шаперонов и их производных в качестве элементов систем продукции. Молекулярные шапероны играют ключевую роль в клетке, обеспечивая правильное сворачивание полипептидных цепей и предотвращая образование агрегатов. Среди них особый интерес представляет шаперон GroEL, обладающий уникальной архитектурой и высокой стабильностью, особенно ярко выраженной у GroEL из термостабильных организмов. Благодаря наличию внутренней полости, способной изолировать полипептидную цепь от клеточной среды, GroEL может служить своеобразной «нанокapsулой» для синтеза и стабилизации различных белков и пептидов. Разработка систем экспрессии, основанных на использовании GroEL, открывает новые возможности для получения сложных в работе и токсичных полипептидов, включая терапевтические и антимикробные пептиды.

Не менее важной задачей является совершенствование методов очистки и модификации рекомбинантных белков. Одним из наиболее широко используемых подходов является аффинная хроматография с использованием полигистидиновых меток, обеспечивающая высокую селективность выделения белков. Однако традиционно

His-метки располагают на N- или C-концах белка, что может ограничивать их применение, особенно в случаях, когда концевые участки белка критичны для сохранения его структуры или функции. Поэтому разработка новых вариантов полигистидиновых меток, пригодных для введения в состав полипептидной цепи и не нарушающих структуру белка, представляет собой важное направление исследований в области белковой инженерии.

Актуальность данной работы также обусловлена растущим интересом к биотехнологическому производству терапевтических пептидов, таких, как антимикробные и противовирусные соединения. Многие из них обладают выраженной биологической активностью, но их промышленное получение затруднено из-за их токсичности для клеток-продуцентов, склонности к деградации или низкой стабильности. Разработка новых стратегий продукции и стабилизации таких полипептидов является необходимым условием для их эффективного производства и практического применения.

Таким образом, актуальной научной задачей является создание и исследование новых систем продукции рекомбинантных белков и пептидов, основанных на использовании молекулярных шаперонов и их модифицированных форм, а также разработка новых инструментов белковой инженерии, включая усовершенствованные аффинные метки. Решение этих задач позволит увеличить разнообразие получаемых полипептидов, повысить эффективность их биосинтеза и очистки и тем самым внести вклад в развитие современной биотехнологии, белковой инженерии и биофармацевтики.

### **Состояние вопроса**

Микроорганизмы, в связи со своим повсеместным распространением, вырабатывают механизмы адаптации к различным условиям обитания, в том числе экстремальным. Адаптация, конечно, включает в себя и изменения в структуре и параметрах функционирования консервативных клеточных белков, и эти их свойства могут найти практическое приложение. В данной работе в качестве основы для разработки систем для стабилизации нерастворимых и сложных в работе полипептидов использован шаперон GroEL из термофильного организма *Thermus thermophilus*, белок, сохраняющий способность функционировать при температуре до 100°C. Основной функцией шаперонов, первоначально открытых как белки теплового шока, является способность предупреждать неправильное сворачивание других белков и способствовать их правильному сворачиванию и стабильности (Saibil, 2013). У шаперонов обнаружены и другие функции – они принимают участие в регуляции деградации белков, а также имеют дополнительные функции, не связанные с поддержанием протеостаза (Henderson et al., 2013; Kupfer et al., 2014). Однако именно фундаментальные свойства шаперонов способствовать правильному фолдингу белков привлекают к ним внимание не только исследователей, но и биотехнологов, заинтересованных в использовании функций шаперонов для возможной стабилизации целевых рекомбинантных белков. Рекомбинантные белки, синтезируемые в гетерологичных экспрессионных системах, часто представляют сложности при получении их полноценных функциональных форм. Во многих случаях они имеют низкую растворимость, проявляют склонность к агрегации, неспособны к правильному сворачиванию, демонстрируют низкую специфическую активность как *in vivo*, так и *in vitro*. При создании штаммов-продуцентов полипептидов применяют различные технологии получения функциональных форм

рекомбинантных белков и пептидов с максимальным выходом. Такие технологии, разумеется, индивидуальны и зависят как от свойств белка, так и от свойств экспрессионной системы, в которой белок получен, но включение в эти процессы шаперонов представляется очень многообещающим с точки зрения биотехнологии, поэтому разработка подобных подходов служит основой для многих исследовательских работ. Следует, однако, учитывать, что сами шапероны представляют собой сложные белки, которыми далеко не всегда удается манипулировать или менять условия их функционирования, поэтому потенциальное включение шаперонов в технологические процессы требует большой предварительной работы. Описано, например, использование ко-экспрессии полного комплекса GroEL/ES, самостоятельно или в сочетании с другими шаперонами, при получении в бактериальной системе целевых белков, имеющих склонность к мисфолдингу и агрегации, с целью их получения в растворимой форме (Kim et al., 2005; Tong et al., 2016; Veisi et al., 2015); та же стратегия применима и для продукции гетерологичных белков в дрожжевой системе (Temer et al., 2017). Однако, несмотря на публикацию ряда успешных работ, ко-экспрессия с шаперонами не является универсально применимым методом, поскольку в большинстве случаев слабо отражается на продукции рекомбинантных белков в растворимой форме. Другой подход основан на использовании GroEL *in cis* с целевыми белками, т.е. создание слитых белковых конструкторов из GroEL и целевого белка (Kyrtatsous et al., 2009; Sts et al., 2016), хотя примеры успешной экспрессии подобных слитых конструкторов также немногочисленны. Это, по-видимому, объясняется стерическими затруднениями, возникающими при присоединении полноразмерного целевого белка к каждому из мономеров GroEL в составе 14-субъединичного комплекса. Возможно, поэтому подход создания слитых конструкторов полноразмерных целевых белков с олигомерным GroEL не нашел широкого применения. GroEL *Mycobacterium sp.* – одно из немногих исключений, существующих не в виде 14-субъединичного комплекса, а преимущественно димера (Qamra et al., 2004; Qamra & Mande, 2004; Tormay et al., 2005). По этой причине GroEL *Mycobacterium sp.* можно использовать в качестве партнера в системах слитых белков для стабилизации различных полипептидов безотносительно к его четвертичной структуре. Учитывая выраженные иммуногенные свойства GroEL *Mycobacterium sp.*, этот подход используется при разработке вакцин. Все вышеперечисленные описанные в литературе подходы не подразумевают внесения изменений в саму молекулу шаперона для улучшения ее характеристик с точки зрения биотехнологии.

Данная работа посвящена разработке инновационных подходов к биотехнологическому использованию шаперона GroEL *T. thermophilus*, состоящих в создании систем слитых белков из модифицированного шаперона в различных формах и целевого полипептида. Разработанные системы предназначены для биосинтетического получения и стабилизации в растворимой форме сложных в работе белков и пептидов. Впервые в молекулу шаперона с помощью белковой инженерии были внесены модификации, позволяющие использовать шаперон как инструмент в биотехнологии. Описаны этапы разработки и примеры применения для биотехнологического использования двух различных систем слитых белков, функционирование которых основано на свойствах шаперона GroEL. Одна из этих систем, в которой используется полноразмерный комплекс GroEL/ES, предназначена для биосинтетического получения пептидов, в том числе гидрофобных, лабильных и даже антибактериальных, в бактериальной системе экспрессии. Эффективность разработанной системы доказана

биосинтетическим получением одного из наиболее токсичных антибактериальных пептидов, полифемузина I. Во второй описанной системе слитых белков в качестве белка-лидера используется модифицированный апикальный домен шаперона GroEL. Эта система предназначена для стабилизации в растворимой форме сложных в работе рекомбинантных белков, склонных к агрегации или исходно нерастворимых. С ее помощью биосинтетическим путем получены в стабильной растворимой форме два исходно нерастворимых вирусных белка, оба – потенциальные кандидаты для получения соответствующих вакцин.

### **Цель исследования**

Целью работы является разработка нового направления в использовании шаперонов для решения комплекса биотехнологических задач.

### **Задачи исследования**

1. Разработка методами белковой инженерии форм шаперонов для использования в следующих направлениях:

- биосинтез нестабильных и токсичных полипептидов в бактериальных системах,
- стабилизация исходно нерастворимых белков и получение их в стабильных растворимых формах,
- принципиальное упрощение последующих этапов получения конечного продукта.

2. Оптимизация методами белковой инженерии разработанных форм шаперона с целью дальнейшего расширения области их применения в биотехнологии.

### **Научная новизна**

Научная новизна работы заключается в первую очередь во внесении методами белковой инженерии целенаправленных изменений в молекулы шаперона для оптимизации их последующего биотехнологического использования и получение функциональных конструкторов. Продемонстрированы возможности биотехнологического применения полученных конструкторов на примере получения практически значимых полипептидов и оптимизация последующего использования разработанных систем. В целом, изучению шаперонов, их строения, функций и процессов с их участием посвящено множество работ со времени их открытия (Fedotov & Baldwin, 1997; Ranson et al., 1998; Tokatlidis et al., 1995). В последнее время появляется больше работ, касающихся практического использования свойств шаперонов, в том числе для поддержания стабильности склонных к агрегации полипептидов (de Marco et al., 2007; Fatima et al., 2021; Stevens et al., 2003; Temer et al., 2017), однако внесение изменений в молекулы шаперона с целью их использования в качестве инструмента в биотехнологии и описание применения полученных конструкторов в данной работе сделано впервые. Научная новизна работы, кроме этого, заключается в создании функциональных пермутированных форм апикального домена модифицированного шаперона GroEL *Thermus thermophilus* и изучении их свойств (Yurkova et al., 2019a) с целью расширения области их практического применения. Разработаны также инновационные полигистидиновые метки для встраивания в полипептидную цепь. Получены два различных белка-носителя для создания систем слитых белков со встроенными

полигистидиновыми метками. Оба полученных белка-носителя обладали полностью сохранившейся функциональностью и свободными N- и C-концами для создания слитых конструкторов.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Теоретическая значимость работы заключается в развитии представлений о возможностях использования молекулярных шаперонов и их производных в белковой инженерии и биотехнологии. В ходе исследования были получены новые данные о структурно-функциональных свойствах шаперона GroEL и его модифицированных вариантов, включая термостабильные формы, модифицированные минишапероны и их инженерные производные. Показано, что элементы системы GroEL могут быть использованы не только для изучения механизмов фолдинга белков, но и как универсальная платформа для конструирования систем продукции и стабилизации рекомбинантных полипептидов.

Полученные результаты расширяют фундаментальные представления о возможностях применения внутренней полости GroEL как изолированной среды для биосинтеза и стабилизации различных полипептидов, включая токсичные, нестабильные и склонные к агрегации. Продемонстрированы новые подходы к конструированию слитых белков на основе полноразмерного шаперона и его отдельных доменов, а также выявлены структурные факторы, влияющие на эффективность продукции, стабильность и растворимость целевых белков.

Существенный вклад в развитие теоретических основ белковой инженерии вносит разработка новых принципов введения аффинных меток в структуру белков. В частности, предложены и экспериментально охарактеризованы новые варианты полигистидиновых последовательностей, пригодные для внутреннего включения в полипептидную цепь без нарушения структуры и функции белка. Эти результаты расширяют существующие представления о допустимости и структурных последствиях модификации белков аффинными метками и открывают новые возможности для их применения в биохимических и биотехнологических исследованиях.

Практическая значимость работы определяется разработкой и экспериментальной апробацией новых биотехнологических подходов к получению рекомбинантных белков и пептидов. Создан ряд инженерных конструкций на основе термостабильного шаперона GroEL *Thermus thermophilus* и его производных, позволяющих эффективно продуцировать полипептиды, представляющие трудности для традиционных систем продукции. Предложенные системы слитых белков обеспечивают повышение растворимости и стабильности целевых продуктов, снижение их токсичности для клеток-продуцентов и возможность контролируемого получения функционально активных полипептидов.

Практическая ценность результатов подтверждена их применением для биосинтеза биологически активных пептидов, включая антимикробный и терапевтический пептиды. В частности, разработанные подходы использованы для получения фармацевтического пептида энфувиртида и других биологически активных молекул, что демонстрирует перспективность предложенных решений для задач биофармацевтической промышленности.

Дополнительную практическую значимость имеет разработка новых вариантов аффинных меток и белков-репортеров, обладающих способностью связываться с ионами

никеля при сохранении интактных N- и C-концевых участков. Эти конструкции могут быть использованы в качестве универсальных инструментов для очистки и анализа рекомбинантных белков, а также для разработки новых биосенсорных и диагностических систем.

Таким образом, полученные в работе результаты имеют важное значение для развития фундаментальных представлений о функционировании молекулярных шаперонов и их применении в белковой инженерии, а также обладают значительным прикладным потенциалом для разработки эффективных технологий получения рекомбинантных белков и пептидов, востребованных в биотехнологии, медицине и фармацевтике.

### **Методология и методы исследования**

В работе использован широкий спектр методов современной биологии: методы работы с ДНК и с бактериальными культурами; методы очистки белков с помощью хроматографии различных типов, методы определения функциональной активности и другие биохимические процедуры; аналитические методы (спектроскопия поверхностного плазмонного резонанса, электрофорез белков в полиакриламидном геле, аналитическая ВЭЖХ хроматография, масс-спектрометрия); спектрофотометрические методы (спектроскопия и оценка яркости флуоресценции для флуоресцентного белка eGFP, спектроскопия кругового дихроизма для исследования вторичной структуры белков). Для димера полифемузина I было проведено молекулярное моделирование его структуры в фосфолипидной мембране, состоящей из дипальмитоилфосфатидилхолина.

### **Степень достоверности полученных результатов**

Степень достоверности полученных результатов обеспечена использованием современных методов исследования и сертифицированного оборудования. Эксперименты проводили независимо друг от друга, в нескольких повторностях и с постановкой необходимых контролей. Исследование подтверждено воспроизводимостью полученных результатов. Данные проанализированы с использованием современных методов статистической обработки.

### **Апробация результатов**

Основные результаты работы были представлены для обсуждения на 44 Конгрессе FEBS, проходившем в Кракове, Польша, 6-11 июля 2019 г., на VII Съезде биохимиков России, объединенном с X Российским симпозиумом «Белки и пептиды», на конференциях ФИЦ Биотехнологии РАН в 2023 г. и 2024 г., в патенте на изобретение РФ, а также в 19 статьях на русском и английском языках в журналах, входящих в реферативные базы данных и системы цитирования Web of Science и Scopus.

### **Личный вклад автора в работу**

Большая часть экспериментальной работы, описанной в диссертации, выполнена автором самостоятельно либо при непосредственном участии автора. Автор участвовал в подготовке всех научных публикаций, обобщении и интерпретации полученных результатов и в их апробации, выступая с докладами по теме диссертации на научных конференциях.

## Структура диссертации

Диссертация состоит из введения, основной части, включающей 5 глав, заключения и выводов, изложенных на 234 страницах, включает 7 таблиц, 53 рисунка и список литературы из 295 наименований на английском и 9 наименований на русском языке.

## Место проведения работы и благодарности

Работа была выполнена в Институте биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН в лаборатории молекулярной биотехнологии (заведующая к.б.н. М.С. Юркова). Исследование биологического действия энфувиртида на *ex vivo* модели ВИЧ инфекции на клетках Т-лимфоцитарной неопластической клеточной линии человека МТ-4 было выполнено в НИЦ эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи. Спектроскопию поверхностного плазмонного резонанса для комплексов белков, меченных His-метками, с ионами  $Ni^{2+}$  проводили на химическом факультете МГУ им. М.В. Ломоносова на кафедре химической энзимологии. В ЦКП ФИЦ Биотехнологии РАН были проведены оценка яркости флуоресценции для флуоресцентного белка eGFP, а также исследование вторичной структуры белков с использованием спектроскопии кругового дихроизма (оптический кабинет). Масс-спектрометрия для подтверждения идентичности пептидов была проведена в ЦКП "Промышленные биотехнологии" ИНБИ. ДНК секвенирование для подтверждения идентичности генетических конструкторов было проведено в Лаборатории молекулярной диагностики ЦБ (ЦКП "Биоинженерия").

Соискатель выражает глубокую благодарность своему научному консультанту Федорову Алексею Николаевичу, всем участникам данной работы и соавторам статей, а также всем сотрудникам лаборатории молекулярной биотехнологии.

## Положения, выносимые на защиту

1. Направленная белковая инженерия молекул шаперона позволила получить функциональные конструкторы, применимые в биотехнологии.
2. Разработана система для биосинтеза пептидов, обеспечивающая не только получение в бактериальной экспрессионной системе *Escherichia coli* различных пептидов, но и осуществление их дальнейшей очистки простыми масштабируемыми методами. С помощью разработанной системы получены и очищены два пептида с различающимися физико-химическими свойствами, один из которых токсичен для клеток-продуцентов.
3. Разработана система для биосинтеза сложных в работе белков, позволившая получить в бактериальной экспрессионной системе *Escherichia coli* два исходно нерастворимых вирусных белка в стабильных растворимых формах.
4. Для расширения области применения системы биосинтеза сложных в работе белков впервые созданы функциональные пермутированные формы белка-носителя.
5. Разработаны инновационные аффинные метки для введения в полипептидную последовательность, позволяющие расширить возможности разработанной системы для биосинтеза сложных в работе белков.

## **Содержание работы**

Во введении обоснована актуальность проблемы, сформулированы цель и задачи исследования, отражена научная новизна и практическая значимость полученных результатов, приведены защищаемые положения и сведения об апробации работы.

## **ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР**

В обзоре литературы кратко описаны известные к настоящему времени свойства шаперонов и направления их дальнейшего исследования. Особое внимание уделено известным к настоящему времени подходам к применению фундаментальных свойств шаперонов для практических целей биотехнологии. Дополнительно каждый раздел работы предварен отдельным обзором литературы по теме соответствующего раздела.

## **ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В главе изложены материалы и методы, использованные в процессе выполнения работы. Стандартные методы молекулярной биологии были применены для внесения необходимых изменений в гены, контролирующие синтез целевых белков. Идентичность каждого из полученных генетических конструкторов была подтверждена ДНК секвенированием. Для экспрессии полученных генетических конструкторов была использована бактериальная система *E. coli*. Экспрессированные белки были очищены преимущественно с помощью различных хроматографических методов. Работа с очищенными белками и пептидами заключалась в оценке их стабильности при проведении различных биохимических манипуляций и в определении функциональной активности при ее наличии. Для определения функциональной активности различных полученных полипептидов были использованы такие методы, как аффинная хроматография на ДНК-агарозе для белка Е6 вируса папилломы человека; определение минимальной ингибирующей концентрации для антимикробного пептида полифемузина I и его димера; исследование биологического действия терапевтического пептида энфувиртида на *ex vivo* модели ВИЧ инфекции на клетках Т-лимфоцитарной неопластической клеточной линии человека МТ-4; спектроскопия поверхностного плазмонного резонанса для комплексов белков, меченных разработанными в исследовании His-метками, с ионами  $Ni^{2+}$ ; спектроскопия и оценка яркости флуоресценции для флуоресцентного белка eGFP. Исследование вторичной структуры белков проводили с использованием спектроскопии кругового дихроизма. Для подтверждения идентичности пептидов были использованы методы ВЭЖХ, масс-спектрометрии и определения их функциональной активности. Для димера полифемузина I было проведено молекулярное моделирование его структуры в фосфолипидной мембране, состоящей из дипальмитоилфосфатидилхолина.

## **ГЛАВА 3. СИСТЕМА ДЛЯ БИОСИНТЕТИЧЕСКОГО ПОЛУЧЕНИЯ ПЕПТИДОВ**

### **1.1. Актуальность технологического биосинтеза пептидов**

Пептиды пользуются большим спросом в различных областях, постоянный и возрастающий интерес вызывают антимикробные пептиды как потенциальные пептидные антибиотики. Кроме того, пептиды используются в таких областях, как научные исследования, промышленность и особенно биофармацевтика, учитывая большой потенциал пептидов в качестве биологически активных веществ: их вторичная

структура позволяет им взаимодействовать со сложными мембранными рецепторами; природные пептидные гормоны и нейротрансмиттеры служат основой для разработки новых пептидных фармацевтических препаратов; пептиды могут быть использованы для направленной доставки лекарственных средств, поскольку по сравнению с обычно применяемыми антителами способны проникать глубже в ткани и могут быть синтезированы намного дешевле; продукты распада пептидов включены в метаболизм человеческого организма (Vazquez-Lombardi et al., 2015).

В настоящее время наиболее широко применяемым методом получения пептидов является твердофазный химический синтез. Химический синтез пептидов – очень детально проработанный метод, эффективность которого доведена практически до совершенства; тем не менее, с увеличением длины синтезируемого пептида увеличивается и количество сложностей при его синтезе. Чем длиннее пептиды, тем менее эффективным и одновременно более трудоемким и дорогостоящим является их синтез (Bray, 2003; Jaradat, 2018). Для пептидов длиннее, чем 40 аминокислотных остатков, крупномасштабное производство становится экономически неоправданным, поскольку стоимость получаемого препарата растет экспоненциально с увеличением длины пептида, что и ограничивает его применение (Lau & Dunn, 2018). Очистка синтезированных пептидов производится методом ВЭЖХ, что является сложной и дорогостоящей процедурой, поскольку процесс твердофазного синтеза пептидов приводит к получению, помимо целевого пептида, очень схожих с ним побочных продуктов (Verbeke et al., 2015). Помимо этого, все большую актуальность и остроту приобретает проблема образования большого количества токсичных отходов в процессе химического синтеза пептидов, что также широко обсуждается (Varnava & Sarojini, 2019) и служит основанием для поиска альтернатив. Альтернативный метод, биосинтез, экологически безопасен и, кроме того, гораздо более точен, чем твердофазный химический синтез (Dhayalan et al., 2017; Drummond & Wilke, 2009), что делает его очень привлекательным. Тем не менее, существует и ряд серьезных препятствий на пути эффективного производства пептидов и коротких белков в клетках. В первую очередь это низкий выход и лабильность экзогенных пептидов в бактериальной системе, поскольку они часто не имеют жесткой третичной структуры и поэтому подвергаются быстрой деградации. Кроме того, некоторые рекомбинантные пептиды и белки могут быть токсичными для клетки-продуцента. Несмотря на то, что некоторые токсичные пептиды могут быть получены в гетерологичных (Parachin et al., 2012) и даже в микробных системах экспрессии (Wegmuller & Schmid, 2014; Wibowo & Zhao, 2019; Zambrowicz et al., 2013), выход целевого пептида невысок и зависит от его токсичности, поэтому масштабирование производства в случае биосинтеза токсичных пептидов редко бывает экономически эффективным (Wibowo & Zhao, 2019).

## **1.2. Обоснование дизайна белка-носителя для системы биосинтеза пептидов**

В данной части работы описана разработка инновационного подхода к биосинтезу пептидов в составе системы слитых белков с использованием мономера шаперона GroEL *Thermus thermophilus* в качестве белка-носителя. Целью работы было создание белка-носителя для системы биосинтеза пептидов, который одновременно служил бы нескольким целям, в конечном счете направленным на надежное и экономичное получение разнообразных пептидов, включая труднопроизводимые целевые пептиды, такие, как протеолитически лабильные или токсичные для продуцента.

