*БИОХИМИЯ, 2021, том 86, вып. 2, с. 228 – 235*

*УДК 577.152.342*

# УСИЛЕНИЕ РАСТВОРИМОСТИ И ОДНОСТАДИЙНАЯ ОЧИСТКА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ДИМЕРА КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ G2*

**© 2021 А. Ходакарами[1], Б. Дабирманеш[1]**, С. Асад[2], М. Каледи[1]**

[1] *Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, 14115 Tehran, Iran; E-mail: dabirmanesh@modares.ac.ir*

[2] *Department of Biotechnology, College of Science, University of Tehran, 14155 Tehran, Iran*

Поступила в редакцию 02.04.2020
После доработки 22.09.2020
Принята к публикации 13.10.2020

Карбоксипептидаза G2 (CPG2) является бактериальным ферментом, который катализирует переход метотрексата в его неактивные формы. Далее эти продукты в присутствии высоких доз метотрексата у пациентов с почечными нарушениями выводятся, минуя почки. В связи с возрастающим спросом на этот фермент важно было упростить процесс его продукции. С этой целью в настоящем исследовании проведена попытка выделить и очистить этот ценный фермент, используя интеин-опосредованную очистку с помощью хитин-связывающей аффинной метки. Таким образом, ген CPG2 из *Pseudomonas* sp. (штамм RS16) был оптимизирован, синтезирован и клонирован в экспрессионный вектор pTXB1. Впоследствии конструкцию трансформировали в штамм BL21 (DE3) *Escherichia coli*. Оптимальные условия для его растворимой экспрессии достигались в 2×YT среде, содержащей 1% глюкозу, 0,5 мМ IPTG через 30 ч инкубации при 25 °C. Фермент без интеина экспрессировался в форме инклюзивных телец, что указывает на необходимость интеина для солюбилизации белка. Затем экспрессированный гомодимерный белок очищали до гомогенности с помощью хитиновой аффинной колонки. Для очищенного белка были получены значения $K_m$ и $k_{cat}$ 6,5 мкМ и 4,57 $c^{-1}$ соответственно. Анализ гель-фильтрации показал, что полученный рекомбинантный белок представляет собой димер с молекуляроной массой 83 kDa. Флуоресцентная спектроскопия и метод спектроскопии кругового дихроизма подтвердили наличие у CPG2 третичной и вторичной структур соответственно. Применение интеин-опосредованной системы обеспечило возможность одностадийной очистки CPG2, открыв путь к использованию карбоксипептидазы G2 в фармацевтике.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** карбоксипептидаза G2; интеин, метотрексат.

**DOI:** 10.31857/S032097252102007X

## ВВЕДЕНИЕ

Карбоксипептидаза G2 (CPG2) является димерным цинк-зависимым металлоферментом, экзопептидазой с молекуляроной массой (ММ) 83 kDa, которая превращает метотрексат (МТХ) в его неактивную форму, 4-дезокси-4-амино-N10-метилпропионовую кислоту и глутамат, удаляя *C*-концевой глутамат из фолиевой кислоты и её аналогов [1, 2]. CPG2 обеспечивает непочечное удаление МТХ у пациентов с почечной недостаточностью. Эта активность сделала CPG2 ферментом, представляющим медицинский интерес. Карбоксипептидаза G2 известна также как глюкарпидаза и продается под названием Voraxaze [3, 4].

В связи с его значимостью необходимо получить этот фермент в высокоочищенной форме, сохраняя при этом его активность и структуру. Очистка часто является основным этапом и сложным процессом в получении рекомбинантных фармацевтических белков в биомедицинских и биотехнологических исследованиях [5]. Стандартные методы требуют ряд дорогостоящих и трудоемких этапов выделения, включая разнообразные хроматографические стадии. Поэтому необходимость простой и экономически эффективной схемы очистки очевидна. К настоящему времени в коммерческих целях используются различные технологии для извлечения нужных белков из грубых биологических экстрактов с использованием простых, недорогих и одностадийных методов [6, 7].

Обратимое аффинное взаимодействие между лигандом и связывающей его мишенью широко используется при очистке биомолекул. Присутствие аффинной метки может влиять на

Принятые сокращения: КД – круговой дихроизм; ММ – молекулярная масса; МТХ – метотрексат; CBD – хитин-связывающий домен; CPG2 – карбоксипептидаза G2; IPTG – изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya, в рубрике «Papers in Press», BM20-099, 18.01.2021.

** Адресат для корреспонденции.

характеристики или функции белка-мишени, поэтому может возникнуть необходимость удалить метку, особенно в случае терапевтических белков. На стадии очистки для удаления метки требуется добавлять ферменты или химические соединения [8, 9]. Эти ферментативные методы могут также увеличивать затраты на процесс производства и в некоторых случаях могут привести к добавлению аминокислотных остатков к слитному белку в месте расщепления [10, 11]. Поэтому для удобного удаления меток с помощью различных способов, таких как добавление восстановителей и изменение pH или температуры в зависимости от используемой конструкции, были созданы самоотщепляющиеся интеиновые аффинные метки. Однако индукция расщепления при изменении температуры или pH *in vivo* не поддается жесткому контролю и может привести к потере продукта, в то время как восстановление тиола может нарушить структуру белков, содержащих дисульфидные связи [12–14].

