

Влияние различных концентраций глицерина на выход и растворимость рекомбинантной метионинаминопептидазы *Escherichia coli*

И. Ю. Славченко^{1, 2}, Е. В. Борейко¹, Н. В. Воробей¹

¹ ПНИК «Биотехнолог»

Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

² Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины

Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

E. mail: biotech@pavex.kiev.ua

Изучали влияние глицерина на выход и растворимость рекомбинантного белка в модельной системе суперсинтеза метионинаминопептидазы (МАР) E. coli с использованием РНК-полимеразы фага T7. Обнаружено, что глицерин в составе богатой питательной среды может угнетать рост штамма-продуцента, способствовать накоплению целевого продукта в растворимой форме и влиять на его выход. Показано, что манипулирование такими параметрами, как концентрация глицерина и оптическая плотность культуры, при которой его вносят в питательную среду, позволяет целенаправленно увеличивать выход МАР в растворимой форме. Разработанные подходы могут быть использованы для получения других рекомбинантных белков в клетках E. coli.

Введение. При высоком уровне экспрессии клонированных генов в бактериальных культурах, в частности, в *E. coli* рекомбинантные белки как гетеро-, так и гомологичного происхождения очень часто накапливаются в клетках штамма-продуцента в виде нерастворимых агрегатов, получивших название «тельца включений» (inclusion bodies). В таких тельцах включений (IBs) рекомбинантный белок находится в неактивном, часто денатурированном и связанном с рибосомами, нуклеиновыми кислотами и цитоплазматическими белками состоянии. Это значительно усложняет процесс получения целевого белка в биологически активной форме, при котором необходимо применять методы, связанные с денатурацией полипептидов и последующей ренатурацией уже очищенных препаратов (см. обзоры [1–3]). При этом выход активного белка из IBs, как правило, не превышает 10–20 %.

Однако проблемы, связанные с накоплением рекомбинантных белков в нерастворимом виде, не ограничиваются усложнением технологического

процесса и большими потерями целевого продукта. Полученные препараты могут содержать молекулы с измененными свойствами, поскольку рекомбинантный белок приходится солиubilизировать в жестких условиях с использованием мощных денатурирующих агентов, таких как гуанидинхлорид, мочевины и детергенты. Такие манипуляции могут неблагоприятно сказываться на структурно-функциональных и антигенных свойствах генно-инженерного продукта, что нежелательно при дальнейшем использовании его как для изучения физико-химических и биологических свойств, так и получения препаратов для медицинских целей. Поэтому для решения проблем, связанных с синтезом рекомбинантных белков в нерастворимом виде, исследователи наряду с оптимизацией методов выделения активного белка из IBs разрабатывают стратегии, обеспечивающие накопление целевого продукта в бактериальной клетке в растворимом виде.

Одним из подходов, способствующих накоплению рекомбинантных белков в растворимой форме, является увеличение в бактериальной клетке концентрации молекулярных шаперонов, участвующей

щих в фолдинге белка, например, GroEL/GroES, DnaJ/DnaK [4—6], что достигается их коэкспрессией с целевым продуктом.

Показано, что такие параметры, как специфическая скорость роста и эффективность синтеза рекомбинантного продукта могут влиять на его растворимость [7]. Эти и другие показатели во многом зависят от условий культивирования продуцента, в частности, состава питательной среды, температурного режима культивирования продуцента, уровня аэрации и т. д. Так, добавление в питательную среду этанола [8, 9], а также неметаболизируемых сахаров, например сахарозы [10—12], в некоторых случаях позволило добиться ожидаемого результата. Внесение в питательную среду в условиях осмотического шока таких химических шаперонов, как глицинбетаин, сорбит и др., также может способствовать получению рекомбинантного белка в растворимом виде [13, 14]. В работе [15] авторами продемонстрировано, что при культивировании продуцента в бедной среде целевой белок образовывался в виде IBs, в то время как в богатой среде — в растворимом виде. Использование некоторых технологических приемов, в частности, снижение температуры культивирования клеток штамма-продуцента [5, 16—19], pH среды [20] и концентрации индуктора [10, 12, 21] также может способствовать накоплению рекомбинантного белка в растворимой форме.

