

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

УДК 577.21

**ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОБНОГО РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА MF3
В РЕФОЛДИНГЕ РАСТИТЕЛЬНОЙ ХИТИНАЗЫ****Александра Михайловна Рожкова¹, Юрий Андреевич Денисенко¹,
Игорь Геннадьевич Синельников¹, Иван Никитич Зоров²,
Денис Валерьевич Ерохин³, Виталий Георгиевич Джавахия³**¹ Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
химический факультет,³ Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии**Автор, ответственный за переписку:** Александра Михайловна Рожкова,
amrojtkova@yahoo.com

Аннотация. Экспрессия рекомбинантных белков важна для изучения их биологической функции. Наиболее часто для первичного описания свойств белка используется система экспрессии бактерии *E. coli*. Однако в условиях сверхэкспрессии скорость агрегации целевых белков часто превышает скорость правильного сворачивания, что приводит к образованию нерастворимых телец включения. Тельца включения являются существенным недостатком системы экспрессии *E. coli*, поскольку препятствуют выделению целевых рекомбинантных белков. Одним из решений существующей проблемы является использование шаперон-подобных белков *in vitro* при рефолдинге целевого белка. В качестве примера шаперон-подобного белка был взят рекомбинантный белок MF3, который увеличил выход растворимой растительной хитиназы на 92% в сравнении с выходом этого белка при использовании стандартной процедуры рефолдинга.

Ключевые слова: рефолдинг, MF3, элиситоры, шапероны

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2024-65-2-152-160

Список сокращений: MF3 – microbial factor 3, ДСН – додецилсульфат натрия, ДТТ – дитиотреитол, 2-МЭ – 2-меркаптоэтанол.**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-16-00154).**Для цитирования:** Рожкова А.М., Денисенко Ю.А., Синельников И.Г., Зоров И.Н., Ерохин Д.В., Джавахия В.Г. Применение микробного рекомбинантного белка MF3 в рефолдинге растительной хитиназы // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2024. Т. 65. № 2. С. 152–160.

ORIGINAL ARTICLE

APPLICATION OF MICROBIAL RECOMBINANT PROTEIN MF3 IN REFOLDING OF PLANT CHITINASE

Aleksandra M. Rozhkova¹, Yuri A. Denisenko¹, Igor G. Sinelnikov¹, Ivan N. Zorov², Denis V. Erokhin³, Vitaly G. Dzhavakhia³

¹ Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences

² Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University

³ All-Russian Institute of Phytopathology

Corresponding author: Alexandra Mikhailovna Rozhkova, amrojtkova@yahoo.com

Abstract. Expression of recombinant proteins is important for studying their biological function. Most often, the expression system of the *E. coli* is used for the primary description of protein properties. However, under overexpression conditions, the rate of aggregation of target proteins often exceeds the rate of proper folding, resulting in the formation of insoluble inclusion bodies. Inclusion bodies are a clear disadvantage of the *E. coli* expression system because they interfere with the release of target recombinant proteins. One solution to the existing problem is the use of chaperone-like proteins *in vitro* to refold the target protein. In this work, the recombinant protein MF3 was taken as an example of a chaperone-like protein, which increased the yield of soluble plant chitinase by 92% compared to the yield of this protein using the standard refolding procedure.

Keywords: refolding, MF3, elicitors, chaperones

Financial Support. The work was supported by Russian Science Fund (Grant № 22-16-00154).

For citation: Rozhkova A.M., Denisenko Yu.A., Sinelnikov I.A., Zorov I.N., Erokhin D.V., Dzhavakhia V.G. Application of microbial recombinant protein MF3 in refolding of plant chitinase // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Chemistry. 2024. T. 65. № 2. S. 152–160.

Экспрессия рекомбинантных белков важна для изучения их биологической функции [1]. Существует несколько стандартных систем экспрессии для производства целевых белков: бактерии, дрожжи, клетки насекомых, клетки млекопитающих и бесклеточные системы. Экспрессия в клетках млекопитающих и насекомых приводит к образованию биологически активных белков, которые содержат посттрансляционные модификации, такие как фосфорилирование, ацетилирование и гликозилирование. Однако экспрессия с использованием этих систем дает низкие выходы рекомбинантных белков, а стоимость этих систем обычно высока для производства белков в промышленных масштабах. Бесклеточные системы также не позволяют получать высокие выходы рекомбинантных белков. В настоящее время наиболее удобной и часто используемой системой для получения рекомбинантных белков является экспрессия в бактериях *Escherichia coli* [2].

Рекомбинантным белкам в процессе биосинтеза в *E. coli* часто требуются модуляторы сворачивания, так называемые белки-шапероны. В условиях сверхэкспрессии скорость агрегации целевых белков часто превышает скорость правильного сворачивания, и собственные белки-шапероны быстро расходуются [3], что приводит к образованию нерастворимых телец включения. Тельца включения являются явным недостатком системы экспрессии *E. coli* [1], поскольку препятствуют выделению целевых рекомбинантных белков.

