

УДК 577.112.083

## Физико-химическая характеристика варианта апикального домена шаперона GroEL для повышения уровня биосинтеза и увеличения стабильности целевых белков

© 2018 К.А. КУРОВ<sup>2</sup>, О.И. САВВИН<sup>2</sup>, М.С. ЮРКОВА<sup>1,2</sup>, В.А. ЗЕНИН<sup>1,2</sup>, Г.С. НАГИБИНА<sup>3</sup>, Б.С. МЕЛЬНИК<sup>3</sup>, А.Н. ФЕДОРОВ<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Российский Университет Дружбы Народов, Москва, 117198

<sup>2</sup>Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии», Российская академия наук, Москва, 119071

<sup>3</sup>Институт белка, Российская академия наук, Московская обл., Пущино, 142290

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

Поступила 03.07.2018 г.

После доработки 24.09.2018 г.

Принята в печать 15.12.2018 г.

Описаны свойства нового белка, являющегося вариантом апикального домена шаперона GroEL, предназначенного служить лидером при создании слитых белков. Данный полипептидный лидер демонстрирует высокий уровень биосинтеза в бактериальной системе, растворим и сохраняет растворимость после стандартных биохимических манипуляций. Исследована его вторичная структура и ее термостабильность, а также растворимость белка в широком диапазоне температур. Для упрощения процедуры последующей очистки целевого белка предусмотрена возможность его химического отщепления по остатку метионина под действием бромциана.

*Ключевые слова:* бактериальная экспрессия, шаперон GroEL, система слитых белков, белок-лидер.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2018-34-6-43-50

Экспрессия генов рекомбинантных белков является основным методом их получения как для исследовательских целей, так и для промышленности, при этом экспрессия в бактериальных системах – наиболее доступная и распространенная. Однако интересующие исследователей белки, как правило, – чужеродные для бактерий, и экспрессия генов гетерологичных белков в бактериальной системе часто бывает затруднена из-за свойств белков: их лабильности, склонности к агрегации в отсутствие гликозилирования, токсичности для бактериальных клеток и т.д. Во многих случаях такие белки, если их удастся получить, после биосинтеза обнаруживаются в виде крупных агрегатов, так называемых телец включения. Существуют различные варианты даль-

нейшей работы с этими белками. Тельца включения можно растворить в денатурирующем буфере и впоследствии ренатурировать, что с некоторыми белками представляет собой достаточно сложную задачу. В этом направлении интересной является разработка метода ренатурации на твердой фазе крупного гидрофобного белка с большим количеством S–S связей [1, 2].

Для повышения растворимости и стабильности плохо растворимых целевых белков может использоваться ко-экспрессия шаперонов в клетке-продуценте. Идея состоит в том, что шапероны способны связываться с несвернутыми и неправильно свернутыми белками и, в некоторых случаях, стабилизировать их [3, 4]. Показано, что такой подход работает только в ограниченном ряде

*Список сокращений:* среда; ИПТГ – изопропил-β-d-тиогалактопиранозид; AEBSF – 4-(2-аминоэтил)бензенсульфонил фторид; LB – среда *Lysogeny Broth*.

случаев, и, как правило, требует равного молярного соотношения между шапероном и целевым белком. Кроме этого, показано, что многие целевые нерастворимые белки обнаруживаются в агрегированной форме (тельца включения) и при ко-экспрессии различных семейств шаперонов [4].

Еще одним, и часто наиболее успешным, решением проблемы агрегации (и не только) чужеродных для бактерий белков является создание слитых белков с лидером, способным нивелировать или устранить проблему, с последующим отщеплением и очисткой целевого белка. В качестве лидеров наиболее широко применяются тиоредоксин, мальтоз-связывающий белок и глутатион-трансфераза, которые в некоторых случаях помогали значительно повысить уровень биосинтеза и/или растворимость целевого белка в составе конструктора [5–8]. Тем не менее, ни один из лидеров не является универсальным и способным разрешить все возникающие проблемы, именно поэтому работы по созданию новых лидеров для слитых белков продолжают [9].

С точки зрения универсальности, наиболее подходящими кандидатами в лидеры представляются клеточные шапероны, иначе называемые белками теплового шока [3]. Функция шаперонов состоит именно в том, чтобы способствовать правильному сворачиванию белков во время биосинтеза, а также в поддержании стабильности клеточных белков в стрессовых условиях. Однако ковалентное присоединение целевых белков к полипептидной цепи шаперона чаще всего дестабилизирует его достаточно сложную структуру, и таким образом нарушает его функционирование. Например, у хорошо изученного шаперона GroEL I типа N- и C-концы сближены и погружены в глубину правильно свернутой белковой глобулы, что, по стерическим соображениям, не позволяет присоединять к нему целевые белки. Однако мономер GroEL состоит из трех хорошо различимых доменов с различными функциями – экваториального, промежуточного и апикального, и субстратные белки связываются именно с апикальным доменом.