Предусматривалось, что система биосинтеза пептидов, помимо собственно продукции пептидов, также позволит проводить их последующую очистку с помощью простых, надежных и масштабируемых процедур. Шаперон GroEL был выбран в качестве основы для создания белка-носителя для такой системы слитых белков с целью обеспечить ряд ключевых преимуществ. Выбор конкретного шаперона GroEL, из термостабильного организма *T. thermophilus*, для разработки белка-носителя для системы слитых белков основывался на нескольких соображениях. При использовании бактериальной системы экспрессии следует учитывать, что эндогенный GroEL необходим для жизнеспособности бактериальных клеток. Использование GroEL бактерий-продуцентов в качестве основы для системы слитых белков наверняка сделало бы эндогенный шаперон нефункциональным или малофункциональным для поддержания стабильности белков клеток-хозяев, тем самым снижая жизнеспособность бактерий. Чтобы избежать этих осложнений, для создания гибридных генных конструкций для экспрессии в клетках *E. coli* был выбран экзогенный GroEL. Конкретно, предпочтение было отдано GroEL *T. thermophilus*, по ряду соображений. Во-первых, была принята во внимание термостабильность шаперона, поскольку это свойство может быть использовано в процессе последующей очистки слитого конструктора. Кроме того, для GroEL *T. thermophilus* опубликована третичная и четвертичная структура, что позволило более обоснованно подойти к выбору места введения пептида.

Структурно GroEL представляет собой 14-мерный комплекс, состоящий из двух колец из семи мономеров каждое, образующих общую полость, обращенную внутрь комплекса, с гидрофобной поверхностью которой связываются субстратные белки в ненативном состоянии (Horwich et al., 2006, 2007; Saibil, 2013; Thirumalai & Lorimer, 2001), (Рисунок 1).

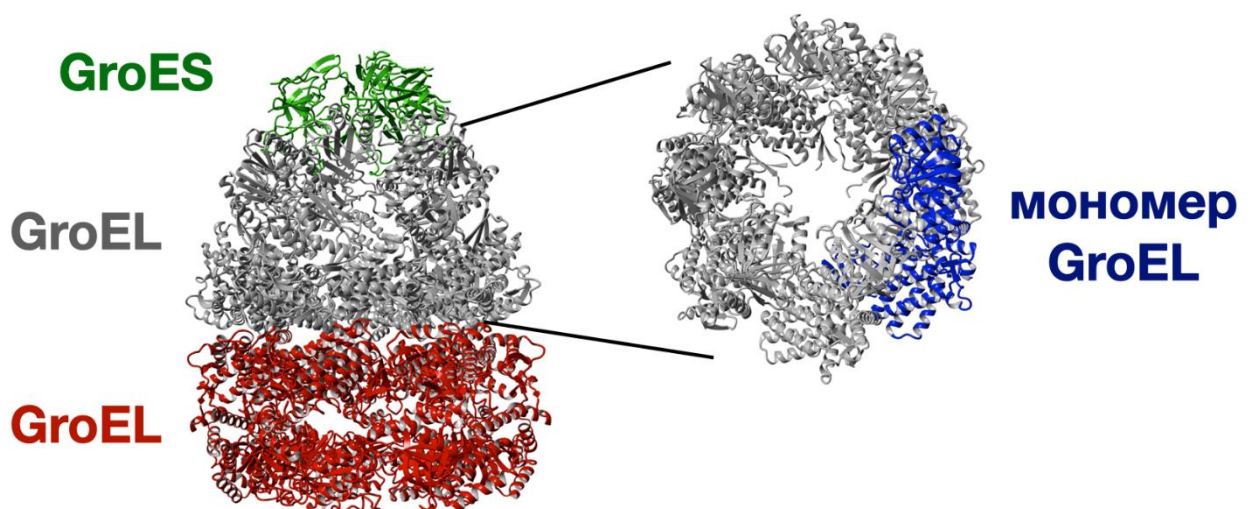


Рисунок 1. Схема строения комплекса GroEL/ES *T. thermophilus*. Использована опубликованная структура GroEL *T. thermophilus* (PDB 2C7D). Манипуляции со структурой проводили с помощью программы I-TASSER™ (Yang & Zhang, 2015; Yang et al., 2015; Zheng et al., 2021) (цит по Yurkova & Fedorov 2022 с изменениями).

Поскольку четвертичная структура GroEL образует полость, ограниченную изнутри субстрат-связывающей поверхностью, предназначенной для взаимодействия с нестабильными гидрофобными полипептидами, логично сконструировать слитый

конструкт таким образом, чтобы целевой потенциально нестабильный полипептид был способен взаимодействовать с субстрат-связывающей поверхностью GroEL. Однако этого невозможно достичь путем присоединения целевых пептидов к N- или C-концам GroEL, удаленным от субстрат-связывающей поверхности. Это приводит к рассмотрению возможности введения целевой вставки внутрь полипептидной цепи GroEL в соответствующем положении.

При структурно обоснованном подходе, примененном в данной работе, элементы для введения целевого пептида были выбраны на внутренней поверхности гептамера GroEL таким образом, чтобы включенные туда полипептидные вставки не влияли на общую структуру олигомера GroEL, а также чтобы целевые пептиды имели возможность взаимодействовать с субстрат-связывающей поверхностью. Такое взаимодействие может дополнительно стабилизировать лабильные пептиды или ослабить токсические свойства пептидов, если пептиды токсичны. Также, учитывая ограниченный размер полости для связывания субстратных белков, было принято во внимание предположение, что небольшой размер пептидов позволит им не разрушить четвертичную структуру комплекса GroEL/ES даже в том случае, если каждый из мономеров в комплексе представляет собой слитый конструкт с пептидом. Кроме того, будучи изолированными внутри полости, пептиды не будут иметь возможности взаимодействовать с окружающей цитоплазмой, что не только предохранит лабильные пептиды от протеолиза, но и, наоборот, предохранит клетки-продуценты от нежелательных свойств пептидов, например, токсичности, если пептиды предназначены к использованию в качестве пептидных антибиотиков. Исходя из совокупности этих соображений, для введения полипептидной вставки была использована небольшая петля в апикальном домене GroEL между аминокислотными остатками Ser199 и Tyr 201 (Рисунок 2 А). Чтобы упростить дальнейшие процедуры очистки, все шесть остатков метионина в GroEL были заменены на остатки лейцина с помощью направленного мутагенеза. Модифицированный таким образом GroEL, ко-экспрессированный с ко-шапероном GroES, сохранил термостабильность и четвертичную структуру исходного комплекса. Термостабильность комплекса позволяет провести его первичную очистку из лизата бактериальных клеток с помощью нагревания в условиях, в которых бактериальные белки агрегируют. Это ценная особенность белка-носителя для системы слитых белков, поскольку не хроматографические методы очистки, если они применимы, предпочтительны при масштабировании как более экономически эффективные. Этапы проектирования такого конструкта показаны на Рисунке 2 и более подробно описаны ниже.

Прежде чем использовать GroEL в качестве белка-носителя во системе слитых белков, в него был внесен ряд изменений на генетическом уровне. Во-первых, в подобной системе экспрессии было необходимо обеспечить возможность последующего отделения целевого полипептида, и для этого была предусмотрена опция химического отщепления по остаткам метионина под действием бромциана. Если при этом белок-носитель не содержит в своей аминокислотной последовательности остатков метионина, то последующая очистка относительно небольшого целевого полипептида от крупных фрагментов белка может быть полноценно осуществлена в одну стадию. С другой стороны, расщепление белка-носителя, содержащего в своей последовательности остатки метионина, на несколько фрагментов, сравнимых по размеру с целевым пептидом, существенно усложняет задачу последующей очистки. Поэтому в качестве

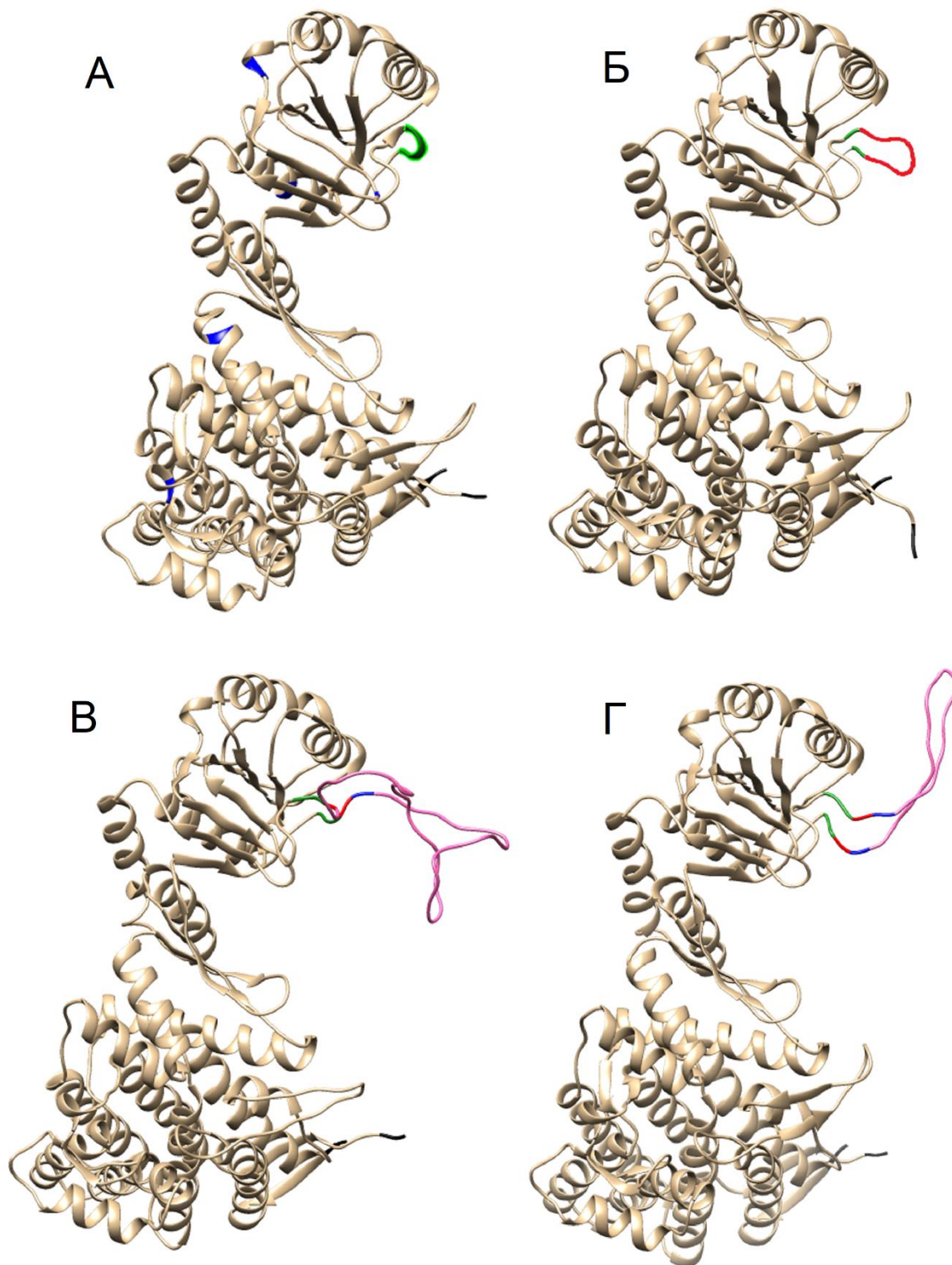


Рисунок 2. Последовательные изменения, внесенные в GroEL *T. thermophilus* для его использования в качестве белка-носителя при биосинтетическом получении пептидов. А – исходный GroEL *T. thermophilus* (pdb: 4V4O). Остатки метионина показаны синим цветом, аминокислотные остатки 199-201, где впоследствии введен полилинкер – зеленым. Б – введенный между аминокислотными остатками 199-201 полилинкер показан красным. В – модифицированный GroEL *T. thermophilus* со вставкой полифемузин I, введенной в состав полипептидной цепи. Г – модифицированный GroEL *T. thermophilus* со вставкой энфувиртид, введенной в состав полипептидной цепи. Изменения, иллюстрирующие положения вставок, внесены в опубликованную структуру GroEL *T. thermophilus* (pdb: 4V4O) с помощью программы UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004) (цит по Yurkova & Fedorov, 2022).

первого шага в разработке белка-носителя все кодоны, кодирующие метионин в исходном гене GroEL *T. thermophilus*, были заменены кодонами, кодирующими лейцин, с помощью направленного мутагенеза. Полученный конструктор был клонирован в бицистронную плазмиду pET-Duet с ко-шапероном GroES для ко-экспрессии. При ко-экспрессии комплекса безметионинового GroEL с GroES шаперон образовывал полноразмерный комплекс GroEL/ES, что было подтверждено с помощью гель-фильтрации, а также сохранял термостабильность исходной формы. Далее, основываясь на опубликованной структуре мономера GroEL *T. thermophilus* (pdb: 4V4O), было выбрано место введения целевого пептида: это небольшая неструктурированная петля в апикальном домене GroEL между аминокислотными остатками 199 и 201. Место введения вставки было выбрано таким образом, чтобы вставка не нарушала структуру GroEL и располагалась вблизи субстрат-связывающей поверхности шаперона.

На Рисунке 2 А остатки метионина GroEL *T. thermophilus* показаны синим цветом, а петля между аминокислотными остатками 199-201 – зеленым. Между кодонами, кодирующими аминокислоты 199 и 201, был введен полилинкер для последующего клонирования вставки, состоящий из сайтов рестрикции BamHI, HindIII и EcoRI, который добавил к полипептиду шесть аминокислотных остатков Gly-Ser-Lys-Leu-Glu-Phe. Они показаны красным цветом на Рисунке 2 Б. После введения полилинкера в последовательность гена *groel* экспрессированный комплекс GroEL/ES продолжал сохранять свою олигомерную структуру. Оба варианта модифицированного GroEL, безметиониновый и безметиониновый с введенным полилинкером, были протестированы на термостабильность в сравнении с GroEL дикого типа и продемонстрировали термоустойчивость. Таким образом, полученная генетическая конструкция безметионинового GroEL с введенным полилинкером была готова для клонирования целевых пептидов, фланкированных остатками метионина для последующего их отщепления под действием бромциана, по сайтам рестрикции BamHI и EcoRI. Безметиониновый вариант GroEL *T. thermophilus* с введенным полилинкером был использован в качестве основы для создания слитых конструкторов с целевыми пептидами – полифемузином I и энфувиртидом.

### **1.3. Экспрессия и свойства слитого конструктора GroEL / полифемузин I**

Полифемузин I является одним из наиболее эффективных антимикробных пептидов и, соответственно, кандидатом для практического использования в качестве антибиотика. В данной работе полифемузин I был выбран в качестве целевого пептида для биосинтеза в бактериальных клетках в первую очередь для демонстрации возможностей разрабатываемой системы слитых белков на основе GroEL, а также с перспективой потенциального применения в биотехнологии. Биосинтетическое получение токсичных пептидов возможно в гетерологичных системах экспрессии (Parachin et al., 2012), а биосинтез других возможен даже в микробных системах экспрессии (Wegmuller & Schmid, 2014; Wibowo & Zhao, 2019; Zambrowicz et al., 2013). Однако масштабирование производства в случае токсичных пептидов редко бывает экономически эффективным: выход токсичного пептида при его биосинтезе зависит от природы и степени его токсичности и, по опубликованным данным, составляет от 0,8 мг на литр культуры для гепсидинов до 35,8 мг на литр культуры для плекстазина (Wibowo & Zhao, 2019). Что касается биосинтеза полифемузина I в бактериальной системе

экспрессии, его получение в виде слитого конструктора с мальтозосвязывающим белком описано только в одной работе (Pierce et al., 1997) без количественной оценки выхода.

Ген, кодирующий полифемузин I, с добавлением кодонов для фланкирующих остатков метионина для последующего химического отщепления целевого пептида и сайтов рестрикции BamHI / EcoRI, был получен с помощью химического синтеза. Использование кодонов гена полифемузина I было адаптировано для *E. coli*. Вставка была клонирована в модифицированный ген GroEL (безметиониновый с введенным полилинкером) по сайтам рестрикции BamHI/EcoRI. Рисунок 2 В иллюстрирует предполагаемое положение вставки. Комплекс конструктора GroEL/полифемузин I с GroES был успешно синтезирован в бактериальной системе. Основные свойства комплекса GroEL/ES не изменились после введения вставки полифемузин I, а именно комплекс сохранил растворимость, термостабильность и олигомерную структуру. Безметиониновый GroEL со вставкой полифемузин I был очищен и подвергнут химическому расщеплению под действием бромциана по остаткам метионина, фланкирующим вставку. Реакция прошла полностью, дав в результате два крупных фрагмента GroEL и полифемузин I. Полифемузин I был очищен с помощью ВЭЖХ на колонке с обратной фазой C 18 (Рисунок 3). Хроматографическое поведение полифемузина I, полученного биосинтетическим путем, совпадало с поведением его химически синтезированного аналога (Рисунок 4), что послужило также одним из методов подтверждения идентичности пептида.

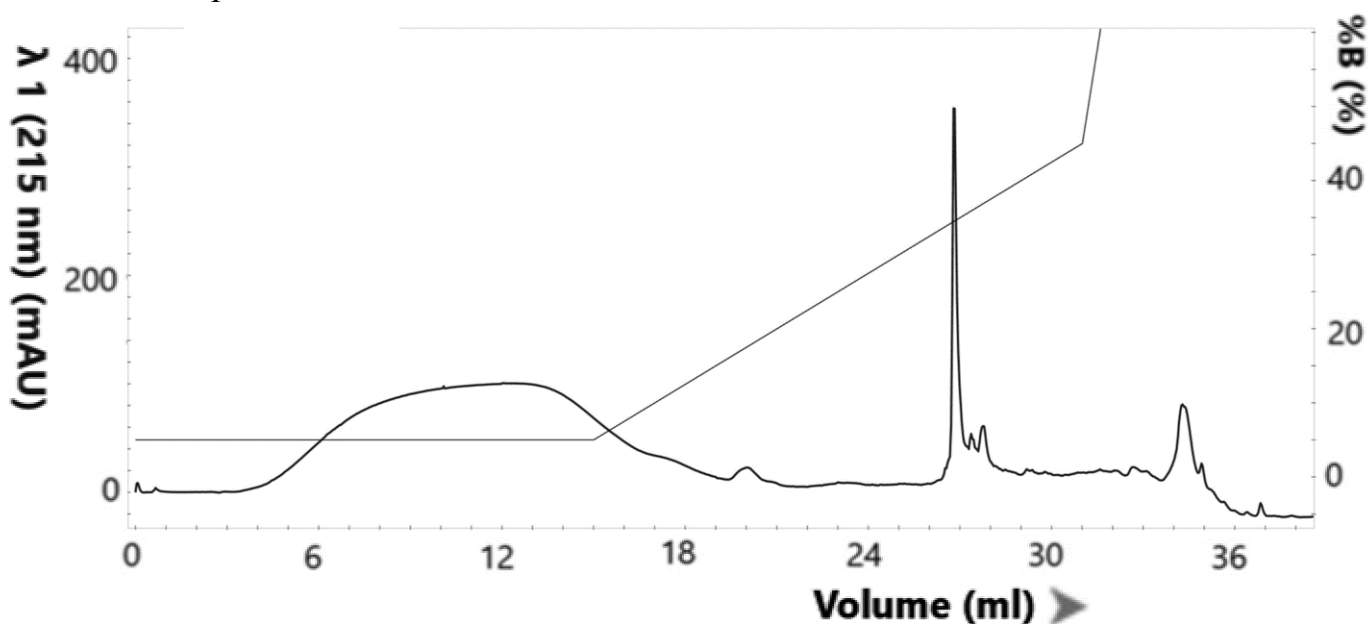


Рисунок 3. Обратная фаза хроматография полученного полифемузина I на колонке C18. Пептид элюировался в градиенте ацетонитрила в воде в присутствии 0.1% TFA между 31% и 32% ацетонитрила, что совпадает с временем удерживания химически синтезированного пептида (цит. по Yurkova et al., 2020 с изменениями).

Идентичность полученного целевого пептида как интактного полифемузина I без аминокислотных замен была подтверждена, помимо хроматографии на обращенных фазах, с помощью масс-спектрометрии и МС-МС. Молекулярная масса основного пика соответствовала полностью окисленной форме полифемузина I (в зависимости от степени окисления остатков цистеина ожидаемая молекулярная масса составляет от 2537 до 2541 Да); МС-МС подтвердил наличие четырех остатков цистеина.

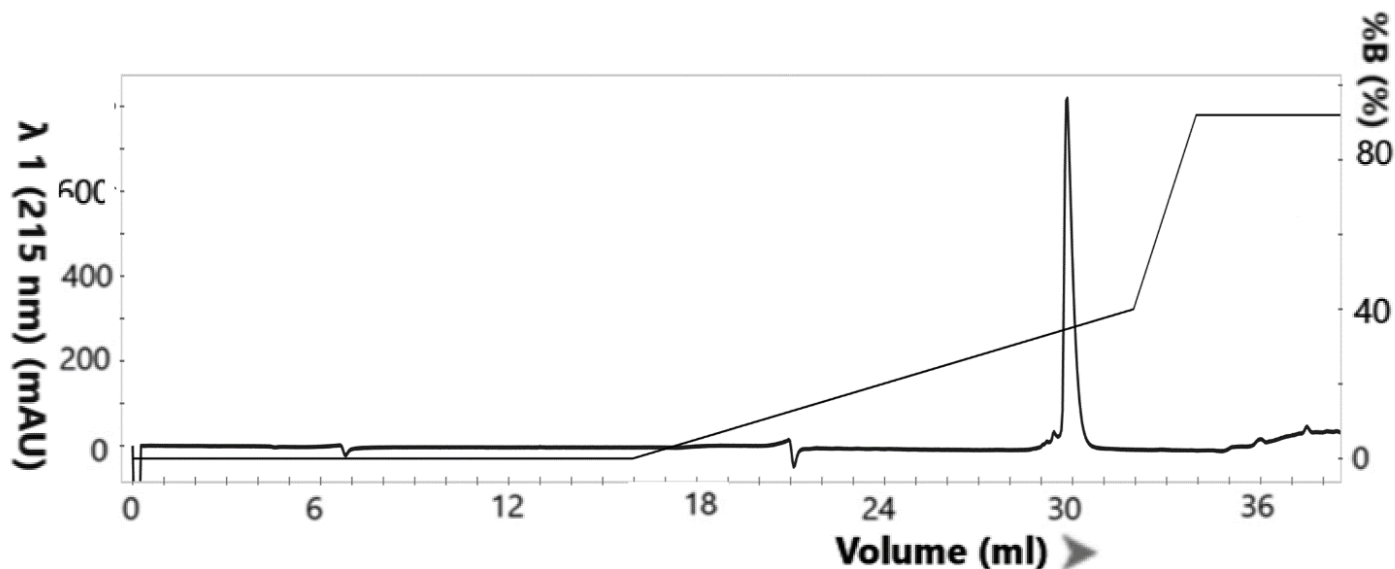


Рисунок 4. Обратная фаза хроматография химически синтезированного полифемузина I на колонке C18. Пептид элюировался в градиенте ацетонитрила в воде в присутствии 0.1% TFA между 31% и 32% ацетонитрила.