Несмотря на большой интерес к решению проблемы биосинтеза рекомбинантных белков в нерастворимом виде, процесс образования IBs еще мало изучен. Поэтому поиск факторов, влияющих на получение рекомбинантных белков в растворимом виде, помогает приблизиться к пониманию данного процесса и создавать технологии, позволяющие получать рекомбинантные белки в активной растворимой форме, что является актуальной задачей при выполнении работ как фундаментального, так и прикладного характера.

Целью данной работы явилось изучение влияния различных концентраций глицерина в составе богатой питательной среды на уровень синтеза и растворимость рекомбинантного белка в модельной системе биосинтеза метионинаминопептидазы (MAP) *E. coli*.

Материалы и методы. В качестве продуцента в работе использовали полученный ранее штамм *E. coli* BL21 (*pET-MAP*) [18], несущий плазмиду *pET-MAP* с геном *map* под контролем промотора гена *10* фага T7. Плазида сконструирована на основе вектора *pET-24a(+)* (Kan^R) («Novagen», США) и трансформирована в штамм *E. coli* BL21 (DE3) (*F', ompT, hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻ gal dcm)*) (DE3).

Среды. Бактериальную культуру выращивали в разработанной нами ранее питательной среде ПВ40 [18] с добавлением канамицина до конечной концентрации 50 мкг/мл. Для индукции синтеза целевого продукта в среду вносили раствор изопропил- β -D-тиогалактозида (ИПТГ) до конечной концентрации 1 мМ, а также глицерин — до заданной концентрации.

Культивирование продуцента. Питательную среду засеивали инокулятом *E. coli* BL21 (*pET-MAP*), предварительно выращенным в термостате при температуре 37 °С в течение ночи. Соотношение объема инокулята к объему среды составляло 1:10. Культуру выращивали на качалке в условиях интенсивной (160 об/мин) аэрации при температуре 37 °С до заданной оптической плотности (ОП) и индуцировали синтез рекомбинантного белка добавлением раствора ИПТГ. Затем продолжали культивирование продуцента в этих же условиях в течение ~18 ч. Глицерин в зависимости от условий эксперимента добавляли в среду перед инокуляцией, при достижении культурой ОП 0,5, 1,0, а также одновременно с индуктором.

Электрофоретический анализ растворимой и нерастворимой фракций клеточных белков, суммарных белков плазмидосодержащих клеток осуществляли, как описано ранее [17]. На полиакриламидный гель (ПААГ) наносили образцы в количестве, эквивалентном 5 мкл клеточной суспензии.

Оптическую плотность культуры определяли на фотоколориметре КФК-3 (Российская Федерация) при $\lambda = 540$ нм с длиной оптического пути 1 см.

Результаты и обсуждение. В качестве объекта для изучения влияния различных концентраций глицерина в составе богатой питательной среды на выход и растворимость рекомбинантного белка в клетках *E. coli* выбрана ранее разработанная нами система экспрессии MAP *E. coli* на основе РНК-полимеразы фага T7 [18]. MAP (ЕС 3.4.11.18) кодируется геном *map* и содержит 264 аминокислотных остатка. Она удаляет N-концевой метионин у большинства растущих полипептидов на ранних стадиях белкового синтеза в клетках *E. coli*. При разработке технологии получения рекомбинантной MAP нами установлено, что в процессе биосинтеза она накапливается в бактериальных клетках преимущественно в нерастворимом виде.

Выбор глицерина в качестве фактора, способного положительно влиять на выход и растворимость рекомбинантного продукта, сделан на следующих основаниях. Известны случаи, когда его добавление в питательную среду обеспечивало более эффективный синтез целевого белка [22—25].