Апикальный домен GroEL настолько структурно изолирован, что может быть получен биосинтетическим путем как отдельный белок, и в этом случае он может свернуться в такую же структуру, какую он имеет в полном размере GroEL, а также сохранить свои функции связывания субстратных белков. Впервые апикальный домен GroEL был получен биосинтетическим путем как отдельный белок в лаборатории Фершта (Fer-

sh) [10] и назван «минишапероном». Структура и субстрат-связывающие свойства минишаперона были детально изучены впоследствии как в этой лаборатории [10–14], так и другими исследователями [15].

Многочисленные исследования продемонстрировали способность рекомбинантного апикального домена GroEL к взаимодействию с различными субстратными белками и к поддержанию их в растворимом состоянии. В некоторых случаях апикальный домен GroEL может также способствовать правильному сворачиванию субстратных белков [12, 16, 17]. Все эти свойства апикального домена GroEL являются очевидными преимуществами для использования его в качестве лидера при создании слитых белков. С таким лидером можно получать целевые белки, которые сложно получить в других условиях, а именно гидрофобные, склонные к агрегации, лабильные, малорастворимые и др.

Цель настоящей работы – описание разработки и свойств новой формы минишаперона, предназначенного для использования в качестве лидера при создании слитых белков для повышения уровня биосинтеза и для стабилизации целевых белков, особенно нестабильных, склонных к агрегации и/или токсичных. Новый лидер получил название GrAD (GroEL Apical Domain).

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Конструирование гена и плазмиды pGrAD

Основой для создания GrAD послужил GroEL из термостабильного организма *Thermus thermophilus*. Нуклеотидная последовательность, кодирующая апикальный домен GroEL (GrAD) термостабильного организма *Thermus thermophilus* (нуклеотидные остатки 190–333 полноразмерного GroEL), в которой все кодоны, кодирующие метионин, заменены на кодоны, кодирующие лейцин, была получена с помощью химического синтеза.

В результате ПЦР (Eppendorf Mastercycler Personal, Германия) с прямым ADf (5'-GGGAAT-TCCATATGGGGTACCAGTTTGGACAAGGGG-TAC-3') и обратным ADr (5'-ACGCATCGGTC-GACTTAGCCGCCACGATGGTGGT-3') праймерами был получен фрагмент GrAD, имеющий стоп-кодон TAA на 3'-конце и ограниченный рестрикционными сайтами NdeI и SalI. Полученный фрагмент был обработан рестриктазами NdeI и SalI и клонирован в модифицированный вектор pET11c с использованием стандартных процедур.

### Получение белка

Белок был получен биосинтетическим путем в клетках *Escherichia coli* BL21 (DE3), выращенных в среде LB (Amresco, США) при температуре 37 °С. Экспрессия была индуцирована добавлением изопропил-β-d-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 0,4 мМ при оптической плотности OD<sub>600</sub> 0,4. Клетки собирали с помощью центрифугирования при 4 000 g и температуре 4 °С (Beckman Coulter, США) по истечении 3 ч индукции.

### Очистка GrAD

Осадок клеток (1 г) ресуспендировали в 50 мл буфера PBS (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,7 мМ, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5,2 мМ, NaCl 150 мМ) pH 7,4, содержащего дополнительно 0,1 М NaCl (все реактивы ACROS Organics) и 1 мМ 4-(2-аминоэтил)бензенсульфонил фторид (AEBSF, Melford, UK). Суспензию трижды обрабатывали ультразвуком при 0 °С (Sony-prep 150, Сапуо, Япония) и центрифугировали при 16400 g и температуре 4 °С. Супернатант инкубировали при 70 °С в течение 10 мин на водяной бане при перемешивании и снова центрифугировали.

К полученному супернатанту добавляли раствор трис 8,0 и мочевины до конечной концентрации 10 мМ трис 8,0, 8 М мочевины, после чего инкубировали при комнатной температуре не менее 1 ч. Затем раствор разводили до конечной концентрации 10 мМ трис 8,0, и 6 М мочевины. Полученный раствор наносили на ионообменную колонку Nitrap Q XL (GE Healthcare, США) объемом 1 мл, уравновешенную тем же буфером. После нанесения колонку промывали от несвязавшегося материала и от мочевины. Белок элюировали градиентом NaCl от 50 до 250 мМ и диализовали против PBS. В результате было получено около 100 мг очищенного GrAD.

