

УДК 601.4; 602.6;604.4; 604.4

Свойства и биотехнологическое применение мутантных производных мини-интеина PRP8 *Penicillium chrysogenum* с улучшенным контролем С-концевого процессинга

© 2019 Е. П. САННИКОВА¹, Ф. А. КЛЕБАНОВ¹, С. Э. ЧЕПЕРЕГИН¹, Д. Г. КОЗЛОВ^{1,*}

¹ФГБУ 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 25.10.2019 г.

После доработки 06.11.2019 г.

Принята к публикации 15.12.2019 г.

Охарактеризованы мутантные варианты мини-интеина PRP8 *Penicillium chrysogenum* (рабочее название Int4b), обладающие улучшенным контролем С-концевого процессинга. Представленные варианты могут служить основой самоудаляемых полипептидных тагов, способных нести аффинную метку и оптимизировать процесс получения целевых белков и пептидов в клетках *E. coli*. Они позволяют синтезировать целевые молекулы в составе растворимых и нерастворимых гибридных белков (фьюжнов), обеспечивают их аффинную очистку, автокаталитический процессинг и получение зрелых целевых продуктов. По сравнению с известными прототипами представленные варианты обладают рядом особенностей. В частности, мутантный мини-интеин Int4bPRO, содержащий мутацию L93P, обладает температурно-зависимыми свойствами. При температуре культивирования клеток ниже 30 °С он позволяет получать целевые молекулы в составе растворимых фьюжнов, а при увеличении температуры до 37 °С направляет большинство синтезируемых фьюжнов в нерастворимые внутриклеточные агрегаты. Переход Int4bPRO в нерастворимое состояние сопровождается полной инактивацией С-концевого процессинга. Далее стандартные процедуры денатурации/ренатурации белков эффективно реактивируют Int4bPRO и происходит процессинг его фьюжнов *in vitro*. Два других варианта Int4b56 и Int4b36, содержащих точечную мутацию T62N и комбинацию мутаций D144N и L146T, соответственно, обладают пониженной скоростью С-концевого процессинга. Их использование в клетках *E. coli* позволяет оптимизировать биосинтез биологически активных целевых белков и пептидов в составе растворимых фьюжнов, пригодных для аффинной очистки и последующего интеин-зависимого процессинга без использования процедуры денатурации/ренатурации белков.

Ключевые слова: интеин, фьюжн, процессинг, скорость процессинга, гелонин

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-6-91-101

Природные интеины были открыты как внутренние элементы некоторых белков, способные к аутокаталитическому вырезанию (сплайсингу), сопровождаемому корректным восстановлением пептидной связи между фланкирующими интеин-частями зрелого белка [1, 2]. Уникальные свойства интеинов были использованы при разработке различных молекулярных систем, обеспечивающих увеличение выхода рекомбинантных белков и пептидов и облегчающих их очистку

[3–12]. Как правило, все они основаны на получении целевых белков и пептидов в составе интеин-содержащих предшественников (фьюжнов). При этом в состав фьюжнов обычно включают дополнительные элементы, совместно с которыми интеины формируют единые вспомогательные модули, обеспечивающие очистку целевых молекул с использованием аффинных или агрегационных методов. По завершении очистки активуют интеин-зависимый N- или С-концевой

Список сокращений: а.о. – аминокислотные остатки; ИПТГ – изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид; ЭДТА – натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты; R^2 – коэффициент определенности, показывающий степень корреляции экспериментальных и расчетных данных, $t_{1/2}$ – время полупроцессинга фьюжна

аутокаталитический процессинг фьюжнов, обеспечивающий прецизионное отделение вспомогательных модулей от целевых белков.

В ряде разработанных систем используется способность интеинов к осуществлению С-концевого рН-зависимого процессинга [4, 5]. Такие системы привлекательны с экономической точки зрения. Вместе с тем их недостатком является низкий уровень контроля активности интеинов, что вследствие преждевременного процессинга приводит к снижению выхода целевых фьюжнов [8, 12, 13]. В большинстве случаев для снижения преждевременного процессинга *in vivo* используются лишь температурный эффект и фактор продолжительности биосинтеза [13–15]. В условиях *in vitro* к ним добавляются эффект от рН [5] и концентрации ионов двухвалентных металлов [16]. Однако он ограничивается пониженной стабильностью белков при нефизиологичных рН, а также токсичностью ионов металлов.

Ограниченность средств, доступных для контроля активности интеинов, в особенности *in vivo*, снижает эффективность использования С-концевых интеиновых систем для получения целевых белков и пептидов и стимулирует поиск новых интеинов или их мутантных производных, обладающих улучшенным контролем С-концевой процессирующей активности.

Объектом настоящего исследования служил мини-интеин PRP8 *Penicillium chrysogenum* размером 157 а.о. [17]. Базовый рабочий вариант этого интеина, названный Int4b, содержал две замены: известную замену Cys1Ala, инактивирующую способность интеинов к сплайсингу, но сохраняющую высокую эффективность С-концевого процессинга [5] и замену Cys11Tyr, характерную для гомологов мини-интеина PRP8 *P. chrysogenum* [17].

В ходе лабораторной разработки Int4b для биосинтеза и очистки целевых белков и пептидов в клетках *E. coli* были отобраны его мутантные производные, отличавшиеся эффективностью

С-концевого процессинга и обеспечивающие увеличение выхода фьюжнов *in vivo*.

Цель настоящего исследования состояла в сравнении характеристик производных Int4b и уточнении условий и особенностей их применения.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Мутантные производные интеина Int4b

Все варианты интеинов, использованные в настоящем исследовании, являлись производными контрольного варианта Int4b: Int4bPRO содержал мутацию L93P; Int4b56, – мутацию T62N; Int4b36 – комбинацию мутаций D144N и L146T.

Структурный ген интеина Int4b был получен ранее [18]. Все производные интеина Int4b содержали N-концевой His-tag, включавший 10 остатков гистидина.

Методы

Для конструирования рекомбинантных ДНК использовали стандартный набор методов [19]. Для амплификации фрагментов ДНК использовали ДНК-полимеразу Phusion (#F-530S, ThermoFisher Scientific, США). Все использованные в работе ферменты получены от фирмы ThermoFisher Scientific. Для наработки рекомбинантных плазмид использовали штамм *E. coli* TOP10 (Invitrogen, США).

Плазмиды для экспрессии производных Int4b и их фьюжнов конструировали на базе вектора pET28b+ (Novagen, USA). В состав фьюжнов включали последовательности рекомбинантных белков eGFP [20], SUMO [21, 22], L-аспарагиназы Was79 *Wolinella succinogenes* [23], глюкогаono-подобного пептида-1 человека rmGLP-1 [24] и рекомбинантного гелонина rGel [25, 26]. Основные структурные особенности фьюжнов производных Int4b с белками eGFP, SUMO и rGel приведены на рис. 1. Структурные особенности фьюжнов производных Int4b с L-аспарагиназой Was79 и с rmGLP-1 были опубликованы ранее [23, 24].

