

УДК 577.112.083

ГЕНО-ИНЖЕНЕРНЫЙ СИНТЕЗ МУТАНТНОГО ДИФТЕРИЙНОГО ТОКСИНА CRM197: ВЛИЯНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА В КЛЕТКАХ *E. coli*

© 2024 г. С. О. Рогожкин¹*, А. С. Герасимов¹

¹Вятский государственный университет, Киров, 610000 Россия

*e-mail: usr22574@vyatsu.ru

Поступила в редакцию 02.02.2024 г.

После доработки 22.02.2024 г.

Принята к публикации 22.02.2024 г.

CRM197 (Cross Reacting Material 197) представляет собой неактивную форму экзотоксина *Corynebacterium diphtheriae*, используемого в качестве белка-носителя для производства конъюгированных полисахаридных вакцин и иммунотерапевтических препаратов. Развитие данных направлений требует разработки эффективной и рентабельной технологии получения CRM197 требуемого качества. Разработан высокоэффективный метод получения рекомбинантного CRM197 в виде гибрида с белком-партнером SUMO в клетках *E. coli*, позволяющий синтезировать более 3 г/л в виде телец включения. Было показано существенное влияние типа экспрессионного вектора, условий гетерологичной экспрессии гена и культивирования продуцента на его растворимость. В результате снижения температуры культивирования и использования промотора гена, кодирующего белок теплового шока CspA, а количество растворимого SUMO-CRM197 составило более 30% от общего белка при уровне биосинтеза около 2 г/л. Коэкспрессия целевого гена с геном дисульфид-изомеразы DsbC *E. coli*, позволила получить целевой белок полностью в растворимом состоянии и выходом более 1.4 г/л. Полученные результаты могут стать основой для разработки перспективной отечественной технологии получения CRM197.

Ключевые слова: CRM197, *E. coli*, рекомбинантные белки, конъюгированные вакцины, экспрессионный вектор

DOI: 10.31857/S0555109924040085 EDN: SALHWX

Вакцины является одним из приоритетных направлений развития фармацевтической биотехнологии. Однако разработка новых иммунологических препаратов, обладающих улучшенными профилями активности, эффективности и безопасности, вместе с относительно простыми и рентабельными технологиями их производства, является сложной мультидисциплинарной задачей. В настоящее время актуально направлять исследования также на разработку технологических платформ, обеспечивающих производство нескольких вакцин по однотипной технологии. Примером является производство конъюгированных полисахаридных вакцин на основе мутантного дифтерийного токсина CRM197.

CRM197 (Cross Reacting Material 197) – нетоксичная форма дифтерийного токсина, находящая свое широкое применение как в фундаментальной науке, так и в медицине. Его использование в качестве адъюванта приводит к образованию T-зависимого иммунного ответа, и существенно увеличивает иммуногенность антигенов [1]. Этот факт

делает данную молекулу идеальным белком-носителем. Разработка и производство вакцин на основе CRM197 интенсивно развивается. Примером является разработка рекомбинантных пептидных и терапевтических вакцин, в которых в качестве антигена выступают фрагменты белковой природы. Серьезным фактором, препятствующим развитию разработки иммунологических препаратов на основе CRM197, является сложность его получения в требуемых количествах. Отсутствие рентабельной и эффективной технологии получения белка-носителя можно назвать критическим фактом, препятствующим развитию прогресса в данной области.

Современные тенденции биофармацевтической промышленности ограничивают применение дифтерийной палочки *Corynebacterium diphtheriae* в качестве продуцента. Развитие методов генной инженерии сделало возможным получение рекомбинантного CRM197. Однако существующие технологии плохо воспроизводимы в промышленном масштабе и требуют высоких затрат на их осуществление. Анализ научной и патентной литературы

показал, что существуют различные способы получения рекомбинантного CRM197 в бактериальных и дрожжевых системах экспрессии. Например, были предприняты попытки экспрессии гена CRM197 в *B. subtilis*, с использованием сигнальной последовательности субтилилина для секреции в культуральную среду. Ввиду низкой продуктивности, порядка 7.1 мг/л, этот организм оказался не перспективным [2]. Большинство результатов по высокопродуктивному биосинтезу CRM197 были получены на клетках *E. coli*. Система экспрессии на основе промотора T7 РНК-полимеразы является наиболее используемой в производстве фармацевтических белков. При получении CRM197, целевой продукт накапливался в виде нерастворимых телец включения, что требует дальнейшего проведения низкоэффективной процедуры рефолдинга [3, 4]. Однако в работе [5] описали способ получения CRM197 путем его секреции в периплазматическое пространство, с использованием лидерных сигнальных последовательностей (восемь SRP-зависимых, две Sec-зависимые и две сигнальные последовательности грамм-положительных бактерий *Streptococcus pneumoniae*). Вектор, несущий конструкцию FlgI–CRM197, оказался наиболее эффективным, а выход составил свыше 1 г/л в условиях биореактора и культивирования с подпиткой [5]. В остальных работах, доступных на данный момент, выход целевого продукта составлял порядка 100–300 мг/л, причем в подавляющем большинстве случаев, в виде телец включения.

Для получения CRM197 также активно используется технология гибридной экспрессии. Например, при использовании белка-партнера SUMO и при культивировании продуцента на среде, содержащей сорбитол, удалось получить небольшое количество целевого продукта в растворимом состоянии. Однако, несмотря на возможность получения целевого белка в растворимом состоянии, выход продукта оказался незначительным [6]. К тому же использование стадии ферментативного расщепления при помощи специфической Upr1-гидролазы, делало этот процесс нерентабельным при соответствующих выходах.

Среди факторов, положительно влияющих на выход CRM197, можно выделить следующие: оптимизация кодонного состава целевого гена, подбор оптимального хозяйского штамма *E. coli*, оптимизация условий культивирования продуцента. Например, Ходак с соавт. [7] показали повышения уровня экспрессии целевого гена в несколько раз путем оптимизации кодонного состава. Дизайн 5'-конца мРНК, с целью снижения вероятности образования трудноплавких вторичных структур, позволил достичь выхода целевого продукта до 270 мг/л. Вторым примером может быть использование штаммов с мутациями в генах оксидоредуктаз *trxB* и *gor*. Известно, что молекула CRM197

имеет 2 дисульфидные связи в положениях Цис186–Цис201 и Цис461–Цис471, причем первая пара остатков цистеина экспонирована на поверхности белка и является потенциальной проблемой образования ковалентных агрегатов и телец включения при сверхэкспрессии в *E. coli*. Использовании штаммов с более высоким внутриклеточным окислительно-восстановительным потенциалом, таких как OrigamiB (DE3) или ShuffleT7 (DE3) позволяет решить данную проблему. Хотя данные штаммы и отличаются низкой продуктивностью как по целевому продукту, так и по скорости накопления клеточной биомассы, все же используются в крупномасштабном производстве [7, 8]. Следовательно, необходимо изучение других факторов, влияющих на уровень биосинтеза целевого продукта, а также его растворимость.