Целью настоящего исследования было упрощение производства CPG2. Для этого последовательность гена карбоксипептидазы G2 *Pseudomonas* sp. (штамм RS-16) была оптимизирована, синтезирована и клонирована в экспрессионный вектор pTXB1. Рекомбинантную конструкцию трансформировали в клетки *Escherichia coli* BL21 (DE3), и подобрали оптимальные условия для ее экспрессии. Белок, кодируемый конструкцией pTXB1–CPG2, содержал аффинную метку интеина и хитин-связывающего домена (CBD) на своем *C*-конце. Полученный меченый фермент был значительно более растворим, чем нативный фермент без метки. Поскольку полученный рекомбинантный белок не имел дисульфидных связей, тиол-индуцированная расщепляющая активность интеина использовалась для высвобождения CPG2 с хитиновой колонки, в то время как интеин и CBD оставались прикрепленными к сорбенту (одностадийная очистка). Были определены кинетические параметры высвобождаемого фермента. Вторичная и третичная структуры очищенного CPG2 были проанализированы с помощью кругового дихроизма (КД) и флуоресцентной спектроскопии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Химические соединения, бактериальные штаммы и плазмиды.** В исследованиях использовали следующие реактивы: дрожжевой экстракт и триптон («Liofilchem», Италия); изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (IPTG, «Cinnagen», Иран); метотрексат и карбоксипептидаза G2 («Sigma Aldrich», USA); рестрикционные эндонуклеазы, pfu DNA полимераза и T4 DNA лигаза («Thermo Scientific», США); молекулярно-биологические киты («GeneAll», Южная Корея); Q-Сефароза («GE Healthcare», Великобритания). В работе использовали праймеры производства «Macrogen», Корея. Интеин-опосредованная очищающая аффинная хитин-связывающая система tag была разработана компанией «New England Biolab», Великобритания. Если не указано иное, остальные реактивы производства «Merck», Германия. Все реактивы были аналитической степени чистоты.

**Клонирование и конструирование рекомбинантной плазмиды pTXB1–CPG2.** Ген, кодирующий карбоксипептидазу G2, был синтезирован «GeneCust», Франция, предпочтительно на основе кодона *E. coli*. Праймеры (прямой праймер: 5′-GGTGGTCATATGGCACTGGCACAAAAGCGTGAC-3′; обратный праймер: 5′-GGTGGTTGCTCTTCCGCATTTGCCAGCACCCAGATCCATAATCAGG-3′) были созданы для ампплификации и клонирования гена карбоксипептидазы G2 в pTXB1 (внутрь сайтов рестрикции NdeI and SapI). ПЦР выполняли на приборе Bio-Rad thermocycler («Bio-Rad», США). Условия проведения ПЦР включали следующие этапы: преденатурация при 95 °C в течение 5 мин; далее 30 циклов (95 °C в течение 1 мин, 59 °C в течение 1 мин и 72 °C в течение 1 мин) и достройку цепи при 72 °C в течение 10 мин. Затем продукт ПЦР наносили на 1%-ный (*w/v*) агарозный гель и очищали. Очищенный фрагмент расщепляли эндонуклеазами рестрикции NdeI и SapI и клонировали в дважды расщеплённую плазмиду pTXB1 («New England Biolab», Великобритания). Секвенирование ДНК («Macrogen», Южная Корея) подтвердило вставленную последовательность. Полученная конструкция (pTXB1–CPG2) была трансформирована в *E. coli* BL21 (DE3).

**Экспрессия карбоксипептидазы G2 в *E. coli*.** Для подбора оптимальных условий экспрессии были тестированы варианты концентраций IPTG (0,1; 0,5 и 1 мМ), различные культуральные среды [Luria Bertani (LB), минимальная среда (M9) и триптон-дрожжевой экстракт (2xYT)], время (10, 20 и 30 ч) и температуры (25, 30 и 37 °C). Среду 2xYT (1 литр), содержащую ампициллин (100 мкг/мл), инокулировали трансформированными бактериальными клетками и инкубировали при 37 °C, 180 rpm, до значения ОП 0,5–0,6. Затем экспрессию белка индуцировали 0,5 мМ IPTG при 25 °C в течение 30 ч в присутствии 1% глюкозы. Клетки собирали центрифугированием (8000 g, 15 мин, 4 °C). Бактери-

альные осадки ресуспендировали в 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), содержавшем 300 мМ NaCl, и обрабатывали ультразвуком на льду в условиях 8 импульсов по 10 с. Растворимую и нерастворимую фракции белка разделяли центрифугированием (8000 g, 30 мин, 4 °C).

**Стадии очистки фермента.** ***Колоночная хроматография с хитином.*** Для очистки фермента и удаления его хитин-связывающей метки и интеина аффинную хроматографию проводили на смоле, покрытой хитином, в соответствии с рекомендациями производителя. Вкратце, хитиновую колонку уравновешивали 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), содержащим 500 мМ NaCl. Белок загружали в колонку и промывали 20 объемами того же буфера. Связанный белок инкубировали в 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), содержащем 500 мМ NaCl и 50 мМ дитиотреитола (DTT), при 4 °C в течение 16–40 ч. Элюированные образцы собирали в виде фракций по 0,5 мл. SDS-PAGE (12% полиакриламид) использовали для подтверждения чистоты CPG2 и полного удаления интеина и CBD.

