

УДК 577.112.083:577.29

## ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЗМЕТИОНИНОВОГО ВАРИАНТА ТЕРМОСТАБИЛЬНОГО ШАПЕРОНА GroEL ИЗ *Thermus thermophilus*

© 2019 г. М. С. Юркова<sup>1,2</sup>, О. И. Саввин<sup>2</sup>, В. А. Зенин<sup>1,2</sup>, А. Н. Фёдоров<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Российский университет дружбы народов, Москва, 117198, Россия

<sup>2</sup>Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”  
Российской академии наук, Москва, 119071, Россия

\*e-mail: a.fedorov@fbras.ru

Поступила в редакцию 03.09.2018 г.

После доработки 17.09.2018 г.

Принята к публикации 25.09.2018 г.

Шаперон GroEL является объектом интенсивных исследований как с точки зрения его устройства и функционирования при сворачивании белков в клетке, так и возможностей использования в создаваемых системах экспрессии для получения рекомбинантных белков в растворимых формах. Создан вариант шаперона GroEL из *Thermus thermophilus*, в котором все остатки метионина заменены на остатки лейцина. Полученный вариант шаперона был очищен до гомогенного состояния. Измененный GroEL полностью сохранял четвертичную структуру, присущую исходному шаперону, в виде частицы из двойного гептамера, а также сохранял исходную термостабильность. Полученный вариант шаперона интересен не только с точки зрения структурной организации GroEL, но и может быть эффективно использован в качестве белка-носителя при получении целевых рекомбинантных белков. Замена остатков метионина в белке-носителе позволяет существенно упростить последующие процедуры очистки целевых полипептидов.

**Ключевые слова:** шапероны, GroEL, сворачивание, фолдинг, аминокислотные замены в белках

**DOI:** 10.1134/S0555109919020156

При экспрессии рекомбинантных белков и полипептидов в бактериальной системе исследователи часто сталкиваются с низким уровнем их экспрессии и/или агрегацией. Это может быть обусловлено различными причинами, как, например, лабильностью полипептидов, их гидрофобностью, неправильным сворачиванием белков в чужеродном организме или отсутствием гликозилирования. Одним из подходов к решению подобных проблем является создание слитых белков, где в качестве белка-лидера используется растворимый нетоксичный белок с высоким уровнем экспрессии, способный стабилизировать целевой белок. В качестве лидеров наиболее широко применяются тиоредоксин, мальтоза-связывающий белок и глутатионтрансфераза, которые в некоторых случаях помогали значительно повысить уровень экспрессии и/или растворимость целевого белка в составе конструктора [1–4]. Кроме перечисленных, разработаны и в некоторых случаях применяются и другие белки-лидеры, однако лидера, способного стабилизировать любые целевые белки, не существует, что объясняется, очевидно, разнообразием самих целевых белков. С точки зрения

универсальности наибольшим потенциалом обладают, вероятно, шапероны, поскольку их нормальной функцией в клетке является ассистирование в сворачивании и стабилизация различных клеточных белков [5]. Кроме того, шаперон GroEL у большинства организмов имеет сложную четвертичную структуру, состоящую из двух колец по семь мономеров в каждом; субстрат-связывающая поверхность GroEL обращена внутрь образовавшейся полости, поэтому субстрат, связанный с GroEL, экранирован от цитоплазмы клетки [6]. Эти свойства GroEL представляются очень привлекательными при использовании его в качестве белка-лидера для экспрессии, например, лабильных полипептидов, или токсичных для бактериальной клетки. По окончании экспрессии слитого белка целевой полипептид бывает необходимо отделить от лидера, что удобно делать с помощью химической обработки, например, бромцианом, который расщепляет остатки метионина.

Цель работы – получение и изучение свойств шаперона GroEL из термостабильного организма, у которого все остатки метионина заменены

на остатки лейцина для использования такой формы GroEL в качестве белка-носителя.