Следует отметить, что авторы многих исследований отмечают факт влияния особенностей реализации транскрипции и трансляции. В настоящей работе была поставлена задача изучить влияние процессов транскрипции и трансляции на уровень биосинтеза целевого белка, используя в качестве модельного белка гибрид CRM197 с белком-партнером SUMO.

МЕТОДИКА

Для всех экспериментов использовались реактивы высокого качества, марки “Для анализа” (“Sigma-Aldrich”, США), если не указано иное. Для приготовления питательных сред использовались компоненты “Becton Dickinson”, (США). Для генной инженерии использовались ферменты производства “Thermo Fisher Scientific” (США). Все генно-инженерные эксперименты проводились на клетках *E. coli* XL1-Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F'*proAB lacIqZΔM15 Tn10* (Tetr)]) (“Stratagene”, США), для бактериальной экспрессии – штамм BL21(DE3) [F– *ompT hsdSB (rB– mB–) gal dcm* (DE3)] (“Novagen”, США).

Конструирование экспрессионных векторов, содержащих ген CRM197. Приготовление компетентных клеток и трансформацию *E. coli*, выделение плазмидной ДНК, гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции, лигирование и другие генноинженерные манипуляции проводили согласно стандартным методикам [9]. Химический синтез олигонуклеотидов, а также контрольное секвенирование полученных конструкций проведены “Евроген” (Россия).

Ген дифтерийного токсина (Uniprot #Q5PY51) с точечной мутацией “Гли52Глу” и 5'-концевой последовательностью гена SUMO, содержащего 6 остатков гистидина, был оптимизирован при помощи онлайн ресурса “GenSmart™” (“Genscript”, США). Гибридный ген был фланкирован сайтами рестрикции *NdeI* и *XhoI*, содержание GC

нуклеотидов – 52%. Последовательность гена SUMO-CRM197 при помощи программы “DNABuilder” была разбита на взаимно перекрывающиеся олигонуклеотидные праймеры длиной 50 нуклеотидов (перекрывание – 15 нуклеотидов). Сборку гена осуществляли методом ПЦР, используя в качестве матрицы смесь олигонуклеотидов (по 0.1 мкМ каждого) и высокоточную полимеразу Phusion, согласно протоколу изготовителя. Далее, полученные фрагменты ДНК были очищены при помощи набора QIAquick PCR Purification Kit (“Qiagen”, Германия), гидролизованы рестриктазами *NdeI* и *XhoI* и клонированы в векторы pET9a (+), pET39b (+) – оба “Novagen” (США), pGEMEX1 – “Stratagene” (США) и pCOLDIII – “TakaraBio” (Япония), также обработанные соответствующими ферментами.

Анализ уровня экспрессии гена SUMO-CRM197. Трансформацию бактериальных клеток *E. coli* BL21(DE3) для экспериментов по экспрессии проводили согласно стандартному протоколу с использованием 0.1 М раствора хлорида кальция [9]. Все эксперименты по экспрессии проводили в 24-луночных планшетах с использованием системы Duetz в шейкере-инкубаторе “Kuhner ISFX-1” (“Kuhner”, Швейцария) [10]. Трансформанты культивировали на среде TBP (12 г/л триптона, 24 г/л дрожжевого экстракта, 100 мМ калий фосфатного буфера, pH 7.0), содержащей либо ампициллин (для pGEMEX1 и pCOLDIII, 100 мкг/мл), либо канамицин (для pET9a (+) и pET39b (+), 50 мкг/мл) до достижения оптической плотности (OP_{550}) 1.5–2 единицы. Затем добавляли раствор ИПТГ до конечных концентраций 0, 0.01, 0.05, 0.25 и 1 мМ. Одновременно проводили эксперимент на автоиндукционной среде TBP-5052, согласно работе [11]. Клетки выращивали при температуре в пределах 15–37°C (в зависимости от генетической конструкции) в течение 16 ч. Содержание целевого белка анализировали методом дот-иммуноблоттинга [12], используя мышиные моноклональные антитела против полигистидинового тэга, конъюгированные с пероксидазой хрена (A7058, “Sigma”, США). Для этого образцы биомассы получали осаждением клеток центрифугированием при 5000 g, 2 мин, предварительно нормализовав объемы культур по конечной оптической плотности (из расчета 100 мкл при OP_{550} 15 ед.). Затем клетки лизировали в 1 мл TES-буфера (100 мМ Трис-НСl, pH 6.8, 1% ДДС-Na, 10 мМ ЭДТА), и 10 мкл лизата наносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C0.45 мкм (“Cytiva”, Швеция). Мембрану высушивали на воздухе и блокировали 5%-ным раствором сухого обезжиренного молока в TBST-буфере в течение 1 ч. Мембрану инкубировали с моноклональными антителами в разведении 1 : 1000 в течение 1 ч, после отмывали буфером TBST (4 раза по 5 минут). Визуализацию проводили с помощью готового хромогенного субстрата для

мембран (T0565, “Sigma”, США). Денситометрический анализ мембраны осуществляли при помощи программы ImageJ (www.imagej.net). В качестве положительного контроля и полуколичественной оценки уровня экспрессии целевого гена использовали очищенный SUMO-CRM197 с известной концентрацией и разведенный в клеточном лизате хозяйского штамма BL21(DE3), не содержащем экспрессионных векторов.

Фракционирование белков из клеток *E. coli*. Биомассу *E. coli*, из 1 мл культуры содержащую целевой белок суспендировали в лизирующем буфере (50 мМ Трис-НСl, pH 8.0, 150 мМ NaCl, 500 мМ сахарозы, 1 мМ ЭДТА, 0.2% Тритона X-100) в соотношении 1 г биомассы: 15 мл раствора. Суспензию переносили в пробирки (2 мл), добавляли 5 мкл раствора лизоцима (10 мг/мл), PMSF до концентрации 0.5 мМ и проводили 3 цикла “замораживания–оттаивания”. Для снижения вязкости лизат трижды обрабатывали ультразвуком в течение 3–5 с, с перерывом между циклами 2–3 мин. Во время всего процесса пробирки находились на ледяной бане. Затем 100 мкл лизата центрифугировали в течение 10 мин при 12000 g и 4°C. Супернатант (растворимый белок) отбирали в отдельную пробирку и добавляли 400 мкл TES-буфера. Для получения раствора белка из телец включения осадок растворяли в 500 мкл TES-буфера. Для получения образца общего белка 100 мкл лизата до центрифугирования смешивали с 400 мкл TES-буфера. Образцы прогревали в течение 5 мин при 90°C. Локализацию целевого белка оценивали методом денатурирующего гель-электрофореза по методу Лэммли (14%-ный разделяющий и 8%-ный формирующий гели) и гель-документирующей системы “ChemiDoc MP” (“Bio-Rad”, США).