***Колоночная хроматография на Q-Сефарозе.*** Для сохранения метки фермент, содержавший связанную с хитином метку и интеин, очищали на Q-Сефарозе. С этой целью исходный экстракт был нанесён на колонку с Q-Сефарозой, предварительно уравновешенную 20 мМ Tris-HCl буфером (pH 8,0).

После промывания колонки тем же буфером был применён линейный градиент 0–2 M NaCl в 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0). Связанный фермент элюировали 20 мМ Tris-HCl, содержащим 0,8 M NaCl. Затем для удаления DTT буфер заменяли на 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), используя центробежный фильтр Amicon Ultra-15 («Millipore», США; отсечение – 10 kDa). Все стадии проводили при 4 °C. После SDS-PAGE белки окрашивали красителем Coomassie brilliant blue R-250 [15]. Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорда [16].

**Активность фермента и биохимическая характеристика.** Активность карбоксипептидазы G2 измеряли с использованием МТХ в качестве субстрата. Разные концентрации субстрата (1–200 мкМ) получали разведением стокраствора (50 мМ) буфером 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), содержащим 50 мМ NaCl и 0,2 мМ $ZnSO_4$. Реакцию начинали добавлением фермента к реакционной смеси (конечный объем 300 мкл): 50 мкл очищенного рекомбинантного фермента слияния (1 мг/мл) или 10 мкл рекомбинантного или коммерческого фермента без интеина (0,4 мг/мл).

Поглощение при 320 нм (для МТХ) непрерывно регистрировали на спектрофотометре Perkin Elmer («Perkin Elmer Inc.», США), и исходную скорость реакции определяли при помощи линейной регрессии. Данные вставлялись в уравнение Михаэлиса–Ментена, и кинетические параметры рассчитывались с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 7. Одну единицу фермента определяли как количество CPG2, необходимое для превращения 1 мкмоль субстрата в продукт за 1 мин [17, 18].

Необходимо отметить, что до определения активности лиофилизованный коммерческий фермент (0,4 мг/мл) был растворён в 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5) и диализован (для отсечения 30 kDa) против этого же буфера (50 мМ Tris-HCl) для удаления возможных неизвестных примесей.

**Гель-фильтрация.** Лизозим (14 kDa), овальбумин (43 kDa), бычий сывороточный альбумин (66 kDa) и альдолаза (150 kDa) использовали для построения стандартной кривой (log MM к объёму) с использованием Sephadex G-100 («GE Healthcare», США). Затем очищенный CPG2 загружали в колонку, уравновешенную 50 мМ Tris-HCl, содержащим 150 мМ NaCl, и элюировали тем же буфером для определения его молекулярной массы (MM).

**Структурные исследования.** ***Флуоресцентная спектроскопия.*** Флуоресцентное излучение ароматических остатков CPG2 в 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5) измерялось на люминесцентном спектрофотометре Perkin Elmer LS 55 («Perkin Elmer Inc.», США). Использовали длину волны возбуждения 280 нм, а эмиссионный спектр регистрировался в диапазоне 300–400 нм. Щели для возбуждения и излучения были установлены на 10 нм. Концентрация фермента составляла 30 мг/мл.

***КД-спектроскопия.*** Спектры КД в дальнем УФ-диапазоне (200–250 нм) записывали на спектрополяриметре JASCO J-715 («JASCO», Япония). Концентрация CPG2 составляла 0,2 мг/мл в 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5). Результаты выражались как молярная эллиптичность [θ] (град.·см$^2$·дмоль$^{-1}$) и рассчитывались по формуле $[\theta]\lambda = (\theta \times 100\ MRW)/(cl)$, где c – концентрация белка в мг/мл, l – длина оптического пути света (см) и θ – измеренная эллиптичность (градусы) при длине волны λ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для очистки целевого белка на хитин-содержащей колонке использовали вектор pTXB1, который содержит интеин из *Mycobacterium xenopi* и хитин-связывающий домен (CBD) на

