

УДК 57.084.1: 57.021

Убиквитин-специфичная протеиназа *E. coli* не нуждается в обязательном наличии дипептида GlyGly в сайте процессинга

© 2019 Е.П. САННИКОВА¹, С.Э. ЧЕПЕРЕГИН¹, Д.Г. КОЗЛОВ^{1,*}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский Институт» – ГосНИИГенетика), Москва, 117545

*e-mail: dg_kozlov@genetika.ru

Поступила в редакцию 09.07.2018 г.

После доработки 18.12.2018 г.

Принята к публикации 15.03.2019 г.

Показано, что, в отличие от убиквитин-специфичных протеиназ эукариот (DUBs deubiquitinating enzymes), деубиквитиназа *ElaD E. coli* не нуждается в обязательном присутствии дипептида GlyGly в сайте процессинга и способна с равной эффективностью процессировать сайты GlyGly и GlyAla, но не AlaGly, AlaAla или GlyPro. Учитывая функциональное назначение деубиквитиназы *E. coli*, снижение специфичности этого фермента может рассматриваться в качестве важного эволюционного приобретения, позволяющего расширить круг молекулярных мишеней, подвергаемых атаке в процессе патогенеза.

Ключевые слова: убиквитин, DUB, протеиназа *E. coli*, *elaD*, фактор вирулентности

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-2-25-29

Одна из наиболее результативных технологий получения рекомбинантных белков в клетках *E. coli* основана на биосинтезе гибридных белков-предшественников [1–3]. Помимо целевого белка в состав таких предшественников часто включают служебные модули, повышающие уровень синтеза и/или растворимость целевого белка или упрощающие его дальнейшую очистку. Данная технология реализована в большом количестве вариантов и имеет много достоинств.

В ряде случаев в составе служебного модуля используются последовательности убиквитина человека или дрожжей [4]. Для высвобождения целевых белков из состава таких предшественников используются рекомбинантные убиквитин-специфичные протеиназы, называемые также деубиквитирующими протеиназами DUB (deubiquitinating enzymes), имеющие, как правило, эукариотическое происхождение. Вместе с тем, как неоднократно отмечалось, клетки *E. coli*, в том числе – штамма BL21(DE3), также способны осуществлять корректный процессинг убиквитиновых модулей в составе различных белков-предшественников [4, 5].

Данный эффект, поначалу воспринятый с недоумением, получил позднее рациональное объяснение.

В частности, примерно 10 лет назад было обнаружено, что некоторые виды бактерий, в том числе *E. coli*, в норме способны синтезировать протеолитические ферменты, которые обладают активностью убиквитин-специфичных протеиназ эукариот (DUBs) и в то же время лишены собственных бактериальных мишеней. Была высказана гипотеза о том, что найденные ферменты являются факторами вирулентности, и их мишенями в условиях патогенеза служат белки организмов-хозяев [6–9]. Аналогичные DUB-протеиназы были открыты у вирусов [6, 10], для которых патогенез и преодоление защитных механизмов организма-хозяина является единственным способом их выживания.

В клетках штаммов *E. coli*, включая BL21(DE3), деубиквитирующая протеиназа кодируется геном *elaD* [6]. Показано, что именно под действием *ElaD*, хотя и медленнее, чем при использовании соответствующих ферментов эукариотического происхождения, в клетках *E. coli* осуществляется специфический процессинг рекомбинантных

Список сокращений: а.о. – аминокислотные остатки; DUB (DUBs, deubiquitinating enzymes) – деубиквитирующая протеиназа, деубиквитиназа; Gly – остаток глицина; Ala – остаток аланина Pro – остаток пролина

убиквитин-содержащих гибридных белков [6]. В связи с этим, вероятно, при известных доработках бактериальные протеиназы типа ElaD могли бы найти применение в рекомбинантных технологиях. В то же время неизученным обстоятельством, потенциально ограничивающим полную взаимозаменяемость протеиназы ElaD и эукариотических ферментов, оставалась специфичность ElaD по отношению к дипептиду GlyGly, высококонсервативному атрибуту сайтов узнавания эукариотических протеиназ DUB, присутствующему на С-конце всех белков убиквитинового семейства [11, 12].