### Исследование стабильности

Растворимый ренатурированный GrAD был сконцентрирован на ячейке Amicon (Millipore) до конечной концентрации 1 мг/мл. Аликвоты для анализа стабильности были отобраны сразу после концентрирования и через 2, 4, 7, 10 и 14 дней хранения раствора при +4 °С.

Другие аликовты были заморожены при –20 °С в течение ночи, затем разморожены. Лиофилизированные пробы восстанавливали добавлением исходного объема деионизованной воды.

Для исследования термостабильности пробы GrAD были прогреты при температурах 65 °С, 70,

75, 80, 85, 90, 95 и 100 °С в течение 5 мин в твердотельном термостате «Гном» («ДНК-технология», Россия). Во всех случаях по окончании процедур растворимые и нерастворимые белки разделяли с помощью центрифугирования при 15000 g и температуре 4 °С в охлаждаемой центрифуге (Eppendorf, Германия). Аликвоты растворимой фракции и осадка, нормализованные относительно объема исходной пробы, были проанализированы с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в трис-трициновой буферной системе (ColeParmer, США) [18] в денатурирующих условиях.

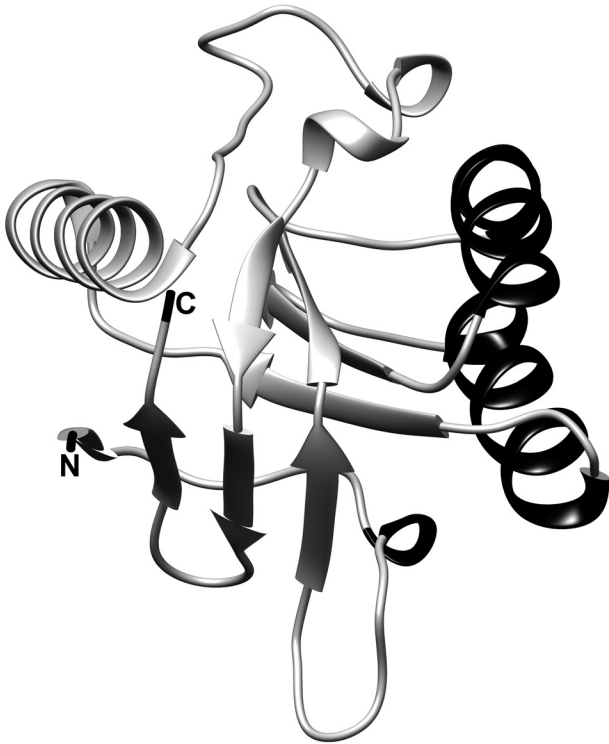
### Исследование вторичной структуры GrAD

Исследование вторичной структуры GrAD проводилось с использованием спектроскопии кругового дихроизма на спектрополяриметре «Chirascan» (Applied Photophysics, Великобритания) в диапазоне длины волны от 190 нм до 250 нм. Значения молярной эллиптичности рассчитывались из уравнения:  $[q] = [q]_{\text{изм}} M_{\text{ост}}/LC$ , где  $C$  – концентрация белка (мг/мл),  $L$  – длина оптического пути кюветы (мм),  $[q]_{\text{изм}}$  – измеренная эллиптичность (град.) и  $M_{\text{ост}}$  – средняя молекулярная масса остатка пептида (Да), рассчитанная из его аминокислотной последовательности. Измерения проводились в 0,1 мм кювете при концентрации GrAD 2 мг/мл.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Апикальный домен GroEL выполняет функцию связывания с субстратными белками и имеет консервативные структурные характеристики, включая обширную гидрофобную субстрат-связывающую поверхность [16]. Этот домен может быть получен биосинтетическим путем как отдельный белок размером около 15 кДа, существующий в форме мономера (рис. 1).