Существует множество химических и физико-химических способов снижения скорости образования телец включения при экспрессии в *E. coli*. Изменение условий роста, таких как температура роста, концентрация индуктора и время индукции, часто может помочь уменьшить образование телец включения (нерастворимой фракции белков). Недавно сообщалось, что рекомбинантные белки сверхэкспрессируются в

растворимой форме при добавлении совместимых химических реагентов в среду экспрессии [4]. Вместо образования телец включения целевой белок может экспрессироваться в виде растворимого белка в присутствии сорбита, аргинина и трегалозы, добавленных при культивировании рекомбинантных штаммов. Эти добавки могут подавлять образование телец включения и тем самым повышать растворимость целевых белков в системах сверхэкспрессии *E. Coli* [4].

Для восстановления биологически активной растворимой формы рекомбинантных белков из телец включения существует метод рефолдинга. В типичной процедуре рефолдинга агрегированные формы денатурируют и растворяют с помощью высокой концентрации денатурантов, таких как мочевины и хлорид гуанидиния, или ионных детергентов, таких как N-лауроилсаркозин. Эти химические реагенты используются для уменьшения нековалентных взаимодействий между молекулами белка. Кроме того, добавляют дитиотреитол (DTT) или 2-меркаптоэтанол (2-МЭ) для уменьшения нежелательных меж- и/или внутримолекулярных дисульфидных связей. Рефолдинг денатурированных белков (развернутая форма) в активные белки (свернутая форма) происходит за счет удаления денатуранта. Эффективность рефолдинга, т.е. выход биологически активного белка можно оценить, например, по ферментативной активности.

Существует нескольких основных методов рефолдинга: эксклюзионная хроматография [5], обращенные мицеллярные системы [6], цеолит-поглощающие системы [7] и естественная шаперонная система GroEL-GroES [8–10]. Методы рефолдинга, использующие хроматографические или нехроматографические стратегии, представлены в недавних обзорах [11–12]. Хотя эти методы хорошо работают для многих телец включения и денатурированных модельных систем, в большинстве случаев происходит значительное осаждение белков, что приводит к низкому выходу рефолдинга. Поэтому процедура рефолдинга для каждого конкретного белка по-прежнему выполняется с помощью серии предварительных оптимизационных экспериментов.

Например, для получения растительной хитиназы из плотоядных растений рода *Drosera* в растворимой форме в экспрессионной системе *E. coli* нами недавно были протестированы три разных подхода: диализ, быстрое разведение и рефолдинг на Ni-NTA-агарозе до ренатурации.

Разработанный протокол быстрого разведения с использованием ренатурационного буфера с добавлением 10%-го глицерина и 2 М аргинина в сочетании с окислительно-восстановительной парой восстановленного/окисленного глутатиона увеличил выход активного растворимого белка до 9,5 мг на 1 г сырой биомассы [13]. Тем не менее, поиск новых подходов к рефолдингу хитиназы все еще представляется актуальной задачей.

В этом смысле использование при рефолдинге дополнительных молекулярных шаперонов может быть оригинальным решением в получении растворимого рекомбинантного белка. Шапероны представляют собой белки, которые способствуют нековалентному сворачиванию или разворачиванию, а также сборке или разборке других макромолекулярных структур. Одной из основных функций шаперонов является предотвращение агрегации как вновь синтезированных полипептидных цепей, так и собранных субъединиц в нефункциональные структуры. Помимо своей фундаментальной роли в сворачивании белков *de novo*, шапероны участвуют в различных аспектах поддержания протеома, включая помощь в сборке макромолекулярных комплексов, транспортировке и деградации белков, а также диссоциацию агрегатов и рефолдинг стресс-денатурированных белков [14]. Шаперон может связываться с экспрессируемым формирующимся белком внутри клетки и предотвращать его агрегацию, уменьшая скорость агрегации, вызванной образованием гидрофобных связей между специфическими сайтами на поверхности белковой глобулы [15].

Несколько исследований подтвердили преимущества шаперонов в сворачивании белков при совместной экспрессии. Некоторые системы шаперонов действуют как фолдазы: они поддерживают сворачивание белков АТФ-зависимым образом (например, система GroEL/GroES или система DnaK/DnaJ/GrpE) [16–17]. Другие шапероны действуют как холдазы (например, DnaJ или Hsp33): они связывают промежуточные соединения в процессе сворачивания, чтобы предотвратить их агрегацию [18–19]. Hsp60 (комплекс GroEL/GroES в *E. coli*) представляет собой наиболее охарактеризованный большой (~1 МДа) шаперонный комплекс. GroEL представляет собой двойное кольцо с гидрофобной открытой полостью, в просвете которой может разместиться нативный зеленый флюоресцентный белок (GFP, 54 кДа). GroES представляет собой гептамер, ко-

торый связывается с GroEL в присутствии АТФ или АДФ. Система GroEL/GroES конкурентна в процессах сворачивания целевого белка, т.е. его связывание внутри полости GroEL идет быстрее, чем агрегация [20]. Шапероны Hsp70 (DnaK в *E. coli*) представляют собой широко распространенный класс белков и, возможно, являются наиболее охарактеризованными небольшими (~70 кДа) шаперонами [14]. Белкам Hsp70 помогают белки Hsp40 (DnaJ в *E. coli*), которые увеличивают скорость потребления АТФ и активность Hsp70. Считается, что многие Hsp70 собираются вокруг развернутого субстрата, стабилизируя его и предотвращая агрегацию до тех пор, пока развернутая молекула не свернется должным образом, после чего Hsp70 теряют сродство к молекуле и диффундируют [21].