## МЕТОДИКА

**Создание гена GroEL *Thermus thermophilus* с заменой кодонов, кодирующих метионин, на кодоны, кодирующие лейцин. Получение экспрессирующей плазмиды.** Аминокислотная последовательность GroEL из *T. thermophilus* содержит 6 остатков метионина, помимо инициаторного [6]. Кодирующие их триплеты были заменены на триплеты, кодирующие остатки лейцина, с помощью ПЦР с использованием следующих пар праймеров (праймеры синтезированы компанией “Евроген”, Россия):

TT-1 lo: 5'CCACSTTCTCCAGGGCGTCCG-CAATCAGCTTG3',

TT-1 up: 5'GATTGCCGACGCCCTGGAGAAG-GTGGGGAAGG3';

TT-2 lo: 5'AGGACCGCTTCCAGCGTCTCCG-GGTTGGTGAC3',

TT-2 up: 5'CAACCCCGAGACGCTGGAAGC-GGTCCTCGAGG3';

TT-3 lo: 5'TGTCSTTGAGCAGCTCCTTCCT-GCGGTCACCGAAG3',

TT-3 up: 5'ACCGCAGGAAGGAGCTGCTCAAG-GACATCGCGG3';

TT-4 lo: 5'CCGGCCCCAGCAGGGAGAGGGT-GGCGTTCTC3',

TT-4 up: 5'GCCACCCTCTCCCTGCTGGGC-CGGGCCGAG3';

TT-5 lo: 5'CGCCTCCACCAGGTCCACGAAC-TCCCGGTG3',

TT-5 up: 5'GGAGTTCGTGGACCTGGTGGAG-GCGGGCATCG3'.

Далее, с помощью PCR со следующими праймерами (синтезированы в “Евроген”, Россия): прямой праймер TT-f-NdeI: 5'GGGAATTC-CATATGGCGAAGATCCTGGTGTGACG3' и обратный праймер TT-r-BglII no Met 5'GGA-AGATCTTTAGAAATCCAGGTCCCCGGCGC3' был получен ген безметионинового GroEL, заканчивающийся стоп-кодоном TAA (стоп-кодон выделен курсивом) и ограниченный рестриционными сайтами для NdeI на 5'-конце и для BglII на 3'-конце (сайты выделены подчеркиванием). В качестве матрицы был использован геном *T. thermophilus*, полученный методом фенол-хлороформной депротенинизации из клеток микроорганизма. Полученный таким образом фрагмент был рестрицирован NdeI и BglII (“Fermentas”, Литва) согласно протоколу производителя и клонирован в экспрессионный вектор pET11c (“Novagen”, Германия), в результате чего была получена экспрессионная плаزمида pGroEL.

**Клонирование GroES и создание бицистронной экспрессионной плазмиды.** GroES из *T. thermophilus*

был получен с помощью ПЦР с использованием прямого праймера (синтезированы в “Евроген”, Россия) f-NcoI 5'CATGCCATGGCCGCGGAG-GTGAAGACG3' и обратного праймера (также “Евроген”, Россия) r-NotI 5'TTTTCSTTTTGGCGG-CCGCTTACTGCAGGACCGCAAGCAGGTCG3', содержащих, соответственно, рестриционные сайты NcoI и NotI (сайты выделены подчеркиванием). В качестве матрицы был использован геном *T. thermophilus*, полученный методом фенол-хлороформной депротенинизации из клеток микроорганизма. Аминокислотная последовательность GroES из *T. thermophilus* не содержала остатков метионина [6].

Фрагмент GroEL, не содержащий кодирующих метионин кодонов, полученный на предыдущем этапе, был рестрицирован NdeI и BglII (“Fermentas”, Литва) согласно протоколу производителя и клонирован во второй полилинкер бицистронного экспрессионного вектора pET Duet (“Novagen”, Германия). Фрагмент GroES был рестрицирован NcoI и NotI и клонирован в первый полилинкер бицистронного экспрессионного вектора pET Duet. В результате была получена бицистронная экспрессионная плазмида pGroEL/ES.

**Экспрессия белков.** Экспрессию модифицированного варианта GroEL проводили в экспрессионном штамме *E. coli* BL21(DE3). Ca<sup>2+</sup>-компетентные клетки были трансформированы плазмидой pGroEL либо pGroEL/ES согласно общепринятой методике [7]. Клетки выращивали в жидкой среде LB с добавлением ампицилина (конечная концентрация 100 мкг/мл) при 37°C и интенсивной аэрации на качалке. По достижении клетками оптической плотности OD<sub>600</sub> 0.4 индукцию начинали добавлением изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) в конечной концентрации 0.4 мМ. Экспрессию проводили при 37°C в течение 3 ч при интенсивной аэрации, после чего клетки собирали с помощью центрифугирования при 4°C и 4000 г в течение 15 мин.