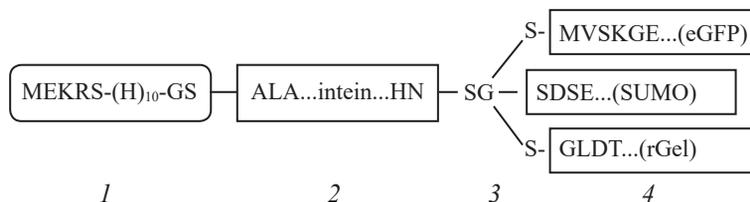


Рис. 1. Структурные особенности фьюжнов производных Int4b: 1 – N-концевой His-tag; 2 – последовательность варианта интеина; 3 – линкерная область, соединяющая последовательность варианта интеина и целевого или репортерного белка, 4 – последовательность целевого или репортерного белка (eGFP, SUMO дрожжей или rGel)

Fig. 1. Structural features of Int4b derivative fusions with proteins eGFP, SUMO and rGel. Each fusion contained 4 elements: (1), N-terminal tag, including 10 residues of histidine, (2), the sequence of the intein Int4b variant, (3), linker region connecting sequences of the intein and the target or reporter protein, (4), the sequence of the target or reporter protein (eGFP, yeast SUMO or rGel)

Для биосинтеза фьюжнов использовали штамм *E. coli* BL21(DE3) (Novagen). В качестве отрицательного контроля использовали клетки этого штамма, трансформированные плазмидой pET28b+. Трансформанты культивировали на среде TRB (дрожжевой экстракт В-207 – 24 г/л, пептон соевый Р140 – 12 г/л, сульфат магния – 2 мМ, фосфатный буфер (рН 7,0) – 100 мМ, глицерин – 5 г/л, лактоза – 2 г/л, канамицин – 90 мг/л) до стационарной фазы роста как было описано ранее [27, 28]. Продолжительность культивирования при температуре (T) 22 °С составляла 44 ч, а при температуре 30 °С и 37 °С – 16–18 ч. Для индукции биосинтеза фьюжнов в среде TRB использовали лактозу.

Если не оговорено иное, клеточные лизаты получали с использованием дезинтегратора Френч-пресс в буфере PBS (Amresco, США), содержащем ингибитор сериновых протеиназ PMSF (Fluka, USA) и ЭДТА (Sigma, США) в конечной концентрации 1 и 5 мМ, соответственно. Нерастворимые и растворимые клеточные белки разделяли с использованием центрифугирования при 16000 g в течение 10 мин. Гель-электрофорез белков проводили, как было описано в работе [24]. Для определения молекулярного веса белков использовали предокрашенные маркеры (Pierce-26616).

Определение скорости процессинга фьюжнов

С целью получения растворимых непроецированных фьюжнов Int4b-eGFP, Int4b36-eGFP, Int4b56-eGFP и Int4bPRO-SUMO, продуцированных в достаточном количестве в одинаковых условиях, их биосинтез осуществляли при $T = 30$ °С в среде LB, содержащей дрожжевой экстракт В-207 (5 г/л), пептон соевый Р140 (10 г/л), хлорид натрия (5 г/л), канамицин (30 мг/л), индуктор ИПТГ в концентрации 1 мМ. Индукцию проводили в экспоненциально растущих культурах в течение 2,5 ч. С целью ингибирования преждевременного процессинга фьюжнов в буфер для дезинтеграции клеток вместо ЭДТА вносили $ZnCl_2$ до конечной концентрации 1 мМ [16]. Процессинг фьюжнов проводили в образцах растворимых клеточных белков и активировали путем внесения ЭДТА до конечной концентрации 25 мМ. Инкубацию образцов с периодическим отбором проб проводили при $T = 22$ °С в течение 48 ч. Для анализа результатов процессинга использовали гель-электрофорез.

Полученные электрофореграммы использовали для электронной денситометрии белковых полос, соответствовавших фьюжнам и продуктам их процессинга. Для проведения электронной ден-

ситометрии использовали программу Phoretix 1D (<http://totallab.com>). Полученные данные обрабатывали с использованием программы CurveExpert Basic, v.2.1.0 (<https://www.curveexpert.net>). С целью учета белкового фона на полученных электрофореграммах для регрессионного анализа использовали уравнение «Exponential Association 3» со свободным членом $y = a(b \cdot \exp[-ct])$. Для расчета времени полупроцессинга фьюжнов ($t_{1/2}$) использовали экспоненциальные показатели скорости убыли фьюжнов и накопления продуктов процессинга.

Эксперименты по процессингу фьюжнов выполняли трижды. Полученные данные усредняли и вычисляли среднеквадратичное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ мутантных производных интеина Int4b

К числу основных характеристик относили сравнительный уровень экспрессии и растворимость мутантных производных интеина Int4b, а также уровень экспрессии, растворимость и скорость процессинга их фьюжнов с белками eGFP и SUMO дрожжей. В последнем случае помимо фьюжнов анализировали также продукты их процессинга: белки eGFP, SUMO и производные интеина Int4b. Их суммарное содержание в клетках отражало уровень экспрессии соответствующего фьюжна, количественные соотношения свидетельствовали о скорости процессинга, а соотношения во фракциях суммарных и нерастворимых клеточных белков свидетельствовали об уровне их растворимости.

Уровень экспрессии. Биосинтез производных Int4b анализировали при $T = 37$ °С, а их фьюжнов с белком eGFP – при 22, 30 и 37 °С.

Как показали полученные результаты, при $T = 37$ °С все производные интеина Int4b обладали высоким уровнем собственной экспрессии (рис. 2), а также обеспечивали высокий, слабо зависевший от температуры уровень экспрессии фьюжнов и продуктов их процессинга (рис. 3). Причем по этим показателям мутантные варианты не уступали контрольному интеину Int4b.

Таким образом, результаты анализа показали, что ни одна из мутаций, специфичных для каждого варианта интеина, не оказывала негативно-го влияния на уровень экспрессии производных Int4b или их фьюжнов с белком eGFP.

Растворимость. Высокий уровень экспрессии, отмеченный в предыдущем подразделе, позволил анализировать растворимость фьюжнов

и продуктов их процессинга непосредственно в клеточных лизатах без использования очистки и концентрирования.

Как видно на рис. 3, в клетках *E. coli* вне зависимости от температурных условий фьюжн Int4b-eGFP подвергался практически полному процессингу, в клеточных лизатах обнаруживались лишь отдельные его компоненты, зрелые белки Int4b и eGFP. Однако, если интеин Int4b всегда оставался растворимым (рис. 2 и 3), то растворимость белка eGFP снижалась при увеличении температуры культивирования клеток (рис. 3). При $T=37\text{ }^{\circ}\text{C}$ доля растворимого белка eGFP в клеточном лизате снижалась почти до нуля (рис. 3), что, вероятно, следует считать характерным свойством этого белка [29].

Полной противоположностью контрольному интеину Int4b проявил себя мутантный вариант Int4bPRO, который обнаружил свойства нерастворимого белка при экспрессии в клетках *E. coli* как отдельно, так и в составе фьюжна Int4bPRO-eGFP при всех температурных режимах (рис. 2 и 3). Продукты процессинга фьюжна Int4bPRO-eGFP в клеточных лизатах отсутствовали (рис. 3), вероятно из-за того, что агрегация этого фьюжна в клетках *E. coli* происходила прежде, чем заканчивалась его свертка и происходила активация процессинга.