Иногда оптимизация условий роста, например снижение концентрации индуктора и температуры индукции, может не привести к получению белка в растворимой форме. Например, альдегиддегидрогеназа (6-His-ALDH3A1) экспрессировалась с более высокой скоростью, но весь рекомбинантный белок находился в тельцах включения. Ни индукция при более низкой температуре, ни стратегия аутоиндукции не улучшали его растворимость. Тем не менее, совместная экспрессия двух групп молекулярных шаперонов (GroES/GroEL и DnaK/DnaJ/GrpE) приводила к более высокому выходу растворимой активной формы ALDH3A1 [22]. Аналогичным образом, доля растворимого фермента хитобиазы была увеличена с 42 до 71% за счет совместной экспрессии системы шаперонов GroEL/ES и оптимизации условий культивирования рекомбинантных штаммов [23].

Однако существует и другая группа белков, улучшающая процесс рефолдинга. К ним относятся пептидил-пролил-цис/транс-изомеразы (PPIase) [24], которые катализируют изомеризацию пептидных связей для достижения конформационных изменений в нативных свернутых белках, а также обладают шаперон-подобной активностью [25–27].

В качестве примера можно привести PPIазу FKBP-типа с приблизительной молекулярной массой 17 кДа (VaFKBP17), выделенную из бактерии *Vibrio anguillarum* O1. Ген *ppi* из *V. anguillarum* O1 был амплифицирован и экспрессирован в *E. coli*. Анализ изомеризационной активности с использованием нитроанилида сукцинил-Ala-Phe-Pro-Phe-p в качестве субстрата показал, что активность VaFKBP17 была максимальной при низкой температуре (5 °C) и щелочных условиях (рН 10). Для оценки шаперон-подобной актив-

сти VaFKBP17 было изучено влияние VaFKBP17 на рефолдинг β -1,3-1,4-глюканазы из *Bacillus* sp. J-10, образующей тельца включения при сверхэкспрессии в клетках *E. coli*. Было показано, что повышение концентрации VaFKBP17 от 1 до 4 мкг увеличивает активность β -глюканазы до 160% в сравнении с контролем (без добавления 4 мкг VaFKBP17) [28].

Недавно во Всероссийском научно-исследовательском институте фитопатологии был выделен и охарактеризован новый белок-элиситор MF3 (microbial factor 3) из бактерии *Pseudomonas fluorescens*, способный индуцировать устойчивость растений к вирусным и грибным патогенам [29]. Определение полной аминокислотной последовательности MF3 [30] показало высокую степень его гомологии к пептидил-пролил-цис/транс-изомеразам FKBP-типа бактерии *P. fluorescens* [31], в связи с чем MF3 был отнесен к PPIазам. MF3 обладает относительно низкой молекулярной массой (16,9 кДа), а также высокой термостабильностью, что значительно облегчает процесс выделения белка из клеточных лизатов. Был получен рекомбинантный штамм – продуцент MF3 в бактериальной системе экспрессии *E. coli* и оптимизирована методика очистки гомогенного препарата MF3 [32].

Цель настоящей работы – определение шаперон-подобной активности PPIазы MF3 в процессе рефолдинга растительной хитиназы *D. capensis* для увеличения выхода растворимого фермента.

Экспериментальная часть

Получение рекомбинантного ферментного препарата MF3

Методом ПЦР с использованием синтетических олигонуклеотидов

5'-3': gacatatgctgatcgccgccaataag;

5'-3': tcgcgccgctcagtggtgatggccaccttc

был получен ПЦР-продукт размером 501 п.н., кодирующий белок MF3. Далее фрагмент был обработан эндонуклеазами рестрикции *NdeI* и *NotI*, очищен от компонентов реакции и коротких фрагментов ДНК с помощью Gel Extraction Kit («Qiagen», Германия). Затем была определена концентрация ДНК полученного фрагмента на приборе «NanoDrop Lite» («Thermo Fisher Scientific», США). Эндонуклеазами рестрикции *NdeI* и *NotI* был также обработан 1 мкг ДНК плазмиды pET28a. Фрагменты ДНК после рестрикции были анализированы в 1%-м агарозном геле и затем выделены с помощью Gel Extraction Kit («Qiagen», Германия).