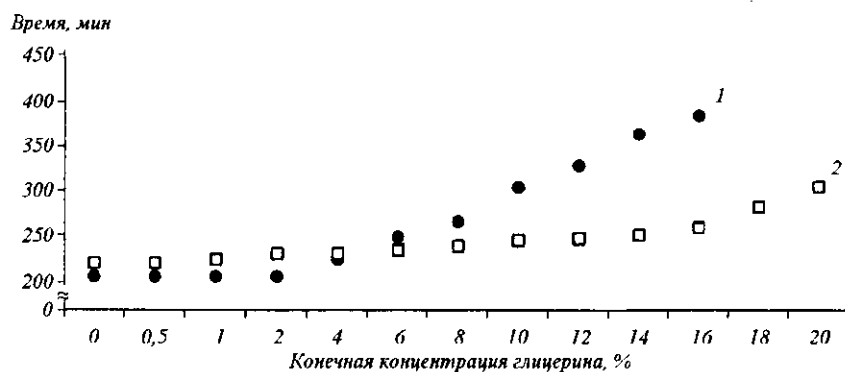


Рис. 1. Влияние различных концентраций глицерина на время роста культуры BL21 (*pET-MAP*) от момента инокуляции до оптической плотности (ОП) 2,0. Глицерин добавлен в среду: 1 — перед инокуляцией; 2 — при достижении культурой ОП 0,5

Так, внесение глицерина в богатую питательную среду до конечной концентрации 0,5 % позволило нам на 30 % увеличить выход рекомбинантного альфа-2b интерферона человека [25]. Глицерин является бедным источником углерода, поэтому маловероятно, что наблюдаемое увеличение выхода целевого продукта связано с повышением энергетической и питательной ценности среды. Недавно показано [23], что углеводы могут усиливать экспрессию чужеродных генов, индуцируя осмотические стрессовые ответы в клетках *E. coli*. Известно, что в результате осмотического стресса повышается уровень фактора σ^s — сигма-субъединицы РНК-полимеразы, контролирующего экспрессию более 50 генов, вовлеченных в клеточный ответ на стресс (см. обзор [26]). В их числе могут быть гены, кодирующие факторы, которые тем или иным способом положительно влияют на экспрессию целевого продукта. Кроме того, глицерин, являясь химическим шапероном, как известно, стабилизирует белки *in vitro* и *in vivo*, а также влияет на процесс сборки белка, регулируя фолдинговую активность таких молекулярных шаперонов, как GroEL, DnaK и ClpV [27].

В данной работе изучали влияние глицерина на скорость роста культуры, выход и растворимость МАР. Глицерин вносили в питательную среду до конечной концентрации 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 14; 16; 18 и 20 %. В контрольный вариант глицерин не добавляли. Поскольку ранее нами установлено, что снижение температуры культивирования продуцента МАР BL21 (*pET-MAP*) после индукции синтеза целевого белка до 21 °С способствует накоплению МАР в растворимой форме [18], продуцент культивировали при 37 °С.

В первой серии экспериментов клетки культивировали в присутствии глицерина с момента инокуляции. Культуру выращивали до ОП 2,0 и учитывали время, за которое она выросла на среде с

разными концентрациями глицерина до данной величины оптической плотности. Анализ полученных результатов показал, что наличие в питательной среде глицерина в концентрации до 2 % не влияет на скорость роста культуры BL21 (*pET-MAP*) (рис. 1, кривая 1). Глицерин в конечной концентрации выше 4 % существенно угнетал рост штамма-продуцента, причем это имело четкую концентрационную зависимость. В вариантах с содержанием глицерина 18 и 20 % культура *E. coli* BL21 (*pET-MAP*) выросла только до ОП ~0,6, поэтому на диаграмме (рис. 1, кривая 1) значение времени, за которое она достигли ОП 2,0 не указано.

Для индукции синтеза рекомбинантного белка при достижении клетками ОП 2,0 в среду добавляли раствор ИПТГ и продолжали культивировать штамм-продуцент при температуре 37 °С в течение 18 ч. Выход МАР определяли электрофоретическим анализом, в результате которого показано, что внесение глицерина в среду при инокуляции в концентрации 0,5 % не приводит к снижению выхода целевого белка по сравнению с контролем (без добавления глицерина). При концентрации же глицерина от 1 до 8 % количество синтезированной МАР в образцах приблизительно одинаковое и несколько ниже, чем в контроле. Близкий между собой, но еще более низкий выход МАР наблюдается при концентрации глицерина от 10 до 16 % (рис. 2). Таким образом, нами установлено, что в условиях данного эксперимента глицерин в конечной концентрации 4 % и выше угнетает рост штамма-продуцента *E. coli* BL21 (*pET-MAP*). При этом степень негативного воздействия глицерина на ростовые свойства культуры возрастает с повышением концентрации глицерина в среде. При добавлении глицерина в концентрации выше 1 % снижается и выход рекомбинантного белка. Примеры отрицательного влияния глицерина на выход