Для того чтобы разделить эффекты, связанные с влиянием белков Int4bPRO и eGFP на растворимость фьюжна, в качестве нового партнера для Int4bPRO был выбран белок SUMO дрожжей. В пользу этого белка свидетельствовала его высокая гидрофильность, быстрая свертка, а также способность служить внутримолекулярным шапе-

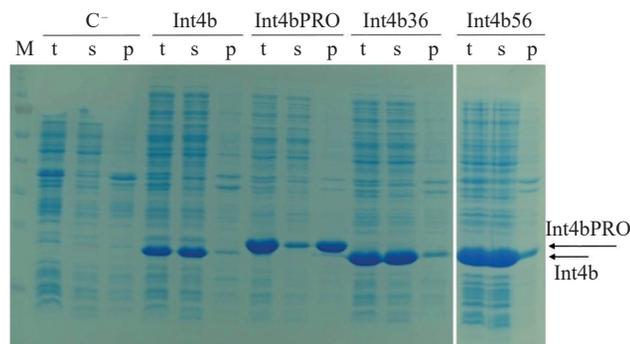


Рис. 2. Анализ экспрессии производных Int4b при температуре 37 °С. На дорожки наносили пропорциональное количество суммарных (t), растворимых (s) и нерастворимых (p) клеточных белков. Стрелками показано положение белковых полос соответствующих производных Int4b, М – маркер молекулярной массы белков; C⁻ – отрицательный контроль

Fig. 2. Analysis of Int4b derivatives expression at a temperature of 37 °C. Samples of total (t), soluble (s) and insoluble (p) cell protein fractions were applied to the tracks in the proportional amounts. The position of the protein bands of corresponding Int4b derivatives is shown by arrows. M – markers of molecular weight of proteins; C⁻ – negative control

роном, стимулирующим корректную свертку других белков [22, 30]. В связи с этим ожидалось, что SUMO не будет оказывать негативного влияния на растворимость фьюжнов, что обеспечит корректную оценку свойств Int4bPRO. Контрольным фьюжном в экспериментах служил Int4b-SUMO.

Как показал анализ экспрессии, свойства нового фьюжна Int4bPRO-SUMO, действительно, отличались от свойств Int4bPRO-eGFP (рис. 4). В условиях синтеза при T равной 22 и 30 °С его поведение практически совпадало с поведением

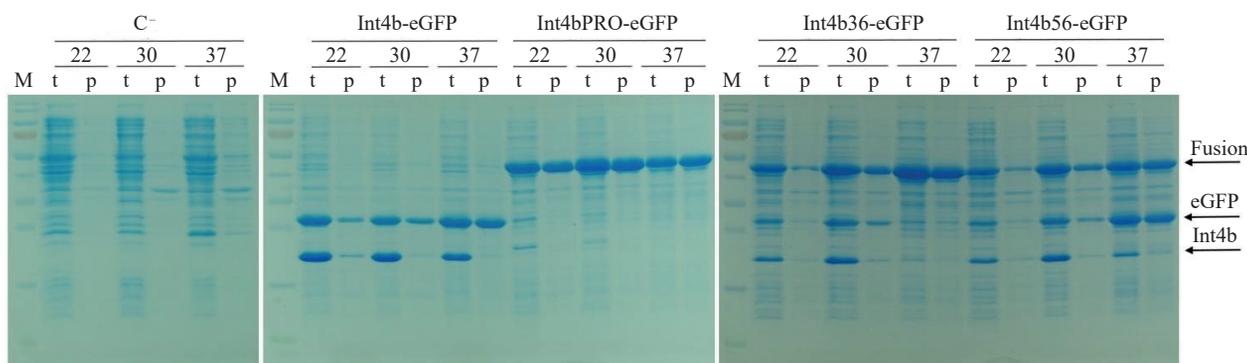


Рис. 3. Анализ экспрессии фьюжнов производных Int4b с белком eGFP при T равной 22, 30 и 37 °С. На дорожки наносили пропорциональные количества суммарных (t) и нерастворимых (p) клеточных белков. Стрелками показано положение белковых полос фьюжнов и продуктов их процессинга, белка eGFP и производных Int4b. М – маркеры молекулярного веса белков; C⁻ – отрицательный контроль

Fig. 3. Analysis of Int4b derivatives fusions expression with eGFP protein at temperatures of 22, 30 and 37 °C. Samples of total (t) and insoluble (p) cell protein fractions were applied to the tracks in the proportional amounts. The position of the protein bands of fusions and their processing products, eGFP protein and Int4b derivatives is shown by arrows. M-markers of molecular weight of proteins; C⁻ – negative control

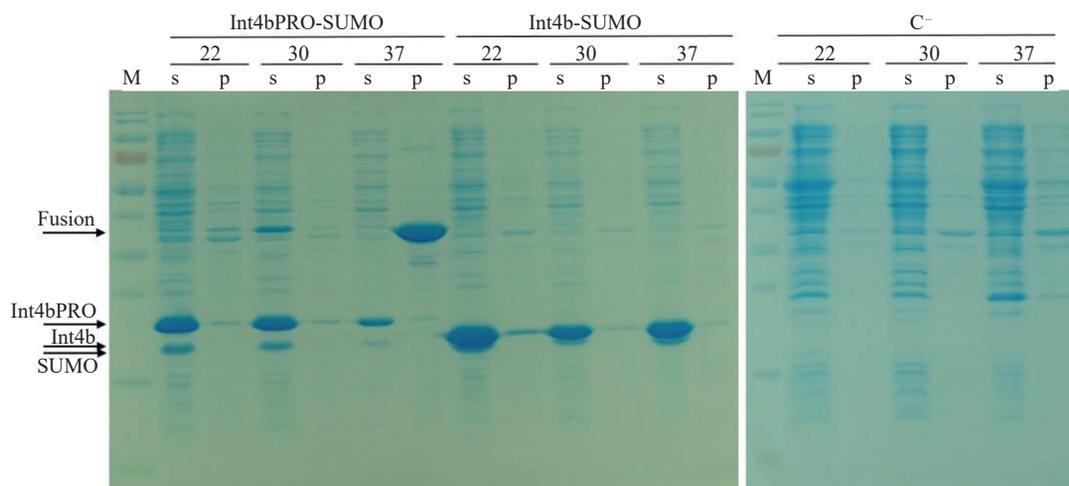


Рис. 4. Анализ экспрессии фьюжнов Int4bPRO-SUMO и Int4b-SUMO при T равной 22, 30 и 37 °C. На дорожки наносили пропорциональные количества растворимых (s) и нерастворимых (p) клеточных белков. Показано положение белковых полос фьюжнов и продуктов их процессинга, белков SUMO, Int4b и Int4bPRO. М – маркеры молекулярного веса белков; C⁻ – отрицательный контроль.