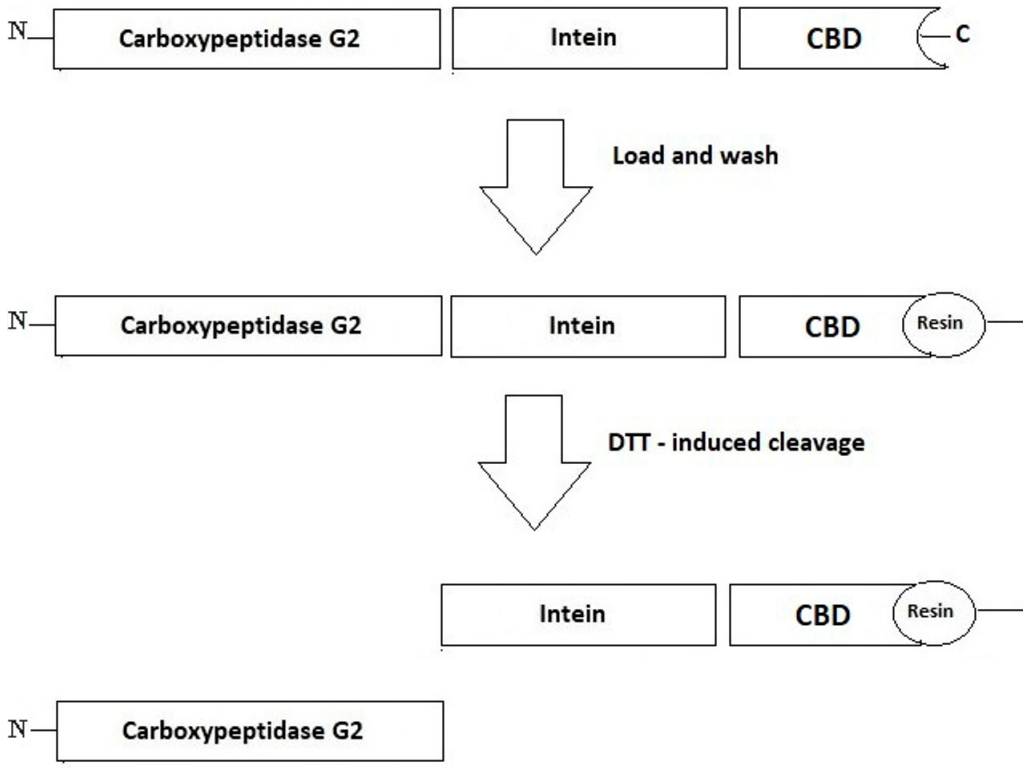


**Рис. 1.** Схематическое изображение конструкции гибридной карбоксипептидазы G2. Кодирующая последовательность CPG2 была встроена в вектор pTXB1. Объединённая конструкция белка состояла из трёх частей: самого фермента, интеина и *C*-концевого CBD для связывания со смолой, покрытой хитином, и для облегчения одностадийной очистки

*C*-конце. CBD – одна из лучших альтернатив гистидиновым меткам, поскольку он дешевле и его можно регенерировать большее количество раз [19, 20]. Генно-инженерный интеин из *M. xenopi* может подвергаться самоотщеплению под действием тиоловых реагентов, в результате чего высвобождается целевой белок (рис. 1). В данном случае ген карбоксипептидазы G2 был оптимизирован по кодонам, синтезирован и затем вставлен в NdeI и SapI (сайты рестрикции вектора pTXB1) для предупреждения добавления любой дополнительной аминокислоты к очищенному ферменту после самоотщепления (рис. 1). Правильное клонирование полного гена подтверждали секвенированием ДНК полученной конструкции (pTXB–CPG2).

Впоследствии были тестированы различные условия экспрессии, включая разные питательные среды (LB, 2xYT и M9), концентрации IPTG (0,1; 0,5 и 1 мМ), температуры (16, 25 и 37 °C) и время инкубации (10, 20 и 30 ч). Наибольшая растворимость белка (~ 50%) была достигнута в среде 2xYT, содержавшей 1% глюкозы, после индукции 0,5 мМ IPTG в течение 30 ч при 25 °C (рис. 2). В других условиях экспрессия белка приводила к очень низкому количеству растворимого белка или к образованию телец включения. Относительное содержание растворимого CPG2 в условиях оптимальной экспрессии было количественно определено с использованием

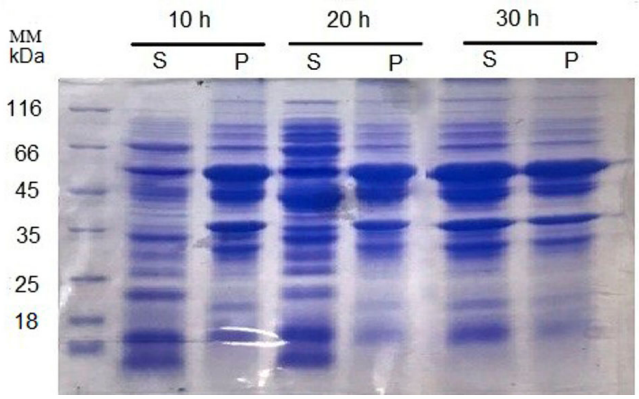


**Рис. 2.** SDS-PAGE анализ экспрессии карбоксипептидазы G2 в оптимальных условиях. Экспрессия в среде 2xYT, содержащей 1% глюкозы, индукция 0,5 мМ IPTG при 25 °C в течение 10, 20 и 30 ч. Оптимальные условия достигались через 30 ч при 25 °C. S – супернатант, P – осадок. (С цветными вариантами рис. 2 и 3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/.)