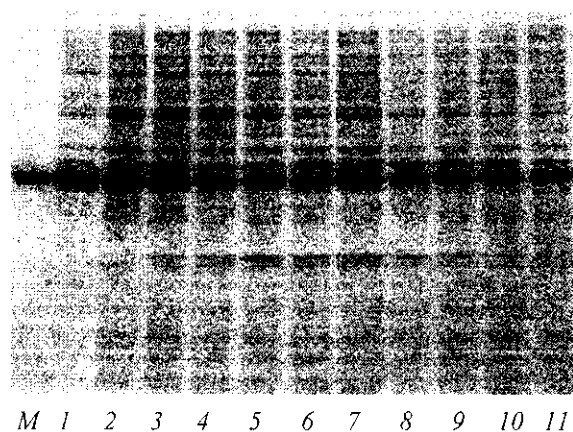


Рис. 2. Электрофореграмма образцов клеток *E. coli* BL21 (*pET-MAP*), культивированных в присутствии различных концентраций глицерина: 1 — 0; 2 — 0,5; 3 — 1; 4 — 2; 5 — 4; 6 — 6; 7 — 8; 8 — 10; 9 — 12; 10 — 14 и 11 — 16 %; м — маркер MAP

целевых продуктов описаны и в работах [28, 29]. В результате исследований нами также установлено, что глицерин способствует накоплению целевого белка в растворимой форме при концентрации выше 6 %.

Однако положительное воздействие на растворимость рекомбинантного белка глицерин оказывал в концентрациях, угнетающих как рост бактериальных клеток, так и синтез целевого белка. А это существенно сказывалось на его конечном выходе. В данных экспериментах штамм-продуцент *E. coli* BL21 (*pET-MAP*) выращивали в присутствии глицерина с момента инокуляции, однако не было известно, влияет ли время внесения глицерина в питательную среду на исследуемые параметры. Поэтому мы исследовали влияние на скорость роста культуры, выход и растворимость MAP не только различных концентраций глицерина, но и оптической плотности культуры, при которой он добавляется в среду.

Для этого глицерин до разных конечных концентраций вносили в среду при достижении культурой *E. coli* BL21 (*pET-MAP*) ОП 0,5 с последующей индукцией синтеза MAP при ОП 2,0. Полученные данные показали (рис. 1, кривая 2), что в таких условиях эксперимента угнетение роста клеток носит менее выраженный характер. Даже в вариантах с содержанием глицерина 18 и 20 % культура выросла до ОП 2,0, в то время как при выращивании продуцента в присутствии таких же концентраций глицерина, но внесенного в среду не при достижении ОП культурой 0,5, а перед инокуляцией, продуцент вырос только до ОП ~0,6. Близкие результаты получены при добавлении гли-