**Выделение и очистка.** Полученную биомассу лизировали под действием ультразвука в фосфатно-солевом буфере (10 мМ КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, pH 7.4, 140 мМ NaCl) в присутствии 1 мМ AEBSF (4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride). Растворимые белки отделяли от клеточного дебриса с помощью центрифугирования при 14000 г в течение 15 мин при 4°C. Затем фракцию растворимых белков инкубировали при 62°C в течение 5 мин на водяной бане при постоянном перемешивании и снова центрифугировали в том же режиме, чтобы отделить агрегировавшие клеточные белки. Термостабильный комплекс GroEL/ES при этом оставался во фракции растворимых белков. Дальнейшую очистку проводили на колонке 10 × 300 мм (Tricorn, “GE Healthcare”, США) на носителе сефакрил S-400 в фосфатно-солевом буфере (10 мМ

$\text{K}_2\text{HPO}_4$  pH 7.4, 140 mM NaCl). Полученные фракции исследовали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Фракции, содержащие гомогенный комплекс GroEL/ES, объединяли и использовали для экспериментов по проверке функциональности.

**Гель-фильтрация.** Аналитическая гель-фильтрация для оценки олигомерного состояния полученного белка или комплекса проводилась на колонке  $10 \times 300$  мм (Tricorn, "GE Healthcare", США) на носителе сефакрил S-400, предварительно откалиброванной с помощью стандартного набора белков Gel Filtration Calibration Kit HMW (голубой декстран, ферритин, бычий сывороточный альбумин, лизоцим, "GE Healthcare", США). Хроматографию проводили в фосфатно-солевом буфере (10 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  pH 7.4, 140 mM NaCl). Полученные фракции исследовали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях.

**Проверка термостабильности.** Для проверки термостабильности комплекса GroEL/ES фракцию растворимых клеточных белков инкубировали при  $62^\circ\text{C}$  в течение 5 мин в твердотельном термостате "Гном" ("ДНК-технология", Россия), после чего охлаждали на льду. Агрегировавшие белки отделяли от растворимой фракции центрифугированием при 13000 g в течение 15 мин при  $4^\circ\text{C}$  (центрифуга Eppendorf 5415R "DJB Labcare Ltd", Великобритания), после чего супернатант и осадок анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях.

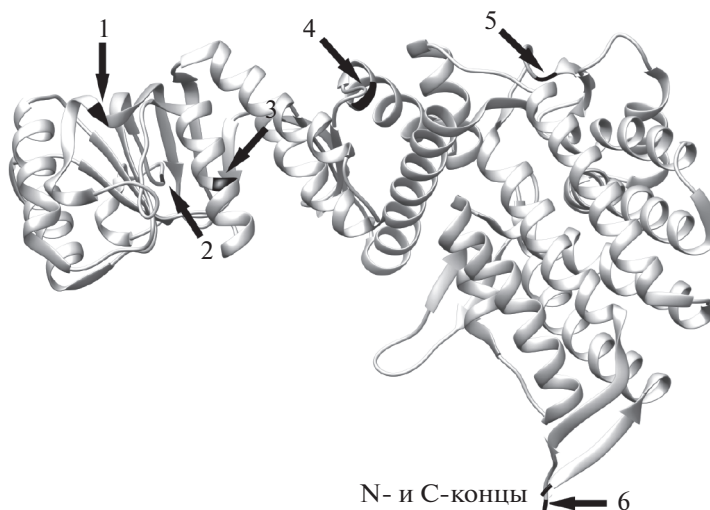
**Проверка функциональности.** Функциональность безметионинового GroEL, так же как и исходного варианта, проверяли по способности обратимо связывать денатурированный зеленый флюоресцирующий белок, GFP [8]. GFP денатурировали 10 mM HCl. Спонтанную ренатурацию проводили в буфере, содержащем 50 mM трис-HCl, 10 mM KCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM ДТТ, pH 7.8, с конечной концентрацией GFP 0.1 мкМ. Для изучения действия GroEL на ренатурацию в буфер добавляли 0.4 мкМ GroEL либо 0.4 мкМ GroEL с 0.8 мкМ GroES, а через 5 мин также добавляли 2 mM АТФ. Наличие функционального GFP определяли по его флюоресценции на 498 нм при длине волны возбуждения флюоресценции 395 нм на спектрофотометре Shimadzu RF-5301 ("Shimadzu", Япония) и рассчитывали как долю или процент флюоресценции от флюоресценции при спонтанном сворачивании GFP.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