Анализ факторов, влияющих на повышение уровня экспрессии SUMO-CRM197 в растворимой форме. Эксперименты проводились на основе конструкций pCOLDIII, pET9a (+) и pET39b (+). Для продуцентов на основе pET-векторов было проведен анализ влияния сорбитола, согласно [6]. Для этой цели 100 колоний трансформантов культивировали одновременно в колбах Эрленмейера объемом 1 л на средах TBP или TBPS (TBP + 200 мМ сорбитола), объемом 100 мл, содержащих 50 мкг/мл канамицина. После достижения OP_{550} 1.5–2 ед. 50 мл клеточной культуры из каждой колбы переносили в две колбы Эрленмейера объемом 500 мл, а затем добавляли раствор ИПТГ до конечных концентраций 0.05 и 0.5 мМ. Дальнейшее культивирование проводили в течение 16 ч при 20 и 30°C для опытов с 0.05 и 0.5 мМ ИПТГ соответственно. Условия для трансформантов на основе pCOLDIII-вектора: температура культивирования – 15°C при концентрациях ИПТГ 0.05 и 0.1 мМ.

Для изучения влияния коэкспрессии дисульфид-изомеразы DsbC *E. coli*, штамм BL21(DE3)

котрансформировали экспрессионными векторами pCOLDIII_SUMO-CRM197 и pBA2219 [13]. 100 колоний трансформантов культивировали в колбе Эрленмейера объемом 1 л на среде ТВР, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 50 мкг/мл канамицина. После достижения оптической плотности (OP_{550}) 1.5–2 ед. по 50 мл клеточной культуры переносились в две колбы Эрленмейера объемом 500 мл, а затем добавляли раствор ИПТГ до конечных концентраций 0.05 и 0.1 мМ. Культивирование проводили при 15°C в течение 16 ч.

Все образцы биомассы, собранные из 1 мл культуры, фракционировали согласно описанной методике. Локализацию целевого белка оценивали методом денатурирующего гель-электрофореза по методу Лэммли (14%-ный разделяющий и 8%-ный формирующий гели) и гель-документирующей системы “ChemiDoc MP” (“Bio-Rad”, США). Биомассу с растворимым SUMO-CRM197 использовали для дальнейших экспериментов по выделению и очистке целевого белка.

Выделение и очистка рекомбинантного CRM197 из клеток *E. coli*. Среду ТВР объемом 100 мл, содержащую ампициллин (100 мкг/мл), инокулировали 50 колониями штамма *E. coli* BL21(DE3), трансформированного вектором pCOLDIII_SUMO-CRM197. Культуру выращивали при 37°C, 300 об./мин в течение 2–4 ч до достижения OP_{550} 1.5. Затем добавляли ИПТГ до конечной концентрации 0.05 мМ и снижали температуру культивирования до 15°C. Индукцию проводили в течение 16 ч. Биомассу отделяли с помощью центрифугирования при 8000 g, в течение 10 мин при 4°C, после чего осадок суспендировали в 35 мл лизирующего буфера (50 мМ Трис-НСl, pH 7.5, 300 мМ NaCl, 20 мМ имидазол, 0.5 мМ 2-меркаптоэтанол, 0.2% Тритон X-100, 0.5 мМ PMSF), клетки разрушали при помощи ультразвука (10 циклов по 30 с, перемены по 2 мин). После разрушения в полученный лизат добавляли 0.05% (об./об.) полиэтиленimina для удаления ДНК, и центрифугировали в течение 30 мин при 12000 g. Супернатант пропускали через фильтр с диаметром пор 0.45 мкм и наносили на колонку HiTrap Ni-sepharose HP (“Cytiva”, Швеция) объемом 5 мл, предварительно уравновешенную лизирующим буфером с использованием хроматографической системы АКТА Pure 25M (“Cytiva”, Швеция). Затем колонку последовательно промывали буфером А (50 мМ Трис-НСl, pH 7.5, 500 мМ NaCl, 40 мМ имидазола) – 10 объемов колонки, буфером В (50 мМ Трис-НСl, pH 7.0, 100 мМ NaCl, 40 мМ имидазола) – 10 объемов колонки. Затем элюцию проводили буфером С (50 мМ Трис-НСl, pH 7.0, 300 мМ NaCl, 200 мМ имидазола) и элюат сразу же переводили в буферный раствор (50 мМ Трис-НСl, pH 7.5, 100 мМ NaCl) на обессоливающую колонку PD10 (“Cytiva”, Швеция), согласно протоколу изготовителя. Препарат целевого белка

инкубировали с Ulp1-протеазой (1 : 1000) в течение 1 ч при комнатной температуре, и снова наносили на колонку HiTrap Ni-sepharose HP. CRM197 собирали как фракцию белков, не связавшихся с сорбентом и далее концентрировали на центрифужных картриджах Millipore с пределом отсечения молекулярных масс 30 кДа до концентрации 2.5 мг/мл. Полученный препарат CRM197 тестировался на наличие эндонуклеазной активности.

Определение эндонуклеазной активности рекомбинантного CRM197. Методика была оптимизирована с использование результатов работы [3]. На 1 реакцию добавляли 600 нг ДНК фага лямбда (SD0011, “ThermoScientific”, США), 2.5 мкг очищенного CRM197, 1 мкл 10-кратного реакционного буферного раствора (100 мМ Трис-НСl, 25 мМ CaCl₂, 25 мМ MgCl₂, pH 7.6). Объем реакционной смеси доводили до конечного объема 10 мкл при помощи деионизованной воды MQ. В случае отрицательного контроля одновременно добавляли 1 мкл 10-кратного стоп-буфера (200 мМ ЭДТА, pH 7.6). Пробирки инкубировали в воздушном инкубаторе при 37°C в течение 6, 20, 30, 44 ч. Результаты эксперимента анализировали в 0.8%-ном агарозном геле и при помощи гель-документирующей системы “ChemiDoc MP” (“Bio-Rad”, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Активная иммунизация признается одним из ключевых способов борьбы с распространением многих инфекционных заболеваний. Тем самым разработка и производство вакцинных препаратов являются релевантным направлением в развитии фармацевтической биотехнологии. Конъюгированные полисахаридные вакцины, в которых в качестве антигенов выступают капсульные полисахариды патогенных бактерий и дрожжей, занимают значительную часть всего наименования вакцин. Однако для их получения требуется производство иммуногенного белка-носителя, например CRM197.

CRM197, не активный мутант дифтерийного токсина, представляет собой глобулярный белок, состоящий из двух субъединиц: А (~21 кДа), и В (~37 кДа). Последняя, в свою очередь, несет рецептор-связывающий (R) и трансмембранный (T) домены. Между цистеинами в положениях 186–201 и 461–471 имеются две дисульфидные связи, которые важны для поддержания иммуногенной структуры [14].

В последнее время наблюдаются успешные варианты разработки пептидных вакцин [15], терапевтических онковакцин [16], препарата для лечения астмы на основе CRM197 [17]. Многие из них находятся уже в фазе клинических испытаний, и этот факт однозначно стимулирует развитие данной иммунотерапевтической платформы.

