©Коллектив авторов

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНОГО МУТАНТНОГО ГОМОЛОГА БЕЛКА CheW ИЗ ГИПЕРТЕРМОФИЛЬНОГО МИКРООРГАНИЗМА *THERMOTOGA PETROPHILA* RKU-1

Д.В. Гришин*, Д.Д. Жданов, Ю.А. Гладилина, В.С. Покровский, О.В. Подобед, М.В. Покровская, С.С. Александрова, А.Л. Милюшкина, М.А. Виговский, Н.Н. Соколов

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
Москва, 119121, Погодинская ул., 10; эл. почта: molbiol_ibm@inbox.ru

В работе получены рекомбинантный хемотаксисный белок CheW *Thermotoga petrophila* RKU-1 (TpeCheW) и его мутантный гомолог (TpeCheW-mut). Показано, что, несмотря на невысокую гомологию с CheW бактерий группы кишечной палочки, данные белки не вызывают метаболической перегрузки и хорошо экспрессируются клетками лабораторных штаммов *E. coli*. Выявлен широкий спектр важных для выделения белка TpeCheW-mut свойств и параметров, таких как стабильность в широком диапазоне температур и значений pH, высокий уровень экспрессии, растворимость, а также возможность применения простых малостадийных схем очистки, включая термообработку. Сформулированы и обоснованы возможные направления использования данного белка в практике научных и прикладных исследований.

Ключевые слова: гипертермофильный микроорганизм, рекомбинантный термостабильный белок CheW, сверхэкспрессия белков, биотехнология

DOI: 10.18097/PBMC20186401053

ВВЕДЕНИЕ

Изучение термостабильных нативных и рекомбинантных (химерных или гибридных белков) актуально с фундаментальной и прикладной точек зрения для дизайна и конструирования искусственных и модифицированных белков с заданными свойствами [1, 2].

Фундаментальный интерес к термостабильным полипептидам связан с необходимостью расширения библиотек подобных молекул и углубления знаний об их функционировании и строении, что важно для понимания характера и динамики молекулярной эволюции. С другой стороны это может дать ответ на вопрос о причинах возникновения вариантов термостабильности белков, связанной, например, с особенностями расположения аминокислотных дуплексов в первичной структуре полипептида или с особенностями сложного фолдинга [1]. Подобные исследования могут прояснить вопрос о причинах утраты термостабильности ряда белков термоустойчивых организмов и её сохранения в некоторых белках у организмов, не относящихся к термофилам [3, 4].

Прикладной аспект изучения нативных и рекомбинантных термостабильных полипептидов связан с их использованием, зачастую в виде различных белковых химер, для исследовательских целей (визуализация внутриклеточных структур и процессов), для получения новых белков с заданными свойствами (лекарственных полипептидов), для упрощения технологического процесса выделения белков и т.п. [5, 6].

Следует отметить, что химерные или гибридные белки (*hybrid protein*, *fusion protein*) это белки, полипептидная цепь которых представляет собой объединённые на генно-инженерном уровне аминокислотные последовательности из двух или более белков, принадлежащих к различным биологическим источникам [7, 8].

Например, для оптимизации выделения белков из сложной смеси используется “пришивка” к ним на генном уровне полигистидинового “tag-домена” [9]. Это позволяет придать белку, объединённому с данным “tag”, способность избирательно связываться никель-содержащими сорбентами, что улучшает селективность выделения продукта. Однако известно, что сорбенты, содержащие тяжелые металлы, способны загрязнять ими элюат, что не всегда приемлемо, особенно, если конечный продукт имеет пищевое или фармакологическое предназначение. Поэтому в настоящее время пытаются получить “tag-домены” и/или “домены-носители” нового класса, которые бы были лишены перечисленных недостатков.

К подобным “доменам-носителям” относят полипептиды, обладающие аффинными свойствами по отношению к био- или синтетическим полимерам [8, 10] или, к примеру, свойствами избирательности по отношению к тем или иным условиям окружающей среды (pH, температура и т.п.) [11, 12]. Важно отметить, что при гибридизации термостабильных белков и разно-функциональных полипептидов из мезофильных организмов параметры фолдинга, склонность к образованию телец включения и термодинамические свойства термо-толерантного домена могут распространяться на результирующий химерный белок в целом [13]. Таким образом, объединив с термостабильным белком-носителем мезофильный полипептид, ценный с биомедицинской или биотехнологической точки зрения, можно оптимизировать процедуру его очистки от примесных бактериальных белков и эндотоксинов

* - адресат для переписки

за счёт применения стратегии предварительной термообработки (термолизиса). Это открывает возможности высокорентабельного получения вакцинных антигенов, фрагментов антител, пищевых и кормовых аминокислот и других продуктов.

К недостаткам данной стратегии можно отнести следующие:

- не каждый рекомбинантный белок из термофилов, если он получен в лабораторных условиях или в его аминокислотной последовательности имеются даже незначительные изменения, сохраняет термостабильность;

- далеко не для каждого термофильного белка можно добиться высокой экспрессии в растворимом виде в чужеродных для них условиях, (то есть в клетках мезофильных штаммов-продуцентов, таких как *E. coli)*.

Сказанное выше подчеркивает актуальность поиска и изучения нативных или конструирования модифицированных термостабильных белков *de novo*, которые могли бы претендовать на роль идеальных термостабильных "белков-носителей" с минимальным количеством перечисленных выше недостатков.