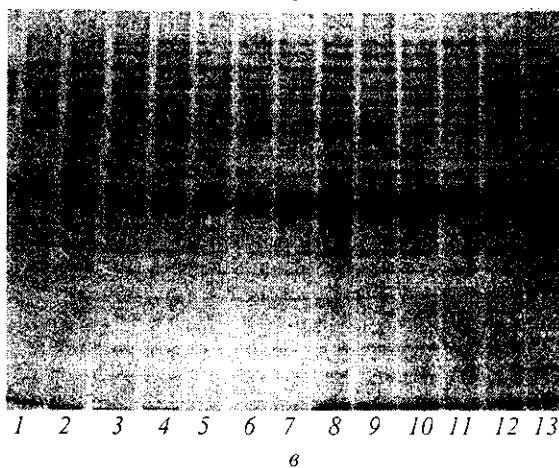
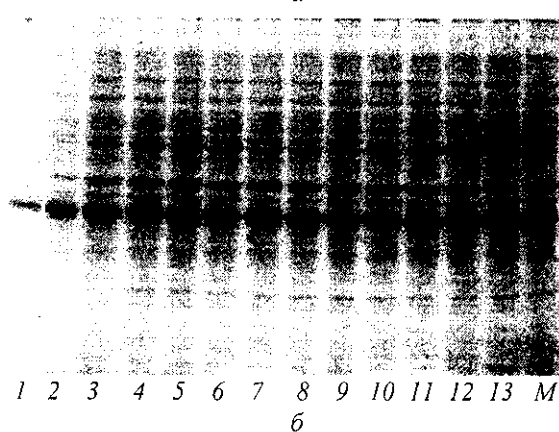
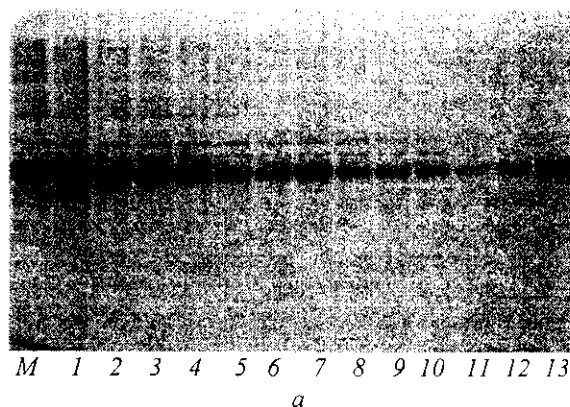


Рис. 3. Электрофореграмма образцов белковых фракций клеток *E. coli* BL21 (*pET-MAP*), культивированных после индукции в присутствии различных концентраций глицерина: 1 — 0; 2 — 0,5; 3 — 1; 4 — 2; 5 — 4; 6 — 6; 7 — 8; 8 — 10; 9 — 12; 10 — 14; 11 — 16; 12 — 18 и 13 — 20 %; а — суммарные белки клетки; б — фракция нерастворимых белков; в — фракция растворимых белков; м — маркер MAP

церина при ОП 1,0. И хотя нам удалось добиться снижения угнетения роста клеток штамма-продуцента и добавление глицерина способствовало накоплению рекомбинантного белка в растворимом

виде (рис. 3, а, б), увеличения выхода МАР с единицы объема по сравнению с контролем мы не наблюдали.

В результате дальнейших исследований установлено, что наиболее благоприятным моментом внесения глицерина является добавление его одновременно с индуктором. На рис. 3 представлены электрофореграммы образцов, полученных в одном из таких экспериментов. Эти данные свидетельствуют о том, что добавление глицерина в момент индукции положительно влияет на выход белка во всем диапазоне используемых концентраций глицерина (рис. 3, а). Нами установлено, что культивирование клеток в его присутствии способствует накоплению рекомбинантного белка в растворимом виде. Показано, что обнаруженный эффект имеет концентрационную зависимость. Так, на электрофореграммах (рис. 3, а, б) продемонстрировано, что при увеличении концентрации глицерина в составе культуральной среды количество МАР уменьшается во фракции нерастворимых и увеличивается во фракции растворимых белков. Конечный выход растворимого белка зависит от того, при какой ОП культуры добавляли глицерин в культуральную среду. Однако этот параметр влияет не на проявление эффекта глицерина, а на общий выход рекомбинантного белка, в том числе растворимого.

Таким образом, в представленном исследовании показано, что культивирование продуцента в присутствии глицерина может существенно увеличивать выход рекомбинантного белка в растворимой форме. Установлено, что на эффективность этого процесса влияют такие параметры, как концентрация глицерина и время его внесения в питательную среду. Разработанные в данной работе технологические подходы могут быть использованы для получения других рекомбинантных белков в растворимой форме в клетках *E. coli*.

I. Yu. Slavchenko, E. V. Boreyko, N. V. Vorobey

Influence of various glycerol concentrations on the yield and solubility of the *Escherichia coli* recombinant methionine aminopeptidase

Summary

The influence of glycerol on the yield and solubility of a recombinant protein in a model system of *E. coli* methionine aminopeptidase (MAP) overproduction using the bacteriophage T7 RNA polymerase has been investigated. We have found, that glycerol added in a rich medium may inhibit the producer growth, promote the MAP accumulation in a soluble form and influence the target product yield. It has been shown, that manipulation of such parameters as glycerol concentration and culture optical density, when glycerol is added to the medium, allows purposely to increase the MAP yield in a soluble form. The approaches developed may be applicable for the production of other recombinant proteins in *E. coli* cells.