Более того, накопленный опыт по конъюгированию CRM197 с другими макромолекулами, и его способность проникать через гематоэнцефалический барьер, взаимодействуя с клеточными рецепторами, открывают перспективы разработки таргетной доставки лекарственных препаратов, для лечения болезни Альцгеймера или опухолей мозга. Исходя из вышеперечисленных аргументов можно предположить, что в будущем на основе CRM197 будут существовать десятки препаратов. Следовательно, эффективная и рентабельная технология его получения является важной задачей.

По оценкам, для удовлетворения потенциального спроса необходима технология, позволяющая достичь продуктивности не менее 1 г/л по целевому продукту. Однако, относительно большой размер молекулы, содержание трансмембранного региона, наличие дисульфидных связей вносят ряд значительных трудностей для его экспрессии в бактериальных клетках. Помимо продуктивности и экономических показателей, важной характеристикой технологии является ее воспроизводимость – способность от партии к партии получать продукт надлежащего и стабильного качества. Технологии, основанные на сложных живых системах в контексте производства высокомолекулярных и структурно детерминированных молекул белков, к сожалению, не являются таковыми *a priori*. Сложность заключается в поиске комбинации определенных факторов, которые оптимально влияют на эффективность процесса и качества продукта. Иначе говоря, на сложную живую систему, такую как клетка-продуцент, может влиять множество факторов, а процесс поиска сводится к тестированию множества вариантов на каждом этапе разработки. Сложность и относительная неэффективность данного подхода привела к смене парадигмы разработки “Quality by testing” (сокр. QbT, качество, достигаемое посредством тестирования) на парадигму “Quality by design” (сокр. QbD, качество, достигаемое посредством дизайна). Согласно последней, не только важно найти ключевые факторы и их комбинации, но также важно понимать каким образом или с какой закономерностью они влияют на данный процесс [18].

В настоящей работе, согласно парадигме QbD было решено оценить, как условия гетерологичной экспрессии могут повлиять на выход и растворимость мутантного дифтерийного токсина. В качестве объекта исследования был изучен биосинтез CRM197, слитого с белком-партнером SUMO. Гибридный белок, как показано в более ранних работах, можно экспрессировать в клетках *E. coli*, а при культивировании на среде, содержащей 200 мМ сорбитола, повысить его растворимость. Этот факт был интересен тем, что всего лишь один ключевой фактор, воздействуя на сложную систему, способен

изменить растворимость целевого белка при определенных условиях экспрессии.

Биосинтез гибридного белка SUMO-CRM197 и факторы, влияющие на его уровень генной экспрессии. Первоначально исходили из представлений о том, что продуцент представляет собой живую бактериальную клетку определенного штамма, трансформированную рекомбинантной ДНК, несущей целевой ген под контролем различных регуляторных элементов, а эффективность биосинтеза – это совокупная характеристика роста продуцента и внутриклеточного содержания целевого белка. Баланс между тем, сколько клеточной биомассы можно получить, и сколько целевого белка при этом будет содержаться в каждой клетке. На этот показатель может влиять множество факторов, например, цитотоксические свойства самого рекомбинантного белка, его внутриклеточная концентрация, эффективность репликации плазмиды, транскрипции и трансляции, а также любые ответные и регуляторные молекулярные механизмы хозяина. В этом случае преимуществом обладают индуцибельные системы экспрессии, позволяющие экспрессировать целевой ген и модулировать интенсивность его транскрипции только при добавлении индуктора в оптимальной концентрации в определенный момент времени роста культуры. Ген SUMO-CRM197 был клонирован в 2 вектора на основе промотора фага T7 – pET9a и pGEMEX1. Существенная разница между данными векторами – это селективные маркеры и копияемость (pET9a – среднекопийный, канамицин), pGEMEX1 (высококопийный, ампициллин). Также был использован вектор pCOLDIII на основе температурочувствительного промотора белков теплового шока CspA. Селективная индукция синтеза целевого белка происходит только при низкой температуре культивирования (15–20°C), что подавляло экспрессию других клеточных белков и снижало активность протеаз. Безусловно, являясь нативным промотором *E. coli*, он обладал меньшей транскрипционной активностью, чем промотор T7, однако вектор pCOLDIII содержал в своем составе TEE-элемент, повышающий эффективность трансляции, дающий в дальнейшем преимущество при трансляции мРНК [19].

В ходе анализа уровня экспрессии целевого гена при различных условиях, был описан различный уровень экспрессии целевого гена, который достигал значений более 3 г/л (табл. 1). Можно также сделать вывод, о различии двух разных векторов на основе T7-промотора, особенно при 37°C (рис. 1). Для продуцента с вектором pGEMEX1, отсутствовал дозозависимый отклик в уровне биосинтеза SUMO-CRM197 в ответ на различные концентрации ИПТГ и при автоиндукции. Это свидетельствовало об определенном пределе, характерном для продуцента в целом в таких условиях и не

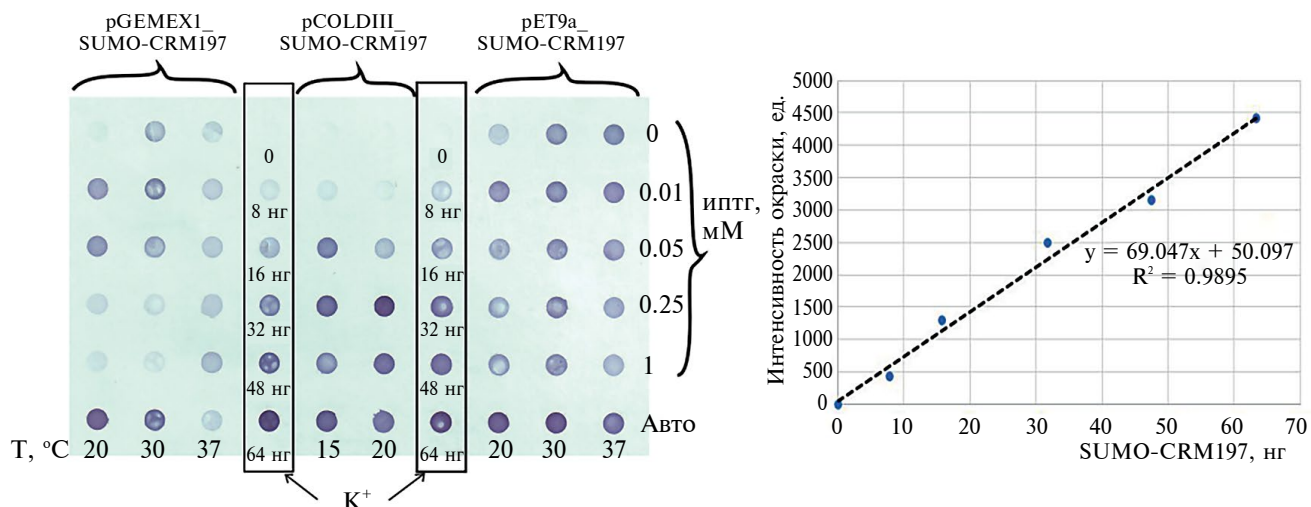


Рис. 1. Иммуноблоттинг лизатов *E. coli* BL21(DE3), выращенных при различных температурах и концентрациях ИПТГ (а) и калибровочный график для полуколичественной оценки уровня экспрессии гибридного белка SUMO-CRM197, приведенного в табл. 1 (б). 1, 2, 3 – лизат клеток, трансформированных вектором pGEMEX1_SUMO-CRM197, 4, 5 – лизат клеток, трансформированных вектором pCOLDIII_SUMO-CRM197, 6, 7, 8 – лизат клеток, трансформированных вектором pET9a_SUMO-CRM197. “К+” – лизат *E. coli* BL21(DE3), содержащий известную концентрацию очищенного SUMO-CRM197. “Авто” – культивирование проводилось на автоиндукционной среде TBP-5052, содержащей лактозу в качестве индуктора.