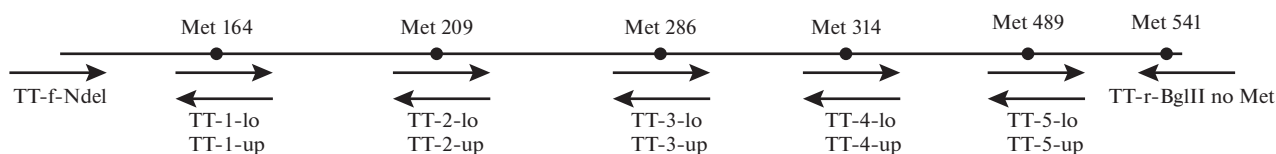
Безметиониновый вариант шаперона GroEL из термофильного организма был предназначен для последующего его использования в качестве

белка-носителя при экспрессии целевых рекомбинантных полипептидов в системе слитых белков. Шаперон GroEL является наиболее полно исследованным шапероном с точки зрения его структурной организации и функционирования в ассистировании сворачивания белков в клетке [9–13]. Функции шаперонов, в том числе GroEL, по стабилизации различных белков в стрессовых для них условиях, могут быть также адаптированы для использования при экспрессии в бактериальной системе лабильных, гидрофобных, склонных к агрегации или токсичных пептидов [14, 15]. Шаперон GroEL применяется для повышения экспрессии, сворачивания и растворимости целевых рекомбинантных белков как при его ко-экспрессии, так и в качестве белка-носителя [5]. Для использования GroEL в качестве белка-носителя в подобной системе экспрессии необходимо предусмотреть возможность последующего отделения целевого полипептида, например, с помощью химического отщепления под действием бромциана по остаткам метионина. Если белок-носитель не содержит в своей аминокислотной последовательности остатков метионина, то очистка относительно небольшого полипептида от крупного белка может быть полноценно осуществлена в одну стадию, тогда как расщепление белка-носителя на несколько фрагментов существенно усложняет эту задачу. Природный GroEL содержит в своей аминокислотной последовательности шесть остатков метионина (рис. 1) [6].

Кодирующие их триплеты были заменены на триплеты, кодирующие остатки лейцина, с помощью ПЦР (рис. 2). В качестве матрицы использовали ген GroEL из термофильного организма *T. thermophilus*. Природный термофильный GroEL из *T. thermophilus* сохраняет свою структуру и функциональность до температуры  $90^\circ\text{C}$  [16]. Предполагалось, что если GroEL сохранит термофильные свойства после внесенных в аминокислотную последовательность изменений, это станет еще одним преимуществом при последующем его использовании в качестве белка-носителя для экспрессии в бактериальной системе, поскольку позволит отделять мезофильные белки клетки-хозяина с помощью нагревания. Полученный ген был клонирован в экспрессионный вектор pET11c и продемонстрировал высокий уровень экспрессии в бактериальной системе *E. coli* (данные не представлены). Однако проведенная с помощью гель-фильтрации оценка агрегатного состояния показала, что рекомбинантный термофильный GroEL существует в форме мономера, не образуя присущей исходной форме сложной четвертичной структуры (рис. 4a). Из литературных данных [17, 18] известно, что присутствие ко-фактора GroES стабилизирует такую структуру, поэтому безметиониновый термофильный GroEL был переклонирован в бицистронный экспресси-



**Рис. 1.** Схема трехмерной структуры мономера GroEL из *T. thermophilus* [рисунок адаптирован из <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/1WE3> с помощью программы Chimera visualization [19]]. Стрелки с номерами указывают остатки метионина в структуре белка. N- и C-концы выделены черным цветом.