Цель настоящей работы – исследование специфичности деубиквитиназы ElaD *E. coli* по отношению к ключевому дипептиду GlyGly, детерминирующему сайт процессинга в природных убиквитин-содержащих гибридных белках.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Материал и методы

Экспрессионные кассеты, кодирующие гибридные белки UbiTox-NN, были клонированы в векторе pET28b+ (Novagen) по сайтам NcoI/XhoI. Гибридные белки UbiTox-NN имели размер 121 а.о. и включали в свой состав, начиная с N-конца: последовательность MetGlu-(6xHis)-GlyGly размером 10 а.о. (Ntag), опосредующую возможность очистки целевых белков с использованием Ni-NTA-аффинной хроматографии; последовательность убиквитина человека (Ubi), два С-концевых остатка которого, определяющие сайт процессинга NN, варьировались; последовательность пептида Tox – варианта Huwentoxin-IV, размером 35 а.о. [13], содержащего три дисульфидные связи.

Контрольная экспрессионная кассета, так же клонированная в векторе pET28b+, кодировала белок Ntag-Ubi размером 86 а.о., включавший в свой состав последовательность ME-(6xHis)-GG и последовательность убиквитина человека (Ubi), С-коцевыми остатками которого были GGS.

Биосинтез опытных UbiTox-NN и контрольного Ntag-Ubi белков осуществляли в клетках реципиентных штаммов *E. coli* BL21(DE3) (Novagen, USA) и BL21(DE3) Δ elaD (Скорородова А.Ю. и Гулевич А.Ю., неопубл. результаты), содержащего мутацию *elaD::cat*. Трансформанты культивировали на среде TRB при температуре 30 °С в течение 16–18 ч [14, 15]. Для индукции использовали лактозу.

Клеточные лизаты получали с использованием дезинтегратора French-press. Для очистки кон-

трольного (Ntag-Ubi) и опытного (UbiTox-AG) белков, послуживших в качестве репортеров (рис. 1), использовали Ni-NTA агарозу (Invitrogen).

Масс-спектрометрию белков проводили на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре UltrafleXtreme Bruker Daltonics (Германия), оснащенном УФ лазером (Nd), в режиме положительных ионов в линейной моде с использованием рефлектрона. Точность измеренных средних масс составляла ~5 Да. Образцы для анализа очищали с использованием Ni-NTA-хроматографии. Расчетные значения масс белков получали с помощью программы VectorNTI.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе с целью уточнения специфичности деубиквитинирующей протеиназы *E. coli* было выполнено стандартное «аланиновое сканирование» сайта процессинга GlyGly в составе модельного белка UbiTox-NN. Ввиду непредсказуемости результатов и с целью более полного раскрытия субстратных «предпочтений» фермента перечень исследованных сайтов процессинга был дополнен вариантом GlyPro, содержащим остаток пролина, блокирующий активность многих известных протеиназ. Все эксперименты выполнялись *in vivo*.

На рис. 1а приведены электрофореграммы суммарных и растворимых фракций клеточных белков, синтезированных в клетках штаммов *E. coli* BL21(DE3)/pET28-UbiTox-NN в условиях лактозной индукции. Как видно из рис. 1а, во всех случаях продукты экспрессии конструкций UbiTox-NN накапливались во фракции растворимых клеточных белков, а их профили содержали как признаки неспецифической деградации, одинаковые для всех конструкций, так и очевидные групповые различия, затрагивавшие мажорные формы целевых белков.