Таблица 1. Уровень экспрессии гена SUMO-CRM197*

Вектор	T, °C	C _{Ind} , mM	ОП _{кон} , ед.	Выход*	Вектор	T, °C	C _{Ind} , mM	ОП _{кон} , ед.	Выход*
pGEMEX	37	0	19.3	+	pET9a	37	0	25.6	++
		0.01	16.5	+			0.01	18.1	++
		0.05	16.4	+			0.05	17.6	++
		0.25	18.3	+			0.25	19.7	++
		1	18.8	+			1	19.6	+
		Auto	20.2	+			Auto	26.1	+++
	30	0	26.7	+	30	0	28.5	++	
		0.01	20.3	++		0.01	24.9	++	
		0.05	19.5	++		0.05	16.8	++	
		0.25	16.9	+		0.25	16.8	++	
		1	16.9	+		1	16.6	++	
		Auto	22.6	+++		Auto	29.2	+++	
	20	0	24.6	–	20	0	25.0	+	
		0.01	25.5	++		0.01	25.6	++	
		0.05	19.0	++		0.05	13.1	++	
		0.25	9.0	+		0.25	12.8	++	
		1	8.8	+		1	12.1	++	
		Auto	37.5	+++		Auto	30.7	+++	
pCOLDIII	20	0	24.4	–	pCOLDIII	15	0	24.1	–
		0.01	24.3	+			0.01	23.8	+
		0.05	22.1	+			0.05	24.3	++
		0.25	20.3	+++			0.25	20.1	+++
		1	17.7	++			1	17.3	++
		Auto	34.3	+++			Auto	31.8	+++

* C_{Ind} – концентрация ИПТГ, mM; T – температура культивирования, °C. полуколичественная оценка уровня экспрессии целевого гена (по данным дот-иммуноблоттинга, рис. 1): “–” менее 100 мг/л, “+” 0.1–1.0 г/л, “++” 1.0–3.0 г/л, “+++” более 3 г/л.

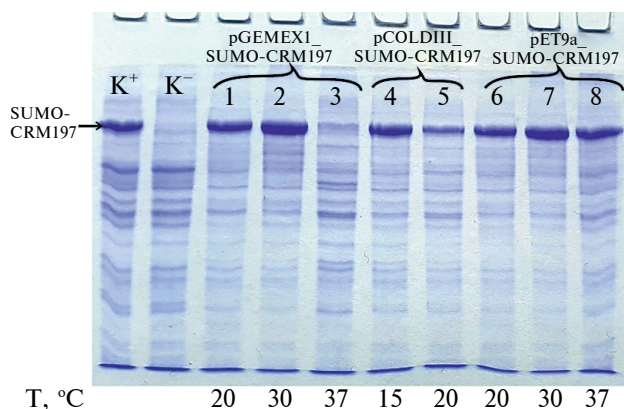


Рис. 2. Электрофорез в ПААГ лизатов *E. coli* BL21(DE3), выращенных на автоиндукционной среде TBP-5052 при различных температурах. “К–” – лизат штамма BL21(DE3); 1, 2, 3 – лизат клеток, трансформированных вектором pGEMEX1_SUMO-CRM197, 4, 5 – лизат клеток, трансформированных вектором pCOLDIII_SUMO-CRM197, 6, 7, 8 – лизат клеток, трансформированных вектором pET9a_SUMO-CRM197; “К+” – лизат “К–”, с добавлением 1 мкг очищенного SUMO-CRM197.

зависило от уровня транскрипции целевого гена. Напротив, для продуцента с pET9a – уровень экспрессии был значительно выше при низких концентрациях ИПТГ и составлял более 3 г/л при автоиндукции, что могло указывать на токсичность процесса гетерологической экспрессии для клетки продуцента.

Можно наблюдать высокий уровень биосинтеза на автоиндукционной среде во всех экспериментах (рис. 2). Известно, что лактоза является более мягким и естественным индуктором транскрипции систем на основе регуляторных элементов

Lac-оперона, а также селективно транспортируется в клетку через LacY-пермеазу. Следовательно, возможно, что клетка испытывает меньший стресс при сверхэкспрессии целевого гена, что также выразилось в большей биомассе клеток на конец культивирования.

Наиболее интересными, на наш взгляд, выглядели результаты при использовании вектора pCOLDIII. В этом случае наблюдались отсутствие самоиндукции (без ИПТГ) экспрессии гена SUMO-CRM197, а также дозозависимый ответ на повышающуюся концентрацию ИПТГ. При концентрации индуктора 0.25 мМ и температуре 20°C выход составил более 3.7 г/л, что соответствовало 3 г/л CRM197. Однако, в данной точке также наблюдался и негативный эффект сверхэкспрессии, которые можно было оценить по снижению оптической плотности в конце культивирования.

Далее был проведен экспрессионный анализ при концентрации ИПТГ в пределах 0.02–0.15 мМ при 15°C. В этих условиях отсутствовал негативный эффект на рост клеток, а дозозависимый эффект наблюдался наиболее отчетливо (рис. 3а), с максимальным выходом более 4.3 г/л по гибриду (3.6 г/л по CRM197) при концентрациях ИПТГ 0.1–0.12 мМ. Стоит отметить, что позитивное влияние может оказывать не только сила промотора и пониженная температура культивирования, но также и его природа, а именно сама зависимость транскрипционной активности CspA от температуры. Было интересно оценить уровень экспрессии целевого гена под контролем других индуцибельных, но слабых промоторов, например, арабинозного или рамнозного оперона. Это помогло бы глубже понять роль транскрипции и условий культивирования продуцента.