Кроме того, полученный биосинтетическим путем полифемузин I, являющийся потенциальным антибактериальным агентом, был протестирован на бактериостатическую активность с помощью определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) после его отщепления от слитого конструктора с GroEL и очистки.

МИК определяется как самая низкая концентрация антимикробного агента, способная ингибировать видимый рост микроорганизма после инкубации в течение 17 часов. В пределах данного эксперимента задачей было сравнение значений МИК для полученного биосинтетическим путем полифемузина I и его химически синтезированного аналога в одинаковых экспериментальных условиях. Тем не менее, соблюдение утвержденных CLSI стандартов для определения антимикробной активности позволило также соотнести полученные данные с литературными. Был использован метод макро-разведения в среде Mueller-Hinton и стандартные контрольные клетки *E. coli* UB1005 в исходной концентрации  $5 \times 10^5$  CFU/mL. По результатам трех независимых экспериментов было показано, что значения МИК в обоих случаях составили 3 мкг/мл (1,2 мкМ), что согласуется с данными других авторов, полученных для химически синтезированного полифемузина I.

Полифемузин I, один из наиболее токсичных антимикробных пептидов, был выбран в качестве целевого пептида, чтобы продемонстрировать возможности системы слитых белков на основе модифицированного GroEL для получения трудноэкспрессируемых пептидов. Насколько известно авторам, биосинтетическое получение полифемузина I, слитого с мальтозосвязывающим белком в качестве лидера, описано только в одной работе (Pierce et al., 1997), но наши попытки получить полифемузин I в виде слитого конструктора с тиоредоксином, или в виде слитого конструктора GroEL/полифемузин I вместе с GroES в клетках BL21(DE3) без жестко регулируемого промотора, или в виде слитого конструктора GroEL/полифемузин I без ко-экспрессии с GroES в клетках BL21(DE3) pLysE, были неудачными и приводили либо к гибели клеток, либо к получению сильно мутировавшего полифемузина I. Таким

образом, образование стабильных полноразмерных комплексов GroEL/ES оказалось необходимым условием для эффективной защиты бактериальной клетки от воздействия токсичного целевого пептида в процессе биосинтеза. С другой стороны, успешная экспрессия слитого конструктора GroEL/полифемузин I, в свою очередь, косвенно указывает на факт формирования и стабильность правильной четвертичной структуры комплекса GroEL/ES, что и было дополнительно подтверждено методом гель-хроматографии.

На основании проведенной работы можно сделать вывод, что двухуровневая защита, которую слитый конструктор на основе GroEL может обеспечить для целевого пептида, позволяет биосинтетически получать наиболее трудноэкспрессируемые пептиды. Биосинтетическое получение в бактериальной системе одного из самых мощных антибактериальных пептидов указывает на перспективность разработанной системы. Процедуры очистки, которые могут быть применены для получения целевого пептида, очень просты, надежны и легко масштабируемы.

#### **1.4. Получение энфувиртида в виде слитого конструктора с GroEL**

Еще одним пептидом, полученным биосинтетическим путем в составе слитого конструктора с модифицированным GroEL, был энфувиртид, фармацевтический пептид, используемый при комплексной терапии СПИД. Физико-химические свойства энфувиртида по всем параметрам отличаются от свойств ранее описанного полифемузина I: энфувиртид представляет собой крупный (36 аминокислотных остатков), слабо структурированный гидрофобный пептид с pI 4.30. Таким образом, биосинтетическое получение этих сильно различающихся пептидов в виде аналогичных слитых конструкторов с модифицированным GroEL продемонстрировало широкие возможности разработанной системы. Кроме того, были оценены возможности биосинтетического получения энфувиртида как потенциальной альтернативы его химического синтеза, используемого в настоящее время для производства энфувиртида в промышленных масштабах. Имея в виду потенциальную возможность практического использования биосинтеза энфувиртида в составе слитого конструктора с GroEL, была проведена тщательная работа по усовершенствованию протокола очистки и гидролиза слитого конструктора, чтобы сделать его максимально простым и удобным для масштабирования; кроме того, был проведен анализ полученного биосинтетическим путем энфувиртида с точки зрения возможности его применения в качестве фармпрепарата.

Ген, кодирующий энфувиртид, с добавлением кодонов для фланкирующих остатков метионина для последующего химического отщепления целевого пептида и сайтов рестрикции BamHI / EcoRI, был клонирован в модифицированный ген GroEL (безметиониновый с введенным полилинкером) аналогично гену полифемузина I. На Рисунке 2 Г показано предполагаемое положение вставки. Полученный слитый конструктор был экспрессирован вместе с GroES в клетках *E. coli* BL21(DE3). Конструктор GroEL/энфувиртид экспрессировался в растворимой форме и сохранял термостабильность, свойственную исходному шаперону, что позволило использовать нагревание лизата клеток-продуцентов в качестве первой стадии очистки конструктора, как и в случае конструктора GroEL с полифемузином I.

Поскольку данная часть работы была посвящена оптимизации условий очистки слитого конструктора, а затем отщепления и очистки энфувиртида с целью упрощения

возможного масштабирования, то для каждой стадии исследовали несколько возможных вариантов и выбирали оптимальный. Для очистки конструктора GroEL/энфувиртид от оставшихся после прогревания клеточных белков и от GroES выбрали для использования анионообменную хроматографию на DEAE-сефарозе, после которой слитый конструктор переводили в летучий буфер и затем лиофилизировали. Полученный таким образом слитый конструктор был подвергнут гидролизу под действием бромциана в разных условиях: было проверено влияние на полноту и скорость прохождения реакции концентрации белка, применения ультразвука и встряхивания, добавления в реакционную смесь ацетонитрила, проведение реакции в различных реакционных средах. Результаты проведения гидролиза конструктора GroEL/энфувиртид под действием бромциана в различных реакционных средах представлены на Рисунке 5.

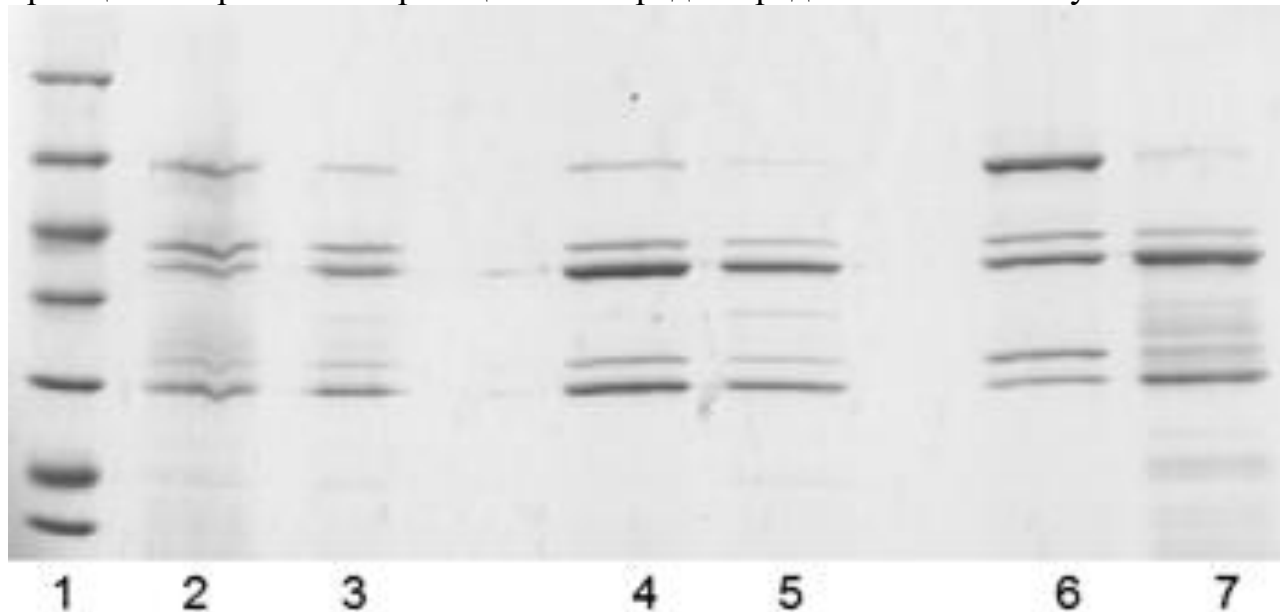


Рисунок 5. Электрофорез результата гидролиза под действием бромциана в различных реакционных средах: 1 – стандарты молекулярной массы; 2 и 3 – реакция в присутствии гуанидина и соляной кислоты; 4 и 5 – реакция в присутствии муравьиной кислоты; 6 и 7 – реакция в присутствии трифторуксусной кислоты, после 1 и 16 часов реакции, соответственно (цит. по Zenin et al., 2023).

По результатам проведенной работы оптимальными условиями реакции гидролиза было признано проведение реакции в присутствии 70% муравьиной кислоты в течение 1 часа. После гидролиза под действием бромциана в присутствии муравьиной кислоты и последующей очистки ВЭЖХ чистота пептида составляла 95% (Рисунок 6).

Проведенный ВЭЖХ-*ms/ms* анализ гидролизованной смеси подтвердил идентичность последовательности энфувиртида с дополнительным С-концевым метионином, модифицированным при расщеплении под действием бромциана в гомосеринлактон YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWFM (M37: Met->Hsl) с высокой степенью вероятности.

При гидролизе конструктора GroEL/энфувиртид под действием бромциана в присутствии муравьиной кислоты продукты реакции подвергаются модификациям, в основном формилированию и окислению. Поскольку биосинтетическое получение энфувиртида рассматривалось с точки зрения потенциальной альтернативы применяемому в настоящее время химическому синтезу, с помощью масс-спектрометрии

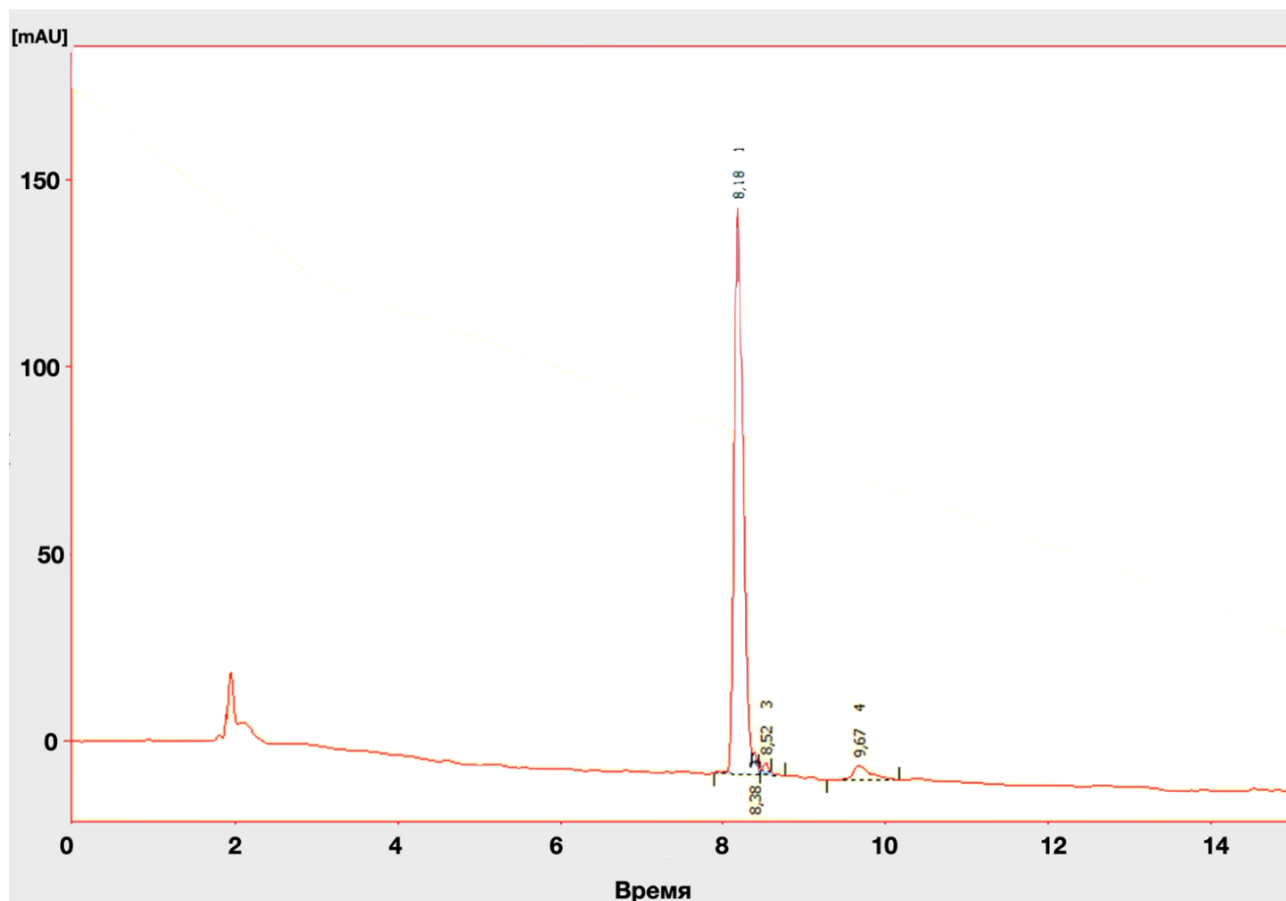


Рисунок 6. Профиль элюции очищенного энфувиртида при длине волны 280 нм (цит. по Zenin et al., 2022 с изменениями).

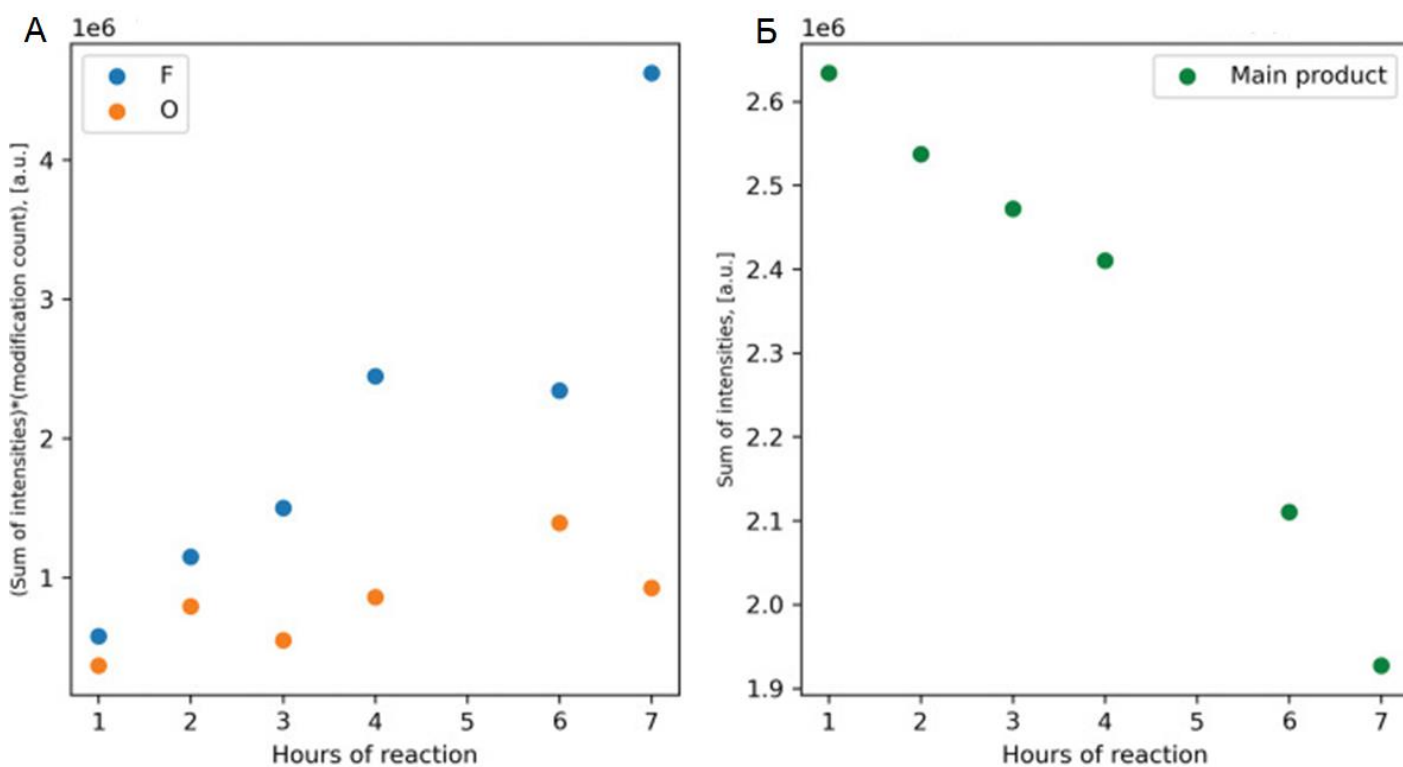


Рисунок 7. Динамика появления модифицированных форм энфувиртида и его накопления с течением времени реакции с бромцианом. А – скорость появления продуктов формилирования (синие точки) и окисления (оранжевые точки); Б – количество энфувиртида (цит. по Zenin et al., 2023 с изменениями).

было исследовано появление с течением времени реакции его модифицированных форм; результаты представлены на Рисунке 7. Формилирование по нескольким амнокислотным остаткам начиналось после 2 часов реакции, наиболее подверженным этой модификации был остаток серина 31 (Рисунок 7 А). Окисление и гидролиз С-концевого гомосерин-лактона до гомосерина происходили существенно медленнее. Концентрация целевого пептида энфувиртида со временем уменьшалась (Рисунок 7 Б). На основании этих данных время реакции гидролиза было ограничено 1 часом.

В полученном препарате энфувиртида, как потенциально предназначенном для фармацевтического применения, была также определена концентрация липополисахаридов (эндотоксинов), поскольку присутствующие в клеточных стенках бактерий липополисахариды являются пирогенными, что недопустимо в фармпрепарате. Концентрация эндотоксина в полученном препарате энфувиртида была измерена с помощью ЛАЛ-теста и составляла менее 1,06 ЕС/мг. Это более чем в два раза ниже, чем допустимый предел 2,5 ЕС/мг для высокодозированного (90 мг на дозу) фармацевтического препарата энфувиртид.

Эндотоксины связываются со многими белками; предполагается, что эти взаимодействия имеют смешанную электростатическую и гидрофобную природу с участием ионов  $Ca^{2+}$ . По этой причине связанные с белками эндотоксины часто соочищаются с рекомбинантными белками, полученными в бактериальной системе. В схеме очистки, разработанной для энфувиртида, на последней стадии используется ВЭЖХ на колонке с обратной фазой в условиях, нарушающих как электростатические, так и гидрофобные взаимодействия. Таким образом, при использовании хроматографии на обратной фазе была достигнута более чем достаточная степень очистки от эндотоксинов, поэтому в схему не вводили отдельную стадию для очистки от эндотоксинов. В случае, если хроматография на обратной фазе не предполагается как заключительная стадия, очистка от эндотоксинов может быть произведена на стадии анионообменной хроматографии. При стандартном проведении ионообменной хроматографии значительного удаления эндотоксинов не происходит по причине сохранения их гидрофобных взаимодействий с очищаемым белком, но в присутствии детергента гидрофобные взаимодействия между белком и эндотоксинами нарушаются. По этой причине введение дополнительной промывки ионообменной колонки со связанным белком неионным детергентом является эффективной мерой по удалению эндотоксинов, связанных с целевым белком.

### **1.5. Исследование биологического действия энфувиртида, полученного биосинтетическим путем**

Энфувиртид применяется при комплексной терапии ВИЧ инфекции, этот пептид блокирует проникновение вируса в клетки. Для исследования его биологического действия была использована модель ВИЧ инфекции *ex vivo* на клетках Т-лимфоцитарной неопластической клеточной линии человека МТ-4, чувствительных к ВИЧ. Кривые ингибирования ВИЧ инфекции (Рисунок 8) были получены как для энфувиртида, полученного биосинтетическим путем, так и для контрольного образца – терапевтического препарата фирмы Roche, полученного с помощью химического синтеза.

На *ex vivo* модели ВИЧ инфекции было показано, что концентрация полумаксимального ингибирования (IC50) для энфувиртида, полученного

биосинтетическим путем, равнялась 0.0453 мкМ (ДИ 0.0316-0.0650), тогда как для контрольного образца ее значение составляло 0.0180 мкМ (ДИ 0.0090-0.0359).

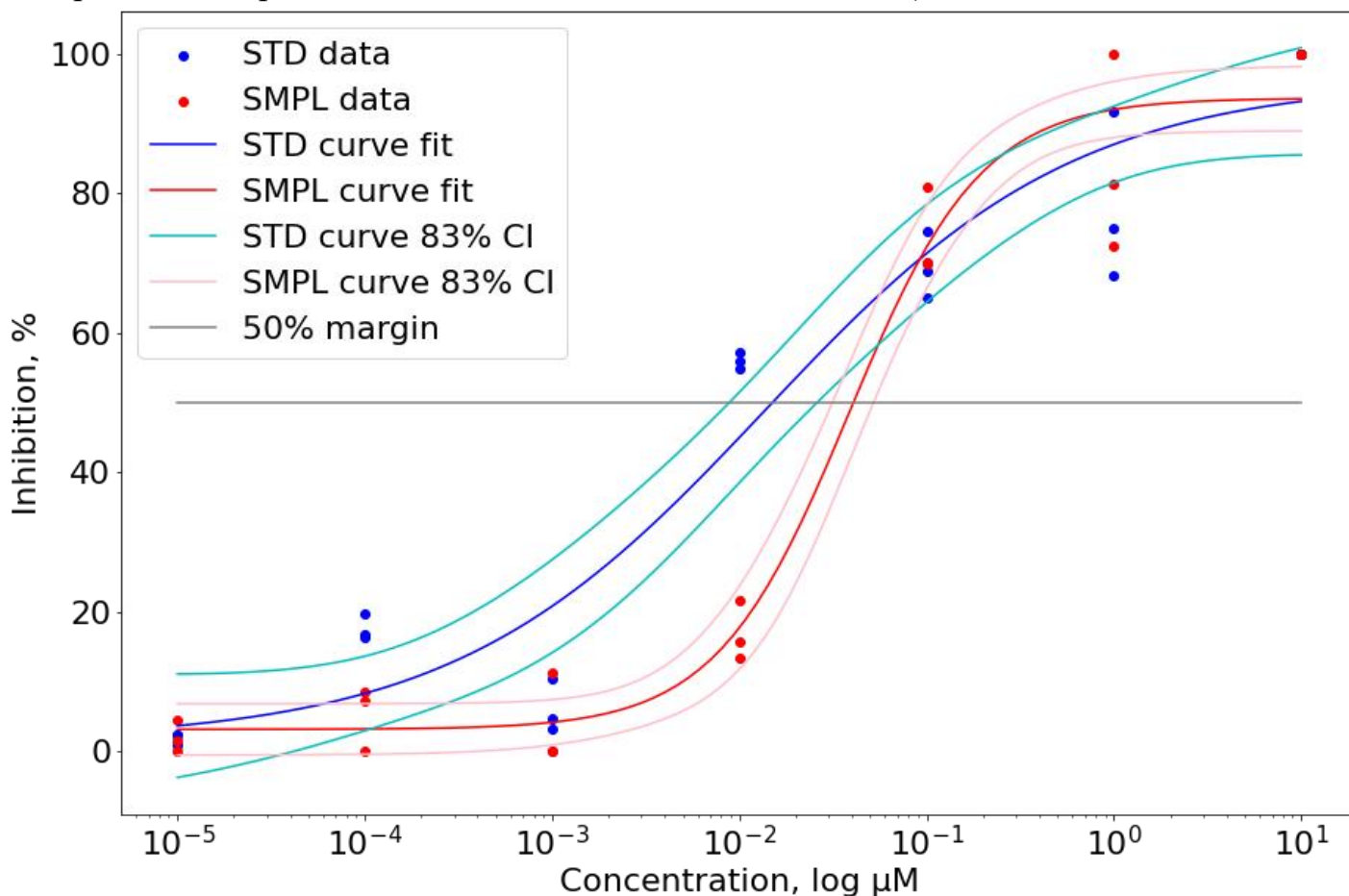


Рисунок 8. Кривые ингибирования инфекции ВИЧ в клетках МТ-4 для энфувиртида, полученного биосинтетическим путем (SMPL), и химически синтезированного энфувиртида (STD). 83% ДИ использовался в качестве порогового значения для статистически значимой разницы ( $p=0,05$ ) при пересечении двух ДИ (цит. по Zenin et al., 2023).