Fig. 4. Analysis of Int4bPRO-SUMO and Int4b-SUMO fusions expression at temperatures of 22, 30 and 37 °C. Samples of soluble (s) and insoluble (p) cell protein fractions were applied to the tracks in the proportional amounts. The position of the protein bands of fusions and products of their processing, SUMO, Int 4b and Int4bPRO is shown by arrows. M-markers of molecular weight of proteins; C⁻ – negative control.

контрольного варианта Int4b-SUMO: оба фьюжна подвергались почти полному процессингу с образованием продуктов, обладавших высокой растворимостью (рис. 4). Преимущественно растворимыми оставались и незначительные остаточные количества непротессированного фьюжна Int4bPRO-SUMO (рис. 4).

В то же время при $T = 37$ °C фьюжн Int4bPRO-SUMO, как и предыдущий вариант Int4bPRO-eGFP, оказывался практически полностью нерастворимым, и его накопление во фракции нерастворимых клеточных белков характеризовалось почти полным отсутствием процессинга (рис. 4). В отличие от него контрольный фьюжн Int4b-SUMO при $T = 37$ °C обнаруживал те же свойства, что и при более низких температурах (рис. 4).

Таким образом, анализ экспрессии фьюжна Int4bPRO-SUMO позволил уточнить ряд важных свойств мутантного интеина. Во фьюжне с SUMO мутантный интеин Int4bPRO продемонстрировал высокую процессирующую активность, а также уникальную способность к температурозависимому формированию нерастворимых агрегатов и прекращению процессинга. Причем на его способность стимулировать при $T = 37$ °C агрегацию фьюжнов не повлияло даже присутствие во фьюжне белка, известного своей высокой растворимостью.

Следует отметить, что характерной особенностью мутантного интеина Int4bPRO являлась

аномальная подвижность, свидетельствовавшая о влиянии мутации L93P на структуру белка даже в условиях электрофореза (рис. 2 и 4). Универсальные свойства этой мутации были подтверждены экспериментально при изучении свойств интеина PRP8 *Neosartorya aurata* NRRL 4378. В присутствии аминокислотной замены L100P (аналог L93P Int4bPRO) мутантный интеин PRP8 *N. aurata* продемонстрировал температурно-чувствительные свойства, характерные для Int4bPRO (Клебанов, неопубл. результаты). На сегодняшний день из более чем десяти модельных белков только рекомбинантный белок YB1 [31] показал неспособность к агрегации в составе фьюжна с Int4bPRO при $T = 37$ °C (Санникова, неопубл. результаты).

Наибольшую сложность в оценке растворимости вызвали мутантные интеины Int4b36 и Int4b56. С одной стороны, будучи экспрессированными в виде отдельных белков, оба варианта интеина продемонстрировали высокую растворимость при $T = 37$ °C (рис. 2). С другой стороны, их растворимость во фьюжнах с белком eGFP резко снижалась при увеличении температуры культивирования клеток (рис. 3). Поскольку ранее аналогичная зависимость растворимости от температуры была обнаружена у белка eGFP (рис. 3), представлялось вероятным, что наблюдавшееся изменение растворимости фьюжнов Int4b36-eGFP и Int4b56-eGFP было опосредовано присутствием

eGFP в их составе. Позднее это предположение косвенно подтвердили результаты экспрессии фьюжнов Int4b36 и Int4b56 с другими белками.

Скорость внутриклеточного процессинга.

Результаты, представленные на рис. 3 и 4, качественно отражают различие скоростей внутриклеточного процессинга фьюжнов и однозначно свидетельствуют о том, что все мутантные производные интеина Int4b обладают пониженной С-концевой процессирующей активностью. В частности, независимо от температурного режима, контрольный фьюжн Int4b-eGFP обнаруживался в клеточных образцах исключительно в форме продуктов процессинга (рис. 3, 4), в то время как некоторая доля остальных фьюжнов всегда сохранялась в непроецессированном состоянии (рис. 3).

Полное отсутствие процессинга демонстрировал только фьюжн Int4bPRO-eGFP, находившийся во фракции нерастворимых клеточных белков при любых режимах культивирования клеток (рис. 3). В то же время часть фьюжнов Int4b36-eGFP и Int4b56-eGFP оставались растворимыми и непроецессированными в течение всего периода культивирования клеток, особенно при пониженных температурах (22 и 30 °C), (рис. 3). Это позволило охарактеризовать Int4b36 и Int4b56 как «замедленные» варианты интеинов.

Любопытная картина внутриклеточного процессинга фьюжнов Int4b36-eGFP и Int4b56-eGFP обнаруживалась при $T=37\text{ }^{\circ}\text{C}$ культивирования клеток (рис. 3). В этих условиях оба фьюжна были почти полностью нерастворимыми. В то же время одновременно с ними в клеточных образцах обнаруживался зрелый белок eGFP, в гораздо меньшей степени в образце Int4b36-eGFP и в значительно большей степени в образце Int4b56-eGFP (рис. 3). Причем, как видно на рис. 3, зрелый белок eGFP так же, как и фьюжны, был нерастворимым, а его содержание в образце Int4b56-eGFP превышало показатели, характерные для других температур, при которых фьюжн и белок eGFP обладали заметно большей растворимостью. Поскольку зрелый белок eGFP мог появляться в клетках только в результате процессинга соответствующих фьюжнов, следовало предположить, что интеины Int4b36 и Int4b56 сохраняли С-концевую процессирующую активность в составе нерастворимых фьюжнов. Для подтверждения этого эффекта были использованы образцы нерастворимых фьюжнов Int4b36-eGFP и Int4b56-eGFP, полученные с помощью центрифугирования соответствующих клеточных лизатов. Эти образцы после промывки были ресуспендированы в буфере для дезинтеграции клеток и инкубированы в течение 24 и 46 ч при $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$. По завершении каждо-

го этапа инкубации осуществляли разделение суспензий на фракции суммарных, растворимых и нерастворимых белков. Результаты ПААГ-анализа полученных фракций приведены на рис. 5.

Как видно на рис. 5, инкубация белковых суспензий *in vitro* выявляла несомненный процессинг обоих фьюжнов и пропорциональное увеличение содержания зрелых производных Int4b и белка eGFP. Характерно, что через 24 и 46 ч инкубации непроецессированные фьюжны и зрелый белок eGFP обнаруживались во фракциях (p), т. е. оставались нерастворимыми. В то же время процессированные производные Int4b обнаруживались преимущественно во фракциях (s), т. е. проявляли свойства растворимых белков. Как и при анализе клеточных лизатов, более высокая процессирующая активность обнаруживалась у мутантного интеина Int4b56 (рис. 3).

Таким образом, полученные данные в совокупности свидетельствовали о том, что оба интеина, в меньшей степени Int4b36 и в большей – Int4b56, обладали способностью сохранять С-концевую процессирующую активность в составе нерастворимых фьюжнов. Ранее подобные свойства были обнаружены и у других интеинов [10].

Скорость процессинга фьюжнов *in vitro*.