I. Ю. Славченко, О. В. Борејко, Н. В. Воробей

Вплив різних концентрацій гліцерину на вихід і розчинність рекомбінантної метіонінамінопептидази *Escherichia coli*

Резюме

Вивчали вплив гліцерину на вихід і розчинність рекомбінантного білка в модельній системі суперсинтезу метіонін-амінопептидази (МАР) *E. coli* з використанням РНК-полімерази фага Т7. Виявлено, що гліцерин у складі багатого поживного середовища може пригнічувати ріст штаму-продуцента, сприяти накопиченню цільового продукту в розчинній формі і впливати на його вихід. Показано, що маніпулювання такими параметрами, як концентрація гліцерину і оптична густина культури, при якій його вносять у середовище, дозволяє цілеспрямовано підвищувати вихід МАР у розчинній формі. Розроблені в даному дослідженні підходи можна використовувати для одержання інших рекомбінантних білків у клітинах *E. coli*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Middelberg A. P. Preparative protein refolding // Trends Biotechnol.—2002.—20, N 10.—P. 437—443.
2. Misawa S., Kumagai I. Refolding of therapeutic proteins produced in *Escherichia coli* as inclusion bodies // Biopolymers.—1999.—51, N 4.—P. 297—307.
3. Mukhopadhyay A. Inclusion bodies and purification of proteins in biologically active forms // Adv. Biochem. Eng. and Biotechnol.—1997.—56.—P. 61—109.
4. Schlieker C., Bukau B., Mogk A. Prevention and reversion of protein aggregation by molecular chaperones in the *E. coli* cytosol: implications for their applicability in biotechnology // J. Biotechnol.—2002.—96, N 1.—P. 13—21.
5. Chao Y. P., Chiang C. J., Lo T. E., Fu H. Overproduction of D-hydantoinase and carbamoylase in a soluble form in *Escherichia coli* // Appl. Microbiol. Biotechnol.—2000.—54, N 3.—P. 348—353.
6. Amrein K. E., Takacs B., Stieger M., Molnos J., Flint N. A., Burn P. Purification and characterization of recombinant human p50csk protein-tyrosine kinase from an *Escherichia coli* expression system overproducing the bacterial chaperones GroES and GroEL // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1995.—92, N 4.—P. 1048—1052.
7. Shin C. S., Hong M. S., Kim D. Y., Shin H. C., Lee J. Growth-associated synthesis of recombinant human glucagon and human growth hormone in high-cell-density cultures of *Escherichia coli* // Appl. Microbiol. and Biotechnol.—1998.—49, N 4.—P. 364—370.
8. Thomas J. G., Baneyx F. Divergent effects of chaperone overexpression and ethanol supplementation on inclusion body formation in recombinant *Escherichia coli* // Protein Exp. Purif.—1997.—11, N 3.—P. 289—296.
9. Nygaard F. B., Harlow K. W. Heterologous expression of soluble, active proteins in *Escherichia coli*: the human estrogen receptor hormone-binding domain as paradigm // Protein Exp. Purif.—2001.—21, N 3.—P. 500—509.
10. Sawyer J. R., Schlom J., Kashmiri S. V. The effects of induction conditions on production of a soluble anti-tumor sFv in *Escherichia coli* // Protein. Eng.—1994.—7, N 11.—P. 1401—1406.
11. Georgiou G., Valax P., Ostermeier M., Horowitz P. M. Folding and aggregation of TEM beta-lactamase: analogies with the formation of inclusion bodies in *Escherichia coli* // Protein Sci.—1994.—3, N 11.—P. 1953—1960.
12. Bowden G. A., Georgiou G. Folding and aggregation of