Наблюдаемую разницу в активности между контрольным и биосинтезированным энфувиртидом можно объяснить их химическими и/или конформационными различиями. Поскольку контрольный препарат получен с помощью химического синтеза, его N- и C-концы защищены ацелированием и амидированием. Ранее для  $\alpha$ -спиральных пептидов, используемых в качестве анти-ВИЧ-агентов, была предложена защита на обоих концах: ацелирование N-конца и амидирование C-конца, чтобы уменьшить эффекты неестественного заряда в этих положениях (Wild et al., 1992). Таким образом, большинство когда-либо опубликованных антиретровирусных  $\alpha$ -спиральных пептидов имеют заблокированные N- и C-концы (Eckert & Kim, 2001; Rimsky et al., 1998; Su et al., 1999; Wild et al., 1994). Что касается биосинтезированного препарата, он имеет свободный N-конец и дополнительный гомосерин лактон на C-конце. На N-конце у биосинтезированного препарата свободный остаток тирозина является основным, и в физиологических условиях он положительно заряжен. Гомосерин лактон на C-конце биосинтезированного препарата гораздо менее полярный, чем свободный C-конец, и, таким образом, сравним с амидированным C-концом. Следовательно, при необходимости адаптации возможно внесение изменений для потенциального улучшения биологической активности полученного пептида, но необходимость такой доработки индивидуальна для

каждого пептида. Например, для полифемузина I, получение которого описано в предыдущем подразделе, разницы в биологической активности химически синтезированного и биосинтезированного пептидов не наблюдалось.

### **1.6. Заключение по разделу «Система биосинтеза пептидов»**

В данном разделе описаны две конструкции на основе модифицированного шаперона GroEL *T. thermophilus* с целевыми пептидами, физико-химические характеристики которых контрастируют во всех аспектах. Первый из них, полифемузин I, один из наиболее мощных антибактериальных пептидов, представляет собой относительно короткий (18 аминокислотных остатков) положительно заряженный структурированный пептид, представленный амфипатической бета-шпилькой, соединенной бета-витком IV типа. Напротив, второй пептид, энфувиртид, терапевтический пептид, применяемый при лечении СПИД, имеет длину 36 аминокислотных остатков, несет слабый отрицательный заряд и практически не структурирован. В случае обеих конструкций GroEL с введенным пептидом продуцировался с высоким выходом и в растворимом состоянии. В обоих случаях конструкции сохраняли первоначальную термостабильность исходного GroEL и могли быть частично очищены от белков клетки-хозяина путем прогрева клеточных лизатов; идентичность целевых пептидов после расщепления бромцианом была подтверждена с помощью ВЭЖХ, масс-спектрометрии и функциональных тестов. Таким образом, возможности разработанной системы, предположительно, очень обширны, поскольку она позволила получить биосинтетическим путем два совершенно несхожих пептида. Данная система, очевидно, подходит для лабильных пептидов и для пептидов с проблемами сворачивания благодаря тому, что целевой пептид поддерживается в растворимой форме на субстрат-связывающей поверхности шаперона GroEL, а также для токсичных пептидов, благодаря изоляции пептида внутри полости комплекса GroEL/ES.

Для обеих вышеописанных конструкций параметры культивирования подуцентов конструкций были общими и обычно применяемыми в лабораторных условиях, они обеспечивали достаточно высокий выход целевого конструкта (от 200 до 500 мг на литр культуры); однако в промышленных условиях существует много возможностей для повышения выхода целевого белка на стадии культивирования. Например, культуры высокой плотности, по мнению некоторых авторов, могут увеличить выход в 9-85 раз (Sivashanmugam et al., 2009). В лабораторных условиях после проведения очистки было получено от 4 до 4,8 мг полифемузина I из одного литра культуры и от 7.14 до 8.29 мг энфувиртида 95% чистоты из 2.5 л культуры. Для токсичных пептидов выход при биосинтезе зависит от природы и степени их токсичности и составляет от 0,8 мг на литр культуры для гепсидинов до 35,8 мг на литр культуры для плекстазина, для полифемузина I данных о выходе при биосинтетическом получении нет.

Возможность очистки целевого белка путем нагревания лизата является одним из ключевых преимуществ получаемых конструктов, поскольку они сохраняют свою термостабильность после введения целевых пептидов в модифицированную последовательность GroEL из термофильного организма. Следует отметить, что при лизисе клеток никаких ингибиторов протеаз, кроме ЭДТА, добавлено не было. Добавление других ингибиторов протеаз увеличивает стоимость процесса; они также могут модифицировать целевой белок при нагревании (Narayanan & Jones, 2015). Быстрое нагревание лизата сразу после лизиса способствует началу скорейшей денатурации

протеаз и, таким образом, позволяет избежать создания оптимальных условий для их активности.

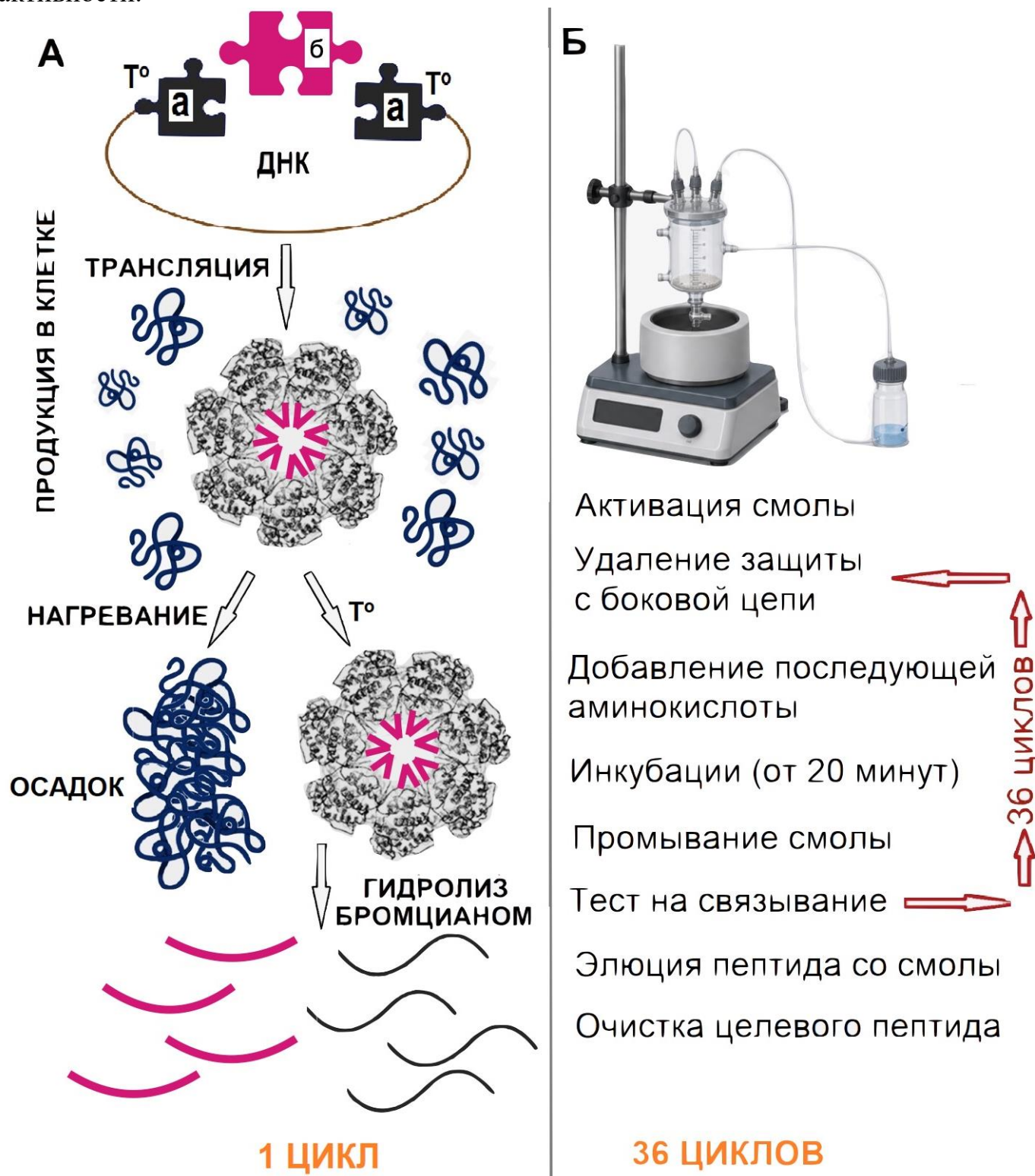


Рисунок 9. Графическая аннотация заключения к разделу «Система биосинтеза пептидов». А – схема биосинтетического получения пептида длиной 37 ак остатков с помощью системы биосинтеза пептидов, а – последовательность ДНК, кодирующая GroEL, б – последовательность ДНК, кодирующая пептид; Б – схема твердофазного химического синтеза.

Селективность очистки при нагревании достаточно высока и сравнима, например, с селективностью Ni-аффинной хроматографии в денатурирующих условиях, но экономическая эффективность несравненно выше. В качестве альтернативного способа

очистки полученного конструктора от белков клетки-хозяина может быть предложена тангенциальная фильтрация, поскольку молекулярная масса полноразмерного комплекса GroEL/ES приближается к 1 млн Да, в отличие от большинства клеточных белков. В случае биосинтетического получения токсичного пептида, как например, полифемузина I, для клетки жизненно важно поддержание целостности комплекса GroEL/ES, иначе, имея возможность взаимодействовать с клеточным окружением, пептид не мог бы продуцироваться. Однако, вероятно, целостность комплекса GroEL/ES не так существенна в случае биосинтетического получения нетоксичных, но лабильных или гидрофобных пептидов.

Дальнейшие стадии очистки конструкторов, гидролиза под действием бромциана и очистки целевых пептидов также стабильно воспроизводимы, масштабируемы и пригодны к промышленному применению. Помимо этого, в рамках разработанной системы возможна индивидуальная адаптация практически каждой стадии с учетом свойств целевого пептида, например, выщепление пептида из слитого конструктора не под действием бромциана, а иным химическим или ферментативным воздействием, что может быть предусмотрено на стадии создания соответствующих генетических конструкций. Графическая аннотация заключения к разделу представлена на Рисунке 9. Преимущества разработанной системы биосинтеза пептидов обеспечены целенаправленными изменениями, внесенными в молекулу шаперона GroEL методами белковой инженерии.

## **ГЛАВА 4. СИСТЕМА ДЛЯ СТАБИЛИЗАЦИИ В РАСТВОРИМОЙ ФОРМЕ ИСХОДНО НЕРАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ**

### **4.1. Актуальность задачи**

Многие рекомбинантные белки, представляющие интерес с точки зрения использования, например, в качестве антигенов для создания вакцин или иммунотерапевтических препаратов, оказываются сложными в работе – гидрофобными, склонными к агрегации или нерастворимыми в нативных условиях.

Технология создания слитых конструкторов, при которой гены, кодирующие последовательности белка-лидера и целевого белка, объединены для получения единой полипептидной цепи, используется как один из способов повышения уровня продукции и/или растворимости и стабильности целевого белка, и этот подход в целом доказал свою эффективность. Существует большой выбор белков-лидеров для использования в системах слитых белков; это, например, тиоредоксин, мальтозосвязывающий белок, глутатион-S трансфераза, GFP и т.д. (Bell et al., 2013; Kapust & Waugh, 1999; Riggs et al., 2001b; Terpe, 2003). Неудивительно, что шапероны также рассматривались с точки зрения использования их в качестве белков-лидеров, учитывая их фундаментальные функции – связывать гидрофобные и неправильно свернутые белки и способствовать сворачиванию и поддержанию стабильности белков. В частности, для этой цели были опробованы бактериальные шапероны семейств HSP70 и HSP 60 (GroEL). В литературе описаны слитые конструкторы с использованием полноразмерных эубактериальных шаперонов, HSP70 и GroEL, в качестве белков-лидеров, где последовательности целевых белков были генетически присоединены к 3'-концу последовательности шаперона (Kyratsous et al., 2009; Kyratsous & Panagiotidis, 2012). Однако изучение трехмерных структур шаперонов показывает, что у целевого белка, присоединенного к C-концу или

к N-концу полноразмерного шаперона, мало возможностей для внутримолекулярного взаимодействия с его субстрат-связывающей поверхностью. Ограниченное использование полноразмерных шаперонов в качестве белков-носителей во системах слитых белков может быть объяснено стерическими затруднениями, которые возникают при добавлении достаточно длинных целевых полипептидных последовательностей к последовательностям шаперонов. В предыдущем разделе работы рассмотрено использование системы для биосинтеза различных пептидов на основе модифицированного шаперона GroEL в качестве партнера в системе слитых белков, в которой целевые пептиды включены в состав полипептидной цепи шаперона, а не присоединены к одному из концов белка-носителя. Однако использование такой системы для получения вместо пептидов более крупных белков приведет к нарушению четвертичной структуры GroEL ввиду ограниченного размера полости внутри комплекса GroEL/ES.

В настоящее время по-прежнему существует неудовлетворенная потребность в общеприменимых системах биосинтеза, облегчающих получение малорастворимых и нерастворимых рекомбинантных полипептидов в стабильных растворимых формах, которые сохраняли бы стабильность в достаточно высоких концентрациях в течение длительных периодов времени и с которыми можно было бы проводить общепринятые биохимические манипуляции.

#### **4.2. Обоснование выбора белка-носителя для системы стабилизации белков**

В данной части работы описаны разработка и применение потенциально широко применимой системы слитых белков, основанной на использовании модифицированного апикального домена GroEL *T. thermophilus* в качестве белка-носителя. Связывание белковых субстратов с GroEL определяется в первую очередь их взаимодействием с субстрат-связывающей поверхностью апикального домена; многоточечные взаимодействия включают гидрофобные и электростатические силы. Апикальный домен шаперона GroEL структурно изолирован от остальной части GroEL и впервые был получен как самостоятельный рекомбинантный белок в лаборатории Фершта (Fersht) (Zahn et al., 1996), получив название минишаперона. Это название было дано изолированному апикальному домену GroEL *E. coli* (аминокислотные остатки с 191 по 345). Минишаперон, экспрессированный как индивидуальный полипептид, обладал стабильной структурой (Buckle et al., 1997) и сохранял субстрат-связывающую поверхность GroEL (Chatellier et al., 2000; Zahn et al., 1996). В той же лаборатории Фершта минишаперон был подробно изучен: была получена его трехмерная структура (Wang et al., 1999). В другой статье были описаны солевые мостики, стабилизирующие структуру аналога минишаперона из термофильной эубактерии *T. thermophilus* (Hua et al., 2001). Что касается активности, минишаперон не обладал АТФазной активностью, но продемонстрировал способность облегчать сворачивание денатурированных белков как в объемном растворе, так и будучи иммобилизованным на смоле (Altamirano et al., 1997, 1999, 2001; Karadimitris et al., 2001; Zahn et al., 1996). Следует, однако, отметить, что исследования активности минишаперона в лаборатории Фершта проводились путем добавления исследуемого белка к минишаперону, как в растворе, так и к иммобилизованному на смоле, но создание слитых конструкторов не рассматривалось. Одним из выводов из этих результатов является то, что изолированный рекомбинантный апикальный домен сохраняет многие аспекты присущей шаперону активности сложного олигомерного комплекса GroEL, но, в отличие от GroEL, он представляет собой мономер

с молекулярной массой около 15 кДа. Таким образом, у минишаперона отсутствует четвертичная структура, наличие которой критично для функциональности полноразмерного GroEL.

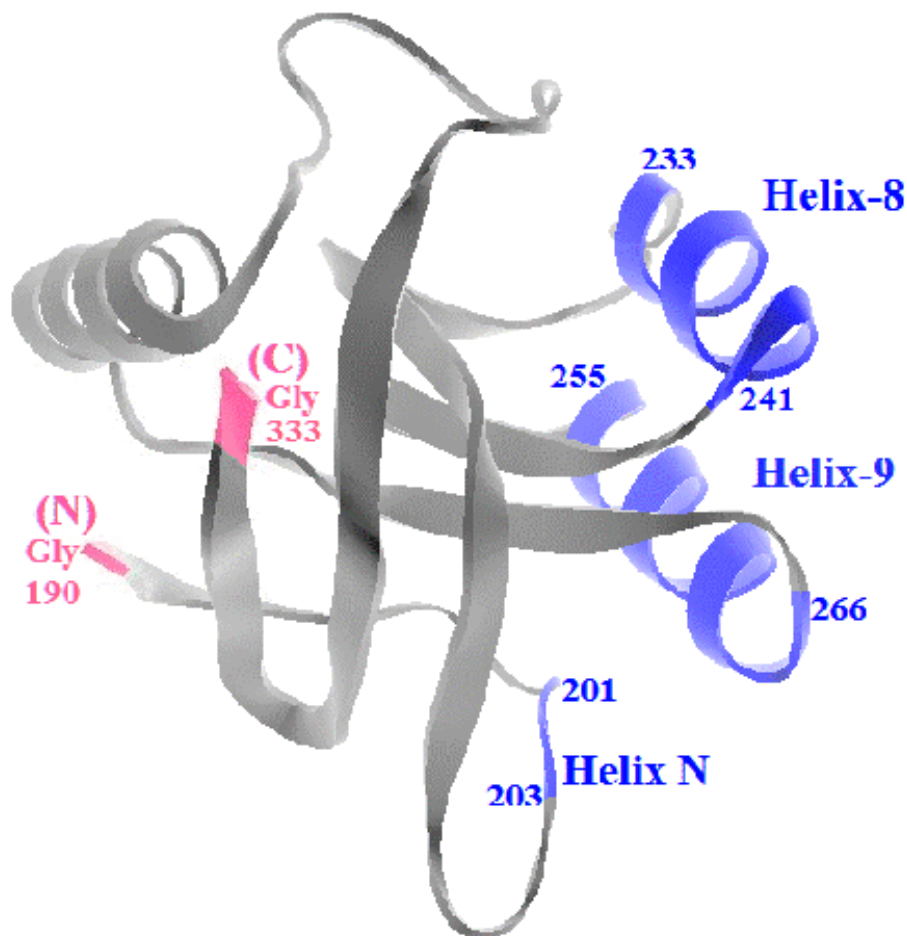


Рисунок 10. Трехмерная структура апикального домена GroEL *T. thermophilus* (pdb: 1SRV), аминокислотные остатки Gly190 – Gly333. Розовым показаны N- и C-концы полипептида, синим –  $\alpha$ -спирали 8, 9 и N, образующие субстрат-связывающую поверхность. Номерами указаны аминокислотные остатки, представляющие собой начала и концы элементов вторичной структуры (цит. по Shararova et al., 2016).

В данном разделе описаны разработка и применение модифицированного апикального домена GroEL *T. thermophilus* (**GrAD**, **GroEL Apical Domain**), предназначенного для использования в качестве белка-носителя для продукции и стабилизации в растворимой форме сложных в работе белков (Shararova et al., 2016). Апикальный домен GroEL впервые был использован в качестве белка-носителя в системе слитых белков и был модифицирован в соответствии с поставленными целями. GrAD (аминокислотные остатки с 190 по 333) отличается от исходного описанного в лаборатории Фершта минишаперона (аминокислотные остатки с 191 по 345) (Zahn et al., 1996) своим источником – он является апикальным доменом GroEL из термофильного организма *T. thermophilus* и сохраняет свою термостабильность, – а также заменой всех остатков метионина на остатки лейцина. Как и в случае с описанной в предыдущем разделе системой для биосинтеза пептидов, отсутствие остатков метионина в GrAD может быть удобным при отщеплении целевого белка под действием бромциана. Трехмерная структура апикального домена GroEL *T. thermophilus*, адаптированная из опубликованной (pdb: 1SRV), показана на Рисунке 10.

### 4.3. Получение и изучение свойств GrAD и слитых конструкторов с ним

В качестве первого шага в создании генной конструкции GrAD при химическом синтезе гена кодоны, кодирующие остатки М 209, М 286 и М 315, были заменены на кодоны, кодирующие остатки лейцина. Полученный безметиониновый GrAD продемонстрировал высокие уровни экспрессии и экспрессировался преимущественно в растворимой форме, а также сохранял присущую исходному минишаперону термостабильность.

В качестве следующего шага были введены относительно длинные гибкие линкеры (11 аминокислотных остатков) либо на С-конце, либо на N-конце GrAD для расширения стерических возможностей взаимодействия целевых белков с субстрат-связывающей поверхностью GrAD при создании слитых конструкций. Последовательность, кодирующая аминокислотные остатки DDDDK, сайт узнавания фермента энтерокиназы, была включена в линкер, чтобы в дальнейшем иметь возможность ферментативного отщепления целевого белка от белка-носителя.