Объектом настоящего исследования явился белок CheW из микроорганизма *Thermotoga petrophila RKU-1*. CheW представляет собой небольшой (17 кДа) однодоменный адапторный белок, участвующий в процессах хемотаксиса прокариот [14-17]. Белок CheW в комплексе с полипептидом CheA участвует в транспорте фосфатных групп к регуляторному белку CheY, который, в свою очередь, активирует базальные тельца типа FliG и FliM [18, 19] жгутиков и ворсинок, обеспечивая проявление соответствующих двигательных реакций. Поскольку процессы хемотаксиса весьма консервативны как у мезофильных, так и у термофильных прокариот, данные белки могут представлять интерес для биомедицины и биотехнологии не только как самостоятельные белки, но и как те самые "носители", потенциально способные улучшить экспрессию и растворимость в клетках *E. coli* фармакологически ценных полипептидов, объединённых с ними в одной рамке считывания.

Мезофильный микроорганизм *E. coli* широко используется в молекулярно-биологических и генно-инженерных работах в качестве продуцента различных экзогенных белков, в том числе и белков термофильных организмов [20]. Однако клетки *E. coli* зачастую продуцируют чужеродные белки в виде неактивных телец включения, требующих сложной многоступенчатой процедуры очистки, удорожающей конечный белковый продукт [21, 22]. Для нивелирования подобных негативных факторов до сих пор не имеется единого решения. К примеру, предлагаются и оптимизация кодонов, и создание химерных конструкций с такими "белками-носителями" как полисахарид-связывающие модули, металл-связывающие tag-последовательности, термостабильные домены и т.п. [23, 24]. При этом особый интерес вызывают гетерологичные белки, способные к высокой экспрессии в клетках *E. coli* в растворимом виде, то есть не требующие дальнейшего применения дополнительной процедуры солюбилизации.

Настоящая работа посвящена биотехнологическим аспектам создания и первичной характеристике сверхэкспрессирующегося мутантного гомолога CheW как полипептида**,** потенциально ценного в качестве эффективного термостабильного "белка-носителя" для нужд биомедицины, сельского хозяйства и пищевой промышленности (см. выше). В частности это касается получения термостабильных "пептидных кассет", обогащенных в необходимой пропорции аминокислотными остатками, важными для метаболизма сельскохозяйственных животных и птицы [2, 25].

МЕТОДИКА

Биоинформатический анализ

Поиск гомологичных последовательностей, относящихся к белкам CheW в GenBank, осуществляли посредством BLAST-анализа [26] с использованием интернет-ресурса NCBI (National Center for Biotechnology Information, США). Для выравнивания двух и более последовательностей мономеров ДНК или белков CheW, а также для последующей визуализации гомологичных и негомологичных участков использовали программы DNASIS v 2.5 ("Hitachi Software Endgineering Co., Ltd") и ClustalX v.1.8 [27]. Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей белков класса CheW из разных биологических источников проведён на базе платформы MEGA 6.0 [28]. Филогенетические деревья, отражающие молекулярную эволюцию белков CheW, были построены методами минимальной эволюции (ME) и присоединения соседей (NJ). Для оценки статистической достоверности группировок, получаемых методами ME и NJ, применяли метод бутстрепа [29]. Суть этой методологии заключается в формировании множества виртуальных выборок (обычно до 1000 реплик), на основе случайного выбора с повторениями в тех случаях, когда о законе распределения выборки нет априорных сведений. Вычисленные средние значения для каждой из таких выборок будут являться в статистическом смысле оценками искомого математического ожидания [29]. Если в 1000 репликах наблюдается 50% и более совпадение по искомому параметру, то он считается статистически достоверным. При этом на построенных деревьях (в процентах) отражаются показатели поддержки для существенных ветвей. Значения показателей поддержки ниже 50% считаются статистически несущественными и не учитываются при конструировании дендрограммы.

Термодинамические характеристики структур комплементарных олигонуклеотидов рассчитывали с применением программ Oligo calculator [30] и DNASIS v 2.5. Анализ рестрикции, вспомогательное виртуальное клонирование целевых генов и построение карт рекомбинантных плазмид проводили

с использованием программы Clone Manager 4.0. (“Scientific & Educational Software”, США). Вычисления значений Tm Index [31] осуществляли с помощью аналитической программы “Tm Predictor” (http://tm.life.nthu.edu.tw). Для оценки растворимости белков использовали программу “Recombinant Protein Solubility Prediction” (http://biotech.ou.edu/) [32].

Штаммы и условия культивирования

Штаммы бактерий *E. coli*: XL1-blue (endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB+ lacI q Δ(lacZ)M15] hsdR17(rK - mK +)) (“Stratagene”, США); BL21(DE3) (F– ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])) (“Stratagene”), культивировали как описано в [22].

Трансформация компетентных клеток

Трансформацию компетентных клеток осуществляли при помощи электропорации на приборе MicroPulser (“Bio-Rad”, США). Подготовленные компетентные клетки размораживали при комнатной температуре во льду. Далее смешивали 80 мкл суспензии клеток и ДНК (5-15 мкл лигазной смеси или 1-2 мкл плазмид). Компетентные клетки *E .coli* трансформировали электропорацией на приборе MicroPulser (“Bio-Rad”) при режиме: 2,5 кВ, 25 мкФ, 4 с., после чего клетки высевали на агаризованную среду с антибиотиками для селекции трансформантов. На следующие сутки проводили пересев отобранных клонов на сектора агаризованной среды и в жидкую среду LB с антибиотиками для последующего скрининга плазмидной ДНК, которую выделяли методом щелочного лизиса по стандартным методикам [33].

Выделение и элюция ДНК

Выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток проводили стандартным методом ДДС-щелочного лизиса [34]. Для элюции фрагментов ДНК из агарозного геля использовали набор “Gel Extraction Kit” (“Qiagen”, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя.