Способность GrAD поддерживать в растворимой форме исходно нерастворимые белки была продемонстрирована в работе [19]. Дополнительным преимуществом представленного в настоящей работе белка-лидера является его термостабильность, обусловленная использованием в качестве основы для его создания GroEL из термостабильного организма *Thermus thermophilus*. При создании лидера для системы слитых белков была также предусмотрена возможность последующего химического отщепления целевого белка под действием бромциана. Для этого при создании генного конструкта все кодоны, кодирующие метионин, были заменены на кодоны, кодирующие



**Рис. 1.** Структура апикального домена *Thermus thermophilus* GroEL (GrAD) (по [16] с модификациями). N-конец – аминокислотный остаток глицин 190 а.о. С-конец – аминокислотный остаток глицин 333 а.о. Черная спираль – субстрат-связывающая поверхность, представленная альфа-спиралями N, 8 и 9

**Fig. 1.** The structure of *Thermus thermophilus* GroEL apical domain (GrAD) (from [16] with modifications). N terminus is amino acid residue Glycine 190; C terminus is amino acid residue Glycine 333. Substrate-binding surface, represented by alpha spirals N, 8 and 9, is shown in black

лейцин. Процедура клонирования описана в разделе «Условия эксперимента». Полученный конструктор был назван GrAD (GroEL Apical Domain). Соответствующий белок был получен биосинтетическим путем в клетках *Escherichia coli* BL21 (DE3) и продемонстрировал высокий уровень биосинтеза (рис. 2, дорожка 1).

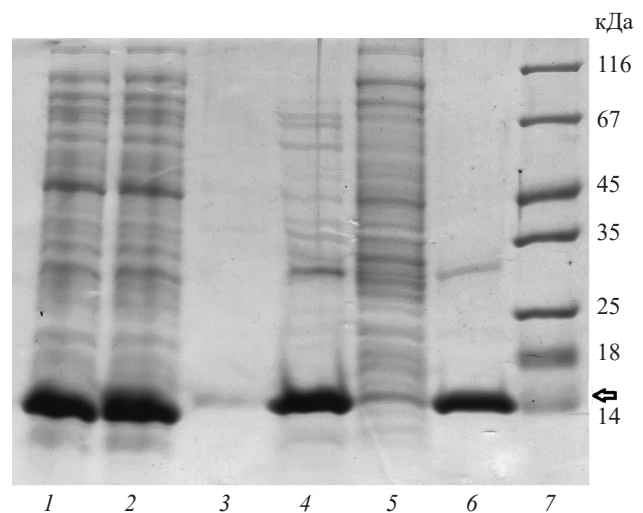
GrAD практически полностью обнаруживался во фракции растворимых клеточных белков (см. рис. 2, дорожка 2 в сравнении с дорожкой 3, представляющей нерастворимые клеточные белки), из чего можно заключить, что замена всех остатков метионина на остатки лейцина не оказала влияния на процесс биосинтетического сворачивания.

Поскольку основой для создания GrAD являлся GroEL из термостабильного организма, в качестве первой стадии при очистке GrAD было

использовано нагревание для преципитации эндогенных клеточных белков. GrAD при этом остается в растворимой фракции (рис. 2, дорожка 4) и отсутствует среди преципитировавших белков (дорожка 5). Хроматографическая стадия очистки GrAD подробно описана в разделе «Условия эксперимента». Результаты представлены в табл. 1.

Для дальнейших экспериментов по изучению свойств был использован очищенный GrAD. Концентрация белка после концентрирования на ячейке Amicon составила 1 мг/мл. В растворимом состоянии в нативном буфере при +4°C GrAD сохранял достаточно высокую концентрацию в течение 14 дней включительно (достаточно длительный период для любых биохимических манипуляций), таким образом была проверена его устойчивость при хранении (рис. 3а).

Помимо этого, GrAD успешно переносил процедуры замораживание–оттаивание и лиофилизация–последующее перерастворение, т.е.



**Рис. 2.** Стадии очистки GrAD. Положение GrAD указано стрелкой справа от геля. 1 – клетки после экспрессии, 2 – растворимые клеточные белки; 3 – нерастворимые, клеточные белки; супернатант (4) и осадок (5) после процедуры прогрева растворимых клеточных белков при 62 °С в течение 5 мин; 6 – очищенный GrAD (объединенные фракции) после ионообменной хроматографии (см. «Условия эксперимента»); 7 – маркер молекулярной массы

**Fig. 2.** The stages of GrAD purification. The position of GrAD is shown by the arrow on the right of the gel. Line 1 – cell after expression; line 2 – soluble cell proteins; line 3 – insoluble cell proteins; line 4 – supernatant, line 5 – pellet after heating of soluble cell proteins at 62 °C for 5 min; line 6 – purified GrAD after ion exchange chromatography (see Methods), line 7 – molecular weight standards