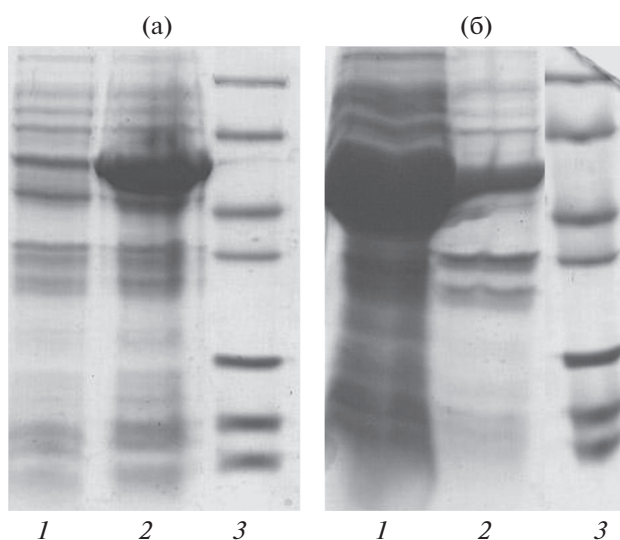


**Рис. 2.** Схема ПЦР для конструирования последовательности GroEL *T. thermophilus*, не содержащей остатков метионина. Последовательности праймеров приведены в разделе “Методика”. Стрелками указано направление амплификации, под стрелками – названия соответствующих праймеров.

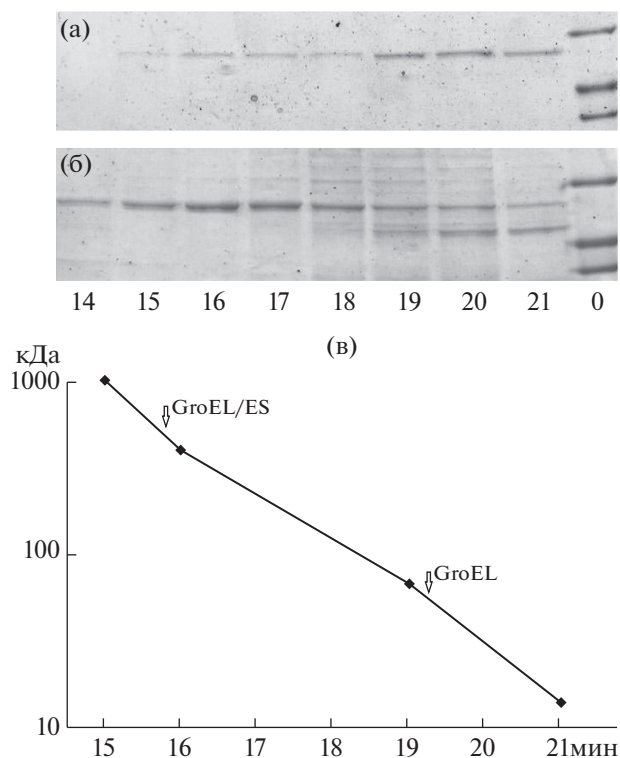
онный вектор pET-Duet вместе с GroES из *T. thermophilus* для ко-экспрессии (см. раздел “Методика”). Полученный в данных условиях безметиониновый GroEL продемонстрировал высокий уровень экспрессии (рис. 3а) и практически полностью присутствовал во фракции растворимых клеточных белков (рис. 3б).

Агрегатное состояние комплекса GroEL/ES было проверено с помощью гель-фильтрации на колонке с сефакирилом S-400 (рис. 4б, 4в). Как показывает электрофоретический анализ фракций, комплекс GroEL/ES выходит в исключенном объеме, пик достигает максимума на 16 мин (рис. 4б) между калибровочными белками голубой декстран (более 1000 кДа) и ферритин (400 кДа), что указывает на сохранение четвертичной структуры комплекса GroEL/ES. Термостабильность комплекса была проверена с помощью нагревания фракции растворимых клеточных белков до 62°C в течение 5 мин (рис. 5).