Конструирование рекомбинантной ДНК методом Гибсона

Генно-инженерные конструкции собирали методом Гибсона с небольшими модификациями [2, 35]. Правильность сборки генов, кодирующих химерные белковые конструкции, подтверждали рестрикционным картированием и ДНК-секвенированием (ЗАО “Евроген”, Россия).

Культивирование штамма-продуцента

Культуру *E. coli* BL21(DE3), выращивали на среде Лоури-Бертани (LB) (16-18 ч при 37°C) в присутствии ампициллина. Трансформанты пересевали в разведении 1:50 – 1:100 на свежую среду LB и дальнейшее выращивание проводили при 37°C и интенсивном перемешивании при 220-250 об/мин на шейкере-инкубаторе (“GFL”, Германия). При достижении значений оптической плотности культуры D_{550} = 0,5–1,0 о.е. для инициации экспрессии белка в среду добавляли индуктор изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 0,3–0,5 мМ и инкубацию продолжали в течение ночи при 26-28°C. Для определения накопления целевого продукта в биомассе проводили электрофорез в 15%-ном ДСН-ПААГ.

Получение целевых белков методом термолизиса.

Осадки индуцированных клеток *E. coli* суспендировали в буфере “А” (20 мМ Tris-HCl, pH (6,8–8,5), 50 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 0,1% Triton X-100) из расчёта 10% от объёма культуры. Суспензию клеток обрабатывали ультразвуком на приборе УЗДН2Т (Россия) в жестком режиме (22 кГц, 30-50 с), на льду. Пробы прогревали при 75°C в течение 40 мин, после чего клеточный дебрис и денатурировавшие белки удаляли центрифугированием. Молекулярную массу, чистоту рекомбинантных белков в супернатанте и растворимость определяли электрофорезом в 15%-ном ДСН-ПААГ. Для концентрирования термостабильных белков, к супернатанту добавляли кристаллический сульфат аммония до концентрации, составляющей 80% от насыщающей, и смесь оставляли на 18 ч при +4°C. Далее раствор осветляли центрифугированием, осадок растворяли в буфере “В” (20 мМ Tris-HCl; pH 7,5; 10 мМ EDTA; 10% глицерин) и хранили при -20°C. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд [36].

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

ПЦР проводили на приборе Терцик (“ДНК-технология”, Россия). 25 мкл реакционной смеси содержали: 2,5 мкл 1X Phusion буфер (“NEB”, США), dNTP в конечной концентрации 400 мкМ, 5×10^{-7} М каждого праймера, 1 мкл Phusion ДНК полимеразы (“NEB”) 2–5 Е фермента на объём пробы, в качестве ДНК матрицы использовали смеси олигонуклеотидных сборок. Параметры амплификации: 98°C – 30 с; (98°C – 10 с, 65°C - 30 с, 72°C – 20 с) ×30; 72°C – 5 мин; 10°C – хранение. Режим амплификации – точный.

Реактивы

В работе использовали коммерческие наборы для элюции ДНК из геля “Gel Extraction Kit” (“Qiagen”); очистки фрагментов ДНК “Wizard SV Gel and PCR Clean Up System” (“Promega”, США); очистки плазмидной ДНК “Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System” (“Promega”); сборки фрагментов ДНК методом Гибсона Gibson Assembly Cloning Kit (“NEB”); синтетические фрагменты ДНК (ЗАО “Евроген”); коммерческие векторы серии pET (“Novagen”, США); ферменты для молекулярной биологии (“Fermentas”, Литва; “СибЭнзим”, Россия; “NEB”) и другие химические реагенты разных фирм производителей со степенью чистоты “осч”. Все растворы готовили на дистиллированной и деионизованной воде.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ исходных последовательностей

Последовательность исходного белка TpeCheW (GenBank: ABQ46258.1) содержала 151 аминокислотный остаток с расчётной молекулярной массой 17 кДа. На рисунке 1 показано полноразмерное множественное выравнивание последовательностей CheW из различных микроорганизмов. При множественном и попарном выравнивании последовательностей CheW выявлены области, которые, с наибольшей степенью вероятности, вовлечены в обеспечение термостабильности белковой молекулы. Эта информация позволила предсказать инвариантные участки и те области, в которые могут вноситься изменения. Очевидно, что белки CheW различных семейств термофилов обладают большей гомологией в начальной и средней частях аминокислотной последовательности, в то время как на С-конце выраженность гомологии снижается. Это указывает на то, что данный концевой регион потенциально может быть использован для белковой гибридизации и сайт-направленного мутагенеза без потери нативных свойств, включая такое важное свойство как термостабильность.

Анализ выравнивания аминокислотных последовательностей хемотаксисных белков CheW различной природы показал, что 60% позиций в пределах усреднённой консенсусной последовательности были информативны (parsimony-informative) для анализа. Филогенетические деревья, построенные на основании данного выравнивания с помощью различных алгоритмов (ML, NJ), показали сходную топологию с хорошими степенями статистической бутстреп-поддержки (рис. 1). При этом наблюдалась уверенная кластеризация таких семейств термофильных прокариот, как *Thermotogaceae*, *Thermococcaceae*, *Archaeoglobaceae* и *Thermaceae* (представитель данного малочисленного семейства дейнококков выступил в качестве “внешней группы”). Всё это указывает также на то, что исследуемая аминокислотная последовательность помимо биотехнологических и биомедицинских перспектив может быть использована и в фундаментальных исследованиях в качестве информативного филогенетического маркера.