GrAD с линкером на С-конце был использован для получения слитых конструкторов с двумя различными белками. В качестве целевых белков были использованы не модельные пептиды, а два изначально нерастворимых белка, оба кандидаты для потенциальной разработки соответствующих вакцин, а именно Е6 из вируса папилломы человека 16 типа и N-концевой фрагмент Е2 из вируса гепатита С. Оба выбранных целевых белка сами по себе являются гидрофобными нерастворимыми полипептидами, получение которых в стабильных растворимых формах имеет практическую актуальность. Белок Е2 оболочки вируса гепатита С долгое время рассматривался в качестве основного кандидата для создания превентивной вакцины против гепатита С, однако такая вакцина не была создана по причине полной нерастворимости белка Е2 в нативных условиях. Онкогенные белки вируса папилломы человека (ВПЧ), преимущественно 16 и 18 типа, такие как белки Е6 и Е7, являются обязательным фактором развития и поддержания клеточной трансформации (Peng et al., 2021) и совместно экспрессируются в большинстве карцином, индуцированных ВПЧ (Норре-Сейлер et al., 2018). Они представляют собой идеальные мишени для разработки терапевтических вакцин против ВПЧ-инфекций и неоплазии, ассоциированной с ВПЧ (Taghizadeh et al., 2019; Wu, 2003). Для лечения неоплазии, ассоциированной с ВПЧ, существует настоятельная потребность в терапевтической вакцине, индуцирующей цитотоксический Т-клеточный ответ, направленный именно на онкобелки Е6 и Е7, и работы по созданию такой вакцины ведутся (Rice et al., 2015). Правда, в последние годы в этом направлении разрабатывается подход создания ДНК вакцины, поскольку только одна из соответствующих белковых вакцин, с белком Е7, была доведена до второй стадии клинических испытаний (Zhou et al., 2014). Однако вакцина с белком Е6 не дошла до стадии клинических испытаний по причине его гидрофобности и склонности к агрегации.

Таким образом, в разрабатываемой системе для стабилизации сложных в работе белков был использован белок Е6 вируса папилломы человека 16 типа, состоящий из 159 аминокислотных остатков. Сам по себе он полностью нерастворим; задокументировано также, что Е6 нерастворим и в составе слитых конструкторов (Karust & Waugh, 1999; Liu et al., 2009). Для анализа системы слитых белков на основе GrAD с короткой вставкой был выбран N-концевой фрагмент структурного гликопротеина Е2 вируса гепатита С, полипептид, состоящий из 45 аминокислотных остатков. Рекомбинантные негликозилированные формы Е2, представляющие собой полноразмерный белок и его

эктодомен, лишенный трансмембранного домена, обладают высокой гидрофобностью и нерастворимостью (Tarr et al., 2007; Yurkova et al., 2004); N-концевой фрагмент E2 вируса гепатита С также нерастворим сам по себе.

Были проанализированы уровень экспрессии и свойства полученных слитых конструкторов с целевыми белками на С-конце GrAD. При экспрессии *in vivo* при 37°C оба слитых конструктора формировали тельца включения (ТВ). Образование ТВ можно рассматривать в качестве преимущества, поскольку при этом в растворе остается большинство клеточных белков, а в ТВ агрегирует большей частью экзогенный целевой белок, что упрощает его последующую очистку и поэтому часто является предпочтительным при выборе стратегии очистки рекомбинантных белков как в аналитике, так и в индустрии. В случае GrAD-E6 и GrAD-E2 тщательно промытые ТВ уже содержали высокоочищенные целевые конструкторы. Полученные ТВ были растворены в 8 М мочеvine; после денатурации в мочеvine, оба конструктора были полностью ренатурированы в растворимой форме методом многократного разведения.

Одним из важнейших практических вопросов при работе с белками является их растворимость и стабильность в нативных буферах в достаточно высоких концентрациях, необходимых для работы – обычно бывает достаточно концентрации 1–2 мг/мл. В случае конструкторов с GrAD после ренатурации методом разведения конечные концентрации ренатурированных белков были очень низкими, от 10 до 20 мкг/мл, поэтому белки были сконцентрированы до конечной концентрации около 1 мг/мл. Полученные слитые конструкторы сохраняли растворимость как после концентрирования, так и при хранении в высокой концентрации в течение нескольких дней. Помимо этого, протестированные слитые конструкторы сохраняли растворимость и после широко употребляемых процедур замораживания-оттаивания и лиофилизации-перерастворения, что очень важно с практической точки зрения.

Описанные выше слитые конструкторы содержали исходно нерастворимые целевые белки, присоединенные к С-концу GrAD, что означает, что часть слитого конструктора с функцией шаперона синтезировалась раньше, чем присоединенный исходно нерастворимый целевой полипептид. Первоначальным обоснованием такого подхода было то, что в таком конструкторе GrAD имел возможность поддерживать целевой белок в растворимом состоянии даже в процессе биосинтеза. Однако практическая проверка показала, что конструкторы экспрессировались в виде ТВ, по крайней мере, при стандартной температуре экспрессии 37°C. Тем не менее, после ренатурации все полученные слитые конструкторы были полностью растворимыми и на удивление стабильными в растворе, принимая во внимание гидрофобную природу целевых белков, что описано выше. Чтобы проверить значимость прикрепления целевого белка к определенному концу белка-носителя в этой системе слитых белков, был получен слитый конструктор N-концевого фрагмента E2, прикрепленного к N-концу GrAD (E2-GrAD), и протестированы его основные характеристики. Они оказались сходными с параметрами его "зеркального" аналога (GrAD-E2), описанного выше. E2-GrAD также экспрессировался в составе ТВ, после ренатурации сохранял растворимость и стабильность в растворе, сохранялся в растворимой форме в высоких концентрациях, а также был способен переносить процедуры замораживания-оттаивания и лиофилизации-перерастворения без потери стабильности. Таким образом, представляется, что присоединение целевого белка к определенному концу GrAD не оказывает существенного влияния на свойства полученного слитого конструктора. Возможно, этот

результат ожидаем, поскольку N- и C-концы белка-носителя GrAD находятся в непосредственной близости друг от друга, и поэтому целевой белок, связанный с GrAD через гибкий линкер, в обоих случаях имеет почти равные возможности для взаимодействия с субстрат-связывающей поверхностью носителя.

Функциональность целевых белков в составе слитых конструкторов является одной из наиболее важных характеристик системы слитых белков, поскольку сохранение функциональности существенно расширяет возможности использования таких конструкторов. Белок E6 вируса папилломы человека, использованный для создания слитого конструктора GrAD-E6, является онкопротеином и способен распознавать несколько клеточных белков, а также обладает способностью связывать ДНК. Именно способность белка E6 связывать ДНК была использована в качестве функционального теста для слитого конструктора с его участием. Тест с использованием аффинной хроматографии на ДНК, связанной с твердым носителем, продемонстрировал, что GrAD поддерживал способность E6 специфически связываться с ДНК, тогда как сам по себе GrAD с ДНК не связывался.

При создании слитых конструкторов часто также требуется возможность аффинной очистки, для чего вводят метку из шести остатков гистидина (His-метка) для аффинной очистки на металло-хелатной смоле, поэтому в один из конструкторов с GrAD, GrAD-E6, была введена His-метка на N-конце (конструктор 6His-GrAD-E6). Ранее нами была разработана методика эффективной ренатурации на металло-аффинной смоле крупных гидрофобных белков (Shararova et al., 2011), и этот подход был применен и в случае с конструктором 6His-GrAD-E6. Конструктор, денатурированный в мочевице, был нанесен на никель-аффинную смолу в денатурирующих условиях, затем успешно ренатурирован на смоле переводом в нативный буфер, после чего элюирован в нативном буфере, содержащем имидазол. Таким образом, введение His-метки в конструктор позволило провести не только его очистку, но и ренатурацию на твердом носителе с высоким выходом, при этом конструктор был получен в растворимой форме в нативном буфере в более высокой концентрации, чем при ренатурации разбавлением. В дальнейшем, для расширения возможностей этого подхода, нами были разработаны инновационные His-метки для введения в состав полипептидной цепи белка-носителя, что позволило придать носителю аффинность к металло-хелатной смоле и при этом освободить его N- и C-концы для создания слитых конструкторов с целевыми белками. Разработка и потенциальное применение таких His-меток описаны в разделе «Разработка гистидиновых меток для введения в состав полипептидной цепи белков».

#### **4.4. Получение и изучение свойств пермутированных форм GrAD**

В предыдущей части работы было показано, что GrAD, использованный в качестве белка-носителя в системе слитых белков, способен поддерживать исходно нерастворимые целевые белки в растворимом и функциональном состоянии. В слитых конструкторах с GrAD для связи между носителем и целевым белком был использован длинный гибкий линкер, что позволяло целевым белкам найти оптимальное положение относительно субстрат-связывающей поверхности GrAD. Однако следует учитывать, что у исходного GrAD N- и C-концы (N-концевой остаток G190 и C-концевой остаток G333) сближены между собой и оба удалены от субстрат-связывающей поверхности, образованной альфа-спиралями N, 8 и 9 (Рисунок 11 А), так что присоединение избранного целевого белка к любому из концов создает приблизительно равные условия

для взаимодействия двух частей слитого конструкта между собой: такое взаимодействие требует их определенной взаимной ориентации, которая не всегда достижима в пределах единой полипептидной цепи.

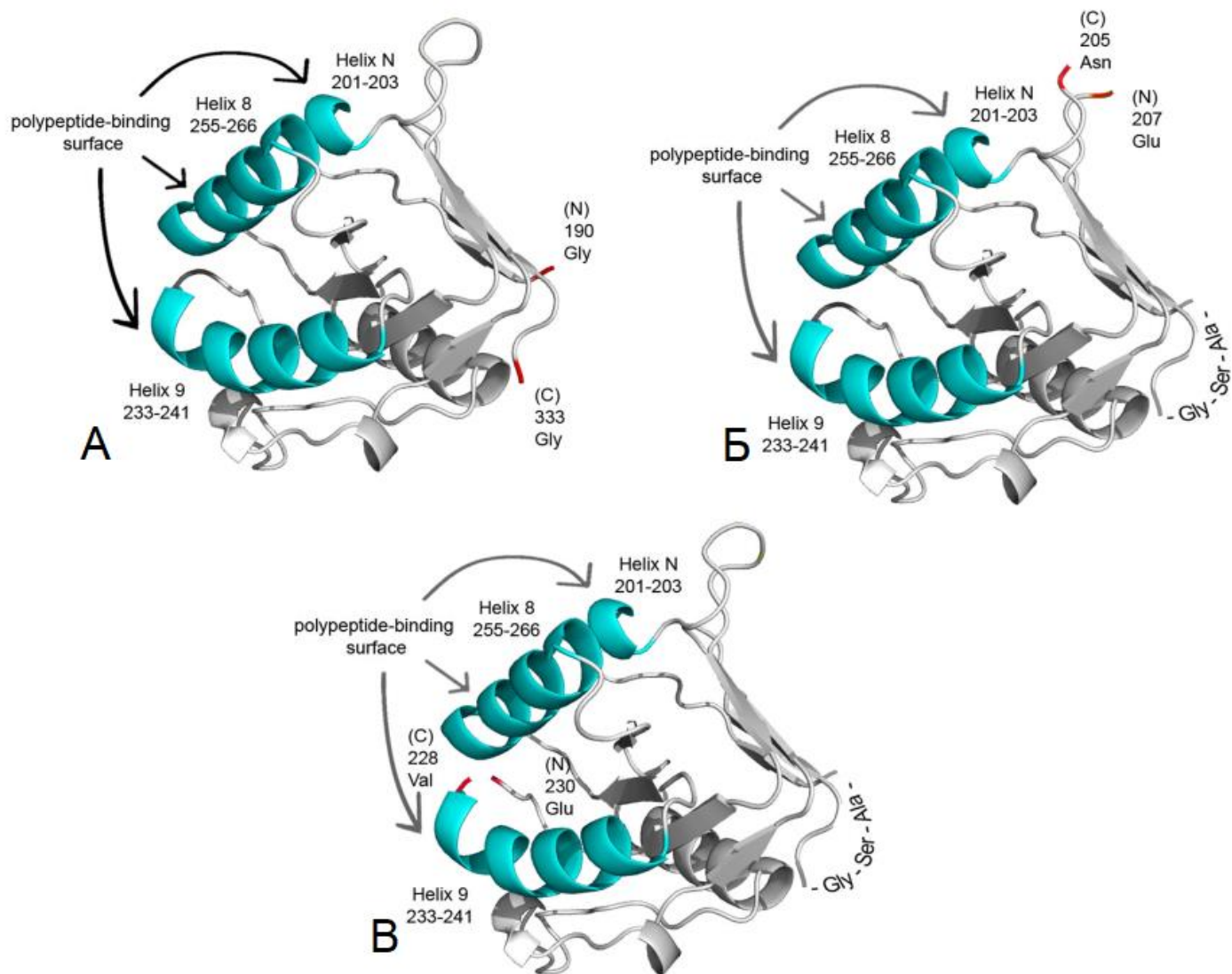


Рисунок 11. Трехмерные структуры GrAD и его пермутированных форм: А – исходный GrAD, Б – GrAD207, В – GrAD230. Для иллюстрации позиций вновь созданных N- и С-концов была использована опубликованная структура апикального домена GroEL *T. thermophilus* (pdb: 1SRV). Исходные (А) или вновь созданные (Б и В) N- и С-концы выделены красным, альфа-спирали 8, 9 и N, образующие полипептид-связывающую поверхность, показаны бирюзовым. Линкер из трех аминокислотных остатков, соединяющий исходные N- и С-концы полипептидной цепи, показан на панелях Б и В. (цит. по Yurkova et al., 2019 с изменениями).

Для расширения возможностей взаимодействия целевого белка с субстрат-связывающей поверхностью GrAD, и, соответственно, для расширения спектра потенциальных целевых белков, разработка GrAD имела продолжение, направленное на улучшение – или, скорее, персонализацию – взаимодействия между целевым белком и белком-носителем. Работа состояла в создании пермутированных форм GrAD, путем соединения его естественных N- и С-концов коротким линкером и создания новых N- и С-концов в разных частях поверхности GrAD, что показано на Рисунке 11 Б и В.

Стратегия получения пермутаций позволяет, соединив существующие N- и С-концы GrAD линкером, создавать новые N- и С-концы в других местах полипептидной

цепи, например, в непосредственной близости к субстрат-связывающей поверхности, не затрагивая ее, и этот подход может сделать белок-носитель действительно широко применимым, т.е. способным эффективно поддерживать в растворимом состоянии самые разные целевые белки. Исходные N- и C-концы GrAD были соединены с помощью линкера из трех аминокислотных остатков Ala-Ser-Gly (Рисунок 11 Б и В). Для новых N- и C-концов были выбраны две альтернативные позиции. Один из разрывов располагался в неструктурированном участке после спирали N исходной полипептидной цепи. Новым N-концом стал Glu 207, а C-концом – Asn 205 (Рисунок 11 Б; эта пермутация получила название GrAD207). Новые концы второй пермутации, N-конец Glu 230 и C-конец Val 228, расположены между альфа-спиралями 8 и 9, образующими основную субстрат-связывающую поверхность. Эта пермутация получила название GrAD230 (Рисунок 11 В). Таким образом, в обоих случаях новые N- и C-концы GrAD расположены в непосредственной близости от субстрат-связывающей поверхности. Обе пермутированные формы GrAD были экспрессированы в клетках *E. coli*, и их основные свойства проанализированы. Обе пермутированные формы были получены с высоким выходом и преимущественно в растворимой фракции; что касается их термостабильности, GrAD207 полностью сохранял термостабильность исходного GrAD, тогда как GrAD230 проявлял некоторую тенденцию к агрегации, хотя более 70% белка оставалось тем не менее в растворимой фракции. Пермутированные формы GrAD были также подвергнуты процедурам замораживания-оттаивания в нативном буфере и лиофилизации-перерастворения, для определения их стабильности при часто используемых биохимических манипуляциях. GrAD207 продемонстрировал такую же стабильность, что и исходная форма GrAD, тогда как GrAD230 оказался несколько более лабильным, сохраняя, однако, не менее 80% белка в растворимом состоянии.

Для определения вторичной структуры GrAD и его пермутированных форм был использован метод кругового дихроизма. Вторичная структура GrAD и его пермутированных форм была определена при температурах 20°C и 94°C (Рисунок 12, А и Б).

Вторичные структуры GrAD и GrAD207 были практически идентичны. При 20°C в обоих случаях они соответствовали наличию сформированной вторичной структуры, состоящей из альфа-спиралей и бета-структур (Рисунок 12 А). Определенные параметры вторичной структуры соответствовали данным трехмерной структуры апикального домена GroEL *Thermus thermophilus*, что говорит о сохранении вторичной структуры в данных формах GrAD. Белок плотно упакован, что следует из данных кругового дихроизма в ближнем ультрафиолете. При 94°C параметры белков, определяемые методом кругового дихроизма, соответствовали таковым при отсутствии стабильной вторичной структуры и плотной упаковки белка. Что касается пермутированной формы GrAD230, для нее спектры кругового дихроизма при 20°C и 94°C существенно не различались между собой и соответствовали таковым при отсутствии стабильной вторичной структуры и плотной упаковки белка (Рисунок 12 Б), что говорит о том, что эта форма GrAD существует в состоянии «расплавленной глобулы». Тем не менее, при всех биохимических манипуляциях пермутированная форма GrAD230 сохраняла растворимость, хотя, как правило, замораживание-оттаивание и лиофилизация в отсутствие стабилизирующих агентов сказываются резко отрицательно на растворимости многих белков даже со стабильной структурой.

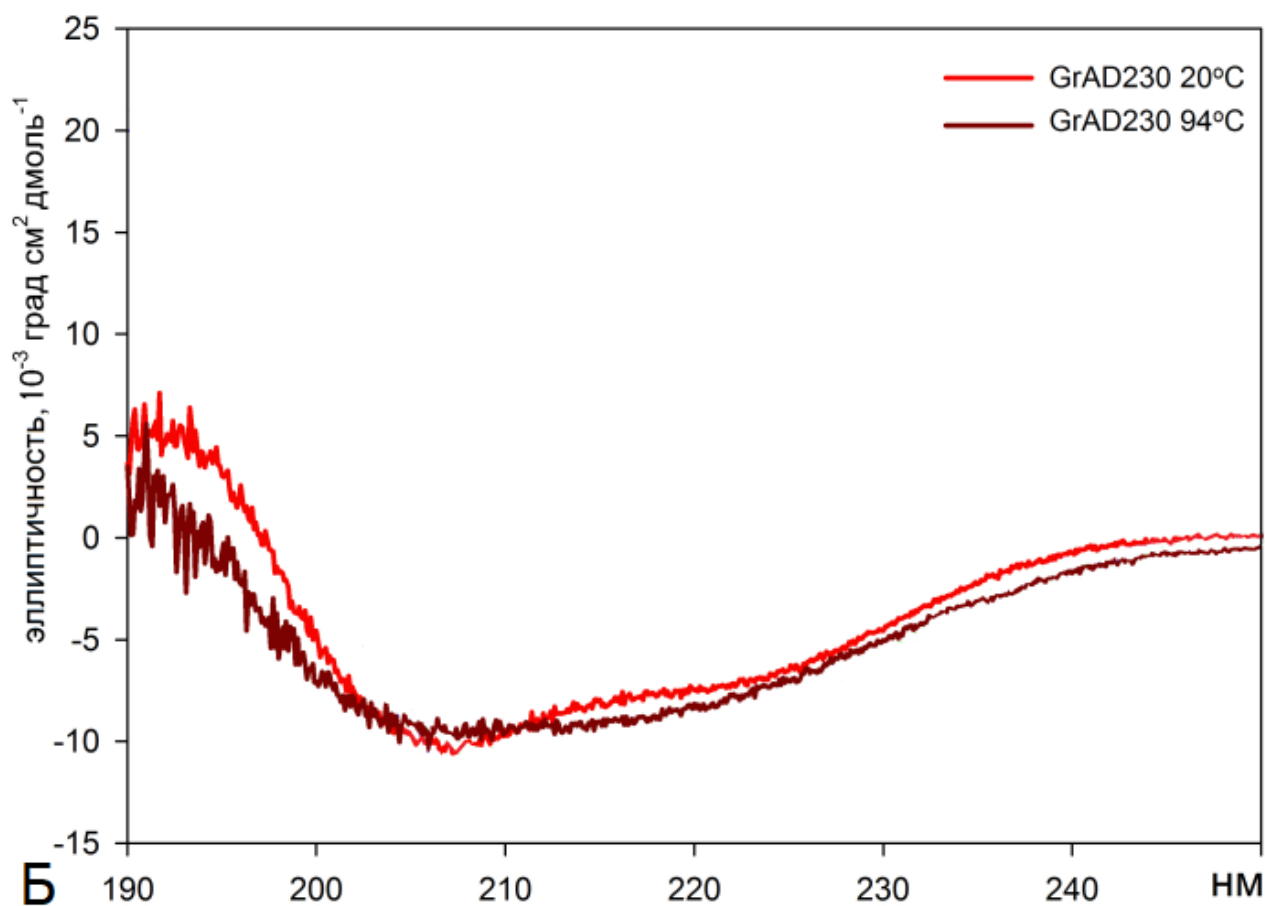
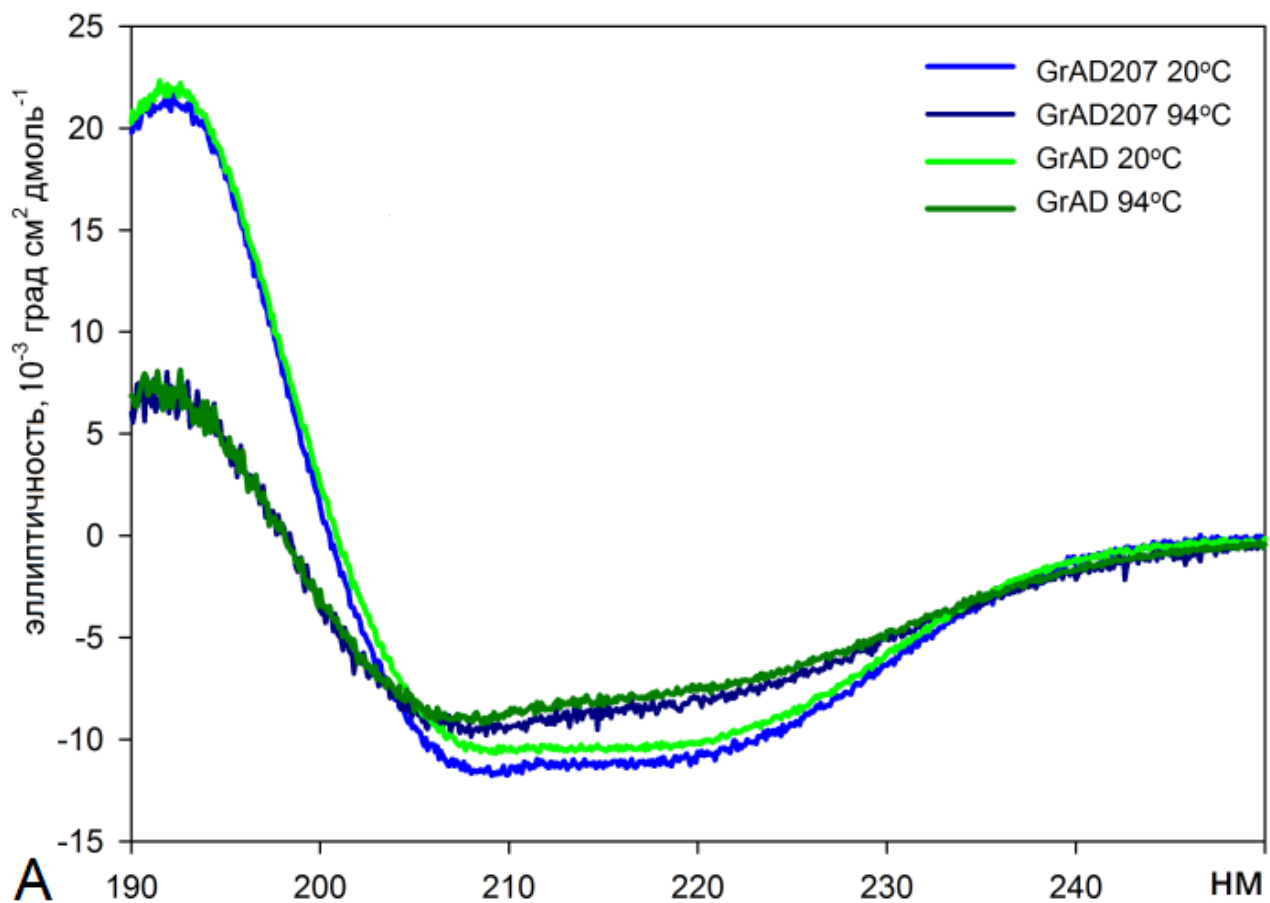


Рисунок 12. Спектры кругового дихроизма GrAD, GrAD207 и GrAD230 при различных температурах: А – GrAD и GrAD207, Б – GrAD230 (цит. по Yurkova, Zenin, et al., 2019).