В частности, профили экспрессии конструкций UbiTox-AA, UbiTox-AG и UbiTox-GP отличались присутствием лишь одного мажорного белка, имевшего сходный для всех конструкций молекулярный вес (рис. 1а). С целью их корректной идентификации был выполнен масс-спектрометрический анализ одного из представителей этой группы белков (указан на рис. 1а, дорожка 6s). Полученные данные однозначно показали, что этим белком являлся полноразмерный вариант белка UbiTox-AG (табл. 1). На этом основании было сделано заключение о том, что мажорными продуктами экспрессии конструкций UbiTox-AA,

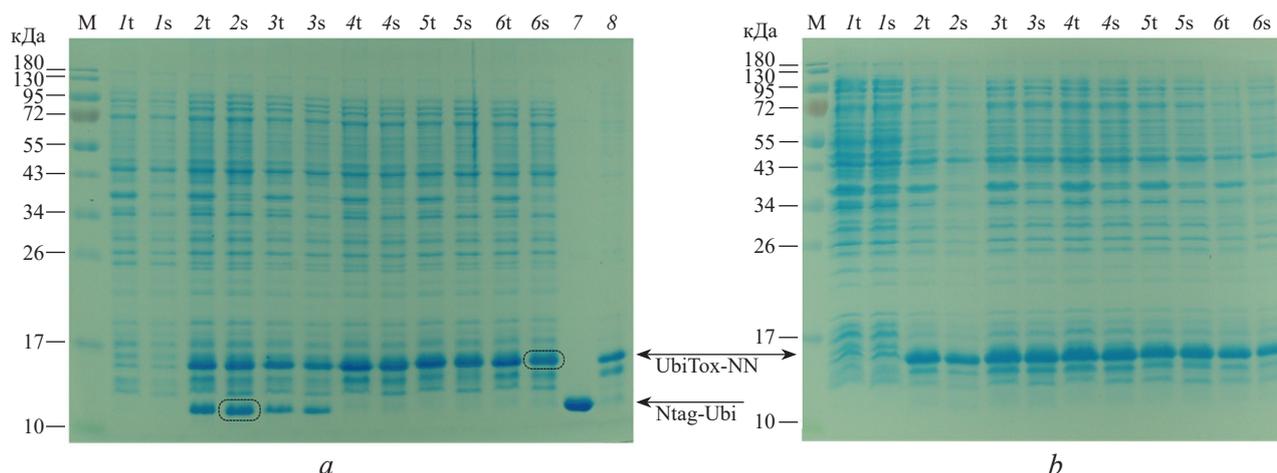


Рис. 1. Процессинг белков UbiTox-NN в клетках штаммов *E. coli*: *a* – BL21(DE3) и *b* – BL21(DE3) Δ elaD. Электрофорез проводили в 15% ПААГ в денатурирующих редуцирующих условиях. На дорожки наносили образцы суммарной (t) и растворимой (s) фракций клеточных лизатов и очищенные репортерные белки: 1 – отрицательный контроль, 2 – UbiTox-GA; 3 – UbiTox-GG; 4 – UbiTox-AA; 5 – UbiTox-GP; 6 – UbiTox-AG; 7 – очищенный Ntag-Ubi; 8 – очищенный UbiTox-AG. Стрелками показано положение белков UbiTox-NN и Ntag-Ubi. М – маркер молекулярной массы (Thermo Scientific, Product #26616). Пунктирной линией обведены полосы белков, подвергнутых масс-спектрометрическому анализу

Fig. 1. Processing of UbiTox-NN proteins in the cells of *E. coli* strains: *a* – BL21(DE3) and *b* – BL21(DE3) Δ elaD. Electrophoresis was performed in 15% PAAG under denaturing and reducing conditions. Samples of total (t) and soluble (s) fractions of cellular lysates and purified reporter proteins were applied to the lanes: 1 – negative control, 2 – UbiTox-GA; 3 – UbiTox-GG; 4 – UbiTox-AA; 5 – UbiTox-GP; 6 – UbiTox-AG; 7 – purified Ntag-Ubi; 8 – purified UbiTox-AG. Arrows show positions of proteins UbiTox-NN and Ntag-Ubi. M – molecular weight markers (Thermo Scientific, Product #26616). The dashed line shows the bands of proteins subjected to mass-spectrometric analysis.

UbiTox-AG и UbiTox-GP являлись соответствующие полноразмерные белки, сохранившие нативную структуру.