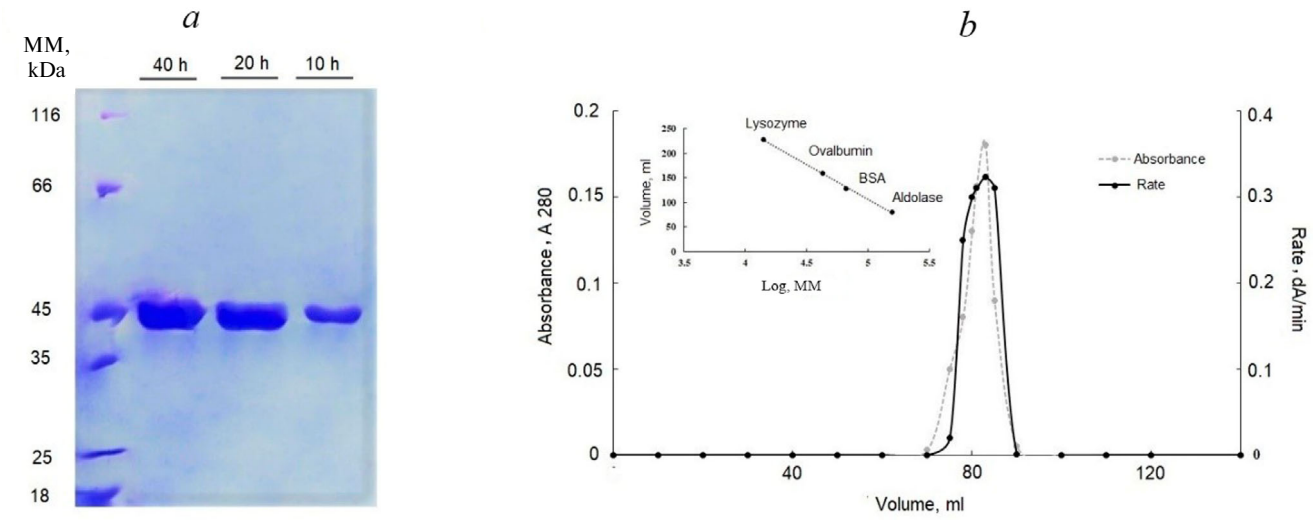


**Рис. 3.** *a* – SDS-PAGE для анализа реакции расщепления на колонке слитого белка CPG2 в присутствии DTT в различные моменты времени в течение 40 ч. Оптимальное время расщепления составляло 20 ч. После расщепления фермент очищали до гомогенности. *b* – Определение молекулярной массы гель-фильтрацией с использованием Sephadex G-100

программного обеспечения ImageJ (рис. 2), которое продемонстрировало равные количества CPG2 в супернатанте и в осадке. Растворимая карбоксипептидаза G2 составляла около 35% от общего количества белков в супернатанте.

Растворённый экспрессированный белок был нанесён на колонку со связанным хитином. Отщепление интеина индуцировали 50 мМ DTT в течение 10, 20, и 40 ч при 4 °C. Инкубация в течение 20 ч приводила к лучшему отщеплению, а через 40 ч степень отщепления существенно не изменялась, однако активность фермента значительно снижалась. Выход активного CPG2 составил 305 мг CPG2 на литр культуры (табл. 1). Очищенный белок дал полосу с ММ 42 kDa на SDS-PAGE (соответствует одной субъединице CPG2), что подтверждает полное удаление интеина и CBD из карбоксипептидазы G2 (рис. 3, *a*).

Молекулярную массу фермента определяли гель-фильтрацией на Sephadex G-100. Стандарты белков использовали для построения калибровочной кривой зависимости логарифма молекулярной массы от объема элюирования. Результаты показали наличие активной фракции (в объеме 110 мл), соответствующей ММ 83 kDa, что указывает на присутствие димерного белка (рис. 3, *b*).

Кинетические параметры очищенного фермента с меткой CBD и без нее рассчитывали с использованием уравнения Михаэлиса–Ментен. Значения $K_m$ и $k_{cat}$ для очищенного фермента были определены как 6,5 ± 0,3 мкМ и 4,57 ± 0,23 $c^{-1}$ соответственно, что существенно не отличалось от значений $k_{cat}$ и $K_m$ коммерчески доступного CPG2 из *Pseudomonas* sp. («Sigma»), использованного в качестве контроля (табл. 2). Хотя для получения очищенного фермента за одну стадию применялись очень большая метка и DTT, проверка активности и гель-фильтрация показали, что фермент сохранил свою димерную структуру и восстановил свою активность после расщепления на колонке. Значение $K_m$ для очищенного фермента с интеином и хитин-связывающим доменом составляло ~47 мМ, а $k_{cat}$ состав-

**Таблица 1.** Очистка растворимого CPG2 из 1 литра культуры

| Этапы | Общий белок (мг) | Общая активность (ед.) | Удельная активность (ед./мг) | Целевой гибридный белок (мг) | Целевой белок (мг) |
|---|---|---|---|---|---|
| Частицы (CPG2 с меткой) | ~ 800 | ND | ND | 585 | – |
| Супернатант (растворимый CPG2 с меткой) | 1000 | 90 | 0,09 | 360 | – |
| Колонка с хитин-связанным доменом (растворимый CPG2 без метки) | 305 | 1020 | 3,34 | – | 305 |

**Таблица 2.** Кинетические параметры, полученные для CPG2

| Фермент | $K_m$ (мкМ) | $k_{cat}$ ($с^{-1}$) | $k_{cat}/K_m$ |
|---|---|---|---|
| CPG2 (контроль) | 6,3 ± 0,3 | 4,34 ± 0,22 | 0,68 |
| CPG2 (без интеина) | 6,5 ± 0,3 | 4,57 ± 0,23 | 0,70 |
| CPG2 (с интеином) | 47,8 ± 2,4 | 0,47 ± 0,01 | 0,01 |

ляло 0,47 $с^{-1}$. По-видимому, присутствие метки из-за ее большого размера значительно снижает каталитическую эффективность.

Чтобы убедиться в отсутствии структурных изменений в растворимой карбоксипептидазе G2, изучались также её вторичная и третичная структуры с использованием КД в дальнем УФ-диапазоне и флуоресцентной спектроскопии. Спектр КД в дальнем УФ-диапазоне полученного рекомбинантного фермента был подобен спектру контрольного CPG2, показывая отрицательные пики, соответствующие структурам α-спирали и β-листа (рис. 4, *a*), о которых ранее сообщалось для карбоксипептидазы G2 [21]. Спектр флуоресценции рекомбинантной карбоксипептидазы G2 также не отличался от контрольного (рис. 4, *b*).