Фрагменты смешивали в эквимольном соотношении и лигировали с помощью T4 ДНК-лигазы («Thermo Fisher Scientific», США) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Лигазная смесь была трансформирована в компетентные клетки *Escherichia coli* Mach1 («Invitrogen», США). Клетки высевались на агаризованную LB: триптон (10 г/л), дрожжевой экстракт (5 г/л), NaCl (5 г/л), бактериологический агар (20 г/л), канамицин (50 мкг/мл). Далее трансформанты культивировали на жидкой среде LB для выделения плазмидной ДНК («Plasmid Mini Kit», «Qiagen», Германия). Полученной плазмидной ДНК трансформировали штамм *E. coli* RosettaTM (DE3) («Merck», Германия). Селекцию трансформантов проводили на агаризованной среде LB с добавкой канамицина (50 мкг/мл) и хлорамфеникола (34 мкг/мл).

Отобранный рекомбинантный штамм *E. coli* MF3 переносили петлей в 5 мл жидкой среды LB (50 мкг/мл канамицин, 34 мкг/мл хлорамфеникол). Клетки выращивали 16 ч при 30 °С. Затем ночную культуру разбавляли 1:100 средой ТВ. Состав среды ТВ: пептон микробиологический (12 г/л), дрожжевой экстракт (24 г/л), K₂HPO₄ (9,4 г/л), KH₂PO₄ (2,2 г/л), глицерин (4 г/л), канамицин (50 мкг/мл). Через 3 ч роста температуру снижали до 26 °С, вносили индуктор изопропил-β-D-тиогалактопиранозил до 0,2 мМ и продолжали культивирование при 26 °С. После культивирования надосадочную жидкость отделяли центрифугированием (4000 об/мин, 5 мин, 4 °С), а клетки ресуспендировали в 5 мл 50 мМ K-Ph-буфере (рН 7,0). Далее суспензия клеток была обработана ультразвуком 3 раза по 30 с с промежутком 1 мин на приборе «Sonic Vibra-cell» («Sonic Materials Inc», США). Суспензию клеток центрифугировали (13 000 об/мин, 15 мин, 4 °С). Супернатант подвергали аффинной хроматографии на колонках с Ni-NTA («Qiagen», Германия) по стандартной процедуре фирмы-производителя.

Рефолдинг рекомбинантной растительной хитиназы

Растительная рекомбинантная эндохитиназа *Drosera capensis* была получена, как описано в [13]. После культивирования трансформированного штамма-продуцента *E. coli* Chit 100 мл культуральной среды центрифугировали и клетки ресуспендировали в 10 мл буфера (50 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 100 мМ NaCl, 5 мМ ДТТ, 1 мМ PMSF). Суспензию клеток разрушали ультразвуком (5×30 с), охлаждая на льду. Лизат бактерий центрифугировали при 12 000 г в течение 30 мин при

4 °С, супернатант и осадок отделяли и идентифицировали электрофорезом в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Результаты показали, что эндохитиназа образует тельца включения. Осадок пять раз промывали 5 мл буфера (50 мМ Трис-НСl (рН 8,5), 100 мМ KCl и 2 М мочевины) для максимального удаления белков *E. coli*. Тельца включения осаждали в течение 15 мин при максимальных оборотах, супернатант удаляли. Осадок растворяли в 5 мл буфера для денатурации (50 мМ Трис-НСl (рН 8,5), 100 мМ KCl, 8 М мочевины, 1 мМ ЭДТА и 20 мМ ДТТ) в течение 2 ч при 40 °С. Раствор центрифугировали 15 мин при максимальной скорости.

Химические добавки и белки-шапероны способны в значительной степени способствовать правильному сворачиванию биомолекул [33]. Основной буфер рефолдинга включал 50 мМ Трис-НСl (рН 8,5) и 200 мМ KCl, с добавками: (NH₄)₂SO₄, додецилсульфат натрия (ДСН), Tween 80, аргинин, аланин, глицин, глицерин, сахароза, 2-меркаптоэтанол (2-МЭ), глутатион GSH/GSSH и MF3 в разных концентрациях. Концентрации ферментов в запасных растворах определяли на приборе «NanoDrop Lite» («Thermo Fisher Scientific», США). Соотношение концентрации эндохитиназы и MF3 составляло 10:1, 5:1, 2:1. Быстрое «шоковое» разведение белка в рефолдинг-буфере в соотношении 1:10 в некоторых случаях предпочтительнее постепенного диализа [34]. Раствор хитиназы в денатурирующем буфере (10 мг/мл) объемом 100 мкл охлаждали до 4 °С и быстро добавляли к охлажденному образцу буфера для рефолдинга объемом 900 мкл при интенсивном перемешивании. Смесь инкубировали 24 ч, отделяли от осадка центрифугированием при 14 000 г в течение 15 мин. Эффективность рефолдинга оценивали по высвобождению растворимой формы хитиназы и ее активности.

Определение хитиназной активности и концентрации белка

Для измерения активности эндохитиназы использовали коллоидный хитин в качестве субстрата. Коллоидный хитин получали из хитина креветки («Sigma», США) по модифицированному методу Хсу [35]. К порошку хитина (40 г) медленно добавляли 600 мл концентрированной соляной кислоты, выдерживали в течение 60 мин при 30 °С и интенсивном перемешивании. Хитин осаждали в виде коллоидной суспензии, медленно разбавляя раствор в 2 л воды при 10 °С. Суспензию фильтровали и промывали дистиллиро-

ванной водой до нейтрального значения pH. Полученную суспензию использовали в работе для определения хитиназной активности.