Экспериментальное определение скорости процессинга фьюжнов Int4b-eGFP, Int4b36-eGFP, Int4b56-eGFP и Int4bPRO-SUMO проводили

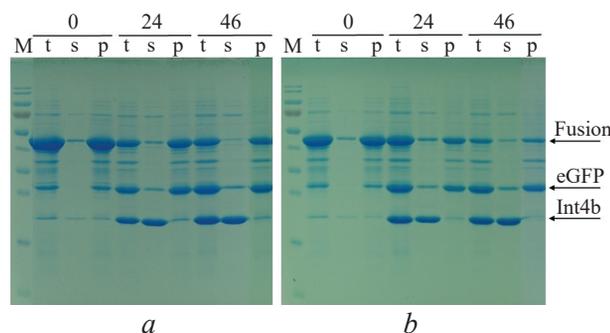


Рис. 5. Анализ процессинга нерастворимых фьюжнов *a* – Int4b36-eGFP и *b* – Int4b56-eGFP в суспензии. На дорожки наносили пропорциональные количества суммарных (t), растворимых (s) и нерастворимых (p) белков, полученных в результате инкубации соответствующих суспензий в течение 0, 24 и 46 ч. Здесь и на рис. 6-9 М – маркер молекулярной массы белков. Стрелками показано положение полос, соответствующих указанным белкам

Fig. 5. Analysis of processing of insoluble fusions of (*a*), Int4b36-eGFP and (*b*), Int4b56-eGFP in suspension. Samples of total (t), soluble (s) and insoluble (p) proteins, obtained during incubation of the respective suspensions for 0, 24 and 44 h, were applied to the tracks in the proportional amounts. M – markers of molecular weight of proteins. The arrows show the position of the bands corresponding to the specified proteins

с использованием фракций растворимых белков соответствующих клеточных лизатов при $T=22\text{ }^{\circ}\text{C}$. С помощью гель-электрофореза анализировали снижение содержания фьюжнов в анализируемых образцах и увеличение содержания продуктов их процессинга. Пример такого анализа и результаты обработки полученных данных приведен на рис. 6а.

На основании результатов обработки полученных данных были рассчитаны значения $t_{1/2}$ (ч) каждого фьюжна: Int4b-eGFP – $1,4 \pm 0,3$; Int4b36-eGFP – $5,8 \pm 1,2$; Int4b56-eGFP – $7,5 \pm 1,6$ и Int4bPRO-SUMO $3,5 \pm 0,5$.

Полученные величины показали, что по сравнению с контрольным вариантом Int4b все мутантные интеины обладали пониженной С-концевой процессирующей активностью. В частности, мутантные интеины Int4b36 и Int4b56 характеризовались 4- и 5,5-кратным снижением скорости процессинга фьюжнов относительно контроля, соответственно, что подтверждало их статус «замедленных» интеинов. При этом, если мутантный интеин Int4b36 является уникальным, то Int4b56 может оказаться типовым. Можно ожидать, что в присутствии мутаций, аналогичных T62N в составе Int4b56, затрагивающих высоко-консервативный остаток треонина [32], и другие интеины будут показывать пониженную С-концевую процессирующую активность.

Следует отметить также, что в дополнение к термочувствительным свойствам у мутантного варианта Int4bPRO было обнаружено умеренное снижение С-концевой процессирующей активности, что позволяет использовать его в качестве «замедленного» интеина для получения растворимых фьюжнов при пониженных температурах.

Применение Int4b и его производных

Применение Int4b. Контрольный вариант интеина Int4b использовался для получения безметиониновой формы L-аспарагиназы Was79 *Wolinella succinogenes* в клетках *E. coli* [23].

На рис. 7 показаны результаты сравнения экспрессии метиониновой (Met⁺) и безметиониновой (Met⁻) форм белка Was79 в клетках штамма *E. coli* BL21(DE3) в условиях автоиндукции в биореакторе [23]. При этом биосинтез формы белка Met⁺ обеспечивала обычная экспрессия структурного гена Was79 под контролем промотора T7, а для получения формы Met⁻ использовался фьюжн Int4b-Was79, который в ходе экспрессии подвергался полному внутриклеточному процессингу [23].

Оба решения обеспечивали соизмеримый выход зрелых форм растворимого белка Was79,

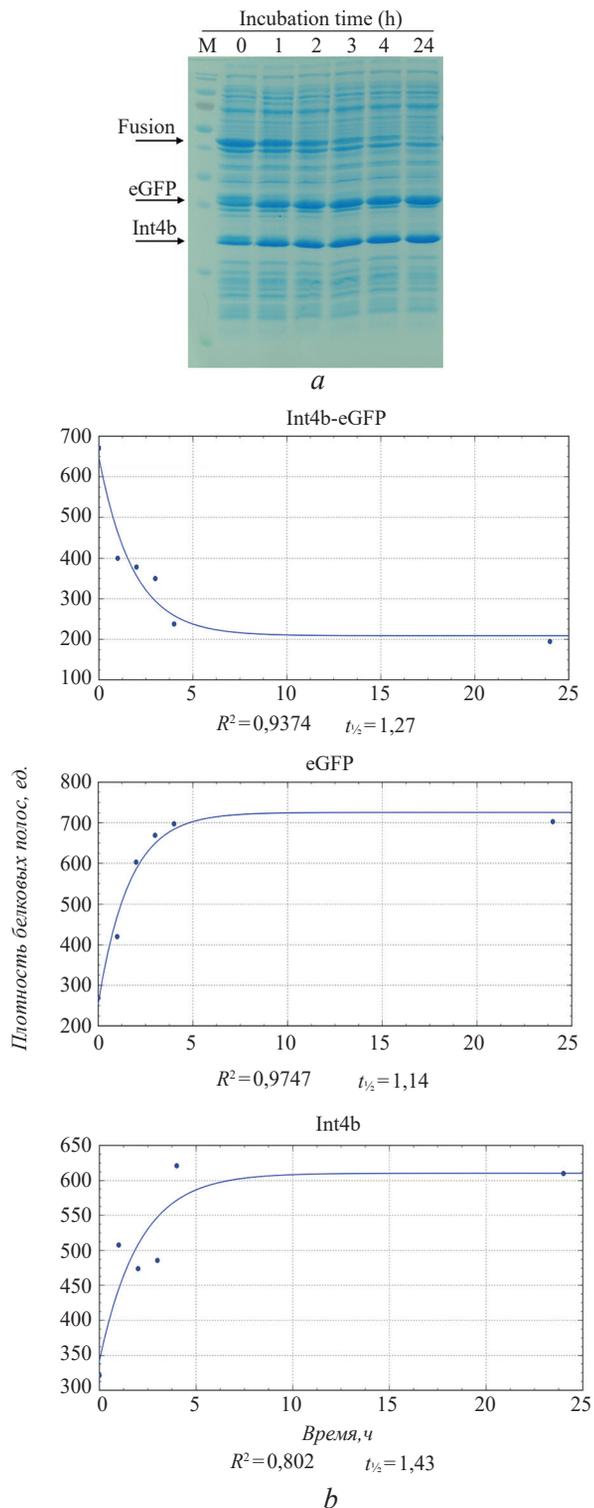


Рис. 6. Анализ скорости процессинга контрольного фьюжна Int4b-eGFP: а – электрофореграмма; б – результаты регрессионного анализа показателей плотности белковых полос фьюжна Int4b-eGFP, белка eGFP и интеина Int4b. Приведены расчетные значения коэффициента определенности R^2 и показателя $t_{1/2}$