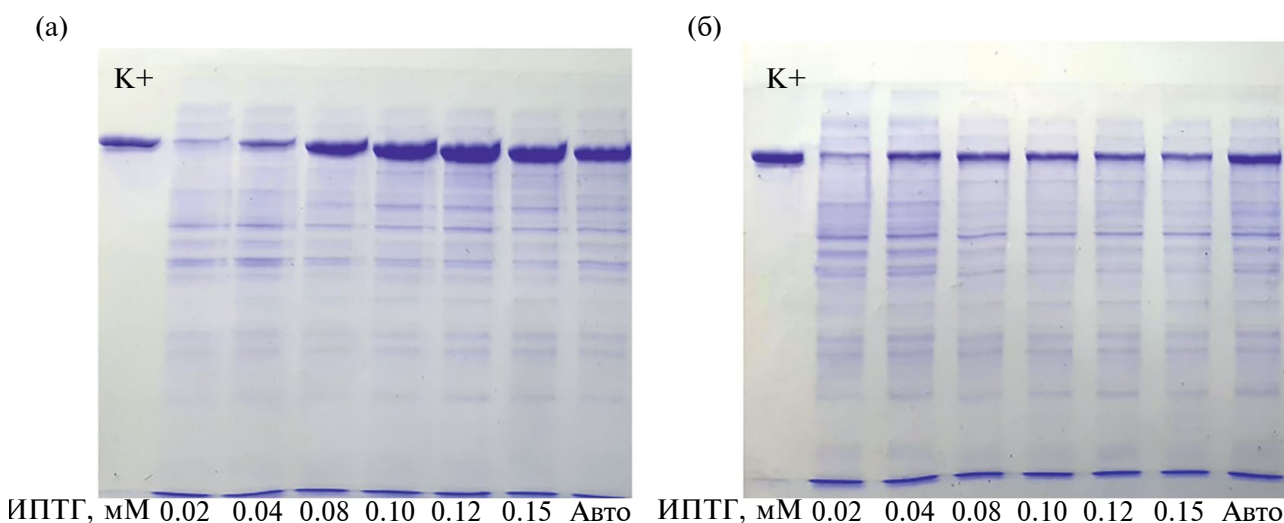


Рис. 3. Электрофорез в ПААГ лизатов *E. coli* BL21(DE3)_pCOLDIII_SUMO-CRM197 (а) и соответствующих номеров фракций растворимых белков (б), выращенных при различных концентрациях ИПТГ и температуре культивирования 15°C. “К+” – 1 мкг очищенного SUMO-CRM197 на лунку.

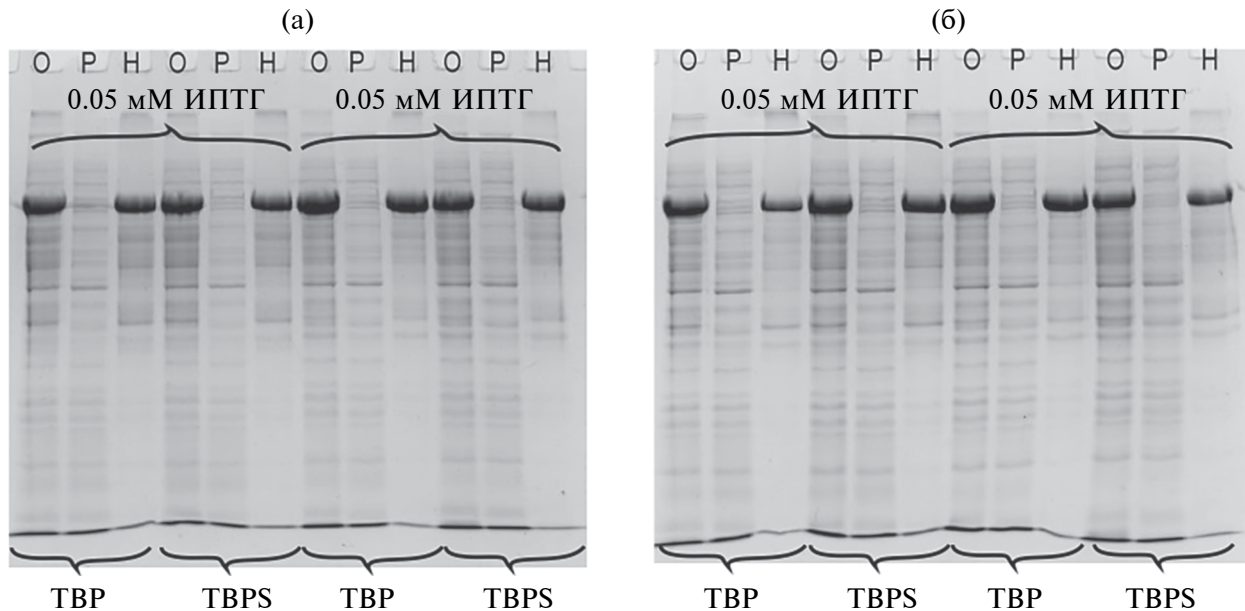


Рис. 4. Электрофорез в ПААГ белковых фракций *E. coli* BL21(DE3) $\text{_pET9a_SUMO-CRM197}$ (а) и BL21(DE3) $\text{_pET39b_SUMO-CRM197}$ (б) при температуре культивирования 30°C и концентрациях ИПТГ 0.05 и 0.5 мМ. 1, 2, 3 – культивирование проводили на среде ТВР, 1с, 2с, 3с – культивирование проводили на среде ТВРС (ТВР + 200 мМ сорбитола); 1, 1с – фракции общего клеточного белка; 2, 2с – фракции растворимого клеточного белка; 3, 3с – фракции нерастворимого клеточного белка.

Необходимо отметить, что только в том случае, когда имеется закономерный ответ системы на изменение факторов, можно говорить о разработке воспроизводимой технологии по методологии QbD. Анализ растворимости показал возможность биосинтеза SUMO-CRM197 в растворимой форме (рис. 3б). Максимальная доля и выход растворимого белка были достигнуты при концентрации ИПТГ 0.04 мМ и автоиндукции соответственно. Был впервые обнаружен факт влияния экспрессионного вектора на растворимость SUMO-CRM197, однако, выходы при этом все же составили менее 1 г/л, что стимулировало к дальнейшему поиску благоприятных условий и факторов, способных повысить растворимость при сохранении общего высокого уровня экспрессии

Также следует отметить тот факт, что, по-видимому, оптимизация нуклеотидной последовательности и кодонного состава, вместе с повышением стабильности репликации экспрессионного вектора, предложенного в работе [7], не влияли на уровень экспрессии целевого гена, а лишь повышали стабильность и воспроизводимость реализации генетической информации в клетке. Напротив, применение технологии гибридной экспрессии с белком-партнером SUMO и оптимизация регуляции транскрипции и трансляции, путем использования вектора на основе естественного промотора CspA и энхансера трансляции, приводили к увеличению выхода целевого продукта на порядок, а также положительно повлияли на его растворимость.