Необходимо подчеркнуть, что создание эффективного *E. coli* штамма-продуцента термостабильных белков возможно лишь

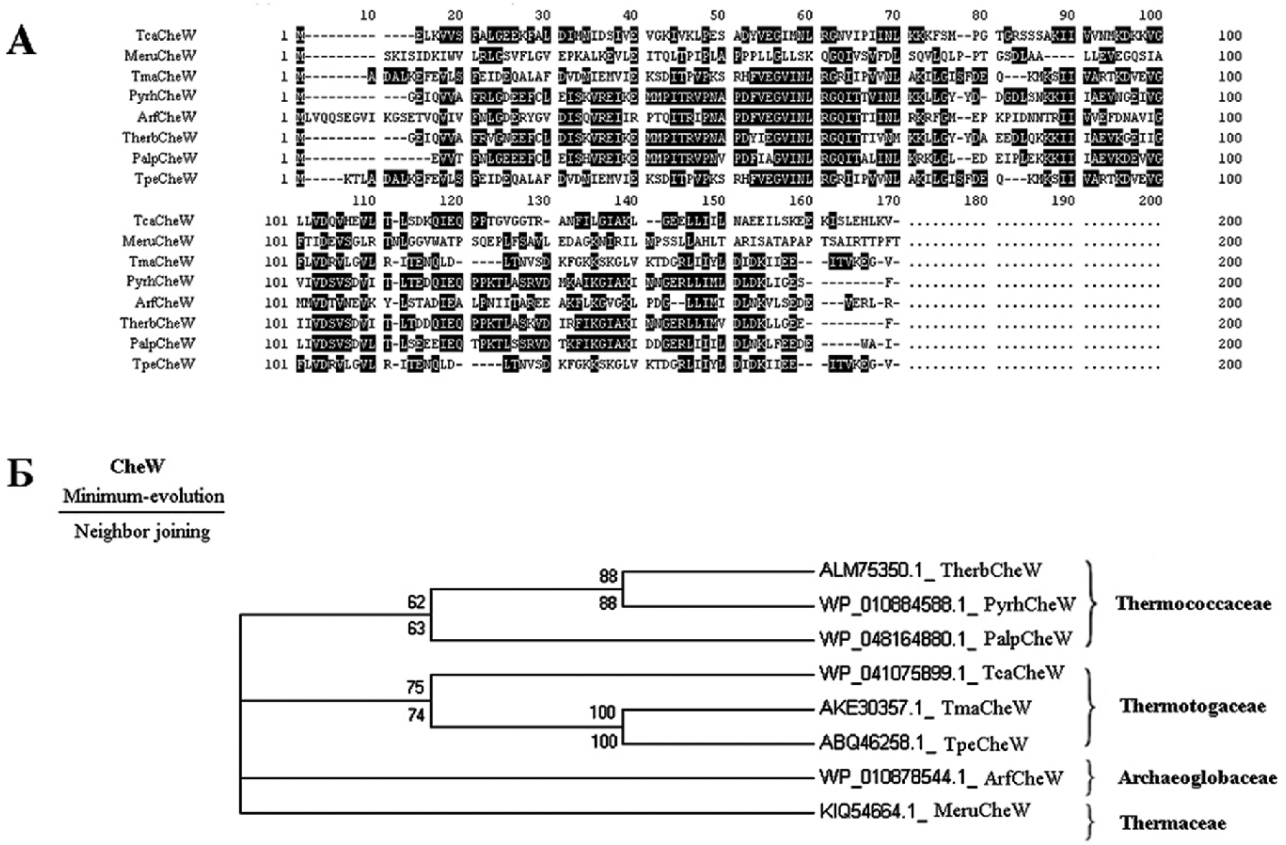

Рисунок 1. (А) Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей белка CheW из различных термофильных микроорганизмов (затемнённые области свидетельствуют о 100%-ной гомологии последовательности на данном участке). (Б) Дендрограмма белков CheW. На кладограмме в процентах отражены показатели поддержки для существенных ветвей. Справа от графика приведены ID аминокислотных последовательностей, размещённых в GenBank, и соответствующие аббревиатуры (TherbCheW - CheW из *Thermococcus barophilus*; TpeCheW - CheW из *Thermotoga petrophila RKU-1*; PalpCheW - CheW из *Palaeococcus pacificus*; ArfCheW - CheW из *Archaeoglobus fulgidus*; PyrhCheW - CheW из *Pyrococcus horikoshii*; TmaCheW - CheW из *Thermotoga maritima*; TcaCheW - CheW из *Thermotoga caldifontis*; MeruCheW - CheW из *Meiothermus ruber*).

при соблюдении ряда условий, наиболее важным из которых является стабильность мРНК при экспрессии целевого гена. Основным фактором стабильности мРНК и эффективности её трансляции, является кодоновая (триплетная) композиция гетерологичного рекомбинантного гена [37, 38].

Говоря о кодоновой композиции нужно помнить, что одним из главных свойств генетического кода является его вырожденность, когда одна L-аминокислота может кодироваться несколькими кодонами. При этом одни из таких кодонов чаще встречаются у эукариот, другие – у термофильных архей, третьи – у мезофильных прокариот. Это связано, прежде всего, с таксономическими особенностями строения и работы ферментов аминоацил-тРНК-синтетаз. Поэтому, если в составе переносимого в клетки *E. coli* чужеродного гена присутствуют редкие для этого мезофильного микроорганизма кодоны, то подобная генетическая конструкция будет либо нежизнеспособна, либо уровень биосинтеза целевого полипептида окажется очень низким, несмотря на эффективность работы регуляторных элементов [39]. Учитывая это, нуклеотидную последовательность исходного белка TpeCheW подвергали кодоновой оптимизации под потребности клеток *E. coli*, в процессе которой часть минорных кодонов с высоким содержанием GC-пар заменяли на синонимичные мажорные кодоны (рис. 2).