Fig. 6. Analysis of the processing rate of the control fusion Int4b-eGFP. The electropherogram (a) and the results of the regression analysis of densities of protein bands fusion Int4b-eGFP, protein eGFP, intein Int4b (b). The estimated values of coefficient of determinacy R^2 and indicator $t_{1/2}$ are given

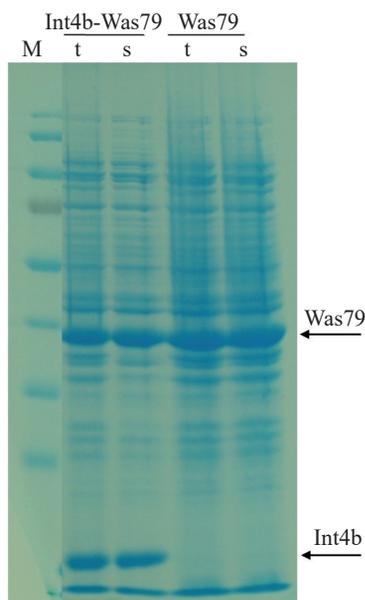


Рис. 7. Сравнительный анализ экспрессии фьюжна Int4-Was79 и нативной L-аспарагиназы Was79 в клетках BL21(DE3) в биореакторе. На дорожки наносили пропорциональные количества суммарных (t) и растворимых (s) клеточных белков

Fig. 7. Comparative expression analysis of the fusion Int4b-Was79 and native L-asparaginase Was79 in BL21(DE3) cells in the bioreactor. M – markers of molecular weight of proteins. Samples of fractions of total (t) and soluble (s) cell proteins were applied to the tracks in the proportional amounts. The arrows show the position of the bands corresponding to the specified proteins

различавшихся только наличием N-концевого метионина. Таким образом, технология применения интеина Int4b для получения безметиониновой формы белка доказала высокую эффективность.

Применение Int4PRO. Мутантный интеин Int4bPRO был использован для получения в клетках *E. coli* модифицированного глюкагоно-подобного пептида-1 человека (rmGLP1) [24]. Согласно разработанной технологии агрегаты нерастворимого фьюжна Int4bPRO-rmGLP1 получали в процессе культивирования штамма-производителя при температуре 37 °С. Полученные агрегаты растворяли с использованием мочевины, после чего осуществляли ренатурацию фьюжна и активацию его процессинга [24]. На стадии отработки технологии процессинг фьюжна выполняли в ренатурирующем буфере при температуре 4 и 12 °С. Как видно на рис. 8, независимо от температуры, продукты процессинга фьюжна выявлялись уже через 2 ч после начала его ренатурации. Однако, если при $T=12\text{ °C}$ уровень процессинга превосходил показатель 90% уже через 18 ч, то при $T=4\text{ °C}$ процессинг осуществлялся медленнее и достигал указанного показателя лишь через 42 ч (рис.8).

Согласно результатам регрессионного анализа полученных данных, при температуре 12 °С время полупроцессинга фьюжна ($t_{1/2}$) составило ~7,5 ч. Снижение скорости процессинга фьюжна Int4bPRO-rmGLP1 относительно таковой у

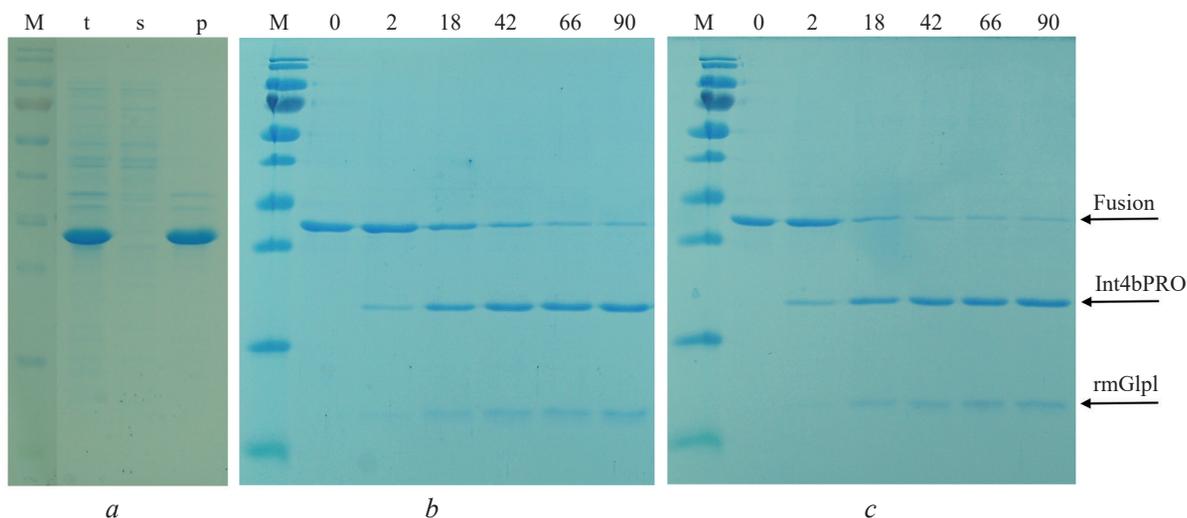


Рис. 8. Анализ процессинга фьюжна Int4bPRO-rmGLP1 в условиях ренатурации. Показаны результаты анализа экспрессии (a) и процессинга фьюжна (после ренатурации) при температуре 4 °С (b) и 12 °С (c). На рис. b и c над дорожками указано время (ч) после начала ренатурации и процессинга. На дорожки наносили пропорциональные количества суммарных (t), растворимых (s) и нерастворимых (p) клеточных белков

Fig. 8. Analysis of processing of the fusion Int4bPRO-rmGLP1 in the conditions of renaturation. The results of the expression analysis (a) and fusion's processing (after renaturation) at 4 °С (b) and 12 °С (c) are shown. The time (h) after the start of renaturation and processing is shown above the tracks on figures (b) and (c). Samples of fractions of total (t), soluble (s) and insoluble (p) cell proteins were applied to the tracks in the proportional amounts. M - markers of molecular weight of proteins. The arrows show the position of the bands corresponding to the specified proteins

Int4bPRO-SUMO может объясняться различиями в аминокислотном окружении интеина Int4bPRO в составе фьюжнов [5].

Результаты исследования доказали способность Int4bPRO к эффективной реактивации в условиях ренатурации, тем самым была подтверждена возможность использования мутантного интеина Int4bPRO в качестве основы новой температурно-чувствительной системы биосинтеза белков, обладающей контролируемой активностью.

Известной альтернативой использованию интеина Int4bPRO является система на основе протеазы N^{pro} вируса рода *Pestivirus* [33, 34]. Фьюжны протеазы N^{pro} с целевыми белками также получают в форме нерастворимых агрегатов и после осуществления денатурации/ренатурации подвергаются автокаталитическому процессингу [35]. Однако, очевидным преимуществом системы на основе Int4bPRO является полностью интеиновая природа процессинга, не допускающая проявления неспецифической протеолитической активности, характерной для системы N^{pro}.