Температурная зависимость кругового дихроизма для всех трех белков (Рисунок 13) показала, что GrAD и GrAD207 при термоинактивации вели себя схожим образом, а именно их структура дестабилизировалась при температурах выше 80 °С, с потерей половины эллиптичности при температуре около 85°С (Рисунок 13, кривые 2 и 3). Структура пермутированной формы GrAD230, напротив, практически не изменялась с изменением температуры и оставалась дестабилизированной на всем протяжении эксперимента (Рисунок 13, кривая 1).

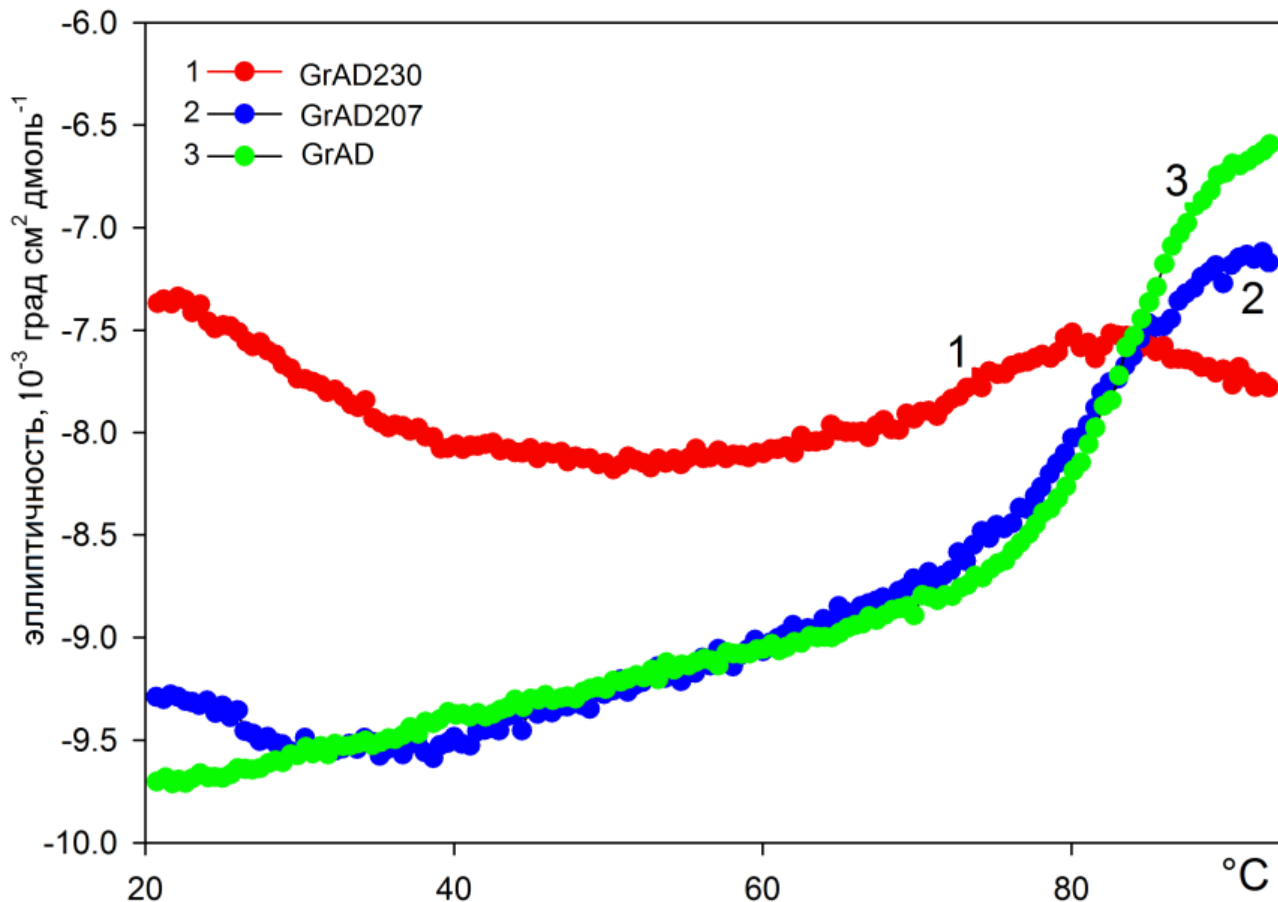


Рисунок 13. Температурная зависимость кругового дихроизма GrAD, GrAD207 и GrAD230 при фиксированной длине волны: 1 – GrAD230, 2 – GrAD207, 3 – GrAD (цит. по Yurkova, Zenin, et al., 2019).

Таким образом, пермутированная форма GrAD230, по данным кругового дихроизма, имела дестабилизированную структуру во всем диапазоне температур, однако при всех биохимических манипуляциях сохраняла растворимость, что не всегда характерно даже для хорошо структурированных белков. Одним из крупных открытий в области физики белков последних лет является обнаружение большого количества белков без стабильной пространственной структуры в нативных условиях (intrinsically disordered proteins). Показано, что такие белки выполняют многие биологические функции, способны к специфическим белок-белковым и белок-лигандным взаимодействиям. Отсутствие жесткой структуры позволяет этой группе белков осуществлять взаимодействия и выполнять функции, на которые неспособны белки со стабильной пространственной структурой. Пермутированная форма GrAD230 соответствовала по физическим характеристикам белкам без стабильной пространственной структуры, интересной задачей может быть дальнейший анализ этого варианта минишаперона.

С точки зрения практического применения можно сделать вывод, что не только GrAD, но и обе полученные пермутированные формы GrAD могут быть успешно использованы в качестве белка-носителя в системе слитых белков. Очевидно, что возможность размещать целевые белки в разных местах на поверхности белка-носителя с целью обеспечить оптимальную взаимную ориентацию двух составных частей слитого конструктора способна сделать подобную систему практически универсальной. Разумеется, возможно создание и других пермутированных вариантов GrAD для выбора наиболее подходящего носителя для конкретного целевого белка. Ожидается, что использование GrAD или его пермутированных форм в качестве носителей не только способно повысить уровень биосинтеза целевых белков и их стабильность в растворе, но также упростить последующие процедуры очистки слитого конструктора и отщепления целевого белка, поскольку GrAD изначально был сконструирован не содержащим остатков метионина для удобства отщепления целевого белка под действием бромциана.

С теоретической точки зрения, интересен сам факт успешного применения стратегии создания пермутированных форм к апикальному домену шаперона GroEL. Из анализа различных пермутаций большого количества белков известно, что соединение исходных N- и C-концов и создание новых концов может оказывать влияние на множество аспектов существования белка, таких, как структура, стабильность, процессы сворачивания и т.д. Важно и то, что существует вероятность создания пермутированных вариантов, сохраняющих основные структурные параметры исходного белка, и даже, в некоторых случаях, с улучшенными характеристиками.

Что касается апикального домена GroEL, было показано, что он способен ассистировать сворачиванию некоторых белков, хотя не обладает собственной АТФазной активностью. Возможно, белки-носители на основе GrAD тоже смогут способствовать правильному сворачиванию целевых белков. Систематический анализ пермутированных вариантов GrAD, хотя и не входил в задачи данной работы, представляет большой интерес не только с практической, но и с теоретической точки зрения.

#### **4.5. Получение и изучение свойств слитых конструкторов на основе GrAD и его пермутированных форм GrAD230 и GrAD207**

С целью сравнить влияние белка-носителя на состояние и стабильность целевого исходно нерастворимого белка в составе слитых конструкторов были получены слитые конструкторы на основе GrAD и его пермутированных форм GrAD230 и GrAD207. В качестве исходно нерастворимого целевого белка был выбран использованный ранее N-концевой фрагмент белка E2 вируса гепатита С. Данный фрагмент был присоединен к C-концам всех трех вариантов GrAD (GrAD-E2, GrAD207-E2, GrAD230-E2), а также к N-концу GrAD (E2-GrAD). Все полученные таким образом слитые конструкторы продемонстрировали высокий уровень экспрессии и продуцировались в нерастворимой форме в составе телец включения, поэтому в качестве исходного материала для дальнейших экспериментов использовали тельца включения. Этот материал был растворен в 8 М мочеvine, очищен с помощью катион-обменной хроматографии и ренатурирован. Для всех конструкторов выход растворимого ренатурированного белка составлял не менее 90%. С помощью еще одной хроматографической стадии белки были дочищены, сконцентрированы и затем использованы для дальнейших анализов. Слитые

конструкты на основе GrAD и его пермутированных форм GrAD230 и GrAD207, как ранее сами белки-носители, были исследованы на предмет стабильности при хранении в высокой концентрации, термостабильности и устойчивости при биохимических манипуляциях. По результатам этих исследований конструктор GrAD207-E2 демонстрировал ту же высокую стабильность, что и конструкторы с GrAD, E2-GrAD и GrAD-E2. Конструктор GrAD230-E2, хотя и был стабильным при хранении, демонстрировал некоторую лабильность при биохимических манипуляциях, как и сам белок-носитель GrAD230, но, тем не менее, подавляющая часть конструктора оставалась растворимой после процедур замораживания-оттаивания и лиофилизации-перерастворения.

Из полученных результатов следует, что, как и в случае конструкторов на основе исходного GrAD, агрегация при продукции *in vivo* не является собственным свойством конструкторов на основе пермутированных форм белка-носителя, а, скорее, результатом биосинтетического пути сворачивания в условиях сверх-продукции. Биосинтетический фолдинг белка в клетке – сложный процесс, который начинается вскоре после начала биосинтеза полипептида, и для многих белков требует вовлечения специфических шаперонов, одного или нескольких. В противоположность этому, ренатурация *in vitro* для многих белков может происходить спонтанно, как с участием шаперонов, так и без него. Очевидно, что влияние белка-носителя GrAD на основные свойства нерастворимых целевых полипептидов обусловлено их связыванием с полипептид-связывающей поверхностью носителя. Неполярная полипептид-связывающая поверхность GrAD достаточно обширна, так что связывание может происходить через многоузловые взаимодействия. Взаимодействие с GrAD может защитить экспонированные на поверхность гидрофобные участки малорастворимых целевых белков и, таким образом, эффективно предотвратить их агрегацию. Кроме того, минишаперон способен облегчать сворачивание некоторых белков. Следовательно, можно предположить, что и GrAD как белок-носитель не только обеспечивает связывание целевых белков, но также может играть активную роль в ренатурации некоторых из них.

Из полученных результатов можно сделать вывод, что все полученные формы GrAD могут быть успешно использованы в качестве белков-носителей в системе слитых белков. Все эти формы продемонстрировали способность поддерживать в растворимой форме исходно нерастворимый белок, N-концевой фрагмент белка E2 вируса гепатита С. Для исходной формы GrAD было сделано два слитых конструктора, с N-концевым фрагментом белка E2 вируса гепатита С, присоединенным и к N-, и к С-концу. Между ними не обнаружилось существенной разницы в свойствах, что можно объяснить тем, что у GrAD N- и С-концы сближены между собой, и присоединение целевого белка к одному из них не оказывает существенного влияния на результирующие свойства конструктора.

В составе слитых конструкторов, описанных в данной работе, обе пермутированные версии GrAD были сравнимы по своим свойствам с исходным GrAD, и были успешно использованы в качестве белков-носителей. Оба слитых конструктора на основе пермутированных форм GrAD с исходно нерастворимым целевым белком продемонстрировали после ренатурации высокую стабильность и растворимость, сохраняющуюся и после процедур замораживания-оттаивания и лиофилизации-перерастворения. Таким образом, полученные пермутированные формы GrAD, так же,

как и исходный GrAD, были способны стабилизировать исходно нерастворимый полипептид. В представленных в данной работе экспериментах свойства исследованных слитых конструкторов не сильно различались между собой, но из общих соображений понятно, что возможность помещать целевые белки на различных частях поверхности белка-носителя с целью добиться оптимальной взаимной ориентации двух частей слитого конструктора делает всю систему более варибельной и поэтому чрезвычайно широко применимой.

#### 4.6. Заключение к разделу «Система для стабилизации в растворимой форме исходно нерастворимых белков»

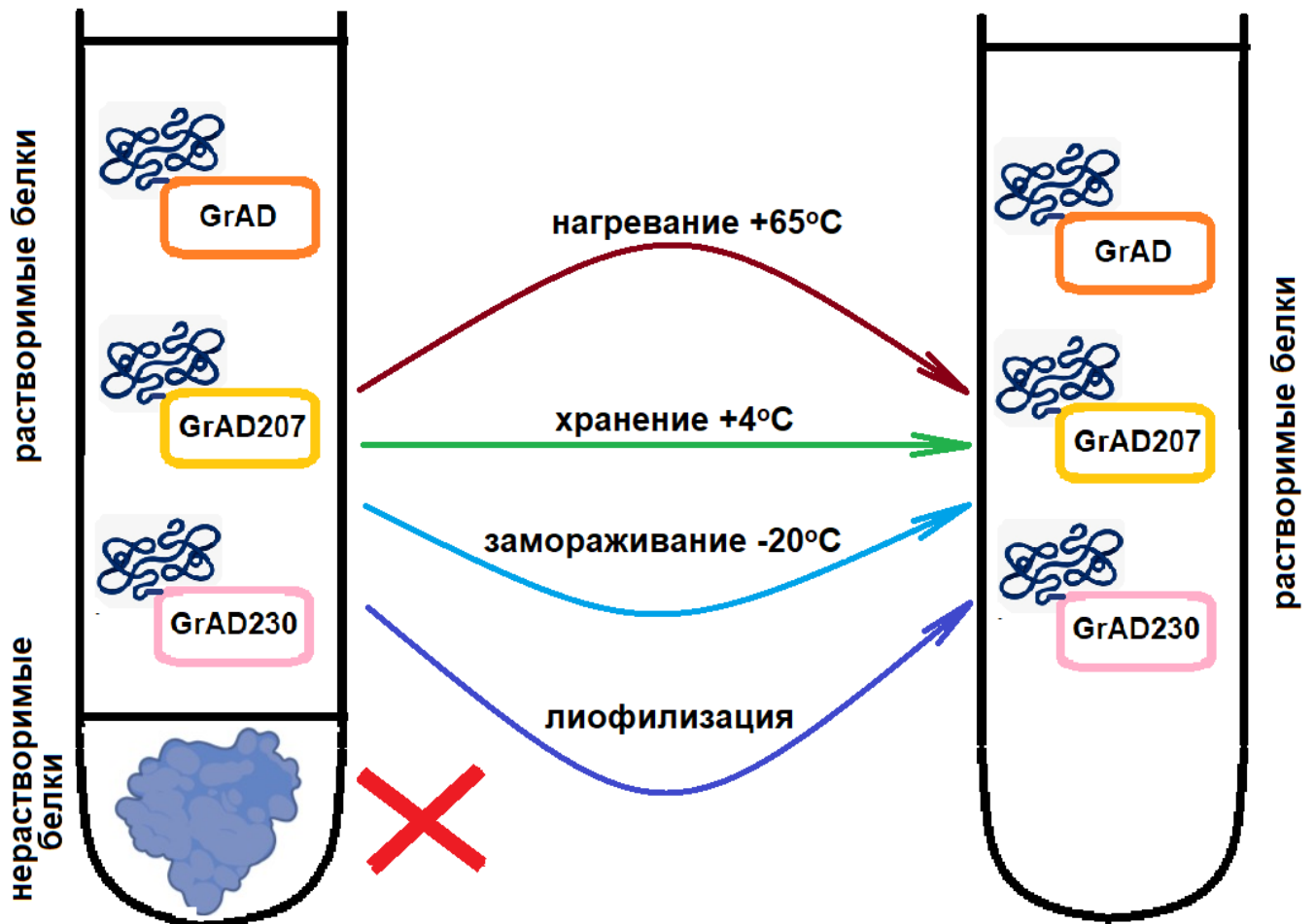


Рисунок 14. Графическая аннотация заключения к разделу «Система для стабилизации в растворимой форме исходно нерастворимых белков».

Графическая аннотация заключения к разделу представлена на Рисунке 14. В данном разделе описана разработка системы для стабилизации сложных в работе белков на основе модифицированного апикального домена шаперона GroEL *Thermus thermophilus*. В виде слитых конструкторов с GrAD в экспрессионной системе *E. coli* были получены в стабильных растворимых формах два исходно нерастворимых белка, имеющих практическое значение. Полученные растворимые формы белков были не только устойчивы при хранении в нативных условиях, но и сохраняли стабильность при стандартных биохимических манипуляциях. В разделе описаны также впервые созданные функциональные пермутированные формы GrAD, применение которых может увеличить разнообразие потенциальных целевых белков.

## ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА ГИСТИДИНОВЫХ МЕТОК ДЛЯ ВВЕДЕНИЯ В СОСТАВ ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ БЕЛКОВ

В одном из предыдущих разделов работы была описана очистка и ренатурация на металло-аффинной смоле слитого конструктора 6His-GrAD-E6, в котором метка из шести остатков гистидина была присоединена к N-концу белка-носителя. Однако у белков, используемых в качестве партнеров в системах слитых белков для различных целей, как это имеет место в данном случае, удобно иметь свободные N- и C-концы, доступные для присоединения целевых белков. Использование любого конца для прикрепления His-метки может либо создавать стерические препятствия для сворачивания целевого белка или всего конструктора с целевым белком, либо препятствовать его аффинной очистке в нативных условиях, опять-таки из-за стерических затруднений. Тем не менее, гистидиновые метки на N- или C-концах белков широко используются не только для аффинной очистки методом металло-аффинной хроматографии, но и для других методов исследований, таких, как иммуноблоттинг (Sano et al., 2018; Sekiya et al., 2021; Zhao & Huang, 2016), мечение флуоресцентными красителями (Bartoschik et al., 2018; Chao et al., 2017; Gatterdam et al., 2018; Mahalingam & Fessenden, 2015; Okitsu et al., 2017), изучение рефолдинга (Ban et al., 2020; Dagar et al., 2017; Mao et al., 2020), разработка вирусных векторов (Chung et al., 2023) и других (Chavan et al., 2019). His-метки удобны: будучи короткими, они позволяют проводить элюирование белков в мягких нативных условиях и при этом обеспечивают разумную степень чистоты. Но описаны и случаи, когда расположение His-меток на концах белка может создавать проблемы: классическая гексагистидиновая последовательность может вызывать образование белковых телец включения (Zhao & Huang, 2016; Zhu et al., 2013), олигомеризацию, опосредованную остатками гистидина (Ayoub et al., 2023; López-Laguna et al., 2023), нарушение каталитических функций ферментов (Aslantas & Surmeli, 2019; Elgharbi et al., 2022; Esen et al., 2019; Majorek et al., 2014), нарушение белок-белковых взаимодействий (Flores et al., 2022), или же метка не может быть использована на N- или C-концах из-за их функциональной и/или структурной вовлеченности в другие процессы, как в случае белков-носителей для слитых конструкторов. Разумной альтернативой является введение метки в полипептидную цепь белка-носителя таким образом, чтобы сохранить его структуру, и чтобы метка была при этом экспонирована в раствор. Существует несколько исследований, описывающих такое применение (Deng & Boxer, 2018; Michel-Souzy et al., 2021). Стратегия использования His-меток в составе полипептидной цепи была применена, например, для очистки и концентрации вирусных векторов с целью их дальнейшего использования при вакцинации или же генной терапии (Chung et al., 2023). Однако в некоторых случаях использование 6His-метки как на C- или N-конце, так и при встраивании в полипептидную цепь, влияло на структуру или функции модифицированного белка. Поэтому как выбор места введения метки, так и конфигурация самой метки, могут иметь решающее значение для функционирования полученной конструкции. Влияние His-меток, встроенных в полипептидную цепь, на вторичную структуру и функцию белка варьирует в зависимости от индивидуальных характеристик отдельных белков и не было изучено достаточно подробно, чтобы понять закономерности рационального дизайна His-меток.

В данном разделе работы описаны разработка новых вариантов His-меток и их использование в сравнении с традиционными вариантами в составе полипептидной цепи

двух белков, принадлежащих к разным структурным классам. Оба эти белка используются в качестве партнеров в составе систем слитых белков для различных целей, поэтому в них удобно иметь свободные N- и C-концы, доступные для присоединения целевых белков.

Одним из протестированных белков-носителей был пермутированный вариант GrAD, GrAD207, описанный в предыдущем разделе работы, а вторым – eGFP, зеленый флуоресцентный белок, имеющий множество применений для флуоресцентного мечения других белков и многих компонентов клетки. Возможность очистки описанных в данной работе и других потенциальных слитых конструкторов с участием GrAD207 в мягких нативных условиях должна стать ценным дополнением к его характеристикам. Что касается eGFP, его выбор был обусловлен широким спектром применения в качестве партнера в составе систем слитых белков, а также отличием его структурных характеристик от таковых GrAD207.

Считается, что при встраивании в полипептидную цепь полигистидиновая последовательность образует спиральные элементы, особенно в контексте отрицательно и положительно заряженных аминокислот (Noble Jesus, 2020). Этот момент важно учитывать при включении His-меток в петлю полипептидной цепи, поскольку образование любых структурированных элементов вторичной структуры может оказаться нежелательным. Чтобы избежать введения непрерывной полигистидиновой последовательности, имеющей склонность к образованию структуры, в состав метки иногда добавляют другие аминокислотные остатки; было, например, описано использование остатков аланина для этой цели (Knecht et al., 2009). В двух новых альтернативных His-метках, описанных в данном разделе работы, для разделения триплетов остатков гистидина были использованы остатки глицина (3N1G3N и 3N3G3N). Известно, что остатки глицина нарушают структуру спиральных элементов по причине их высокой конформационной подвижности; именно поэтому остатки глицина обычно обнаруживаются на концах спиральных элементов либо внутри неструктурированных областей, и в данном случае им была предназначена такая же роль.