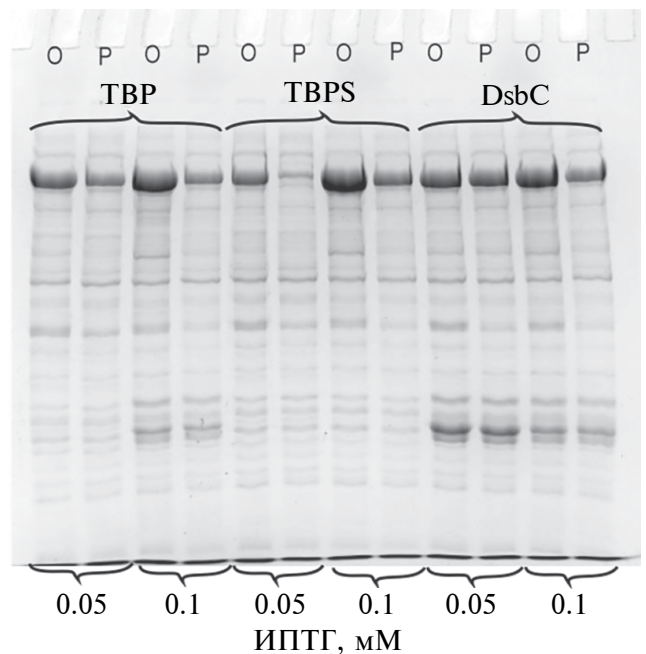


Рис. 5. Электрофорез в ПААГ белковых фракций *E. coli* BL21(DE3) $\text{_pCOLDIII_SUMO-CRM197}$ при температуре культивирования 15°C и концентрациях ИПТГ 0.05 и 0.1 мМ. 1, 2 – культивирование проводили на среде ТВР, 1с, 2с – культивирование проводили на среде ТВРС (ТВР + 200 мМ сорбитола); 1д, 2д – коэкспрессия с геном дисульфид-изомеразы на среде ТВР; 1, 1с, 1д – фракции общего клеточного белка; 2, 2с, 2д – фракции растворимого клеточного белка.

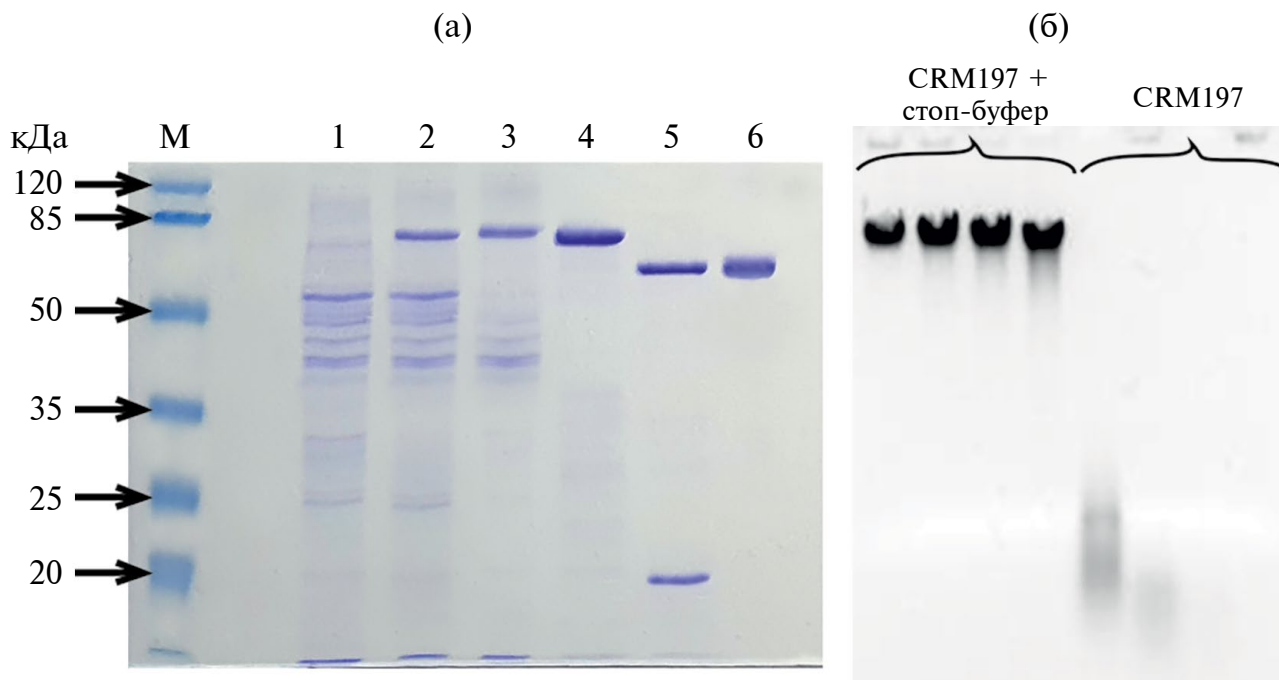


Рис. 6. Электрофорез в ПААГ образцов, содержащих целевой белок и полученных в ходе выделения и очистки CRM197 (а). М – маркер молекулярной массы; 1 – общий белок штамма BL21(DE3); 2 – общий белок штамма BL21(DE3), содержащего плазмиду pCOLDIII_SUMO-CRM197; 3 – растворимый белок штамма pCOLDIII_SUMO-CRM197; 4 – элюат после стадии металлохелатной аффинной хроматографии; 5 – гидролиз SUMO-CRM197 при помощи Upr1-гидролазы, 6 – препарат CRM197 после стадии вычитающей металлохелатной аффинной хроматографии. Электрофорез в 0.8%-ном агарозном геле препаратов геномной ДНК фага лямбда, инкубированного с очищенным препаратом CRM197 (б) при инкубировании в течение 6, 20, 30, 44; 1, 2, 3, 4 – реакция проводилась в реакционном буфере с добавлением стоп-буфера (20 мМ ЭДТА, отрицательный контроль); 5, 6, 7, 8 – реакция проводилась в реакционном буфере, содержащем по 2.5 мМ CaCl₂ и MgCl₂.

Влияние сорбитола и коэкспрессии гена DsbC на растворимость SUMO-CRM197. Известно, что при синтезе целевого белка, слитого с SUMO, наблюдалось заметное увеличение экспрессии целевого полипептида и его растворимости [20]. Внешняя гидрофильная оболочка и внутренний гидрофобный кор белка-партнера иногда могли оказывать эффект, аналогичный детергентам при солюбилизации, что действительно оказалось полезным для биосинтеза CRM197, содержащего трансмембранный регион. Также известны условия, при которых возможно получение растворимого CRM197 при прямой экспрессии – это секрета в периплазматическое пространство и использование штаммов типа Origami B или Shuffle. В этом случае важное значение имело корректное образование дисульфидных связей, которое достигалось путем фолдинга белка в условиях более высокого окислительно-восстановительного потенциала и перегруппировке случайно образованных некорректных дисульфидных связей благодаря дисульфид-изомеразе DsbC.

В первую очередь был исследован факт влияния сорбитола на растворимость SUMO-CRM197. Для этой цели использовали векторы pET9a (+) и pET39b (+), отличающиеся между собой лишь

тем, что в последнем имеется последовательность гена *LacI*, отвечающая за более строгую регуляцию экспрессии. Опираясь на полученные данные по уровню экспрессии в различных условиях и информацию, описанную в референтном исследовании, как и предполагалось, не удалось получить SUMO-CRM197 в растворимом состоянии (рис. 4а, 4б). Однако, в этом случае, было бы нелогично делать вывод о влиянии сорбитола на растворимость, поскольку не было четкой закономерности по экспрессии целевого белка в моделируемых условиях. Для того чтобы проверить эффект сорбитола на растворимость SUMO-CRM197 была использована плаزمид pCOLDIII при концентрациях ИПТГ 0.05 и 0.1 мМ. В обоих случаях белок может нарабатываться в растворимом состоянии, однако при 0.05 мМ растворимая доля белка близка к максимальной, а при 0.1 мМ общий выход. Следовательно, можно судить об изменении уровня растворимости SUMO-CRM197 при культивировании на среде, содержащей сорбитол.