Конструирование экспрессионных векторов и молекулярное клонирование

Синтетический ген *TpeCheW* был собран из олигонуклеотидных дуплексов (см. раздел “Методика”) и клонирован в вектор pET-11a под контроль сильного промотора фага T7 (pET-TpeCheW). Для оптимизации процедуры субклонирования на N-конце гена был запланирован сайт узнавания для эндонуклеазы рестрикции NdeI (его частью в теле гена стал старт-кодон), в то время как на C-конце гена были добавлены сайты узнавания для рестриктаз HindIII и BamHI.

На втором этапе с целью оптимизации процедуры очистки белкового продукта данный ген был интегрирован по сайтам NdeI/HindIII в вектор pET-21a, содержащий C-концевой полигистидиновый tag с комплексом дополнительных сайтов рестрикции. В результате данной процедуры в единой рамке считывания на C-конце целевого гена появились новые сайты рестрикции NotI и XhoI, а также область, кодирующая шесть последовательно расположенных остатков гистидина. Таким образом, в составе экспрессионной плазмиды pET-TpeCheW-mut был получен ген нового мутантного гомолога белка TpeCheW, последовательность которого представлена на рисунке 2 и обозначена как TpeCheW-mut.

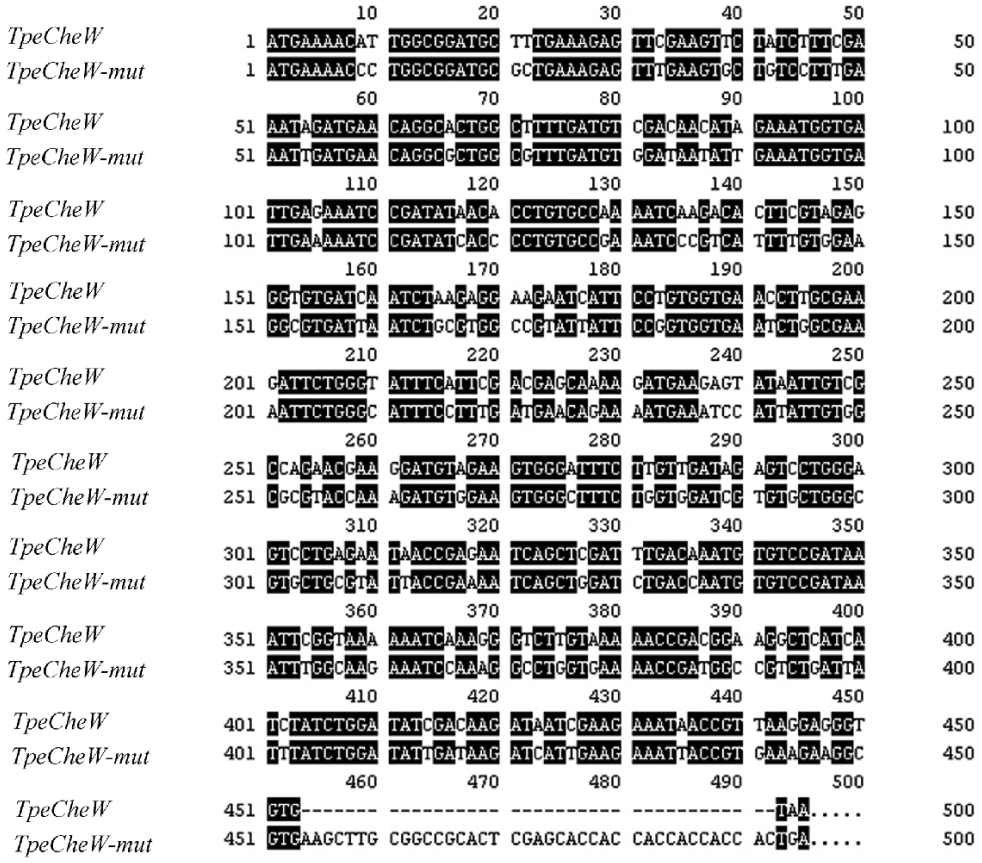

Рисунок 2. Выравнивание нуклеотидных последовательностей белка TpeCheW и оптимизированного варианта его мутантного гомолога TpeCheW-mut (затемнённые области обозначают 100%-ную идентичность последовательности на данном отрезке).

Изучение экспрессии TpeCheW и TpeCheW-mut

Компетентные клетки *E. coli* BL21 (DE3) трансформировали экспрессионными плазмидами pET-TpeCheW и pET-TpeCheW-mut. Правильность субклонирования была проверена рестрикционным скринингом и секвенированированием. Для культивирования бактерий использовали среду Лоури-Бертани (LB) (см. раздел "Методика"). Индуцибельность рекомбинантных штаммов и уровень экспрессии целевых белков были проверены после внесения в среду индуктора ИПТГ.

Анализ экспрессии конструкций в 15%-ом ДСН-ПААГ показал присутствие зон ожидаемого молекулярного веса (17-18 кДа) в индуцированных клетках и их отсутствие в клетках без индукции (рис. 3). При этом выход мутантного белка TpeCheW-mut из 18-часовых культур клеток *E. coli* почти в два раза превышал таковой для нативного гомолога (TpeCheW), составив около 160 мг/л (рис. 3).

Изучение термостабильности TpeCheW-mut

Белок TpeCheW обладает высокой растворимостью и термостабильностью в широком диапазоне температур (60–75°C). Известно, что сайт-направленный мутагенез и/или гибридизация исходных белков с чужеродными белковыми доменами и tag-последовательностями различным образом отражается на таких свойствах результирующего белка, как растворимость, термостабильность, pH-стабильность и т.п. [23, 40, 41]. Поэтому целью данного этапа работ стало изучение того, как внесённые в нуклеотидную последовательность TpeCheW изменения отразились на некоторых важных свойствах мутантного белкового продукта TpeCheW-mut.