Активность по хитину определяли методом, основанном на спектрофотометрической детекции выделяемого в ходе гидролиза N-ацетилглюкозамина. К 120 мкл суспензии коллоидного хитина (10 г/л), подогретого до 55 °С, добавляли 90 мкл ацетатного буфера (pH 5,0) и 60 мкл ферментного препарата (с концентрацией 1 мг/мл). После чего инкубировали 10 мин и добавляли 900 мкл красящего раствора (0,5 г/л гексаацианоферрата(III) калия в 0,5 М Na₂CO₃). Смесь инкубировали 15 мин при 100 °С, центрифугировали и измеряли оптическую плотность при длине волны 400 нм [36]. За единицу хитиназной активности принимали количество фермента, необходимое для высвобождения 1 мкмоль N-ацетил-D-глюкозамина из коллоидного хитина в течение 1 мин.

Результаты и обсуждение

Влияние РРІазы MF3 на процесс рефолдинга рекомбинантной хитиназы из D. capensis

Электрофоретический анализ образцов эндохитиназы в клеточном дегристе подтвердил наличие нерастворимой формы фермента, находящейся в виде телец включения. На рис. 1 представлена электрофореграмма, на которой видно, что полоса, соответствующая эндо-хитиназе массой 37 кДа, присутствует только в нерастворимой фракции.

Для определения шаперон-подобной активности у РРІазы MF3 (т.е. изучения влияния MF3 на правильный фолдинг эндохитиназы) был проведен эксперимент по рефолдингу эндохитиназы в присутствии MF3 по аналогии с экспериментом, поставленным Geon A.J. с соавторами для рефолдинга β-1,3-1,4-глюканазы в присутствии РРІазы VaFKBP17 [28]. Для сравнения эффекта были также протестированы буферы для рефолдинга с классическими добавками: 100 мМ (NH₄)₂SO₄; 0,25% додецилсульфат натрия; 0,1% Tween 80; 0,25 М аргинин; 0,25 М пролин; 0,25 М глицин; 5% глицерин; 2 мМ 2-МЭ; глутатион GSH/GSSH 0,5/0,5%. Концентрация РРІазы MF3 в буфере для рефолдинга составляла 0,1; 0,2 и 0,5 мг/мл.

Как следует из рис. 2, сульфат аммония, Tween 80 и сахароза не оказали значительного влияния на выход эндохитиназы после рефолдинга, в то время как 2-МЭ и ДСН снизили выход рекомбинантного фермента по сравнению с контролем. В качестве контроля использовали основной буфер для рефолдинга (50 мМ

Трис-НСІ (pH 8,5) + 200 мМ КСІ). Глицерин является основной буферной добавкой, которая доказала эффективность рефолдинга для широкого спектра ферментов [37]. В случае добавления глицерина при рефолдинге эндохитиназы выход увеличился на 188% по сравнению с контролем. Добавление аминокислот, таких как аргинин, аланин, глицин увеличило выход на 122, 41, 44% соответственно. Аминокислоты могут действовать как «химические шапероны», взаимодействуя с гидрофобными участками полипептидной цепи и предотвращая внутри- и межмолекулярную агрегацию молекул белка [38]. Использование буфера для рефолдинга с окислительно-восстановительной парой глутатиона GSH/GSSG (1:1) увеличило выход эндохитиназы на 47%. Ранее эффективность использования окислительно-восстановительных пар глутатиона GSH/GSSG, используемых в соотношении 1:10, была продемонстрирована в работах по рефолдингу лизоцима [39]. Добавление белка РРІазы MF3 к эндохитиназе в количестве 0,1 и 0,2 мг/мл не увеличило выход эндохитиназы. При добавлении 0,5 мг/мл MF3 наблюдалось увеличение выхода активной формы эндохитиназы на 92% по сравнению с контролем.

Полученные результаты согласуются с аналогичными данными для РРІаз FKBP-типа. Известно, что шапероны и фолдазы способствуют правильному сворачиванию полипептидов в функциональные белки внутри клеток. Шапероны, такие как DnaJ, DnaK, GrpE и GroE, определяются как белки, обеспечивающие правильное сворачивание при отсутствии ковалентных изменений. Они распознают и избирательно связываются с ненативными белками и подавляют агрегацию промежуточных продуктов сворачивания. Напротив, фолдазы катализируют ковалентные реакции, необходимые для сворачивания белка. Таким образом, фолдазы отличаются от шаперонов своим участием в ковалентных изменениях. На сегодняшний день охарактеризованы только два семейства фолдаз: протеиндисульфидизомеразы и РРІазы. Однако в некоторых сообщениях предполагается, что РРІазы обладают шаперон-подобными функциями *in vitro* и *in vivo* [40, 41]. Интересно, что шаперон-подобная активность и эффективная активность сворачивания развернутых белков требуют дополнительных дискретных доменов. Однако MF3, как и VaFKBP17, состоит из одного домена. Поэтому одна из гипотез предполагает, что VaFKBP17 обладает шаперон-подобной активностью, которая включает связывание субстрата (β-1,3-1,4-глюканазы) с его