В то же время в профиле экспрессии конструкций UbiTox-GA и UbiTox-GG (рис. 1a, дорожки 2t,s и 3t,s) наряду с полноразмерными формами обнаруживались также дополнительные белковые продукты, обладавшие меньшей молекулярной массой, сходной с массой контрольного белка Ntag-Ubi (рис. 1a, дорожка 7). Их появление представлялось результатом высокоспецифичного протеолиза полноразмерных белков. В частно-

сти, об этом свидетельствовали высокий уровень их накопления на фоне пропорционального снижения содержания полноразмерных белков UbiTox-GA и UbiTox-GG (рис. 1a, дорожки 2t,s и 3t,s).

С целью однозначной идентификации был проведен масс-спектрометрический анализ укороченного продукта биосинтеза белка UbiTox-GA (рис. 1a, дорожка 2s). Анализ подтвердил, что исследуемый белок получен в результате процессинга белка-предшественника UbiTox-GA и также, как вариант Ntag-Ubi, содержит на С-конце остатки GlyAla (табл. 1). Таким образом,

Таблица 1

Масс-спектрометрический анализ мажорных продуктов биосинтеза белков UbiTox-GA и UbiTox-AG
Mass-spectrometric analysis of major biosynthesis products of UbiTox-GA and UbiTox-AG proteins

Позиция белка*	Конструкция	Масса белкового продукта		
		Экспериментальная		Расчетная
		MH+	MH++	
2s	UbiTox-GA	9779	4891	9776
6s	UbiTox-AG	13727	6861	13727

Примечание: MH+ и MH++ – значения массы однозарядного и двухзарядного ионов соответственно.

*Позицию белка см. на рис. 1

Note: MH+ and MH++ – masses of ions with single and double charge, correspondingly.

*The position of the protein, see Fig. 1

полученные данные свидетельствовали о том, что в ходе биосинтеза в *E. coli* оба белка UbiTox-GA и UbiTox-GG подвергались эффективному процессингу с образованием продуктов, сходных с Ntag-Ubi. Причем, несмотря на различие сайтов гидролиза (GlyGly или GlyAla), только первый из которых являлся каноническим, процессинг обоих белков, очевидно, осуществлялся с одинаковой эффективностью (рис. 1а, дорожки 2t,s и 3t,s). С учетом того, что продуктом процессинга в обоих случаях являлся вариант убиквитина, по формальным признакам такой процессинг следовало бы отнести к бактериальной разновидности деубиквитинирования.

Единственная известная протеиназа *E. coli*, способная осуществлять подобный процессинг – это деубиквитиназа ElaD, активное действие которой неоднократно фиксировалось в клетках штамма *E. coli* BL21(DE3) [4–6]. Для того чтобы доказать ElaD-зависимый характер процессинга белков UbiTox-GG и UbiTox-GA, анализируемые конструкции были экспрессированы в клетках изогенного мутантного штамма *E. coli* BL21(DE3) Δ elaD, дефектного по синтезу протеиназы ElaD (рис. 1б). Как видно из рис. 1б, инактивация гена *elaD* привела к унификации профилей экспрессии всех вариантов UbiTox-NN и к исчезновению укороченных продуктов процессинга.

Таким образом, полученные данные однозначно свидетельствовали о том, что процессинг белков UbiTox-GG и UbiTox-GA, наблюдавшийся в клетках штамма *E. coli* BL21(DE3), опосредовался протеиназой ElaD, которая, очевидно, обладала одинаковой активностью в отношении сайтов GlyGly и GlyAla.

Впервые было показано, что субстратная специфичность деубиквитинирующей протеиназы ElaD *E. coli* отличается от специфичности эукариотических DUB. Бактериальная DUB проявила себя как менее специфичный фермент, не нуждающийся в обязательном присутствии на С-конце убиквитина канонического дипептида GlyGly. Причем, если рассматривать белки UbiTox-GG, UbiTox-AG, UbiTox-GA и UbiTox-AA как ряд субстратов, реализующих аланиновое сканирование сайта процессинга, следует заключить, что активность протеиназы ElaD коррелировала с наличием остатка глицина в положении (–2) относительно С-конца убиквитина. Его присутствие в белках UbiTox-GG или UbiTox-GA опосредовало процессинг, тогда как его отсутствие в белках UbiTox-AG и UbiTox-AA приводило к блокированию процессинга. Независимо от наличия остатка глицина в

положении (–2), процессинг блокировался в присутствии остатка пролина в положении (–1) относительно С-конца убиквитина.