Предварительная теоретическая оценка растворимости и термостабильности белка по его первичной аминокислотной последовательности (рис. 4) была проведена при помощи аналитических программ "Recombinant Protein Solubility Prediction" и "Tm Predictor (TI)" (см. раздел "Методика"). Для мутантного белка TpeCheW-mut расчётные значения растворимости приближались к 99%, в то время как значения TI были выше единицы, что свидетельствовало о потенциально высокой термостабильности. Для доказательства этого предположения индуцированные клетки подвергали УЗ дезинтеграции и термолизису (термолизу) в буфере "А" (см. раздел "Методика") в течение 40 мин при температуре 75°C с последующим осаждением денатурировавших белков клетки-хозяина центрифугированием.

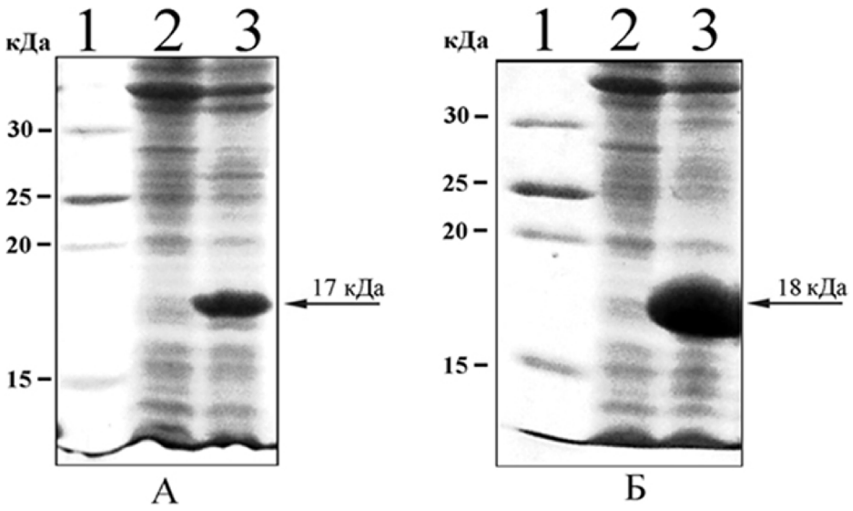

Рисунок 3. Контроль экспрессии белков TpeCheW (А) и TpeCheW-mut (Б) в 15%-ом ДСН ПААГ (объём наносимых на один трек проб 5 мкл). (А) 1 - Маркер молекулярной массы PageRuler™ Broad Range (MBR); 2 - BL21(DE3)[pET-TpeCheW] (до индукции); 3 - BL21(DE3)[pET-TpeCheW] (индукция ИПТГ); (Б.) 1 - Маркер MBR; 2 - BL21(DE3)[pET-TpeCheW-mut] (до индукции); 3 - BL21(DE3)[pET-TpeCheW-mut] (индукция ИПТГ).

```
                      10         20         30         40         50
TpeCheW-mut     1 MKTLADALKE FEVLSFEIDE QALAFDVDNI EMVIEKSDIT PVPKSRHFVE  50
TpeCheW         1 MKTLADALKE FEVLSFEIDE QALAFDVDNI EMVIEKSDIT PVPKSRHFVE  50
                      60         70         80         90        100
TpeCheW-mut    51 GVINLRGRII PVVNLAKILG ISFDEQKMKS IIVARTKDVE VGFLVDRVLG 100
TpeCheW        51 GVINLRGRII PVVNLAKILG ISFDEQKMKS IIVARTKDVE VGFLVDRVLG 100
                     110        120        130        140        150
TpeCheW-mut   101 VLRITENQLD LTNVSDKFGK KSKGLVKTDG RLIIYLDIDK IIEEITVKEG 150
TpeCheW       101 VLRITENQLD LTNVSDKFGK KSKGLVKTDG RLIIYLDIDK IIEEITVKEG 150
                     160        170        180        190        200
TpeCheW-mut   151 VKLAAALEHH HHHH..... ..........  .......... .........  200
TpeCheW       151 V--------- ----..... ..........  .......... .........  200
```

Рисунок 4. Выравнивание аминокислотных последовательностей белка TpeCheW и его мутантного гомолога TpeCheW-mut (затемнённые области обозначают 100% -ную идентичность последовательности на данном отрезке).