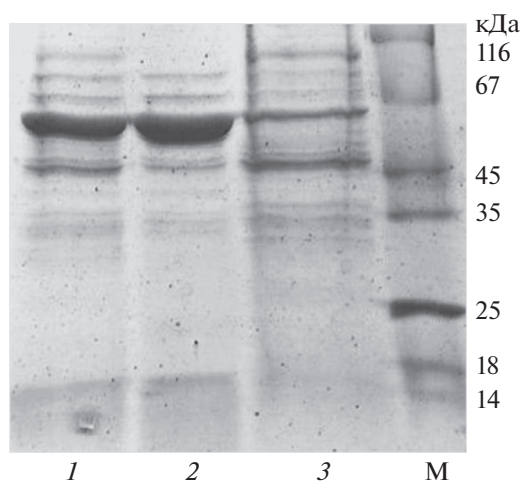
Комплекс GroEL/ES преимущественно оставался в растворе, тогда как большая часть белков мезофильной клетки-хозяина агрегировала. Сохра-



**Рис. 3.** Электрофорез экспрессируемого белка GroEL *T. thermophilus*, не содержащего остатков метионина. а: 1 – до индукции, 2 – по окончании экспрессии; б: 1 – растворимые клеточные белки, 2 – нерастворимые белки. 3 – стандарты молекулярной массы.



**Рис. 4.** Гель-фильтрация на колонке с сефакрил S-400 GroEL из *T. thermophilus*, не содержащего остатков метионина, экспрессированного без GroES (а), ко-экспрессированного с GroES в составе бицистронной плазмиды (б). 14–21 – время выхода фракций, мин.; *M* – стандарты молекулярной массы; в – калибровочная кривая для колонки с сефакрил S-400 (кДа): голубой декстран – 1000, ферритин – 400, бычий сывороточный альбумин – 67, лизоцим – 14. Стрелками указано время выхода мономера GroEL и комплекса GroEL/ES.



**Рис. 5.** Проверка термостабильности GroEL, не содержащего остатков метионина. 1 – до нагревания; 2 – супернатант, 3 – осадок после нагревания. М – стандарты молекулярной массы.

нение термостабильности косвенно подтверждает сохранение четвертичной структуры комплексом GroEL/ES. Кроме того, термостабильность комплекса GroEL/ES предоставляет практическое преимущество, поскольку позволяет очистить его от белков клетки-хозяина с помощью нагревания, что и было использовано при последующей очистке белка на первой стадии. Дальнейшую очистку до гомогенного состояния проводили с помощью гель-проникающей хроматографии на колонке с сефакрилом S-400 (см. “Методика”), поскольку размеры комплекса GroEL/ES значительно превосходят размеры клеточных белков. Полученный гомогенный комплекс GroEL/ES использовали в экспериментах по проверке его функциональности. Одним из белков для изучения сворачивания с участием шаперона GroEL является зеленый флуоресцентный белок GFP, который в силу простоты и чувствительности теста является общепринятой моделью. Показано, что GroEL способен связывать и инкапсулировать GFP внутри частицы шаперона, а в присутствии также GroES и АТФ рефолдинг возобновляется с параметрами, неотличимыми от спонтанной ренатурации [8]. В проведенных экспериментах по ренатурации GFP было показано, что в присутствии как исходного GroEL, так и его безметионинового варианта, восстановления флюоресценции, т.е. ренатурации GFP, не происходило. Ренатурация возобновлялась в обоих случаях после добавления GroES и АТФ, и конечная достигнутая флюоресценция соответствовала флюоресценции GFP при спонтанной ренатурации в аналогичных условиях.

Замена сразу нескольких метионинов не сказывалась на основных параметрах шаперона GroEL – он оставался растворимым, сохранялся как термостабильная частица в комплексе GroEL/ES, а также сохранял функциональность. Это делает созданный вариант шаперона привлекательным для использования в качестве белка-носителя при получении целевых рекомбинантных пептидов в составе слитых белков.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, уникальный идентификатор работы (проекта) RFMEFI57517X0151.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kapust R.B., Waugh D.S. // Protein Sci. Publ. Protein Soc. 1999. V. 8. № 8. P. 1668–1674.
2. Riggs P., La Vallie E.R., McCoy J.M. // Curr. Protoc. Mol. Biol. Ed. Frederick M Ausubel Al. 2001. V. Chapter 16. C. Unit 16.4A. doi 10.1002/0471142727.mb1604as28.10.1002/0471142727.mb1604as28
3. Terpe K. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003. V. 60. № 5. P. 523–533.