В свете гипотезы об участии (функциональной роли) бактериальных DUB в процессе патогенеза наблюдаемое снижение специфичности деубиквитиназы *E. coli* представляется совершенно оправданным признаком. В самом деле, например, в клетках человека к семейству ферментов DUB относят около 100 протеиназ, имеющих разный уровень гомологии и разные механизмы действия и нацеленных на разные мишени [12]. Анализируя эти данные, можно предположить, что совокупная специфичность такого большого количества ферментов может быть настолько велика, что ферменты данного семейства могли бы опосредовать процессинг избыточно широкого круга клеточных мишеней, что наносило бы вред хозяйской клетке. В этой связи именно консерватизм, ограничивающий действие хозяйских DUB исключительно «своими», содержащими дипептид GlyGly мишенями, представляется ключевым фактором, сдерживающим мощный разрушительный потенциал DUB-протеиназ. Из этого предположения следует, что преодоление фактором вирулентности консерватизма хозяйских DUB будет способствовать расширению круга его мишеней, подвергающихся атаке в процессе патогенеза, и тем самым приводить к увеличению его вирулентного потенциала.

В практическом плане результаты настоящей работы позволят оптимизировать процесс получения убиквитин-содержащих гибридных белков в клетках *E. coli* [16].

Проведенное исследование показало, что по сравнению с протеиназами эукариотического происхождения деубиквитиназа ElaD *E. coli* обладает пониженной специфичностью и не нуждается в обязательном присутствии дипептида GlyGly в сайте процессинга. Деубиквитиназа ElaD *E. coli* опосредовала одинаковую эффективность гидролиза убиквитин-содержащих белков, сайты процессинга которых включали дипептиды GlyGly и GlyAla, однако не было зафиксировано ее процессингующей активности в отношении белков, в сайтах процессинга которых присутствовали дипептиды AlaGly, AlaAla или GlyPro.

Авторы приносят искреннюю благодарность сотрудникам НИЦ «Курчатовский институт»–ГосНИИгенетика Скороходовой А.Ю. и Гулевищу А.Ю. за предоставление сконструированного для настоящей работы штамма BL21(DE3) Δ elaD.