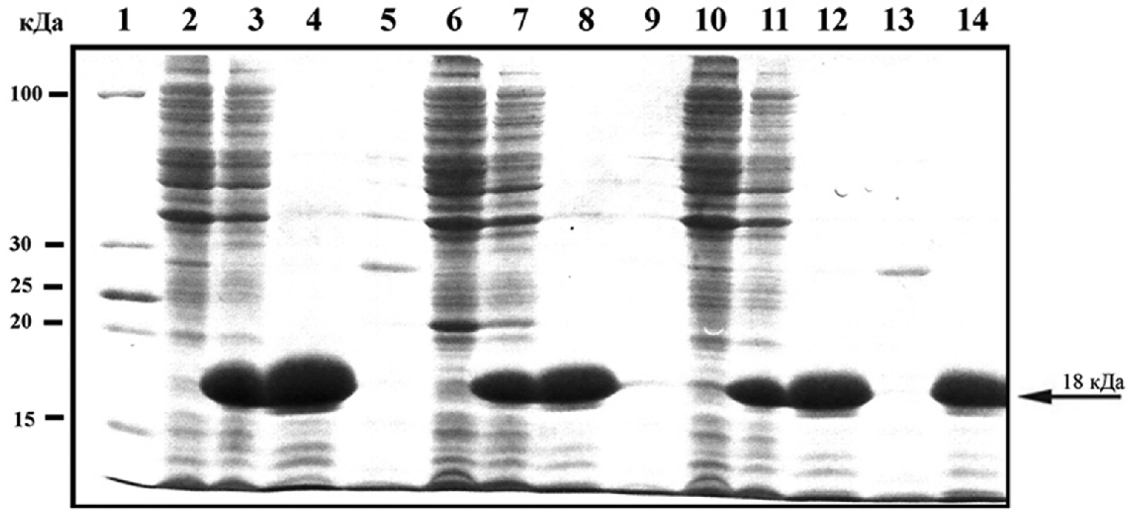

Рисунок 5. Изучение растворимости и термостабильности белка TpeCheW-mut в 15%-ом ДСН ПААГ (объём наносимых на один трек проб без термолиза составил 5 мкл, с термолизом - 15 мкл). 1 - Маркер MBR; 2 - BL21(DE3)[pET-TpeCheW-mut] (до индукции); 3 - BL21(DE3)[pET-TpeCheW-mut] (индукция ИПТГ); 4 - BL21(DE3)[pET-TpeCheW-mut] (индукция ИПТГ+Термолиз, pH8,0); 5 - BL21(DE3)[pET-TpeCheW-mut] (до индукции+Термолиз); 6 - BL21(DE3)[pET-TpeCheW-mut] (до индукции); 7 - BL21(DE3)[pET-TpeCheW-mut] (индукция ИПТГ); 8 - BL21(DE3)[pET-TpeCheW-mut] (индукция ИПТГ+Термолиз, pH7,0); 9 - BL21(DE3)[pET-TpeCheW-mut] (до индукции+Термолиз); 10 - BL21(DE3)[pET-TpeCheW-mut] (до индукции); 11 - BL21(DE3)[pET-TpeCheW-mut] (индукция ИПТГ); 12 - BL21(DE3)[pET-TpeCheW-mut] (индукция ИПТГ+Термолиз, pH8,5); 13 - BL21(DE3)[pET-TpeCheW-mut] (до индукции+Термолиз); 12 - BL21(DE3)[pET-TpeCheW-mut] (индукция ИПТГ+Термолиз, pH 6,8).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В ходе проведённых исследований показано, что внесённые изменения не оказали негативного воздействия на растворимость и термостабильность мутантного белка. Как и в случае белка дикого типа для TpeCheW-mut наблюдались высокие показатели растворимости. По данным, полученным при помощи программ Gel-Analysis (“Helicon”, Россия) и Adobe Photoshop cs2 (histogram option) (“Adobe Systems”, США), реальный уровень растворимости составил 97%, что было всего на 2% ниже расчётного значения. Термостабильность TpeCheW-mut по сравнению с исходным белком также практически не изменилась: белок выдерживал 40 мин прогревание при температуре до 75°C в диапазоне pH от 6,8 до 8,5, при этом максимальная термоустойчивость наблюдалась при pH=8,0 (рис. 5, трек №4). Из картины электрофореза следует, что процедура термолиза позволяет в диапазоне температур от 60°C до 75°C избавиться от 90–95% белков клетки-хозяина и добиться получения высокоочищенного препарата целевого термостабильного белка (TpeCheW-mut).

Таким образом, стабильно высокий, даже на фоне внесения изменений по С-концу молекулы, уровень экспрессии рекомбинантного мутантного гомолога белка CheW из *T. petrophila RKU-1* (≥25% от тотального белка клетки *E. coli*), высокие показатели растворимости, термостабильности (60–75°C) и простота очистки посредством термообработки свидетельствуют о его потенциале в качестве “белка-носителя” для получения биотехнологически ценных полипептидов, ассоциированных с этим белком на генно-инженерном уровне. Помимо этого, благодаря уникальному аминокислотному составу (рис. 4) и возможности сокращения стадий очистки, белок TpeCheW-mut потенциально может быть использован в пищевой промышленности и кормопроизводстве для балансирования общего белка и аминокислотного состава рационов человека и различных сельскохозяйственных животных.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №16-16-04086).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Гришин Д.В., Покровская М.В., Подобед О.В., Гладилина Ю.А., Покровский В.С., Александрова С.С., Соколов Н.Н.* (2017) Биомед. химия, **63**, 124-131. DOI: 10.18097/pbmc20176302124.
2. *Гришин Д.В., Гладилина Ю.А., Александрова С.С., Покровская М.В., Подобед О.В., Покровский В.С., Жданов Д.Д., Соколов Н.Н.* (2017) Прикл. биохим. микробиол., **53**(6), 1-12.
3. *Sterner R., Liebl W.* (2001) Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., **36**(1), 39-106.
4. *Ming D., Hellekant G.* (1994) FEBS Lett., **355**(1), 106-108.
5. *Cuadros C., Lopez-Hernandez F.J., Dominguez A.L., McClelland M., Lustgarten J.* (2004) Infect Immun., **72**(5), 2810-2816.
6. *Rizzuto R., Brini M., Pizzo P., Murgia M., Pozzan T.* (1995) Curr. Biol., **5**(6), 635-642.
7. *Chen X., Zaro J.L, Shen W.C.* (2013) Adv. Drug Deliv. Rev., **65**(10), 1357-1369.