Наши предыдущие исследования показали, что интеин можно использовать для очистки тетрамерного фермента (уриказы) [22]. Как и в текущих исследованиях, функциональных и структурных различий по сравнению с контролем не наблюдалось [22]. Кислые и основные факторы роста фибробластов человека, человеческий α-1-антитрипсин и цекропин (противомикробный) также экспрессировались с использованием этой интеиновой системы [23–25].

Ранее CPG2 из *Pseudomonas* sp. (штамм RS16) был очищен с использованием трех стадий очистки, включающих хроматографии на SP-Sephadex, DEAE-Sepharose и затем с иммобилизованной на Sepharose Procion red H-8BN [26]. В другом исследовании Minton et al. [27] этот фермент экспрессировался в *E. coli* с очень низким выходом. Чтобы улучшить его экспрессию, Goda et al. [2] экспрессировали синтетический ген с оптимизированными кодонами в виде телец включения, которые требовали рефолдинга, что могло снизить выход активного белка. В том же исследовании His-метка использовалась для одностадийной очистки с использованием колонки Ni-NTA, но метка оставалась неотщепленной [2]. Недавно Jeyharan et al. [28] сообщили о производстве растворимого белка (250 мг/литр) с использованием His-метки для простой очистки. В их исследовании метка была удалена протеазой TEV, что потребовало дополнительной стадии очистки на колонке Ni-NTA с последующей хроматографией на Superdex 75-GL. Протеаза TEV – дорогой фермент; кроме того, расщепление TEV оставляет лишний остаток, который может не подходить для терапевтических белков [28].

В текущем исследовании очистка CPG2 была упрощена до одной стадии с использованием самоотщепляющегося интеина без добавления аминокислот. К настоящему времени в ряде исследований сообщалось об очистке белков с помощью интеинов, но уникальность характеристик каждого белка может привести к разным результатам. Таким образом, каждый белок требует

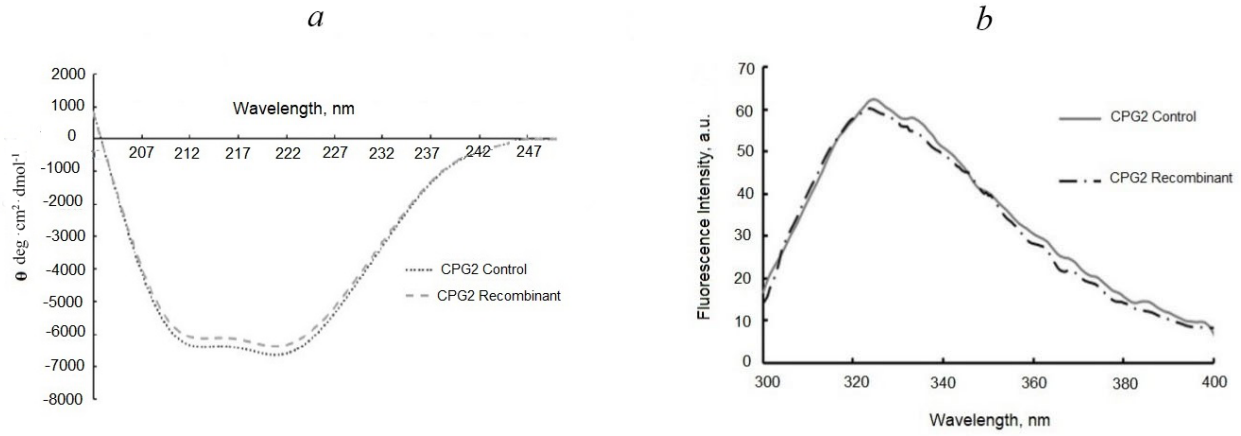


**Рис. 4.** Структурный анализ карбоксипептидазы G2. *a* – Спектры КД рекомбинантного и контрольного ферментов CPG2 карбоксипептидазы G2 (0,2 мг/мл) в 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5). *b* – Флуоресценция очищенного и контрольного ферментов CPG2. Длина волны возбуждения составляла 280 нм, и регистрировали излучение в диапазоне 300–400 нм. Концентрация фермента составляла 60 мкг/мл в 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5)

независимой оценки. В данной работе соответствующий выход растворимого фермента (305 мг/литр) был достигнут при оптимальных условиях культивирования, и никаких структурных и функциональных изменений не произошло. Другой ключевой аспект – способность этой метки увеличивать растворимую экспрессию карбоксипептидазы G2. Прогноз ccSOL omics был использован для расчёта показателя способности к растворению и для идентификации растворимых фрагментов в белке. Эта программа предсказывает результаты эндогенной и гетерологичной экспрессии белков *E. coli* на основе их гидрофобности и гидрофильности, а также склонности к образованию β-листовых и α-спиральных структур [29, 30]. Вероятность того, что CPG2, слитый с интеином и CBD, будет экспрессироваться в растворимой форме была рассчитана как ~60%, что было больше, чем общая оценка, полученная для одного фермента (35%). CcSOL omics также идентифицировал больше нерастворимых областей в первичной последовательности карбоксипептидазы G2 по сравнению с фрагментом интеина. Ранее мы клонировали ген, кодирующий карбоксипептидазу G2 (без метки), в вектор pET28, и исследовали его экспрессию в различных условиях, однако только небольшое количество белка было найдено в растворимой фракции (неопубликованные данные). Этот результат, согласующийся с другими нашими экспериментальными данными, также подтвердил способность интеина увеличивать растворимость CPG2.