Результаты экспериментов подтвердили предположение. Сорбитол не оказывал влияния на растворимость SUMO-CRM197, напротив, DsbC значительно ее повысил (рис. 5). В результате

при концентрации ИПТГ 0.05 мМ в условиях ко-экспрессии удалось достигнуть получения полностью растворимого продукта с выходом более 1.7 г/л (1.4 г/л по CRM197) в условиях периодического культивирования в колбе. Полученные результаты могут внести значительный вклад в развитие промышленной технологии получения CRM197.

В дальнейшем были проведены эксперименты по выделению и очистке CRM197 (рис. 6а). Оценка молекулярной массы методом масс-спектрометрии показала значение 58387.64 Да, что соответствовало теоретическому значению 58410 Да (данные не представлены). Биохимической особенностью CRM197 является наличие эндонуклеазной активности в присутствии катионов двухвалентных металлов. Данный факт был подтвержден гидролизом полноразмерной ДНК фага лямбда, что свидетельствовало о его правильной биологической конформации (рис. 6б).

* * *

Было проанализировано влияние условий гетерологической экспрессии на уровень биосинтеза SUMO-CRM197. Подтверждено, что использование генетически модифицированных живых систем для производства высокомолекулярных продуктов является сложно воспроизводимой задачей при разработке технологии. Тем не менее, посредством систематического анализа, удалось получить CRM197 в цитоплазме с выходом более 1 г/л. В дальнейшем планируется проведение экспериментов по анализу факторов, повышающих растворимость SUMO-CRM197 без использования коэкспрессии DsbC, с целью дальнейшего повышения технологичности, рентабельности и воспроизводимости данного подхода.

ФИНАНСИРОВАНИЕ. Проведение работы не поддерживалось внешними источниками финансирования и грантами.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ. В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Broker M.* // Human Vaccine and Immunotherapeutics. 2016. V. 12. № 3. P. 667–669.
2. *Zhou J., Petracca R.* // J Tongji Med. Univ. 1999. V. 19. № 4. P. 253–256.
3. *Stefan A., Conti M., Rubboli D., Ravagli L., Presta E., Hochkoepler A.* // J. Biotechnol. 2011. V. 156. № 4. P. 245–252.
4. *Духовлинов И.В., Федорова Е.А., Богомолова Е.Г., Добровольская О.А., Черняева Е.Н., Аль-Шехадат Р.И., Симбирцев. А.С.* // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5. № 1. С. 37–44.
5. *Goffin P., Dewerchin M., De Rop P., Blais N., Dehottay P.* // Biotechnol. J. 2017. V. 12. № 7. P. 1–11.
6. *Tarahomjoo S., Bandehpour M., Aghaebrahimian M., Ahangaran S.* // Prot. and Pept. Lett. 2022. V. 29. № 4. P. 350–359.
7. *Khodak Y.A., Ryazanova A.Y., Vorobiev I.I., Kovalchuk A.L., Ovechko N.N., Aparin P.G.* // BioTech. 2023. V. 12. № 1. P. 1–9.
8. Патент США. 2015. № US10093704B2.
9. *Sambrook J., Green M.R.* Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 4th Ed. V. 3. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012. 1546 p.
10. *Duetz W., Ruedi L., Hermann R., O'Connor K., Buchs J., Witholt B.* // Appl. Biotech. Microbiol. 2000. V. 66. № 6. P. 2641–2646.
11. *Studier W.F.* // Protein. Expr. Purif. 2005. V. 41. № 1. P. 207–234.
12. *Zeder-Lutz G., Cherouati N., Reinhart C., Pattus F., Wagner R.* // Protein Expr. Purif. 2006. V. 50. № 1. P. 118–127.
13. *Austin B.P., Waugh D.S.* // Protein Expr. Purif. 2011. V. 82. № 1. P. 116–124.
14. *Carboni F., Kitowski A., Sorieul C., Veggi D., Marques M.C., Oldrini D.* // Chem. Sci. 2022. V. 13. № 8. P. 2440–2449.
15. *Zhao Q., Gao Y., Xiao M., Huang X., Wu X.* // Chem. Commun (Camb). 2021. V. 57. № 12. P. 1474–1477.
16. *Xiong A.W., Fang J.M., Ren S., Li W., Wang J, Zhao Y. et al.* // Front. Oncol. 2022. V. 5. № 11. P. 1–10.
17. *Conde E., Bertrand R., Balbino B, Bonnefoy J., Stackowicz J, Caillot N. et al.* // Nat. Comm. 2021. V. 2574. № 12. P. 1–14.
18. *Rathore A.S., Winkle H.* // Nat. Biotech. 2009. V. 27. № 1. P. 26–34.
19. *Герасимов А.С., Рогожкин С.О., Шахова Е.С., Чепурных Т.В., Гороховатский А.Ю., Мышкина Н.М. и др.* // Биоорг. химия. 2021. Т. 47. № 5. С. 610–622.
20. *Butt T.R., Edavettal S.C., Hall J.P., Mattern M.R.* // Prot. Expr. Purif. 2005. V. 43. № 1. P. 1–9.

Bacterial Expression of CRM197: Investigation and Optimization of Gene Expression Factors for Effective Production in *E. coli*.

S. O. Rogozhkin^{a, *}, A. S. Gerasimov^a

^a*Vyatka State University, Kirov, 610000 Russia*

^{*}*e-mail: usr22574@vyatsu.ru*

CRM197 (Cross Reacting Material 197) is an inactive form of *C. diphtheriae* exotoxin used as a carrier protein for the development and production of conjugated polysaccharide vaccines and immunotherapeutic drugs. However, the development of these research areas is not possible without an efficient and cost-effective technology to produce CRM197 of the proper quality. In this study, we developed a highly efficient method to produce recombinant CRM197 as a fusion with SUMO protein, yielding more than 3 grams per liter in form of the inclusion bodies. We examined the significant effect of expression vector type, heterologous gene expression conditions and cultivation on its solubility. Using a combination of reduced cultivation temperature and the promoter of the gene encoding the heat shock protein CspA, we achieved an increase in the solubility level of SUMO-CRM197 of more than 30%, with an overall biosynthesis level of more than 2 grams per liter. Coexpression of the target gene with the DsbC disulfide isomerase gene allowed us to obtain the target protein completely in the soluble state with a yield of more than 1.4 grams per liter. The results obtained may become the basis for the development of a promising domestic technology for the production of CRM197.

Keywords: CRM197, *E. coli*, recombinant proteins, conjugated vaccine, expression vector