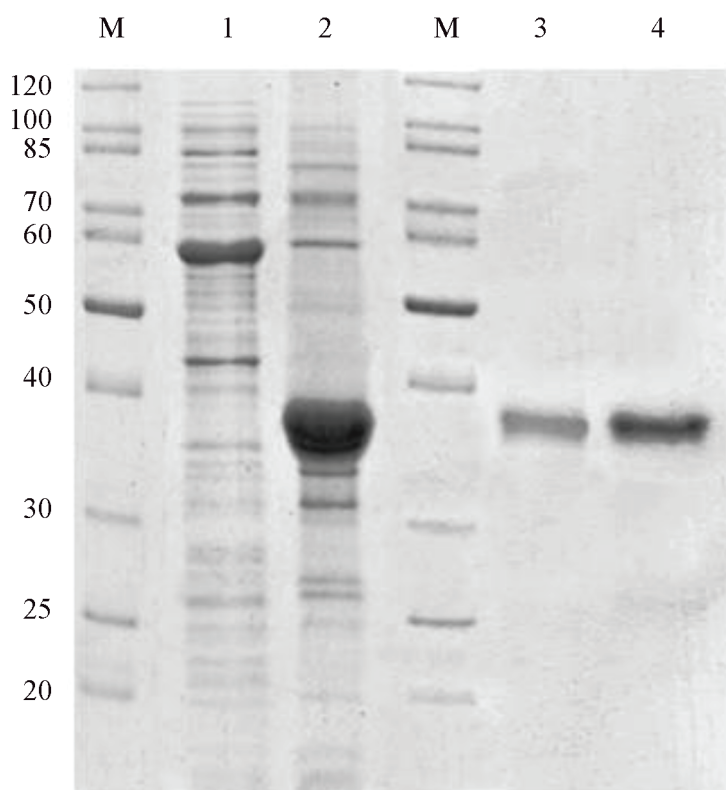


Рис. 1. ПААГ-электрофореграмма (М – маркер, 1 – растворимая фракция, 2 – нерастворимая фракция, 3 – фермент после рефолдинга в буфере Трис-НСl + КСl, 4 – фермент после рефолдинга в буфере с РРl MF3 0,55 мг/мл)

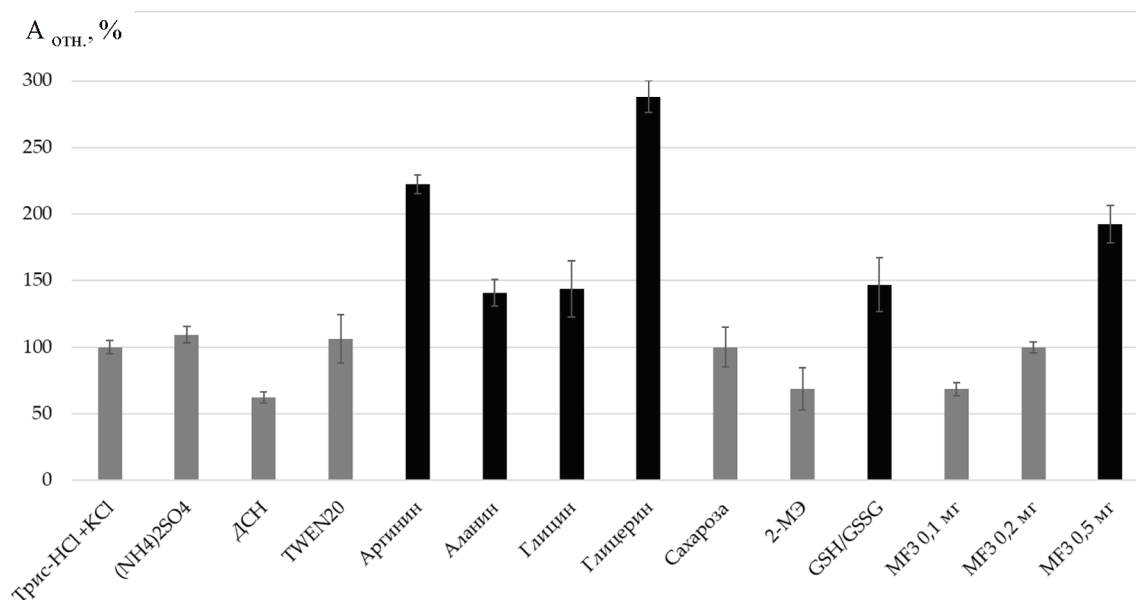


Рис. 2. Относительная активность эндохитиназы после проведения рефолдинга в буферах с разными добавками

гидрофобным активным карманом. В этом варианте гидрофобные поверхности РРlазы взаимодействуют с промежуточными продуктами неправильной укладки β -1,3-1,4-глюканазы и

восстанавливают активность фермента, трансформируя белок в нативную форму [41, 42]. Аналогичный вариант шаперон-подобной активности возможен и в случае взаимодействия

растительной эндохитиназы и РРІазы MF3, имеющей высокую степень гомологии с РРІазами FKBP-типа, а именно, РаFKBP-25 (JQ0140) из *Pseudomonas aeruginosa*.