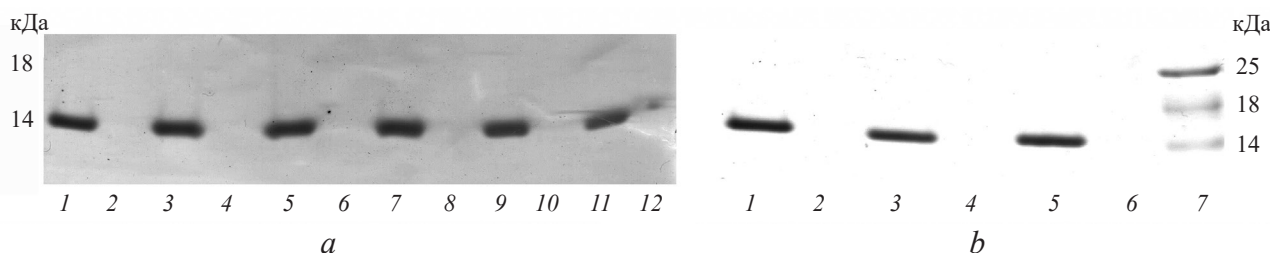
**Оценка выхода и чистоты полученного белка по стадиям выделения**

**Assessment of the yield and purity of the protein at different purification stages**

Стадия очистки	Чистота, %	Выход, % от исходного
Биомасса	49	100
Лизис	53	94
Нагревание	73	82
Ионообменная хроматография	95	63

*Примечание:* чистота белка на каждой стадии очистки оценивалась с помощью денситометрии полученной электрофореграммы в программе One-D-scan.

*Note:* protein purity at every stage was assessed by densitometry of obtained electrophoregram using the program One-D-scan.



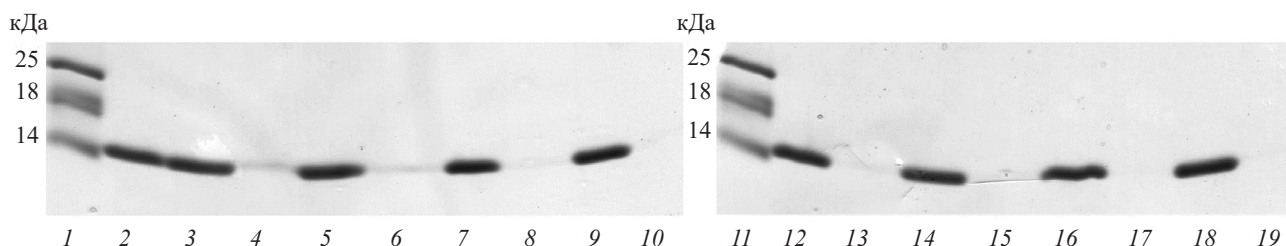
**Рис. 3.** Электрофорез в полиакриламидном геле аликвоты растворимой фракции и осадка. *a* – устойчивость GrAD при хранении: 1, 3, 5, 7, 9 и 11 – супернатант, 2, 4, 6, 8, 10 и 12 – осадок GrAD после хранения раствора белка в нативном буфере в концентрации 1 мг/мл в течение 0, 2, 4, 7, 10 и 14 дней, соответственно; *b* – стабильность GrAD при биохимических манипуляциях: 1, 3 и 5 – супернатант, 2 – осадок исходного GrAD; 4 – осадок GrAD после процедуры замораживание–оттаивание; 6 – осадок GrAD после процедуры лиофилизация–перерастворение. 7 – маркер молекулярной массы

**Fig. 3.** The polyacrylamide gel electrophoresis of an aliquot of the soluble fraction and the precipitate. (*a*), Stability of GrAD at storage. Lines 1, 3, 5, 7, 9 and 11 – supernatant, lines 2, 4, 6, 8, 10 and 12 – pellet of GrAD after storage of the protein in native buffer at 1 mg/mL for, correspondingly, 0, 2, 4, 7, 10 and 14 days. The positions of molecular weight standards are shown on the right of the gel; (*b*), Stability of GrAD at biochemical manipulations. Line 1 – supernatant, line 2 – pellet of initial GrAD; line 3 – supernatant, line 4 – pellet of GrAD after freezing / thawing; line 5 – supernatant, line 6 – pellet of GrAD after lyophilization / re-dissolving. Line 7 – molecular weight standards, values (kDa) are shown on the right of the gel

манипуляции, очень часто приводящие к агрегации различных белков, как известно из биохимической практики. (рис. 3*b*).

Была исследована термостабильность GrAD, в первую очередь, образование агрегатов при нагревании. GrAD инкубировали при температурах

от 65 °C до 100 °C в течение 5 мин, после чего центрифугировали, чтобы отделить образовавшиеся агрегаты от растворимой фракции. И супернатант, и осадок были проанализированы с помощью электрофореза в трис-трициновой буферной системе (см. «Условия эксперимента»; рис. 4).