4. Bell M.R., Engleka M.J., Malik A., Strickler J.E. // Protein Sci. Publ. Protein Soc. 2013. V. 22. № 11. P. 1466–1477.
5. Fedorov A.N., Yurkova M.S. // NanoWorld J. 2018. V. 4. № 1. P. 8–15.
6. Horwich A.L., Farr G.W., Fenton W.A. // Chem. Rev. 2006. V. 106. № 5. P. 1917–1930.
7. Inoue H., Nojima H., Okayama H. // Gene. 1990. V. 96. № 1. P. 23–28.
8. Ishino S., Kawata Y., Taguchi H., Kajimura N., Matsuzaki K., Hoshino M. // J. Biol. Chem. 2015. V. 290. № 24. P. 15042–15051.
9. Thirumalai D., Lorimer G.H. // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 2001. V. 30. P. 245–269.
10. Saibil H. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2013. V. 14. № 10. P. 630–642.
11. Fedorov A.N., Baldwin T.O. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. № 52. P. 32715–32718.
12. Kim Y.E., Hipp M.S., Bracher A., Hayer-Hartl M., Hartl F.U. // Annu. Rev. Biochem. 2013. V. 82. P. 323–355.
13. Tokatlidis K., Friguet B., Deville-Bonne D., Baleux F., Fedorov A.N., Navon A., Djavadi-Ohanian L., Goldberg M.E. // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 1995. V. 348. № 1323. P. 89–95.
14. Kim S.G., Kweon D.H., Lee D.H., Park Y.C., Seo J.H. // Protein Expr. Purif. 2005. V. 41. № 2. P. 426–432.
15. Tong Y., Feng S., Xin Y., Yang H., Zhang L., Wang W., Chen W. // J. Biotechnol. 2016. V. 218. P. 75–84.
16. Taguchi H., Konishi J., Ishii N., Yoshida M. // JBC 1991. V. 266. № 33. P. 22411–22418.
17. Weiss C., Jebara F., Nisemlat S., Azem A. // Front. Mol. Biosci. 2016. <https://doi.org/doi.10.3389/fmolb.2016.00080>
18. Ryabova N.A., Marchenkov V.V., Marchenkova S.Y., Kotova N.V., Semisotnov G.V. // Biochemistry. (Moscow). 2013. V. 78. № 13. P. 1405–1414.
19. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. // J. Comput. Chem. 2004. V. 25. № 13. P. 1605–1612.

## Design and Characterization of No-Methionine Variant of Thermostable *Thermus thermophilus* Chaperone GroEL

M. S. Yurkova<sup>a, b</sup>, O. I. Savvin<sup>b</sup>, V. A. Zenin<sup>a, b</sup>, and A. N. Fedorov<sup>a, b, \*</sup>

<sup>a</sup>RUDN University, Moscow, 117198 Russia

<sup>b</sup>Federal State Institution “Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences”  
Moscow, 119071 Russia

\*e-mail: a.fedorov@fbras.ru\*

Received September 3, 2018

Revised September 17, 2018

Accepted September 25, 2018

Chaperone GroEL is the subject of extensive studies concerning its organization and functioning at folding cell proteins as well as the possibility of using it when developing new expression systems to obtain recombinant proteins in soluble forms. In this work, a new variant of *Thermus thermophilus* chaperone GroEL is developed, in which all methionine residues are substituted for leucine residues. Obtained variant of the chaperone was purified to homogeneity. Modified GroEL retained tetrameric structure characteristic for initial chaperone consisting of double heptamer, and also retained the initial thermostability. Obtained variant of the chaperone is interesting not only from the point of view of GroEL structural organization, but it can be effectively used as a leader to obtain recombinant target proteins. The substitution of methionine residues in a leader allows to significantly simplify the following purification of target polypeptide.

**Keywords:** chaperones, GroEL, folding, amino acid substitutions in proteins