Эндохитиназа *D. capensis* обладает двухдоменной структурой, состоящей из каталитического и хитин-связывающего доменов, соединенных протяженным линкером. Анализ 3D-структуры фермента, проведенный нами ранее [13], показал, что помимо наличия цистеинов в позициях C191, C231 и C286, обеспечивающих термодинамическую стабильность структуры на финальных этапах сворачивания белковой глобулы, существуют также и аминокислотные остатки на поверхности эндохитиназы, которые предположительно могут обеспечивать агрегацию белка за счет гидрофобных взаимодействий при сверхэкспрессии эндо-

хитиназы. Препятствуя этим взаимодействиям, РРІаза MF3 может обеспечивать более высокую растворимость активной растительной хитиназы при рефолдинге.

Таким образом, применение микробного рекомбинантного белка MF3 в рефолдинге растительной эндохитиназы *D. capensis* в соотношении 2:1 (эндо-хитиназа : MF3) позволило увеличить выход активной формы фермента на 92% относительно контрольного буфера для рефолдинга, что можно объяснить наличием шаперон-подобной активности у MF3, являющейся РРІазой FKBP-типа. Полученный результат имеет также прикладное значение, позволяющее использовать микробный белок MF3 в рефолдинге гидрофобных белков вместо различных химических добавок.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Clark E.D.B. // Curr. Opin. Biotechnol. 2001. Vol. 12. P. 202.
2. Baneyx F. // Curr. Opin. Biotechnol. 1999. Vol. 10. P. 411.
3. Baneyx F., Mujacic M. // Nat. Biotechnol. 2004. Vol. 22. P. 1399.
4. Prasad S., Khadatre P.B., Roy I. // Appl. Environ. Microbiol. 2011. Vol. 77. P. 4603.
5. Li M., Su Z.-G., Janson J.-C. // Protein Expr. Purif. 2004. Vol. 33. P. 1.
6. Sakono M., Kawashima Y., Ichinose H., Maruyama T., Kamiya N., Goto M. // Biotechnol. Prog. 2004. Vol. 20. P. 1783.
7. Nara T.Y., Togashi H., Sekikawa C., Kawakami M., Yaginuma N., Sakaguchi K. // Colloids Surf. B Biointerfaces. 2009. Vol. 68. P. 68.
8. Zhi W., Landry S.J., Gierasch L.M., Sreere P.A. // Protein Sci. 1992. Vol. 1. P. 522.
9. Eiberle M.K., Jungbauer A. // Biotechnol. J. 2010. Vol. 5. P. 547.
10. Sharapova O., Yurkova M., Fedorov A. // Protein Eng. Des. Sel. 2016; Vol. 29 (2). P. 57 (DOI: 10.1093/protein/gzv060).
11. Hashemzadeh M., Mohammadi M., Ghaleh H., Sharti M., Choopani A., Panda A. // Protein Pept. Lett. 2021; Vol. 28 (2). P. 122 (DOI: 10.2174/0929866527999200729182831).
12. Yamaguchi H., Miyazaki M. // Biomolecules. 2014. Vol. 20 (1). P. 235 (DOI: 10.3390/biom4010235).
13. Sinelnikov I.G., Siedhoff N.E., Chulkin A.M., Zorov I.N., Schwaneberg U., Davari M.D., Sinitsyna O.A., Shcherbakova L.A., Sinitsyn A.P., Rozhkova A.M. // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2021. Vol. 9 (DOI: 10.3389/fbioe.2021.728501).
14. Kim Y.E., Hipp M.S., Bracher A., Hayer-Hartl M., Ulrich F. // Annu. Rev. Biochem. 2013. Vol. 82. P. 323.
15. Gottesman S., Wickner S., Maurizi M.R., Betts C.R., Clipstone N.A., Ho S.N., Crabtree G.R., Zamir I., Zhang J., Lazar M.A. // Genes Dev. 1997. Vol. 11. P. 815.
16. Amrein K.E., Takacs B., Stieger M., Molnos J., Flint N.A., Burn P. // Proc. Natl. Acad. Sci. 1995. Vol. 92 (4). P. 1048.
17. Nishihara K., Kanemori M., Kitagawa M., Yanagi H., Yura T. // Appl. Environ. Microbiol. 1998. Vol. 64 (5). P. 1694.
18. Hoffmann J., Linke K., Graf P., Lilie H., Jakob U. // <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14685279/> EMBO J. 2004. Vol. 14 (1). P. 160 (DOI: 10.1038/sj.emboj.760001).
19. de Crouy-Chanel A., Kohiyama M., Richarme G. // J. Biol. Chem. 1995. Vol. 270 (39). P. 22669 (DOI: 10.1074/jbc.270.39.22669).
20. Fenton W.A., Horwich A.L. // Q. Rev. Biophys. 2003. Vol. 36 (02). P. 229.
21. Mayer M., Bukau B. // Cell. Mol. Life Sci. 2005. Vol. 62 (6). P. 670.
22. Voulgaridou G.-P., Mantso T., Chlichlia K., Panayiotidis M.I., Pappa A. // PLoS One. 2013. Vol. 8 (2). e56582 (DOI: 0.1371/journal.pone.0056582).
23. Dangi A.K., Rishi P., Tewari R. // Protein J. 2016. Vol. 35 (1). P. 72.
24. Maruyama T., Furutani M. // Front Biosci. 2000. Vol. 5. P. 821 (DOI: 10.2741/maruyama).
25. Zhang X.C., Wang W.D., Wang J.S., Pan J.C. // FEBS Lett. 2013. Vol. 587 (6). P. 666 (DOI: 10.1016/j.febslet.2013.01.028).
26. Liu C.P., Zhou Q.M., Fan D.J., Zhou J.M. // Int. J. Biochem. Cell. Biol. 2010. Vol. 42 (6). P. 890 (DOI: 10.1016/j.biocel.2010.01.019).
27. Ou W.B., Luo W., Park Y.D., Zhou H.M. // Protein Sci. 2001. Vol. 10 (11). P. 2346 (DOI: 10.1110/ps.23301).
28. Geon-A. J., Jong M.L., Gyuyou N., Dong S.K., So-Hyun K., Sun-Hee A., In-Soo K. // Protein Expression and Purification. 2015. Vol. 110. P. 130.