**Рис. 4.** Электрофорез в полиакриламидном геле в трис-трициновой буферной системе аликуот растворимой фракции (3, 5, 7, 9, 12, 14, 16 и 18) и осадка (4, 6, 8, 10, 13, 15, 17 и 19) после прогрева GrAD в течение 5 мин при температурах 65 °C, 70, 75, 80, 85, 90, 95 и 100 °C, соответственно. 1 и 11 – маркеры молекулярной массы; 2 – исходный GrAD

**Fig. 4.** Thermostability of GrAD. Lines 1 and 11 – molecular weight standards are shown on the left of each gel; line 2 – initial GrAD; lines 3, 5, 7, 9, 12, 14, 16 and 18 – supernatant, lines 4, 6, 8, 10, 13, 15, 17 and 19 – pellet of GrAD after heating GrAD for 5 min at, correspondingly, 65 °C, 70, 75, 80, 85, 90, 95 and 100 °C (see Methods)

Согласно приведенным результатам, GrAD полностью остается в растворе и во всем диапазоне исследованных температур не образует агрегатов, появление которых обычно отражает денатурацию белка в соответствующих условиях. Контрольные эксперименты с TEV-протеазой, термочувствительным белком, показали, что данный белок полностью преципитирует при 65 °С. Таким образом, GrAD сохраняет стабильность в растворе до температуры 100 °С включительно.

Вторичная структура GrAD при температуре 20 °С, определяемая методом кругового дихроизма, соответствовала наличию сформированной вторичной структуре, состоящей из альфа-спиралей и бета-структур (рис. 5а, кривая 2). Определенные параметры вторичной структуры соответствовали данным трехмерной структуры апикального домена из *Thermus thermophilus* [16], что говорит о сохранении вторичной структуры в исследованном нами GrAD. Белок плотно упакован, что следует из данных кругового дихроизма в ближнем ультрафиолете.

При температуре 94 °С параметры белка, определяемые методом кругового дихроизма, существенно образом менялись и соответствовали параметрам при отсутствии стабильной вторичной структуры и плотной упаковки белка (рис. 5а, кривая 1).

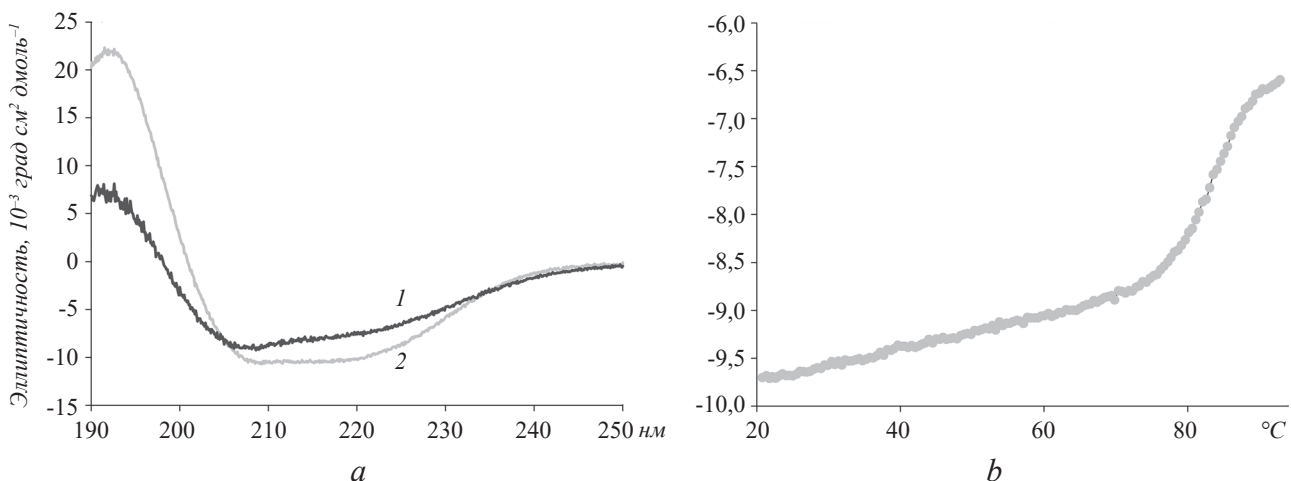
Температурная зависимость кругового дихроизма показывает, что структура белка дестабили-

зируется при температурах выше 80 °С, с потерей половины эллиптичности при температуре около 85 °С (рис. 5б).