Остатки гистидина, в свою очередь, были объединены в триплеты; объединение в триплеты было выбрано исходя из следующих соображений. Моделирование взаимодействий полигистидиновых пептидов с иммобилизованными ионами переходных металлов показало, что в этом процессе преимущественно участвуют остатки, занимающие положения  $i$  и  $i+2$  или  $i$  и  $i+5$  (Chen et al., 2005; Knecht et al., 2009). Эти данные были получены для пептидов, но, предположительно, могут быть верны и в случае белков с His-метками, в отсутствие значительных стерических эффектов. Поэтому в данной работе для встраивания в полипептидные цепи были предложены, помимо более распространенных полигистидиновых меток без промежуточных аминокислотных остатков, неканонические пептиды 3N1G3N и 3N3G3N.

His-метки были протестированы на двух белках, принадлежащих к разным структурным классам, а анализ полученных результатов позволил предложить основания для рационального дизайна His-меток для включения в разные белки. Оба белка, на которых были протестированы разработанные встраиваемые His-метки, используются в качестве партнеров в составе систем слитых белков для разных целей.

GrAD207, пермутированный вариант апикального домена шаперона GroEL из *T. thermophilus*, описанный в предыдущих разделах этой работы, предназначен для стабилизации в растворе склонных к агрегации белков. Пермутированная форма

GrAD207 относится к  $\alpha$  и  $\beta$  структурным классам — трехслойная  $\beta\beta\alpha$ -складка. Встроенные His-метки были введены вместо линкера, первоначально соединявшего нативные N- и C-концы пермутированного белка (Ala-Ser-Gly, Рисунок 11 Б); таким образом, место вставки His-меток находилось между аминокислотными остатками 128 и 132 на повороте между  $\beta$ -цепью и  $\alpha$ -спиралью вблизи C-конца белка GrAD207. Место вставки расположено таким образом, что не затрагивает функционально значимую субстрат-связывающую поверхность GrAD207 и не влияет на структурные элементы, участвующие в формировании гидрофобного кора белка; кроме того, на предыдущем этапе работы при создании пермутированной формы GrAD207 было показано, что соединение N- и C-концов GrAD линкером не повлияло на структурную организацию GrAD. Это дало основание полагать, что введение His-метки вместо линкера Ala-Ser-Gly также не окажет существенного влияния на структуру GrAD. Для GrAD207 были получены конструкторы как со вставками 3Н1G3Н и 3Н3G3Н, так и 7Н и 3Н.

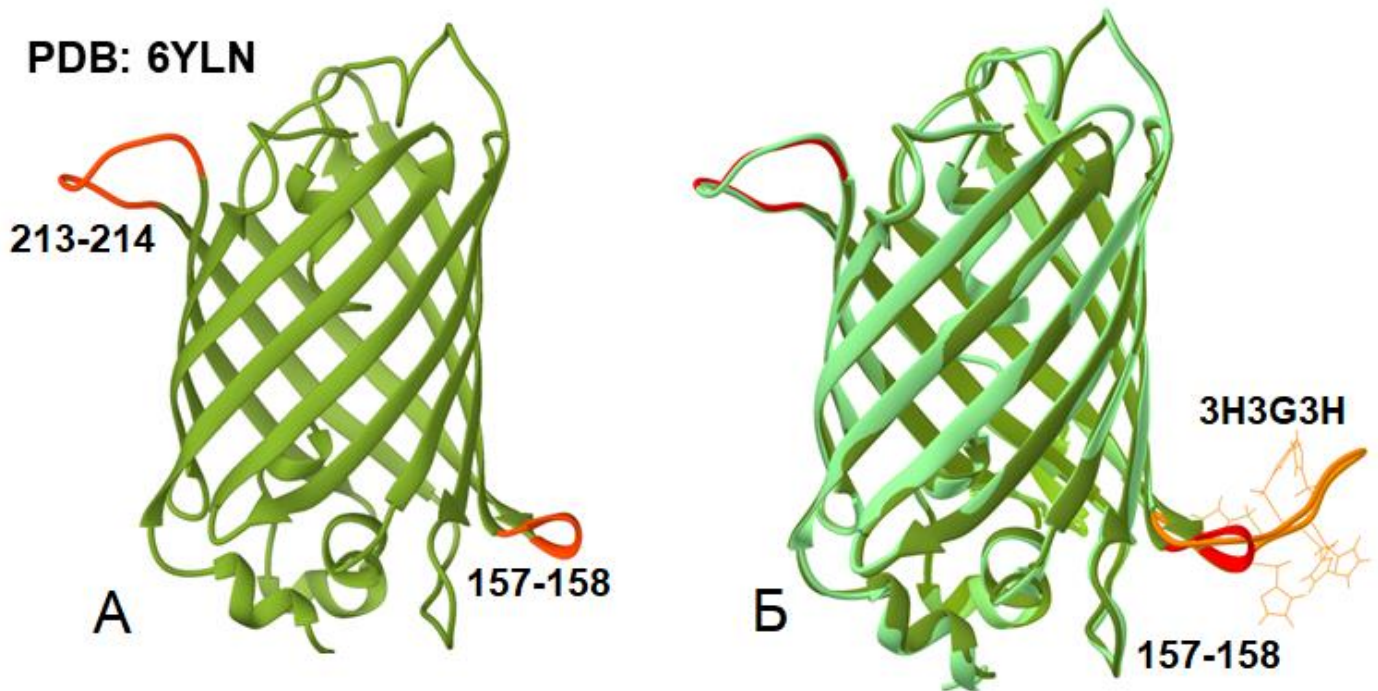


Рисунок 15. Положение метки 3Н3G3Н, введенной в eGFP: А – опубликованная структура eGFP (pdb 6YLN), Б – модель eGFP с меткой 3Н3G3Н, введенной между аминокислотными остатками 157 и 158. Модель предсказана при помощи программы I-TASSER, суперпозиция выполнена в UCSF Chimera.

eGFP – зеленый флуоресцентный белок медузы *Aequorea victoria* с повышенной интенсивностью флуоресценции (enhanced green fluorescent protein, eGFP), полученный с помощью случайного мутагенеза. eGFP имеет целый ряд применений: его используют как репортерный ген, для визуализации *ex vivo* или для определения эффективности трансфекции (Cormack et al., 1996). Коммерчески доступные варианты eGFP обычно имеют N-концевую His-метку, поскольку их очистку проводят с помощью металло-аффинной хроматографии. Без преимущества аффинной очистки eGFP является сложным в работе белком, склонным к агрегации и неспецифическим взаимодействиям с хроматографическим носителем. Если рассматривается возможность создания слитого конструктора с eGFP, предпочтительно, чтобы концы eGFP были свободными. Структурно eGFP относится к в основном  $\beta$ -структурным белкам и имеет жесткую структуру  $\beta$ -

бочонка. Сайт для вставки His-метки был выбран между аминокислотными остатками 157 и 158 на повороте  $\beta$ -шпильки, что проиллюстрировано на Рисунке 15.

Выбор места введения His-метки был основан на анализе опубликованной трехмерной структуры eGFP (PDB: 6YLQ) и литературных данных с учетом его структурных и функциональных свойств. Поворот в  $\beta$ -шпильке между аминокислотными остатками 157 и 158 был выбран, поскольку эта петля экспонирована в раствор, а также на основании литературных данных о том, что мутации в этом месте не должны влиять на созревание хромофора GFP. eGFP был получен с метками 3H3G3H и 7H, встроенными между аминокислотными остатками 157 и 158.

Все полученные конструкторы были экспрессированы в соответствующих штаммах *E. coli*: конструкторы GrAD207 (GrAD207, GrAD207\_3H, GrAD207\_7H, GrAD207\_3H1G3H, GrAD207\_3H3G3H) в BL21(DE3), а конструкторы eGFP (eGFP, eGFP157\_7H, eGFP157\_3H3G3H) в ArcticExpress(DE3). Все белки продуцировались преимущественно в растворимой форме, за исключением случая с GrAD207\_7H, для которого соотношение растворимой и агрегированной форм составляло примерно 1:1. Таким образом, введение 7H-метки в GrAD 207 привело к образованию телец включения. В случае eGFP образование телец включения не наблюдалось, ни с 7H меткой, ни с 3H3G3H.

Для дальнейшей работы белки были очищены и протестированы на стабильность. В образце GrAD207\_7H после недели хранения при температуре +4°C появилась белая суспензия. В других образцах при тех же условиях визуально обнаруживаемых изменений не наблюдалось. Исследование образца GrAD207\_7H методом гель-хроматографии и сравнение профиля элюции с профилем GrAD207\_3H1G3H выявило присутствие нескольких агрегатных форм GrAD207\_7H в растворе. Эти результаты указывают на то, что введение 7H-метки в GrAD 207 не только увеличило вероятность образования телец включения при продукции, но и способствовало последующей агрегации очищенного белка в растворе. В случае введения 7H в eGFP таких эффектов обнаружено не было.

Для качественной характеристики сродства конструкторов к иммобилизованным ионам  $Ni^{2+}$  было использовано определение относительного времени удерживания на  $Ni^{2+}$ -аффинной смоле. Электрофоретический анализ полученных профилей элюции конструкций с  $Ni^{2+}$ -аффинной смолы показал, что белки со всеми вариантами His-меток были способны связываться с  $Ni^{2+}$ -аффинной смолой, но обладали разной способностью удерживаться на смоле в зависимости от введенной His-метки (Рисунок 16). Для обоих белков с 7H меткой относительное время удерживания было самым продолжительным, а для GrAD207\_3H – самым коротким. Хроматографический метод выявил лишь незначительную разницу между временами удерживания GrAD207\_3H1G3H и GrAD207\_3H3G3H, и эта разница становилась более выраженной по мере насыщения смолы белком. Увеличение количества белка на смоле снижает вероятность повторного связывания белка с носителем в процессе элюирования, а также уменьшает влияние неспецифических взаимодействий с матриксом. Эти соображения привели к предположению, что для GrAD207\_3H3G3H неспецифические взаимодействия вносили свой вклад в его связывание с металло-аффинной смолой, что дополнительно обсуждается позже. Для eGFP157\_3H3G3H профиль элюции не был схож с профилем элюции GrAD207\_3H3G3H, а был аналогичен профилю GrAD207\_3H, что позволяет предположить, что введение метки 3H3G3H оказывает различное влияние на структуры eGFP и GrAD207.

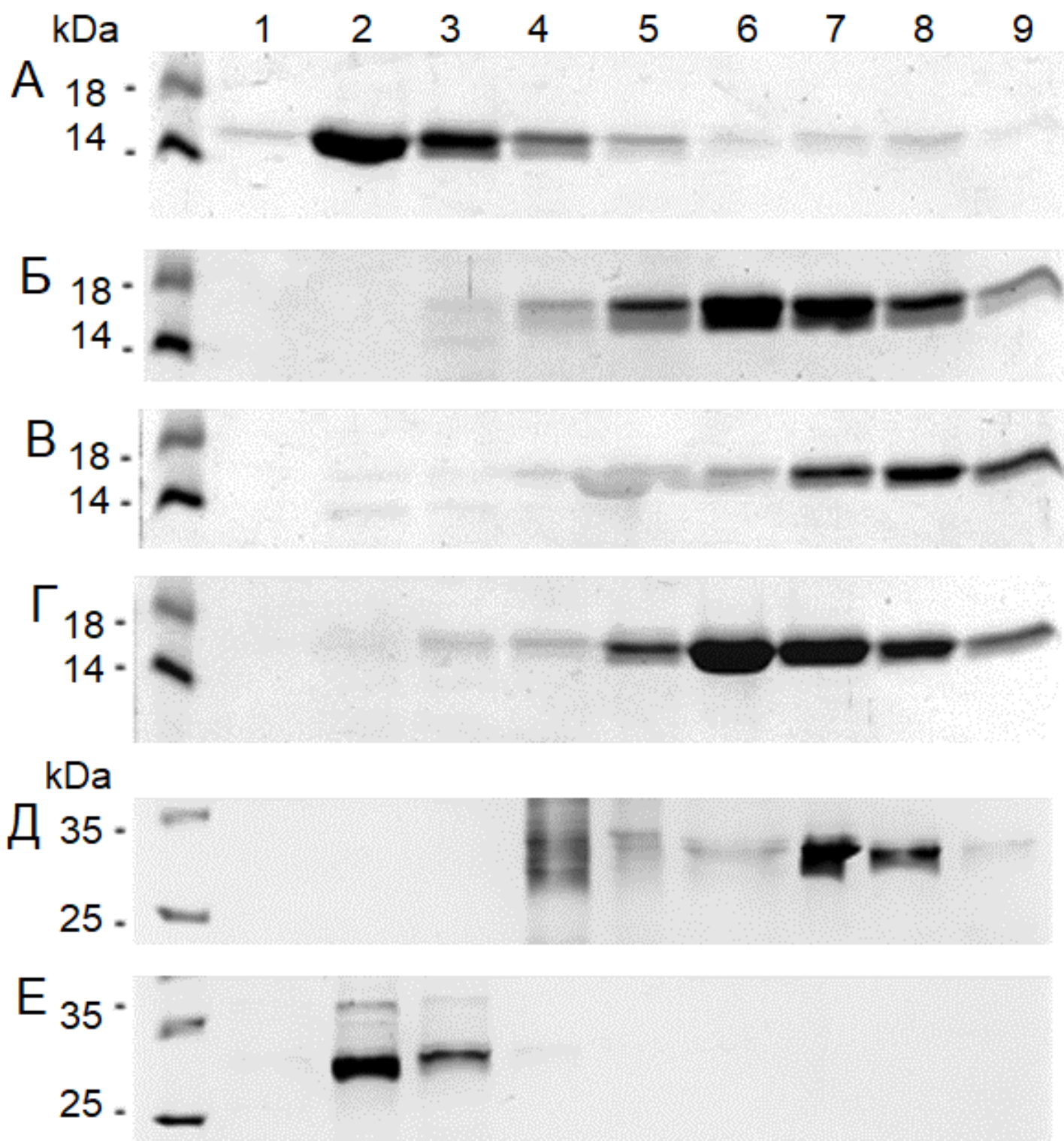


Рисунок 16. Изучение аффинных свойств белков с введенными His-метками. Электрофореграммы пиков элюции GrAD207\_3H (А), GrAD207\_3H1G3H (Б), GrAD207\_7H (В), GrAD207\_3H3G3H (Г); eGFP157\_7H (Д), eGFP157\_3H3G3H (Е). Для всех панелей номера дорожек соответствуют номерам фракций элюции (цит. по Tarabarova et al., 2023 с изменениями).

Для количественной оценки взаимодействий между His-мечеными вариантами GrAD207 с нитрилотриуксусной кислотой (NTA) при комплексообразовании с ионами

$Ni^{2+}$  была использована спектроскопия поверхностного плазмонного резонанса. Полученные равновесные константы диссоциации приведены в Таблице 1.

Таблица 1 – Равновесные константы диссоциации (KD) для комплексов  $Ni^{2+}$ , образованных между His-меченными вариантами GrAD207 и иммобилизованной на чипе нитрилотриуксусной кислотой (NTA), измеренные методом спектроскопии поверхностного плазмонного резонанса.

Белковый конструктор	$K_D^a$ , $\mu M$
GrAD207_3H	$8.1 \pm 1.3$
GrAD207_7H	$2.5 \pm 0.9$
GrAD207_3H1G3H	$2.7 \pm 0.8$
GrAD207_3H3G3H	$6.0 \pm 1.6$

<sup>a</sup>  $K_D$  представлена как среднее значение трех независимых измерений.

Значение KD для GrAD207\_3H хорошо согласовывалось с ранее полученными данными для белков, меченных классическими His-метками (Fischer et al., 2011; Nieba et al., 1997). Образование наиболее стабильного комплекса наблюдалось в случае GrAD207\_7H, что коррелировало с его наибольшим временем удерживания на аффинной смоле. При замене одного из остатков гистидина на остаток глицина (3H1G3H) прочность комплекса практически не изменялась. Наблюдалось незначительное снижение прочности комплекса при дальнейшем увеличении числа остатков глицина между триплетами остатков гистидина (3H3G3H), что согласуется с литературными данными по связыванию олигогистидиновых и смешанных олигогистидин/олигоаланиновых пептидов с  $Ni^{2+}$ -NTA (Knecht et al., 2009).

Изменения во вторичной структуре всех полученных конструкторов оценивались методом спектроскопии кругового дихроизма (Рисунок 17). Среди вариантов GrAD207 наибольшие изменения формы спектра произошли в GrAD207\_7H (Рисунок 17 А), для которого было обнаружено преобладание бета-листов и неправильных структур. Для других вариантов GrAD207 изменения по сравнению со спектром исходного GrAD207 были минимальными, спектр GrAD207\_3H3G3H был наиболее близок к спектру структуры GrAD207 без введенных меток (Рисунок 17 А). Что касается спектров вариантов eGFP (Рисунок 17 Б), оба варианта eGFP, содержавшие His-метки, показали явный сдвиг минимума влево по сравнению со структурой без меток, однако введение His-меток не привело к денатурации белка или появлению неупорядоченных структур. Количественный анализ КД-спектров на содержание типов вторичных структур для конструкторов GrAD207 показал самый высокий процент, 24%, спиральных элементов и самый высокий процент, 26%, неструктурированных элементов в GrAD207\_3H. GrAD207\_3H1G3H и GrAD207\_3H3G3H имели почти одинаковое соотношение элементов вторичной структуры, но вариант с 3G показал уменьшение доли спиральных элементов и увеличение количества поворотов на 1%. Для вариантов eGFP количественный спектральный анализ для типов вторичной структуры показал увеличение количества спиральных элементов на 14% в eGFP157\_3H3G3H и на 10% в eGFP157\_7H.

Среди изученных вариантов GrAD207 GrAD207\_3H3G3H, GrAD207\_3H1G3H и GrAD207\_3H имели форму КД-спектров, очень близкую к форме спектра GrAD207 (Рисунок 17 А).

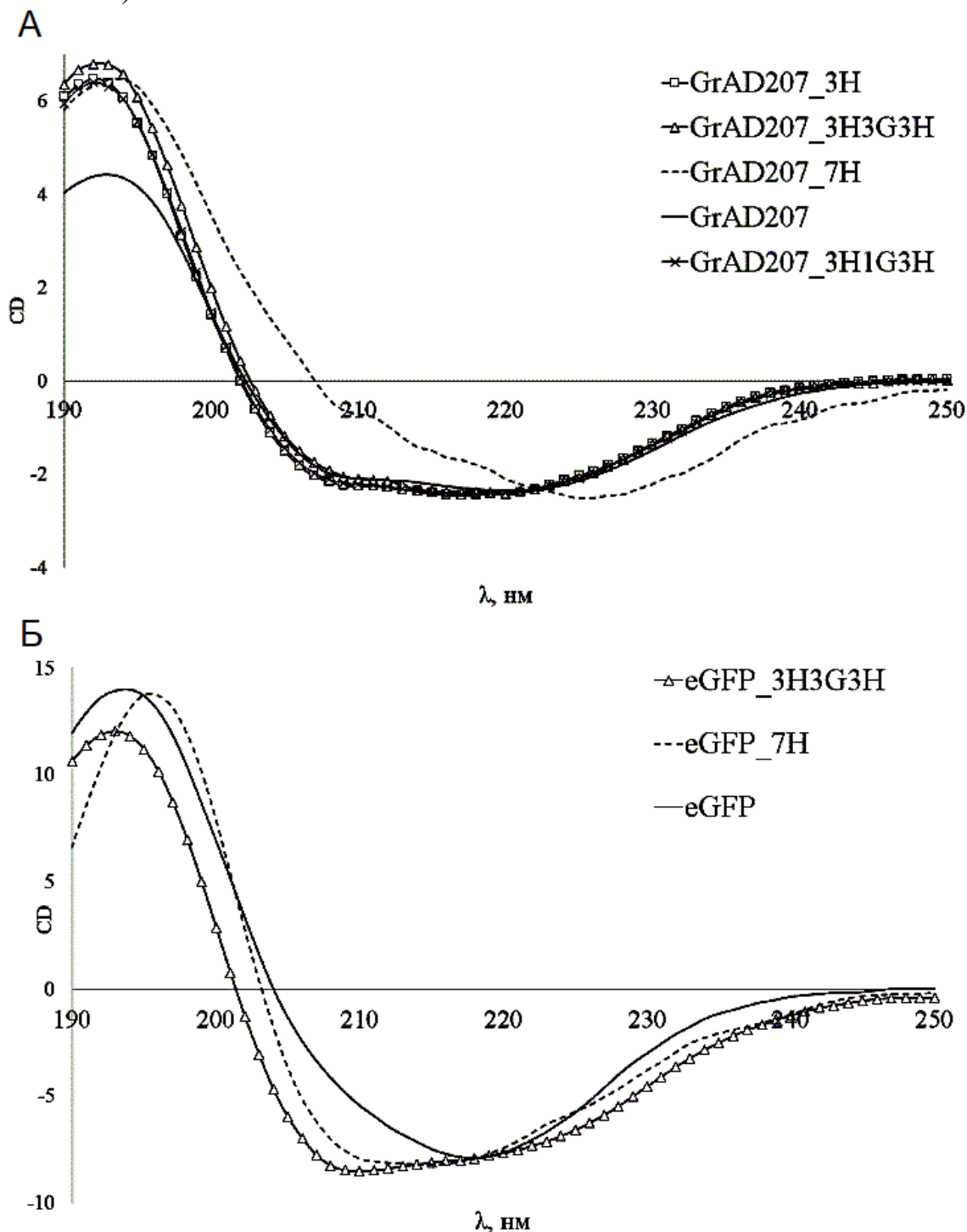


Рисунок 17. Изучение влияния встроенных His-меток на вторичную структуру исследуемых белков методом спектроскопии кругового дихроизма. А – наложение КД-спектров GrAD207, GrAD207\_3H, GrAD207\_7H, GrAD207\_3H1G3H и GrAD207\_3H3G3H; В — наложение КД-спектров eGFP157\_7H, eGFP157\_3H3G3H на спектр eGFP, предсказанный программным обеспечением PDBMD2CD (Drew & Janes, 2020) (цит. по Tarabarova et al., 2023 с изменениями).