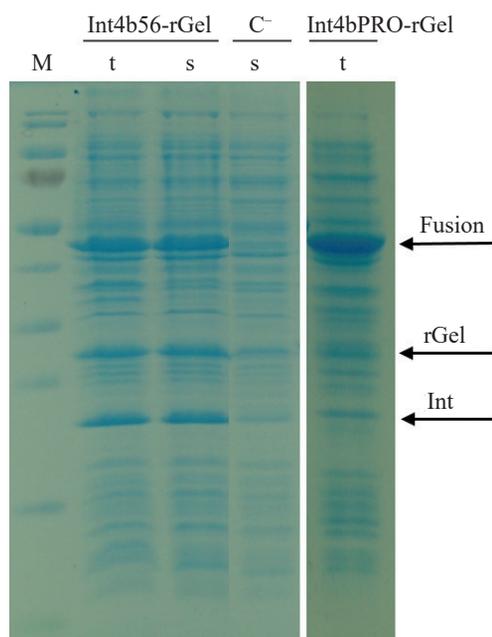


Рис. 9. Анализ экспрессии рекомбинантного гелонина rGel в составе фьюжнов с интеинами Int4b56 и Int4bPRO. На дорожки наносили пропорциональные количества суммарных (t) и растворимых (s) клеточных белков

Fig. 9. Analysis of the recombinant gelonin (rGel) expression in the composition of fusions with inteins Int4b56 and Int4bPRO. Samples of fractions of total (t) and soluble (s) cell proteins were applied to the tracks in the proportional amounts. M – markers of molecular weight of proteins. The arrows show the position of the bands corresponding to the specified proteins

Применение Int4b56. Рекомбинантный гелонин (rGel) является растительным токсином, используемым в качестве эффекторной части в иммунотерапевтических препаратах направленного действия [26]. Ранее была разработана технология получения rGel в тельцах включения в составе нерастворимого интеин-содержащего фьюжна [25].

В настоящей работе с целью сравнения эффективности получения интеин-содержащих фьюжнов с rGel во фракции растворимых и нерастворимых клеточных белков были сконструированы фьюжны Int4b56-rGel и Int4bPRO-rGel. Их биосинтез был проведен в клетках штамма *E. coli* BL21(DE3), выращенных до стационарной фазы роста в условиях индукции лактозой при температуре 30 и 37 °C, соответственно. Как видно на рис. 9, в этих условиях осуществлялся биосинтез растворимого фьюжна Int4b56-rGel, при этом наблюдался его частичный процессинг. В то же время фьюжн Int4bPRO-rGel синтезировался преимущественно в форме нерастворимого и непротессированного белка. В условиях эксперимента оба штамма обеспечили соизмеримый уровень накопления непротессированных фьюжнов (рис. 9). Препараты rGel, выделенные из состава обоих фьюжнов, также показали сходную специфическую активность (данные не представлены).

Таким образом, было показано, что применение «медленного» интеина Int4b56 может обеспечить высокий уровень экспрессии растворимого непротессированного фьюжна, соизмеримый с уровнем экспрессии нерастворимого белка.

В результате проведенных исследований определены характеристики и возможности применения интеина Int4b и его мутантных производных: Int4bPRO, Int4b36 и Int4b56. Показано, что все мутантные интеины обладают улучшенным контролем С-концевой процессирующей активности, а также другими ценными характеристиками, позволяющими использовать их в клетках *E. coli* для получения фьюжнов с целевыми белками как во фракции растворимых, так и нерастворимых клеточных белков (табл. 1).

Таким образом, при практическом применении каждый вариант интеина в составе рекомбинантных белков может удовлетворять той или иной потребности в каждом конкретном случае благодаря значительному отличию свойств предшественников.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа поддержана Государственным заданием № 595-00003-19 ПР.

Основные характеристики и область применения производных интеина Int4b
Main characteristics and applications of intein Int4b derivatives

Интеин	Характеристика			Применение
	Растворимость	Скорость процессинга	Очистка	
Int4b	Высокая	Высокая (<i>in vitro</i>)	Стандартная, применяемая для целевых белков, не требует ренатурации	Экспрессия безметионинных форм белков
Int4b36 Int4b56	Высокая	Замедленный процессинг <i>in vitro</i>	Не требует ренатурации, необходима очистка	Получение растворимых непроцессированных предшественников, процессинг нерастворимых фьюжнов
Int4bPRO ($T \leq 30$ °C)	Компромиссная	Высокая <i>in vitro</i>	Требует очистки	Получение растворимых непроцессированных предшественников
Int4bPRO ($T \geq 37$ °C)	Низкая	Быстрый процессинг <i>in vitro</i>	Требует ренатурации из-за агрегации фьюжнов, что в дальнейшем упрощает их очистку	Получение нерастворимых непроцессированных предшественников