Насколько нам известно, хотя эта коммерческая система саморасщепляющегося интеина использовалась для очистки ряда белков, в данном исследовании впервые оценивается ее влияние на растворимость белка. В целом нам удалось повысить растворимость экспрессированного CPG2 и очистить его с помощью одностадийной процедуры, опосредованной интеином. Примечательно, что фермент сохранил свою активность и гомодимерную структуру после процесса экспрессии и очистки. Наш результат вселяет надежду на то, что использование интеинов для очистки мультимерных белков может стать перспективным вариантом. Тем не менее представляется необходимым проведение дополнительных исследований для улучшения самостоятельной системы интеина или в сочетании её с другими системами для крупномасштабной очистки таких терапевтических ферментов, особенно мультимерных белков.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Иранского национального института развития медицинских исследований (NIMAD, проект № 940711).

**Благодарности.** Мы благодарны исследовательскому совету Университета Tarbiat Modares, проф. Khosro Khajeh за поддержку в этом исследовании.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в какой-либо сфере деятельности.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rowsell, S., Pauptit, R. A., Tucker, A. D., Melton, R. G., Blow, D. M., and Brick, P. (1997) Crystal structure of carboxypeptidase G2, a bacterial enzyme with applications in cancer therapy, *Structure*, **5**, 337-347, doi: 10.1016/S0969-2126(97)00191-3.
2. Goda, S. K., Rashidi, F. A. B., Fakharo, A. A., and Al-Obaidli, A. (2009) Functional overexpression and purification of a codon optimized synthetic glucarpidase (Carboxypeptidase G2) in *Escherichia coli*, *Protein J.*, **28**, 435-442, doi: 10.1016/J.ENZMICTEC.2016.08.001.
3 Ramsey, L. B., Balis, F. M., O'Brien, M. M., Schmiegelow, K., Pauley, J. L., et al. (2018) Consensus guideline for use of glucarpidase in patients with high-dose methotrexate induced acute kidney injury and delayed methotrexate clearance, *Oncologist*, **23**, 52-61.
4. Rattu, M. A., Shah, N., Lee, J. M., Pham, A. Q., and Marzella, N. (2013) Glucarpidase (voraxaze), a carboxypeptidase enzyme for methotrexate toxicity, *P T*, **38**, 732-744.
5. Wingfield, P. T. (2015) Overview of the purification of recombinant proteins, *Curr. Protoc. Protein Sci.*, **80**, 6.1.1-6.1.35, doi: 10.1002/0471140864.ps0601s80.
6. Rosano, G. L., and Ceccarelli, E. A. (2014) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges, *Front. Microbiol.*, **5**, 172, doi: 10.3389/fmicb.2014.00172.
7. Goh, H. C., Sobota, R. M., Ghadessy, F. J., and Nirantar, S. (2017) Going native: Complete removal of protein purification affinity tags by simple modification of existing tags and proteases, *Protein Expr. Purif.*, **129**, 18-24, doi: 10.1016/J.PEP.2016.09.001.
8. Li, Y. (2011) Self-cleaving fusion tags for recombinant protein production, *Biotechnol. Lett.*, **33**, 869-881, doi: 10.1007/s10529-011-0533-8.
9. Fan, Y., Miozzi, J. M., Stimple, S. D., Han, T. C., and Wood, D. W. (2018) Column-free purification methods for recombinant proteins using self-cleaving aggregating tags, *Polymers (Basel)*, **10**, 468, doi: 10.3390/polym10050468.
10. Wu, W. Y., Mee, C., Califano, F., Banki, R., and Wood, D. W. (2006) Recombinant protein purification by self-cleaving aggregation tag, *Nat. Protoc.*, **1**, 2257-2262, doi: 10.1038/nprot.2006.314.
11. Arnau, J., Lauritzen, C., Petersen, G. E., and Pedersen, J. (2006) Current strategies for the use of affinity tags and tag