29. Shumilina D., Krämer R., Klocke E. // *Phytopathol. Pol.* 2006. Vol. 41. P. 39.
30. Шумилина Д.В., Джавахия В.Г. // *Агро XXI.* 2007. С. 12.
31. Isaki L., Beers R., Wu H.C. // *J. Bacteriol.*, 1990. Vol. 172. P. 6512.
32. Popletaeva S., Statsyuk N., Voinova T., Arslanova L., Zernov A., Bonartsev A., Bonartseva G. Dzha-vakhiya V. // *AIMS Microbiology.* 2018. Vol. 4 (1). P. 192.
33. Yamaguchi S., Yamamoto E., Mannen T., Nagamune T., Nagamune T. // *Protein Biotechnol. J.* 2013. Vol. 8. P. 17 (DOI: 10.1002/biot.201200025).
34. Wang Y., Van Oosterwijk N., Ali A.M., Adawy A., Anindya A.L., Dömling A.S.S., et al. // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7. P. 9355 (DOI: 10.1038/s41598-017-09687-z).
35. Hsu S.C., Lockwood J.L. // *Applied Microbiology. Amer. Soc. Microbiol.* 1975. Vol. 29 (3). P. 422.
36. Margoutidis G. et al. // *ACS Sustainable Chemistry and Engineering. Amer. Chem. Soc.* 2018. Vol. 6 (2). P. 1662.
37. Moghadam M. et al. // *Varastegan Institute for Medical Sciences.* 2015. Vol. 4 (1). P. 19.
38. Xia Y. et al. // *International Journal of Biological Macromolecules.* 2007. Vol. 40 (5). P. 437.
39. Bastings M.M.C. et al. // *BMC Biotechnology. BioMed Central.* 2008. Vol. 8 (1). P. 76.
40. Martino L. et al. // *FEBS.* 2009. Vol. 276. P. 4529.
41. Hartl F.U. et al. // *Nature.* 2011. Vol. 475. P. 324.
42. DeCenzo M.T. et al. // *Protein Eng.* 1996. Vol. 9. P. 173.
43. Galat A., Riviere S. // *Peptidyl-prolyl cys/trans isomerases.* Oxford University Press. Oxford, New-York, Tokyo, 1998. 117 p.

Информация об авторах

Александра Михайловна Рожкова – ст. науч. сотр. лаборатории биотехнологии ферментов Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. хим. наук (amrojtkova@yahoo.com);

Юрий Андреевич Денисенко – науч. сотр. лаборатории биотехнологии ферментов Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, канд. хим. наук (mailto:zcbml@yandex.ru denisenkoyura@mail.ru);

Игорь Геннадьевич Синельников – мл. науч. сотр. лаборатории биотехнологии ферментов Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, аспирант (sinelnikov.i@list.ru);

Иван Никитич Зоров – вед. науч. сотр. химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (inzorov@mail.ru);

Денис Валерьевич Ерохин – науч. сотр. отдела молекулярной биологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии» (erokhin.denis.v@gmail.com);

Виталий Георгиевич Джавахия – вед. науч. сотр. отдела молекулярной биологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии», канд. биол. наук (dzhavakhiya@yahoo.com).

Соблюдение этических стандартов

В данной работе отсутствуют исследования человека и животных.

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила в редакцию 30.10.2023;
одобрена после рецензирования 12.11.2023;
принята к публикации 14.11.2023.