- beta-lactamase in the periplasmic space of *Escherichia coli* // J. Biol. Chem.—1990.—265, N 28.—P. 16760—16766.
13. Barth S., Huhn M., Matthey B., Klimka A., Galinski E. A., Engert A. Compatible-solute-supported periplasmic expression of functional recombinant proteins under stress conditions // Appl. Environ. and Microbiol.—2000.—66, N 4.—P. 1572—1579.
 14. Blackwell J. R., Horgan R. A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form // FEBS Lett.—1991.—295, N 1—3.—P. 10—12.
 15. Moore J. T., Uppal A., Maley F., Maley G. F. Overcoming inclusion body formation in a high-level expression system // Protein Exp. Purif.—1993.—4, N 2.—P. 160—163.
 16. Schein C. H., Noteborn M. H. M. Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature // Biotechnology.—1988.—N 6.—P. 291—294.
 17. Славченко И. Ю., Борейко Е. В., Гавриш Т. Г., Костюченко И. П., Кордюм В. А. Биосинтез основного фактора роста фибробластов человека в клетках *Escherichia coli* и его очистка // Біополімери і клітина.—2003.—19, № 2.—С. 179—184.
 18. Славченко И. Ю., Борейко Е. В., Воробей Н. В., Гавриш Т. Г., Пехота Е. Н., Кордюм В. А. Суперсинтез и очистка метионинаминопептидазы *Escherichia coli* // Біополімери і клітина.—2003.—19, № 3.—С. 274—280.
 19. Славченко И. Ю., Борейко Е. В., Воробей Н. В., Черных С. И., Кордюм В. А. Суперсинтез растворимого альфа-2b интерферона человека в клетках *Escherichia coli* с использованием системы экспрессии на основе РНК-полимеразы фага T7 // Біополімери і клітина.—2003.—19, № 4.—С. 367—373.
 20. Sugimoto S., Yokoo Y., Hatakeyama N., Yotsuji A., Teshiba S., Hagino H. Higher culture pH is preferable for inclusion body formation of recombinant salmon growth hormone in *Escherichia coli* // Biotechnol. Lett.—1991.—13.—P. 385—388.
 21. Yang Q. H., Wu C. L., Lin K., Li L. Low concentration of inducer favors production of active form of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in *Escherichia coli* // Protein Exp. Purif.—1997.—10, N 3.—P. 320—324.
 22. Park S. J., Gunsalus R. P. Oxygen, iron, carbon, and superoxide control of the fumarase *fumA* and *fumC* genes of *Escherichia coli*: role of the *arcA*, *fnr*, and *soxR* gene products // J. Bacteriol.—1995.—177, N 21.—P. 6255—6262.
 23. Kagawa N., Cao Q. Osmotic stress induced by carbohydrates enhances expression of foreign proteins in *Escherichia coli* // Arch. Biochem. and Biophys.—2001.—393, N 2.—P. 290—296.
 24. Leandro P., Lechner M. C., Tavares de Almeida I., Konecki D. Glycerol increases the yield and activity of human phenylalanine hydroxylase mutant enzymes produced in a prokaryotic expression system // Mol. Genet. Metab.—2001.—73, N 2.—P. 173—178.
 25. Славченко И. Ю. Влияние органических источников углерода на синтез рекомбинантного белка в клетках *Escherichia coli* // Біополімери і клітина.—2002.—18, № 4.—С. 334—339.
 26. Hengge-Aronis R. Back to log phase: σ^S as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli* // Mol. Microbiol.—1996.—21, N 5.—P. 887—893.
 27. Diamant S., Eliahu N., Rosenthal D., Goloubinoff P. Chemical chaperones regulate molecular chaperones *in vitro* and in cells under combined salt and heat stresses // J. Biol. Chem.—2001.—276, N 43.—P. 39586—39591.
 28. Eppler T., Boos W. Glycerol-3-phosphate-mediated repression of *malT* in *Escherichia coli* does not require metabolism, depends on enzyme PA^{Glc} and is mediated by cAMP levels // Mol. Microbiol.—1999.—33, N 6.—P. 1221—1231.
 29. Fang A., Demain A. L. Influence of aeration and carbon source on production of microcin B17 by *Escherichia coli* ZK650 // Appl. Microbiol. and Biotechnol.—1997.—47, N 5.—P. 547—553.

УДК 579.258 + 577.124
Надійшла до редакції 20.08.03