Необходимо отметить, что в статье, исследовавшей апикальный домен GroEL *T. thermophilus* [16], указано, без приведения экспериментальных данных, что структура белка, также исследованного методом кругового дихроизма, остается стабильной как до, так и выше 80 °С. Такое различие в стабильности может быть объяснено введением остатков лейцина вместо остатков метионина в нашем варианте апикального домена, однако, это выглядит достаточно маловероятным, с точки зрения физики белка, и утверждение о стабильности вторичной структуры при температурах выше 100 °С [16] требует перепроверки.

Представляет интерес сравнение данных о термостабильности GrAD, полученных методом кругового дихроизма, и с помощью анализа стабильности в растворимом виде. В результате сравнения можно сделать вывод, что при повышенных температурах (в условиях дестабилизации структуры GrAD) остаточная структура достаточно стабильна для поддержания белка в растворе без его агрегации.

GrAD демонстрирует высокий уровень экспрессии в бактериальной системе, экспрессируется в растворимой форме и сохраняет термостабильность белка исходного организма. Учитывая способность GrAD к стабилизации белков в растворе, он представляется многообещающим



**Рис. 5.** Спектроскопия кругового дихроизма GrAD: а – спектры кругового дихроизма в диапазоне длины волны от 190 нм до 250 нм при фиксированной температуре (1 – при 94 °С, 2 – при 20 °С); б – температурная зависимость кругового дихроизма GrAD при фиксированной длине волны (222 нм)

**Fig. 5.** GrAD circular dichroism spectroscopy: (a), GrAD circular dichroism spectra at fixed temperatures Along the X-axis wavelength, nm; along the Y-axis ellipticity, 10<sup>-3</sup>deg cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup>. Curve 1 – at 94 °C. curve 2 – at 20 °C; (b), Dependence of GrAD circular dichroism on temperature at fixed wavelength. Along the X-axis temperature, °C; along the Y-axis ellipticity at 222 nm

белком-лидером в системе слитых белков. Для упрощения процедуры последующей очистки целевого белка предусмотрена возможность его химического отщепления по остатку метионина под действием бромциана.

Все вышеописанные свойства GrAD указывают на его способность выполнять функции лидера при создании систем слитых белков. Апикальный домен GroEL является объектом направленных изменений. В работах исследовательской группы А. Фершта (Fersht) показана возможность повышения стабильности GroEL в результате введения ограниченного числа аминокислотных замен [17]. Проведенный в настоящей работе анализ GrAD имеет важное значение как при использовании данного варианта апикального домена в качестве оптимального лидера для различных целевых белков, так и в качестве основы для новых экспериментов в области белковой инженерии.

Ожидается, что использование GrAD 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.