ЛИТЕРАТУРА

- Shah N.H., Muir T.W. Inteins: Nature's gift to protein chemists. *Chem. Sci. (Camb)*, 2014, 5, 446–461. doi: 10.1039/C3SC52951G
- Novikova O., Topilina N., Belfort M. Enigmatic distribution, evolution, and function of inteins. *J. Biol. Chem.*, 2014, 289, 14490–14497. doi: 10.1074/jbc.R114.548255
- Chong S., Mersha F.B., Comb D.G., et al. Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element. *Gene*, 1997, 192, 271–281. doi: 10.1016/S0378-1119(97)00105-4
- Chong S., Montello G.E., Zhang A., et al. Utilizing the C-terminal cleavage activity of a protein splicing element to purify recombinant proteins in a single chromatographic step. *Nucleic. Acids Res.*, 1998, 26(22), 5109–5115. doi: 10.1093/nar/26.22.5109
- Mathys S., Evans T.C.Jr., Chute I.C., et al. Characterization of a self-splicing mini-intein and its conversion into autocatalytic N- and C-terminal cleavage elements: facile production of protein building blocks for protein ligation. *Gene*, 1999, 231, 1–13. doi: 10.1016/S0378-1119(99)00103-1
- Xu M.Q., Evans T.C. Purification of recombinant proteins from *E. coli* by engineered inteins. *Methods Mol. Biol.*, 2003, 205, 43–68. doi: 10.1385/1-59259-301-1:43
- Wood D.W., Camarero J.A. Inteин applications: from protein purification and labeling to metabolic control methods. *J. Biol. Chem.*, 2014, 289, 14512–14519. doi: 10.1074/jbc.R114.552653
- Cui C., Zhao W., Chen J., et al. Elimination of *in vivo* cleavage between target protein and intein in the intein-mediated protein purification systems. *Protein Expr. Purif.* 2006, 50, 74–81. doi: 10.1016/j.pep.2006.05.019
- Lin Z., Zhao Q., Xing L., et al. Aggregating tags for column-free protein purification. *Biotechnol. J.*, 2015, 10(12), 1877–1886. doi: 10.1002/biot.201500299.
- Zhao Q., Zhou B., Gao X., et al. A cleavable self-assembling tag strategy for preparing proteins and peptides with an authentic N-terminus. *Biotechnol. J.*, 2017, 12(6). doi: 10.1002/biot.201600656.
- Yang X., Pistolozzi M., Lin Z. New trends in aggregating tags for therapeutic protein purification. *Biotechnol. Lett.*, 2018, 40(5), 745–753. doi: 10.1007/s10529-018-2543-2.
- Fan Y., Miozzi J.M., Stimple S.D., et al. Column-free purification methods for recombinant proteins using self-cleaving aggregating tags. *Polymers (Basel)*, 2018, 10(5). pii: E468. doi: 10.3390/polym10050468
- Zhao Z., Lu W., Dun B., et al. Purification of green fluorescent protein using a two-intein system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, 77(5), 1175–1180. doi: 10.1007/s00253-007-1233-0.
- Southworth M.W., Amaya K., Evans T.C., et al. Purification of proteins fused to either the amino or carboxy terminus of the *Mycobacterium xenopi* gyrase A intein. *Biotechniques*, 1999, 27(1), 110–114, 116, 118–120. doi: 10.2144/99271st04
- Mills K.V., Connor K.R., Dorval D.M., Lewandowski K.T. Protein purification via temperature-dependent, intein-mediated cleavage from an immobilized metal affinity resin. *Anal. Biochem.*, 2006, 356, 86–93. doi: 10.1016/j.ab.2006.04.055
- Mills K.V., Paulus H. Reversible inhibition of protein splicing by zinc ion. *The Jour. of Biol. Chem.*, 2001, 276(14), 10832–10838. doi: 10.1074/jbc.M011149200
- Elleuche S., Nolting N., Pöggeler S. Protein splicing of PRP8 mini-inteins from species of the genus *Penicillium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, 72(5), 959–967. doi: 10.1007/s00253-006-0350-5
- Козлов Д.Г., Санникова Е.П., Чеперегин С.Э. Патент RU 2619217 от 12.05.2017. Температурно-чувствительный мутантный интеин для нерастворимой экспрессии предшественника целевого белка. Заявка №2015152071, 04.12.2015. Опубл. 12.05.2017, бюл. №14. Истекает 04.12.2035.
- Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982, 545
- Yang T.T., Cheng L., Kain S.R. Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic Acids Res.*, 1996, 24(22), 4592–4593. doi: 10.1093/nar/24.22.4592
- Johnson E.S., Schwienhorst I., Dohmen R.J., Blobel G. The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer. *EMBO J.*, 1997, 16(18), 5509–5519. doi: 10.1093/emboj/16.18.5509

22. Marblestone J.G., Edavettal S.C., Lim Y., et al. Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: enhanced expression and solubility with SUMO. *Protein Sci.*, 2006, 15(1), 182–189. doi: 10.1110/ps.051812706
23. Sannikova E.P., Bulushova N.V., Cheperegin S.E., et al. The Modified Heparin-Binding L-Asparaginase of *Wolinetella succinogenes*. *Mol. Biotechnol.*, 2016, 58(8), 528–539. doi: 10.1007/s12033-016-9950-1.
24. Санникова Е.П., Булушова Н.В., Чеперегин С.Э. и др. Специфическая активность рекомбинантного модифицированного глюкагоно-подобного пептида человека (рмГПП-1). *Биотехнология*, 2018, 34(4), 37–50. doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-4-37-50
25. Guo C., Li Z., Shi Y., et al. Intein-mediated fusion expression, high efficient refolding, and one-step purification of gelonin toxin. *Protein Expression Purification*, 2004, 37, 361–367. doi: 10.1016/j.pep.2004.06.037
26. Lyu M.A., Cao Y.J., Mohamedali K.A., Rosenblum M.G. Cell-targeting fusion constructs containing recombinant gelonin. *Methods Enzymol.*, 2012, 502, 167–214. doi: 10.1016/B978-0-12-416039-2.00008-2.
27. Studier F.W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.*, 2005, 41(1), 207–234. doi: 10.1016/j.pep.2005.01.016
28. 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
29. Tsien R.Y. The green fluorescent protein. *Annu Rev. Biochem.*, 1998, 67, 509–544. doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.509
30. Butt T.R., Edavettal S.C., Hall J.P., Mattern M.R. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein Expr Purif.*, 2005, 43(1), 1–9. doi: 10.1016/j.pep.2005.03.016
31. Guryanov S.G., Selivanova O.M., Nikulin A.D., et al. Formation of amyloid-like fibrils by Y-box binding protein 1 (YB-1) is mediated by its cold shock domain and modulated by disordered terminal domains. *PLoS One*, 2012, 7(5), e36969. doi: 10.1371/journal.pone.0036969.
32. Dearden A.K., Callahan B., Roey P.V., et al. A conserved threonine spring-loads precursor for intein splicing. *Protein Sci.*, 2013, 22, 557–563. doi: 10.1002/pro.223
33. WO2006113957. Publication Date: 02.11.2006. Production of recombinant proteins by autoproteolytic cleavage of a fusion protein
34. US6936455. Publication date August 30 2005. Production of heterologous proteins using an N^{pro} autoprotease of a pestivirus and inclusion bodies
35. Li Y. Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: a review. *Protein Expr Purif.*, 2011, 80, 260–267. doi: 10.1016/j.pep.2011.08.001

Properties and Biotechnological Application of mutant Derivatives of Mini-intein PRP8 from *Penicillium chrysogenum* with Improved Control of C-terminal Processing

E. P. SANNIKOVA¹, F. A. KLEBANOV¹, 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; dik-sent@yandex.ru

Received October 25, 2019

Revised November 6, 2019

Accepted December 15, 2019

Mutant variants of mini-intein PRP8 from *Penicillium chrysogenum* (Int4b) with improved control of C-terminal processing were characterized. The presented variants can serve as a basis for self-removed polypeptide tags capable of carrying an affine label and allowing to optimize the process of obtaining target proteins and peptides in *E. coli* cells. They allow to synthesize target molecules in the composition of soluble and insoluble hybrid proteins (fusions), provide their affine purification, autocatalytic processing and obtaining mature target products. The presented variants have a number of features in comparison with the known prototypes. In particular the mutant mini-intein Int4bPRO, containing the L93P mutation, has temperature-dependent properties. At cultivation temperature below 30 °C it allows the production of target molecules as part of soluble fusions, but after increasing of cultivation temperature to 37 °C it directs the most of synthesized fusions into insoluble intracellular aggregates. The transition of Int4bPRO into insoluble form is accompanied by complete inactivation of C-terminal processing. Further application of standard protein denaturation-renaturation procedures enable efficiently reactivate Int4bPRO and to carry out processing of its fusions *in vitro*. Two other variants, Int4b56 and Int4b36, containing a point mutation T62N or combination of mutations D144N and L146T respectively, have a reduced rate of C-terminal processing. Their use in *E. coli* cells allows to optimize the biosynthesis of biologically active target proteins and peptides in the composition of soluble fusions, suitable for affine purification and subsequent intein-dependent processing without the use of protein denaturation-renaturation procedures.

Key words: intein, fusion, processing, processing rate, gelonin

Funding – The work was supported within the framework of the State Assignment no. 595-00003-19 PR.

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-6-91-101