Для GrAD207\_3H3G3H, кроме того, качественный и количественный анализ его взаимодействия с ионами  $Ni^{2+}$  показал, что введение метки 3H3G3H в GrAD207 сохраняло или даже усиливало гидрофобные взаимодействия GrAD207\_3H3G3H. Это

наблюдение важно для GrAD207, который, являясь модифицированным апикальным доменом GroEL, сохраняет свойственную шаперонину функцию связывания субстратных белков с гидрофобной поверхностью. Вероятно, конструктор GrAD207\_3H3G3H сохранил свою субстрат-связывающую поверхность в наиболее интактном состоянии, но это предположение нуждается в экспериментальном доказательстве. Тем не менее, КД-спектры конструкторов GrAD207, за исключением GrAD207\_7H, были все очень схожими со спектрами контрольного GrAD207 без метки, что говорит в пользу сохранения функции связывания субстратного белка. В случае eGFP сохранение его функции менее очевидно из полученных КД-спектров (Рисунок 17 Б), поэтому для конструкторов eGFP были проведены исследования флуоресценции.

Сравнение формы спектров излучения eGFP и его конструкторов с введенными полигистидиновыми метками показало, что они идентичны (Рисунок 18).

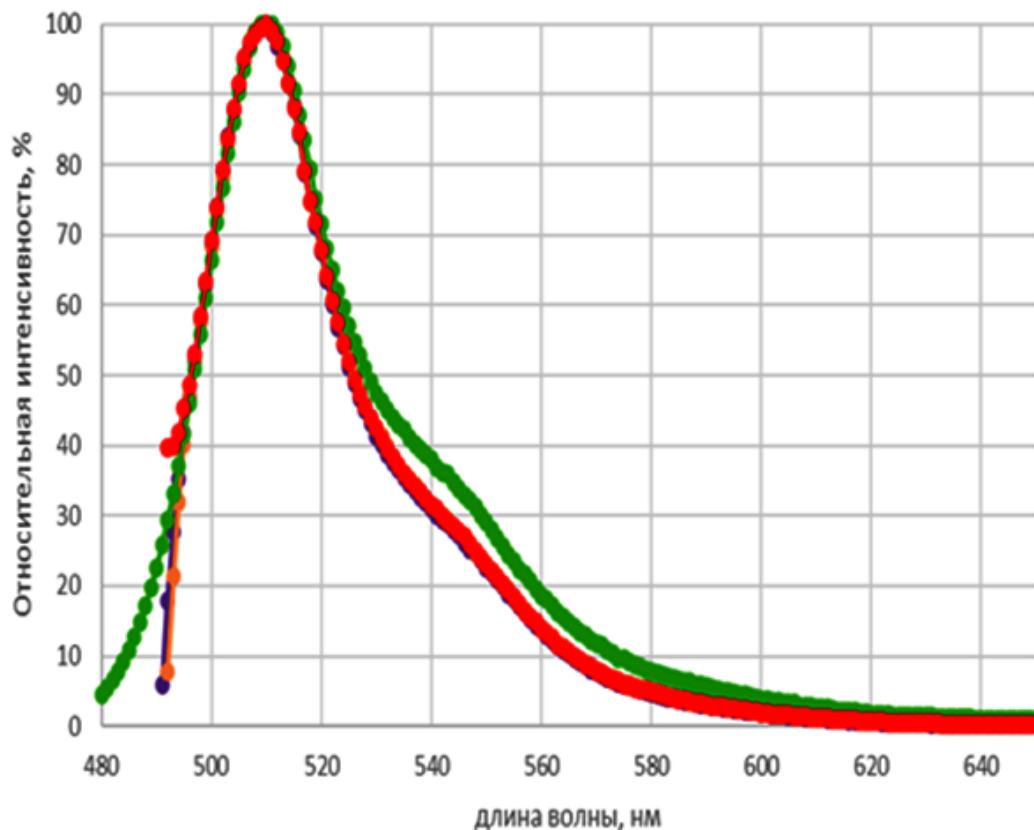


Рисунок 18. Сравнение спектров флуоресценции eGFP и его конструкторов. Фиолетовая кривая – eGFP157\_3H3G3H, желтая кривая – eGFP, красная кривая – eGFP157\_7H, зеленая кривая – теоретический спектр eGFP (цит. по Tarabarova et al., 2023 с изменениями).

Следует отметить, что созревание хромофора eGFP происходит после завершения фолдинга белка (Krasowska et al., 2025), и включает в себя циклизацию пептидной цепи (Ser65-Tyr66-Gly67) и ее окисление кислородом. Зрелый хромофор удерживается внутри  $\beta$ -бочонка водородными связями, например, с участием Arg96 и Glu222 (Macdonald et al., 2012), т.е. удаленными по полипептидной цепи. Таким образом, сохранение флуоресценции конструкторов eGFP с введенными полигистидиновыми метками косвенно свидетельствует и о сохранении структурной организации белка.

Для сравнения флуоресцентных характеристик конструкторов eGFP были получены их коэффициенты молярной экстинкции и относительные квантовые выходы. Для вычисления коэффициентов молярной экстинкции eGFP и его вариантов белки

денатурировали в 1 М NaOH. В этих условиях GFP-подобный хромофор поглощает при длине волны 447 нм с известным коэффициентом экстинкции  $44000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Мамонтова и др., 2020). На основе поглощения нативных и денатурированных щелочью белков были рассчитаны коэффициенты молярной экстинкции для нативных состояний в соответствии с законом Бугера–Ламберта–Бера. Расчет квантового выхода флуоресценции проводили на основе сравнения площади под кривой спектра флуоресценции белка с площадью под кривой спектра флуоресцеин-йодацетамида с известным квантовым выходом 0,5. Последняя характеристика, яркость флуоресценции, является производной от первых двух и рассчитывается как молярный коэффициент экстинкции, умноженный на квантовый выход.

Все флуоресцентные характеристики полученных вариантов eGFP в сравнении с литературными данными приведены в Таблице 2. Рассчитанные значения яркости конструкторов eGFP были ожидаемыми: вариант eGFP\_3H3G3H продемонстрировал наименьшую яркость.

Коэффициенты молярной экстинкции eGFP и eGFP157\_7H имели очень близкие значения  $54\ 016 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  и  $53\ 354 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  соответственно, в то время как для eGFP157\_3H3G3H он составлял  $47\ 067 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Расчет относительного квантового выхода показал 0,55 единиц для eGFP157\_3H3G3H, тогда как для eGFP157\_7H и eGFP он составил 0,70 и 0,67 единиц соответственно. Согласно литературным данным, квантовый выход для eGFP составляет 0,60 единиц.

Яркость варианта eGFP с 7H-меткой была на 1,36 единицы выше, чем у контрольного eGFP без метки, в то время как яркость eGFP157\_3H3G3H была на 10,13 единицы ниже. Таким образом, из двух полученных конструкторов eGFP конструктор eGFP157\_7H в результате введения метки 7H полностью сохранил свою функциональность и свободные N- и C-концы и приобрел сродство к  $\text{Ni}^{2+}$  смоле.

Таблица 2 – Флуоресцентные характеристики полученных вариантов eGFP в сравнении с литературными данными.

Конструктор	Коэффициент молярной экстинкции, $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	Квантовый выход	Яркость	Относительная яркость
eGFP157_3H3G3H	47 067	0.55	26.08	0.78
eGFP157_7H	53 354	0.70	37.57	1.12
eGFP	54 016	0.67	36.21	1.08
Литер. eGFP (Tsien, 1998)	55 900	0.60	33.54	1.00

### 5.1. Заключение к разделу «Разработка гистидиновых меток для введения в состав полипептидной цепи белков»

Подводя итог раздела, можно сказать, что новые разработанные His-метки, 3H1G3H и 3H3G3H, могут быть рекомендованы для встраивания в полипептидную цепь белков для разделения конформационно подвижных структур и спиральных элементов, в то время как метка 7H может быть более подходящей в случаях конформационно жестких структур. Метка 3H1G3H обладала более высоким сродством к  $\text{Ni}^{2+}$ -смоле, чем метка 3H3G3H, и поэтому ее можно использовать вместо метки 7H, если последняя

вызывает повреждение структуры белка. Графическая аннотация заключения к разделу представлена на Рисунке 19.

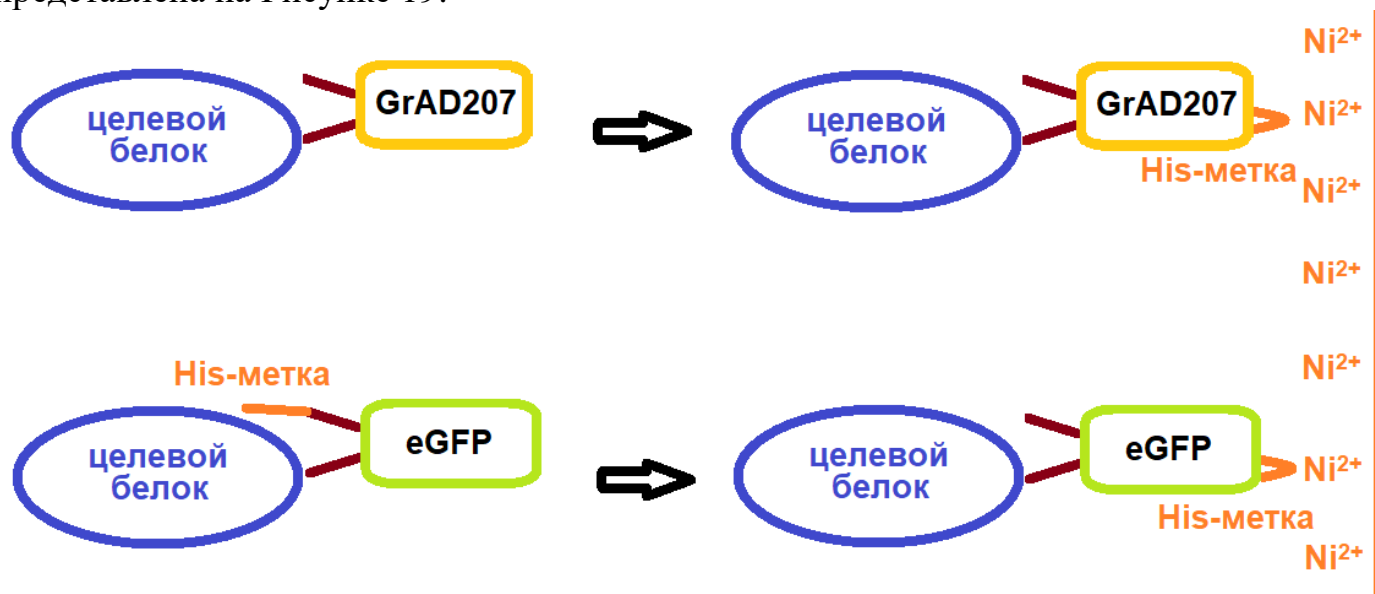


Рисунок 19. Графическая аннотация заключения к разделу «Разработка гистидиновых меток для введения в состав полипептидной цепи белков».

Полученные в работе белки-носители для систем слитых белков со встроенными His-метками приобрели аффинность к никелевой смоле, сохранив свободные N- и C-концы, а также свои функциональные свойства, и могут быть непосредственно использованы для дальнейших исследований.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Описаны разработка и биотехнологическое применение двух систем слитых белков на основе шаперона GroEL, предназначенных для биосинтетического получения широкого спектра сложных в работе полипептидов.

При разработке белков-носителей для систем слитых белков в исходную последовательность шаперона GroEL или его апикального домена с помощью белковой инженерии были внесены модификации, предназначенные для оптимизации их дальнейшего практического применения. Это включает как возможность получения конструкторов в клетках-продуцентах, так и упрощение последующих процедур очистки получаемых конструкторов и целевых полипептидов, а также отщепление целевых пептидов при необходимости. Также были предусмотрены пути адаптации системы с учетом индивидуальных особенностей конкретных целевых полипептидов. Следует отметить, что в области использования шаперонов для применения в биотехнологии внесение целенаправленных изменений в их молекулы для достижения определенных практических результатов описано впервые.

В системе для биосинтетического получения пептидов, основанной на полноразмерном шапероне GroEL, внесенные в молекулу GroEL изменения не нарушили способность шаперона поддерживать в стабильном состоянии пептиды с сильно различающимися физико-химическими свойствами, что свидетельствует о возможности самого широкого применения разработанной системы. Полученные в данной системе два различающихся пептида были успешно очищены по общей схеме, состоящей из легко масштабируемых этапов. Для обеих вышеописанных конструкций параметры культивирования были общими, обычно применяемыми в лабораторных условиях, и они

обеспечивали достаточно высокий выход целевого конструкта (от 200 до 400 мг на литр культуры); однако в промышленных условиях существует много возможностей для повышения выхода целевого белка на стадии культивирования. Например, культуры высокой плотности, по мнению некоторых авторов, могут увеличить выход в 9-85 раз (Sivashanmugam et al., 2009). В лабораторных условиях после проведения очистки было получено от 4 до 4,8 мг полифемузина I из одного литра культуры и от 7.14 до 8.29 мг энфувиртида 95% чистоты из 2.5 л культуры. Для токсичных пептидов выход при биосинтезе зависит от природы и степени их токсичности и составляет от 0,8 мг на литр культуры для гепсидинов до 35,8 мг на литр культуры для плекстазина, для полифемузина I данных о выходе при биосинтетическом получении нет.

Система для биосинтетического получения и стабилизации сложных в работе труднорастворимых белков, основанная на апикальном домене шаперона GroEL, GrAD, продемонстрировала свою эффективность с двумя исходно нерастворимыми целевыми белками, белком Е6 вируса папилломы человека и N-концевым фрагментом белка Е2 вируса гепатита С. Исходно нерастворимые целевые белки в составе слитого конструкта сохраняли стабильность и растворимость после ренатурации, без стабилизирующих агентов переносили процедуры замораживания, лиофилизации и основные биохимические манипуляции. В разработанной системе слитых белков предусмотрены характеристики для упрощения очистки как целевых белков, так и всего конструкта. Для очистки конструкта на металло-аффинной смоле разработаны инновационные полигистидиновые метки, встроенные в полипептидную цепь белка-носителя. Встроенные полигистидиновые метки придают белку-носителю аффинность к ионам  $Ni^{2+}$ , не нарушая его структуру, что позволяет проводить очистку в нативных условиях, при этом N- и C-концы белка-носителя остаются свободными для создания слитых конструктов. Целевые белки могут быть либо отщеплены от слитого конструкта заранее выбранным способом, либо они могут быть использованы непосредственно в составе слитых конструктов, что открывает множество возможностей для применения разработанной системы слитых белков. Учитывая разнообразие свойств потенциальных целевых белков, система может быть адаптирована с учетом их индивидуальных особенностей: продемонстрирована возможность создания функциональных пермутированных форм GrAD, предназначенных для внесения изменений в нужном направлении для оптимизации взаимодействия GrAD с выбранным целевым белком.

Таким образом, разработанные системы слитых белков способны значительно расширить область практического применения фундаментальных свойств шаперонов в биотехнологии.

## **ВЫВОДЫ**

1. С помощью методов белковой инженерии разработана система для биосинтетического получения и последующей очистки пептидов на основе шаперона GroEL *Thermus thermophilus*. С использованием бактериальной платформы *Escherichia coli* в разработанной системе получен один из самых токсичных антимикробных пептидов полифемузин I в активной форме, а также лабильный терапевтический пептид энфувиртид в активной форме. Произведена очистка двух различающихся по свойствам пептидов по единой схеме, состоящей из легко масштабируемых этапов.

2. Разработана система для стабилизации сложных в работе белков на основе апикального домена шаперона GroEL *Thermus thermophilus*. С использованием бактериальной платформы *Escherichia coli* в разработанной системе впервые получены в

растворимой форме исходно нерастворимый N-концевой фрагмент белка E2 вируса гепатита С, а также исходно нерастворимый белок E6 вируса папилломы человека 16 типа.

3. Полученные растворимые формы исходно нерастворимых вирусных белков сохраняли стабильность при хранении в нативных условиях, замораживании и лиофилизации без стабилизаторов, и были, таким образом, пригодны для разработки вакцин.

4. Впервые созданы функциональные пермутированные формы модифицированного апикального домена шаперона GroEL *Thermus thermophilus*, применимые для стабилизации исходно нерастворимых белков.

5. Разработаны инновационные аффинные метки для введения в полипептидную последовательность белков.

6. Для белков GrAD207 и eGFP впервые получены варианты с введенными аффинными метками, которые приобрели сродство к металло-аффинной смоле, сохранив функциональность и свободные N- и C-концы для создания слитых конструкторов.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Tarabarova A., Lopukhov A., Fedorov A.N., **Yurkova M.S.** Novel His-tag variants for insertion inside polypeptide chain // ACS Omega. – 2024. – V. 9. – P. 858–865. DOI: 10.1021/acsomega.3c06682

2. Тарабарова А.Г., **Юркова М.С.**, Федоров А.Н. Новый Ni<sup>2+</sup>-аффинный вариант eGFP со свободными C- и N-концами // Прикладная биохимия и микробиология. – 2023. – Т. 59. – № 6. – С. 614-621. DOI: 10.31857/S0555109923060193

3. Zenin V., Tsedilin A., **Yurkova M.**, Siniavin A., Fedorov A. Thermostable chaperone-based polypeptide biosynthesis: enfuvirtide model product quality and protocol-related impurities // PLoS One. – 2023. – V. 18. – № 6. – art. e0286752. DOI: 10.1371/journal.pone.0286752

4. Zenin V.A., **Yurkova M.S.**, Tsedilin A.M., Fedorov A.N. Enfuvirtide biosynthesis in thermostable chaperone-based fusion // Biotechnol. Rep. Amst. Neth. – 2022. – V. 35. – art. e00734. DOI: 10.1016/j.btre.2022.e00734

5. **Yurkova M.S.**, Fedorov A.N. GroEL—a versatile chaperone for engineering and a plethora of applications // Biomolecules. – 2022. – V. 12. – № 5. – art. 607. DOI: 10.3390/biom12050607

6. **Yurkova M.S.**, Sadykhov E.G., Fedorov A.N. Production of a toxic polypeptide as a fusion inside GroEL cavity // Sci. Rep. – 2020. – V. 10. – № 1. – art. 21024. DOI: 10.1038/s41598-020-78094-8

7. **Юркова М.С.**, Саввин О.И., Зенин В.А., Федоров А.Н. Получение и характеристика безметионинового варианта термостабильного шаперона GroEL из *Thermus thermophilus* // Прикладная биохимия и микробиология. – 2019. – Т. 55. – №. 2. – С. 138-143. DOI: 10.1134/S0555109919020156

8. **Юркова М.С.**, Зенин В. А., Садыхов Э.Г., Федоров А. Н. Димеризация антимикробного пептида полифемузина I в единую полипептидную цепь: теоретические и практические следствия // Биотехнология. – 2019. – Т. 35. – №. 5. – С. 36-41. DOI: 10.21519/0234-2758-2019-35-5-36-41

9. Зенин В.А., Новикова Л.А., **Юркова М.С.**, Саввин О.И., Куров К.А., Федоров А.Н. Химическая модификация слитого белка на основе шаперона GroEL из *Thermus thermophilus* ингибитором протеаз AEBSF // Прикладная Биохимия и Микробиология. – 2019. – Т. 55. – № 6. – С. 553–558. DOI: 10.1134/S0555109919060163

10. **Yurkova M.S.**, Zenin V.A., Nagibina G.S., Melnik B.S., Fedorov A.N. Physico-chemical characterization of permuted variants of chaperone GroEL apical domain // Applied

Biochemistry and Microbiology. 2019. – V. 55. – № 6. – P. 588–595. DOI: 10.1134/S0003683819130027

11. **Yurkova M.S.**, Sharapova O.A., Zenin V.A., Fedorov A.N. Versatile format of minichaperone-based protein fusion system // Sci. Rep. – 2019. – V. 9. – № 1. – P. 1–11. DOI: 10.1038/s41598-019-51015-0

12. Куров К.А., Саввин О.И., **Юркова М.С.**, Зенин В.А., Нагибина Г.С., Мельник Б.С., Федоров А.Н. Физико-химическая характеристика варианта апикального домена шаперона GroEL для повышения уровня биосинтеза и увеличения стабильности целевых белков // Биотехнология. – 2018. – Т. 34. – № 6. – С. 43-50. DOI:10.21519/0234-2758-2018-34-6-43-50

13. Fedorov A.N., **Yurkova M.S.** Molecular chaperone GroEL – toward a nano toolkit in protein engineering, production and pharmacy // NanoWorld J. – 2018. – V. 4. – № 1. – P. 8–15. DOI:10.17756/nwj.2018-053

14. Sharapova O.A., **Yurkova M.S.**, Fedorov A.N. A minichaperone-based fusion system for producing insoluble proteins in soluble stable forms // Protein Engineering, Design & Selection PEDS. – 2016. – V. 29. – № 2. – P. 57–64. DOI: 10.1093/protein/gzv060

15. Зенин В.А., Куров К.А., Саввин О.И., Шаропова О.А., **Юркова М.С.** Федоров А.Н. Подходы к эффективной стабилизации белков с помощью молекулярных шаперонов и их производных // Актуальные вопросы биологической физики и химии. – 2016. – Т. 1. – № 1. – С. 225–229.

16. Федоров А.Н., **Юркова М.С.**, Лауринавичюте Д.К. Начальный структурный и функциональный анализ иммобилизованного гесЕ2, белка оболочки вируса гепатита С // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2007. – Т. 3. – С. 20–26.

17. **Юркова М.С.**, Лауринавичюте Д.К., Федоров А.Н. Экспрессия, выделение и характеристика функционального негликозолированного структурного белка Е2 вируса гепатита С // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2006. – Т. 4. – С. 32–37.

18. **Yurkova M.S.**, Patel A.N., Fedorov A.N. Characterisation of bacterially expressed structural protein E2 of hepatitis C virus // Protein Expression and Purification. – 2004. – V. 37. – № 1. – P. 119–125. DOI: 10.1016/j.pep.2004.05.016

19. Федоров А.Н., **Юркова М.С.**, Гудим Е.А, Тоневецкий А.Г. Создание и характеристика рибосомных комплексов, несущих вновь синтезированный белок Е2 вируса гепатита С // Аллергия, астма и клиническая иммунология. – 2003. – Т. 7. – С. 41–44.

#### **Конференции:**

20. **Юркова М.С.**, Князева К.Э., Зенин В.А., Федоров А.Н. Исследование свойств системы биосинтеза пептидов // III Объединенный научный форум ♦ VII Съезд физиологов СНГ ♦ Научная сессия физиологического общества им. И.П. Павлова ♦ VII Съезд биохимиков России ♦ X Российский симпозиум «Белки и пептиды». – Сочи, 3–7 октября 2022.

21. **Yurkova M.**, Sharapova O., Zenin V., Fedorov A. Minichaperone-based fusion system for stabilization of hydrophobic proteins in stably soluble forms // FEBS Open Bio. – 2019. – V. 9. – P-27-078. DOI:10.1002/2211-5463.12675

#### **Патент:**

22. Зенин В.А., **Юркова М.С.**, Садыхов Э.Г., Федоров А.Н., Суровцев В.В. Патент на изобретение РФ 27318952731895. Белок GroEL микроорганизма *Thermus thermophilus* с измененной аминокислотной последовательностью. Дата приоритета 28.11.2018, дата публикации 09.09.2020.