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

## ЛИТЕРАТУРА

- Sharapova O.A., Pozdnykova N.V., Laurinavichyute D.K., et al. High-efficient expression, refolding and purification of functional recombinant C-terminal fragment of human alpha-fetoprotein. *Protein Expression Purification*, 2010, 73(1), 31–35. doi: 10.1016/j.pep.2010.03.025
- Sharapova O.A., Yurkova M.S., Laurinavichyute D.K., et al. Efficient refolding of a hydrophobic protein with multiple S-S bonds by on-resin immobilized metal affinity chromatography. *J. Chromatography*, 2011, 1218(31), 5115–5119. doi: 10.1016/j.chroma.2011.05.075
- Fedorov A.N., Yurkova M.S. Molecular Chaperone GroEL – toward a Nano Toolkit in Protein Engineering, Production and Pharmacy. *NanoWorld J*, 2018, 4, 8–15. doi: 10.17756/nwj.2018-053
- de Marco A. Molecular and chemical chaperones for improving the yields of soluble recombinant proteins. *Methods Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2011, 705, 31–51. doi: 10.1007/978-1-61737-967-3\_3
- Kapust R.B., Waugh D.S. *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Science: A Publication Protein Society*, 1999, 8(8), 1668–1674. doi: 10.1110/ps.8.8.1668
- Riggs P., La Vallie E.R., McCoy J.M. Current Protocols in Molecular Biology / Edited by Frederick M. A. et al. Hoboken, USA, John Wiley & Sons Inc. 2001 Chapter 16 Unit16.4A 16.4.1–16.4.4. doi: 10.1002/0471142727.mb1604as28
- Terpe K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnology*, 2003, 60(5), 523–533. doi: 10.1007/s00253-002-1158-6
- Bell M.R., Engleka M.J., Malik A., Strickler J.E. To fuse or not to fuse: what is your purpose? *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 2013, 22(11), 1466–1477. doi: 10.1002/pro.2356
- Del Proposto J., Majmudar C.Y., Smith J.L., and Brown W.C. Mocr: A novel fusion tag for enhancing solubility that is compatible with structural biology applications. *Protein Expression Purification*, 2009, 63(1), 40–49. doi: 10.1016/j.pep.2008.08.011
- Zahn R., Buckle A.M., Perrett S., et al. Chaperone activity and structure of monomeric polypeptide binding domains of GroEL. *Proceedings Nat. Acad. Sci.*, 1996, 93(26), 15024–15029. PMID: 8986757
- Buckle A.M., Zahn R., Fersht A.R. A structural model for GroEL–polypeptide recognition. *Proceedings Nat. Acad. Sci.*, 1997, 94(8), 3571–3575. doi: 10.1073/pnas.94.8.3571
- Chatellier J., Hill F., Lund P.A., Fersht A.R. *In vivo* activities of GroEL minichaperones. *Proceedings Nat. Acad. Sci.*, 1998, 95(17), 9861–9866. PMID: 9707566
- Golbik R., Zahn R., Harding S.E., Fersht A.R. Thermodynamic stability and folding of GroEL minichaperones. *J. Mol. Biol.*, 1998, 276(2), 505–515. doi: 10.1006/jmbi.1997.1538
- Tanaka N., Fersht A.R. Identification of substrate binding site of GroEL minichaperone in solution. *J. Mol. Biol.*, 1999, 292(1), 173–180. doi: 10.1006/jmbi.1999.3041
- Chen J., Yagi H., Sormanni P., et al. Fibrillogenesis propensity of the GroEL apical domain: A Janus-faced minichaperone. *FEBS Letters*, 2012, 586(8), 1120–1127. doi: 10.1016/j.febslet.2012.03.019
- Hua Q., Dementieva I.S., Walsh M.A., et al. A thermophilic mini-chaperonin contains a conserved polypeptide-binding surface: combined crystallographic and NMR studies of the GroEL apical domain with implications for substrate interactions. *J. Mol. Biol.*, 2001, 306(3), 513–525. doi: 10.1006/jmbi.2000.4405
- Wang Q., Buckle A.M., Fersht A.R. Stabilization of GroEL minichaperones by core and surface mutations. *J. Mol. Biol.*, 2000, 298(5), 917–926. doi: 10.1006/jmbi.2000.3716

18. Schagger H., von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 1987, 166(2), 368–379. PMID: 2449095
19. 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*, 2016, 29(2), 57–64. doi: 10.1093/protein/gzv060

## Physicochemical Characteristics of Modification of Chaperon GroEL Apical Domain Designed to Enhance Expression and Stability of Target Proteins

K.A. KUROV<sup>2</sup>, O.I. SAVVIN<sup>2</sup>, M.S. YURKOVA<sup>1,2</sup>, V.A. ZENIN<sup>1,2</sup>, G.S. NAGIBINA<sup>3</sup>, B.S. MELNIK<sup>3</sup>, and A.N. FEDOROV<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>*Peoples' Friendship University of Russia, 117198, Moscow Russia*

<sup>2</sup>*Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology», Russian Academy of Sciences, 119071, Moscow Russia*

<sup>3</sup>*Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, 142290, Puschino, Moskovskaya Oblast Russia*

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

Received July 3, 2018

Revised September 24, 2018

Accepted December 15, 2018

**Abstract**—The expression of heterologous proteins in bacterial system is often impeded or even impossible due, for instance, to their lability, hydrophobicity or toxicity. In many cases, the problem can be partially or completely solved by creating fusion proteins with a leader able to enhance the solubility or stability of a target protein. In this work, the properties of a new protein, a modification of GroEL apical domain, designed to be a leader in fusion systems have been described. This polypeptide leader demonstrates a high level of expression in the bacterial system; it is soluble and retains its solubility after standard biochemical manipulations. The secondary structure of the protein and its thermal stability, and also the protein solubility were studied in the wide temperature range. To simplify the following purification of the target protein, a possibility of its chemical cleavage from the fused protein at the methionine residues using cyan bromide is provided.

**Key words:** bacterial expression, chaperon GroEL, fusion system, leader protein.

**Acknowledgement** – This work was supported by FTP (federal target program) «Research and development in priority areas of development of the scientific and technological complex of Russia in 2014–2020», grant agreement № 14.575.21.0151.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2018-34-6-43-50