8. *Zhang J., Lu X., Xu R., Tao X., Dong Y., Sun A., Wei D.* (2015) Appl. Microbiol. Biotechnol., **99**(16), 6705-6713.
9. *Allers T., Barak S., Liddell S., Wardell K., Mevarech M.* (2010) Appl. Environ. Microbiol., **76**(6), 1759-1769.
10. *Bakhshinejad B., Sadeghizadeh M.* (2016) Anal. Biochem., **512**, 120-128.
11. *Zang H., Xie S., Wu H., Wang W., Shao X., Wu L., Rajer F.U., Gao X.* (2015) Enzyme Microb. Technol., **78**, 1-9.
12. *Liu Y., Duan X., Liu X., Guo J., Wang H., Li Z., Yang J.* (2014) Gene, **540**(2), 246-250.
13. *de Marco A., Casatta E., Savaresi S., Geerlof A.* (2004) J. Biotechnol., **107**(2), 125-133.
14. *Schübbe S., Williams T.J., Xie G., Kiss H.E., Brettin T.S., Martinez D., Ross C.A., Schüler D., Cox B.L., Nealson K.H., Bazylinski D.A.* (2009) Appl. Environ. Microbiol., **75**(14), 4835-4852.
15. *Li Y., Hu Y., Fu W., Xia B., Jin C.* (2007) Biochem. Biophys. Res. Commun, **360**, 863-867.
16. *Zhang K., Liu J., Tu Y., Xu H., Charon N.W., Li C.* (2012) Mol. Microbiol., **85**(4), 782-794.
17. *Boukhvalova M., Dahlquist F.W., Stewart R.C.* (2002) J. Biol. Chem., **277**(25), 22251-22259.
18. *Zhao R., Amsler C.D., Matsumura P., Khan S.* (1996) J. Bacteriol., **178**(1), 258-265.
19. *Passmore S.E., Meas R., Marykwas D.L.* (2008) Microbiology, **154**, 714-724.
20. *Baneyx F., Mujacic M.* (2004) Nat. Biotechnol., **22**(11), 1399-1408.
21. *Jenney F.E.Jr., Adams M.W.* (2008) Extremophiles, **12**(1), 39-50.
22. *Wang Y., Zhang Y.H.* (2009) Microb. Cell Fact., **8**(30), DOI: 10.1186/1475-2859-8-30.
23. *Murashima K., Kosugi A., Doi R.H.* (2003) Proteins, **50**(4), 620-628.
24. *Чупров-Неточин Р.Н., Файзуллина Н.М., Сыкилинда Н.Н., Симакова М.Н., Месянжинов В.В., Мирошников К.А.* (2010) Биоорган. химия, **36**(2), 193-199.
25. *Гришин Д.В., Подобед О.В., Гладилина Ю.А., Покровская М.В., Александрова С.С., Покровский В.С., Соколов Н.Н.* (2017) Вопр. питания, **86**(3), 19-31.
26. *Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J.* (1997) Nucl. Acids Res., **25**(17), 3389-3402.
27. *Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G.* (1997) Nucl. Acids Res., **25**(24), 4876-4882.
28. *Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S.* (2013) Mol. Biol. Evolution, **30**, 2725-2729.
29. *Felsenstein J.* (1985) Evolution, **39**(4), 783-791.
30. *Kibbe W.A.* (2007) Nucleic Acids Res., **35** (Web Server issue): W43-W46.
31. *Ku T.H., Lu P.Y., Chan C.H., Wang T.S., Lai S.Z., Lyu P.C., Hsiao N.W.* (2009) Comp. Biol. Chem., **33**, 445-450.
32. *Diaz A., Tomba E., Lennarson R., Richard R., Bagajewicz M., Harrison R.G.* (2009) Biotechnol. Bioeng., **105**(2), 374-383.
33. *Drury L.* (1996) Methods Mol. Biol., **58**, 249-256.
34. *Yadav P., Yadav A., Garg V., Datta T.K., Goswami S.L., De S.* (2011) Indian J. Exp. Biol., **49**(7), 558-560.
35. *Gibson D.G.* (2011) Methods Enzymol., **498**, 349-361.
36. *Bradford M.M.* (1976) Anal. Biochem., **72**, 248-254.
37. *Yang C., Xu Y., Jia R., Li P., Zhang L., Wang M., Zhu D., Chen S., Liu M., Yin Z., Cheng A.* (2017) J. Virol Methods., **247**, 1-5.
38. *Tanaka M., Tokuoka M., Gomi K.* (2014) Appl. Microbiol. Biotechnol., **98**(9), 3859-3867.
39. *Gustafsson C., Govindarajan S., Minshull J.* (2004) Trends Biotechnol., **22**(7), 346-353.
40. *Yuan H., Yang X., Hua Z.C.* (2004) Microbiol. Res., **159**(2), 147-156.
41. *Costa S., Almeida A., Castro A., Domingues L.* (2014) Front Microbiol., **19**(5), 63.

Поступила: 01. 11. 2017.
Принята к печати: 01. 12. 2017.

CONSTRUCTION AND CHARACTERIZATION OF A RECOMBINANT MUTANT HOMOLOG OF THE CheW PROTEIN FROM *THERMOTOGA PETROPHILA* RKU-1

D.V. Grishin, D.D. Zhdanov, Ju.A. Gladilina, V.S. Pokrovsky, O.V. Podobed, M.V. Pokrovskaya, S.S. Aleksandrova, A.L. Milyushkina, M.A. Vigovskiy, N.N. Sokolov

Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; e-mail: molbiol_ibm@inbox.ru

In the work a recombinant chemotaxis protein CheW from *Thermotoga petrophila* RKU-1 (TpeCheW) and its mutant homolog (TpeCheW-mut) were created. It was shown that, despite the low homology with CheW prototypes from intestinal bacteria, these proteins didn't cause metabolic overload and were well expressed by cells of *E. coli* laboratory strains. We have discovered a broad spectrum of industrial valuable properties of the TpeCheW-mut protein such as stability in a wide range of temperatures and pH, high expression level, solubility and possibility of the application of a simple low-stage purification methodology with the use of preliminary heat treatment. Possible directions of the scientific and industrial application of this protein were claimed.

Key words: hyperthermophilic microorganism, recombinant thermostable protein CheW, protein overexpression, biotechnology