removal for the purification of recombinant proteins, *Protein Expr. Purif.*, **48**, 1-13, doi: 10.1016/J.PEP.2005.12.002.
12. Belfort, M., Stoddard, B. L., Wood, D. W., and Derbyshire, V. (2006). *Homing endonucleases and inteins*, Springer Science & Business Media.
13. Banki, R., and Wood, D. W. (2005) Inteins and affinity resin substitutes for protein purification and scale up, *Microb. Cell Fact.*, **4**, 1-6, doi: 10.1186/1475-2859-4-32.
14. Lahiry, A., Fan, Y., Stimple, S. D., Raith, M., and Wood, D. W. (2018) Inteins as tools for tagless and traceless protein purification, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **93**, 1827-1835, doi: 10.1002/jctb.5415.
15. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680.
16. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
17. Rashidi, F. B., AlQhatani, A. D., Bashraheel, S. S., Shaabani S., Groves, M. R. et al. (2018) Isolation and molecular characterization of novel glucarpidases: enzymes to improve the antibody directed enzyme pro-drug therapy for cancer treatment, *PLoS One*, **13**, e0196254, doi: 10.1371/journal.pone.0196254.
18. AlQahtani, A. D, Al-Mansoori, L., Bashraheel, S. S., Rashidi, F. B., Al-Yafei, A., et al. (2019) Production of "biobetter" glucarpidase variants to improve drug detoxification and antibody directed enzyme prodrug therapy for cancer treatment, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **127**, 79-91, doi: 10.1016/J.EJPS.2018.10.014.
19. Wang, L, Kang, J. H., Kim, K. H., and Leeb, E. K. (2009) Expression of intein-tagged fusion protein and its applications in downstream processing, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **85**, 11-18, doi: 10.1002/jctb.2277.
20. Fong, B. A., Wu, W. Y., and Wood, D. W. (2010) The potential role of self-cleaving purification tags in commercial-scale processes, *Trends Biotechnol.*, **28**, 272-279, doi: 10.1016/j.tibtech.2010.02.003.
21. Yachnin, B. J., and Khare, S. D. (2017) Engineering carboxypeptidase G2 circular permutations for the design of an autoinhibited enzyme, *Protein Eng. Des.*, **30**, 321-331, doi: 10.1093/protein/gzx005.
22. Alishah, K., Asad, S., Khajeh, K., and Akbari, N. (2016) Utilizing intein-mediated protein cleaving for purification of uricase, a multimeric enzyme, *Enzyme Microb. Technol.*, **93-94**, 92-98, doi: 10.1016/J.Enzmictec.2016.08.001.
23. Wood, D. W., Derbyshire, V., Wu, W., Chartrain, M., Belfort, M., and Belfort, G. (2000) Optimized single-step affinity purification with a self-cleaving intein applied to human acidic fibroblast growth factor, *Biotechnol. Prog.*, **16**, 1055-1063, doi: 10.1021/bp0000858.
24. Sharma, S. S., Chong, S., and Harcum, S. W. (2006) Intein-mediated protein purification of fusion proteins expressed under high-cell density conditions in *E. coli*, *J. Biotechnol.*, **125**, 48-56, doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.01.018.
25. Díaz, M., Venturini, E., Marchetti, S., Arenas, G., and Marshall, S. H. (2012) Intein-mediated expression of cecropin in *Escherichia coli*, *Electron. J. Biotechnol.*, **15**, doi: 10.2225/vol15-issue2-fulltext-2.
26. Sherwood, R. F, Melton, R. G., Alwan, S. M., and Hughes, P. (1985) Purification and properties of carboxypeptidase G2 from *Pseudomonas* sp. strain RS-16, *Eur. J. Biochem.*, **148**, 447-453, doi: 10.1111/j.1432-1033.1985.tb08860.x.
27. Minton, N. P., Atkinson, T., and Sherwood, R. F. (1983) Molecular cloning of the *Pseudomonas* carboxypeptidase G2 gene and its expression in *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*, *J. Bacteriol.*, **156**, 1222-1227.
28. Jeyaharan, D., Aston, P., Garcia-Perez, A., Schouten, J., Davis, P., and Dixon, A. M. (2016) Soluble expression, purification and functional characterisation of carboxypeptidase G2 and its individual domains, *Protein Expr. Purif.*, **127**, 44-52, doi: 10.1016/J.PEP.2016.06.015.
29. Agostini, F., Cirillo, D., Livi, C. M., DelliPonti, R., and Tartaglia, G. G. (2014) ccSOL omics: a webserver for solubility prediction of endogenous and heterologous expression in *Escherichia coli*, *Bioinformatics*, **30**, 2975-2977, doi: 10.1093/bioinformatics/btu420.
30. Hebditch, M., Carballo-Amador, M. A., Charonis, S., Curtis, R., and Warwicker, J. (2017) Protein-Sol: a web tool for predicting protein solubility from sequence, *Bioinformatics*, **33**, 3098-3100, doi: 10.1093/bioinformatics/btx345.

# ENHANCED SOLUBILITY AND ONE-STEP PURIFICATION OF FUNCTIONAL DIMERIC CARBOXYPEPTIDASE G2*

**A. Khodakarami[1], B. Dabirmanesh[1]**, S. Asad[2], and M. Khaledi[1]**

[1] *Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, 14115 Tehran, Iran; E-mail: dabirmanesh@modares.ac.ir*

[2] *Department of Biotechnology, College of Science, University of Tehran, 14155 Tehran, Iran*

Carboxypeptidase G2 is a bacterial enzyme that catalyzes methotrexate conversion to its inactive forms which are then eliminated via a non-renal pathway in patients with renal disorders during a high-dose methotrexate administration. Due to the increasing demand of this enzyme, it was of interest to simplify its production process. For this reason, we developed a method for production and one-step purification of this enzyme using an intein-mediated system with a chitin-binding affinity tag. The carboxypeptidase G2 gene from *Pseudomonas* RS16 was optimized, synthesized, cloned into the pTXB1 expression vector and finally transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells. The optimal condition for the enzyme soluble expression was achieved in 2×YT medium containing 1% glucose at 25°C for 30 h with 0.5 mM IPTG. The enzyme without intein was expressed as inclusion bodies indicating the importance of intein for the protein solubility. The expressed homodimer protein was purified to homogeneity on a chitin affinity column. The $K_m$ and $k_{cat}$ values of 6.5 μM and 4.57 $s^{-1}$, respectively, were obtained for the purified enzyme. Gel filtration analysis indicated that the resulting recombinant protein was a dimer of 83 kDa. Fluorescence and circular dichroism spectroscopy confirmed the enzyme tertiary and secondary structures, respectively. The use of intein-mediated system provided the possibility of the one-step carboxypeptidase G2 purification, paving the way to the application of this enzyme in pharmaceutics.

*Keywords*: carboxypeptidase G2, intein, methotrexate