ЛИТЕРАТУРА

1. Shatzman A.R., Rosenberg M. Expression, identification, and characterization of recombinant gene products in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.*, 1987, 152, 661–673.
2. Wood D.W. New trends and affinity tag designs for recombinant protein purification. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2014, 26, 54–61. doi: 10.1016/j.sbi.2014.04.006
3. Kosobokova E.N., Skrypnik K.A., Kosorukov V.S. Overview of fusion tags for recombinant proteins. *Biochemistry*, 2016, 81, 187–200. doi: 10.1134/S0006297916030019
4. Catanzariti A.-M., Soboleva T.A., Jans D.A., et al. An efficient system for high-level expression and easy purification of authentic recombinant proteins. *Protein Sci.*, 2004, 13, 1331–1339. doi: 10.1110/ps.04618904
5. Wang Z., Li H., Guan W., et al. Human SUMO fusion systems enhance protein expression and solubility. *Protein Expression and Purification*, 2010, 73, 203–208. doi: 10.1016/j.pep.2010.05.001
6. Catic A., Misaghi S., Korbel G.A., Ploegh H.L. ElaD, a deubiquitinating protease expressed by *E. coli*. *PLoS ONE*, 2007, 2(4), e381. doi: 10.1371/journal.pone.0000381
7. Pruneda J.N., Durkin C.H., Geurink P.P., et al. The molecular basis for ubiquitin and ubiquitin-like specificities in bacterial effector proteases. *Molecular Cell*, 2016, 63, 261–276. doi: 10.1016/j.molcel.2016.06.015
8. Le Negrate G., Faustin B., Welsh K., et al. *Salmonella* secreted factor L deubiquitinase of *Salmonella typhimurium* inhibits NF- κ B, suppresses I κ B α ubiquitination and modulates innate immune responses. *J. Immunol.*, 2008, 180, 5045–5056. doi: 10.4049/jimmunol.180.7.5045
9. Nakayasu E.S., Sydor M.A., Brown R.N., et al. Identification of *Salmonella typhimurium* deubiquitinase SseL substrates by immunoaffinity enrichment and quantitative proteomic analysis. *J. Proteome Res.*, 2015, 14(9), 4029–4038. doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00574
10. Bailey-Elkin B.A., Knaap R.C.M., Kikkert M., Mark B.L. Structure and function of viral deubiquitinating enzymes. *J. Mol. Biol.*, 2017, 429(22), 3441–3470. doi: 10.1016/j.jmb.2017.06.010
11. Drag M., Mikolajczyk J., Bekes M., et al. Positional-scanning fluorogenic substrate libraries reveal unexpected specificity determinants of DUBs (deubiquitinating enzymes). *Biochem. J.*, 2008, 415, 367–375. doi: 10.1042/BJ20080779
12. Amerik A.Y., Hochstrasser M. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, 2004, 1695, 189–207. doi: 10.1016/j.bbamer.2004.10.003
13. Revell J.D., Lund P.-E., Linley J.E., et al. Potency optimization of Huwentoxin-IV on hNav1.7: A neurotoxin TTX-S sodium-channel antagonist from the venom of the Chinese bird-eating spider *Selenocosmia huwena*. *Peptides*, 2013, 44, 40–46. doi: 10.1016/j.peptides.2013.03.011
14. Studier F.W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.*, 2005, 41(1), 207–234.
15. Grabski A., Mehler M., Drott D. The overnight express autoinduction system: high-density cell growth and protein expression while you sleep. *Nature Methods*, 2005, 2, 233–235. doi: 10.1038/nmeth0305-233
16. Fernandes de Oliveira L.M., Morale M.G., Chaves A.A.M., Demasi M., Ho P.L. Expression, Polyubiquitination, and Therapeutic Potential of Recombinant E6E7 from HPV16 Antigens Fused to Ubiquitin. *Mol. Biotechnol.*, 2017, 59, 46–56. doi: 10.1007/s12033-016-9990-6

Ubiquitin-Specific Proteinase of *E. coli* Does Not Require Obligatory Presence of Dipeptide GlyGly at Processing Site

E.P. SANNIKOVA¹, S.E. CHEPEREGIN¹, D.G. KOZLOV^{1,*}

¹State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of National Research Center «Kurchatov Institute» (NRC «Kurchatov Institute» – GosNIIgenetika), 117545, Moscow Russia

*e-mail: dg_kozlov@genetika.ru

Received July 09, 2018

Revised December 18, 2018

Accepted March 15, 2019

It was shown that unlike eukaryotic ubiquitin-specific proteinases (DUBs deubiquitinating enzymes) deubiquitinase ElaD *E.coli* does not need obligatory presence of GlyGly dipeptide at the processing site and is capable to process sites GlyGly and GlyAla with equal efficiency. At the same time similar to eukaryotic DUB the bacterial enzyme does not process sites with dipeptides AlaGly, AlaAla or GlyPro. Considering functional mission of the deubiquitinating agent of *E. coli*, decrease in its specificity can be considered as valuable evolutionary acquisition allowing to expand a list of the molecular targets being attacked during pathogenesis.

Keywords: ubiquitin, DUB, *E. coli* proteinase, *elaD*, virulence factor

Acknowledgments—The authors sincerely thank the staff of the NRC «Kurchatov Institute» – GosNIIgenetika Drs. Skorokhodova A. Yu. and Goulevitch A.Yu. for designing and supplying the strain BL21(DE3) Δ *elaD* for the present work.

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-2-25-29