

ПОВЫШЕНИЕ УРОВНЯ СИНТЕЗА БЕЛКА YciM ПОЗВОЛЯЕТ СНИЗИТЬ ЗАГРЯЗНЕНИЕ ЭНДОТОКСИНАМИ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ, ПОЛУЧАЕМЫХ В *Escherichia coli*

© 2023 П.А. Бобровский^{1,2}, Д.Д. Харлампиева¹, С.А. Кириллин¹, К.А. Бровина^{1,2},
Е.Н. Графская¹, В.Н. Лазарев^{1,2}, В.А. Манувера^{1,2*}

¹ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина
Федерального медико-биологического агентства,
119435 Москва, Россия; электронная почта: vmanuvera@yandex.ru

² Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
141701 Долгопрудный, Московская обл., Россия

Поступила в редакцию 29.06.2023

После доработки 10.08.2023

Принята к публикации 11.08.2023

Загрязнение эндотоксинами рекомбинантных белков, полученных из *Escherichia coli*, в ряде случаев является достаточно серьёзной проблемой. Одним из путей её решения может быть использование специальных модифицированных штаммов со сниженным содержанием липополисахаридов (ЛПС). Мы сравнили два подхода к получению подобных штаммов. Первый достаточно широко известен и заключается в модификации метаболического пути синтеза ЛПС с помощью нокаута семи генов *E. coli*. Второй подход, ранее не применявшийся, основан на повышении экспрессии белка *E. coli* YciM. По литературным данным, повышение экспрессии YciM приводит к снижению количества белка LpxC, который является ключевым ферментом пути биосинтеза ЛПС. Мы решили проверить, приведёт ли коэкспрессия YciM и eGFP к снижению количества эндотоксинов в препаратах выделенного рекомбинантного eGFP. В итоге оба подхода показали сходный результат. И в том и в другом случае происходит падение количества эндотоксинов в препаратах очищенного модельного белка.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рекомбинантный белок, липополисахарид, эндотоксин, штамм-продуцент, липид IVa, CRISPR, Cas9.

DOI: 10.31857/S0320972523090117, **EDN:** WUMDOY

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день *Escherichia coli* широко используется в биотехнологии как эффективный продуцент рекомбинантных белков. Главные преимущества этой бактерии при получении рекомбинантных белков заключаются в простоте манипуляций, дешевизне и лёгкой масштабируемости процесса культивирования. Однако использование *E. coli* для производства белков связано с целым рядом проблем, основными из которых являются частый неправильный фолдинг с образованием продуктом телец включения и отсутствие большинства посттрансляционных модификаций. В ряде случаев серьёзной проблемой оказывается также загрязнение препаратов бел-

ков липополисахаридами (ЛПС). ЛПС — это основной компонент внешней мембраны, при этом они являются сильным эндотоксином [1]. ЛПС действуют как агонисты рецепторного комплекса CD14/TLR4/MD2 клеток млекопитающих, что вызывает септический шок и может приводить к летальному исходу [1]. В связи с этим при медицинском использовании рекомбинантных белков, полученных в *E. coli*, а также при целом ряде биологических экспериментов, на результаты которых оказывают влияние ЛПС, требуется тщательная очистка препаратов белков от эндотоксинов.

Проблема загрязнения рекомбинантных белков ЛПС закономерно привела к тому, что исследователи пытаются её решить разными способами. Один из них — дополнительная

Принятые сокращения: ЛПС — липополисахариды; ОП₆₀₀ — оптическая плотность раствора при длине волны 600 нм и длине оптического пути 1 см; eGFP — рекомбинантный зелёный флуоресцирующий белок.

* Адресат для корреспонденции.

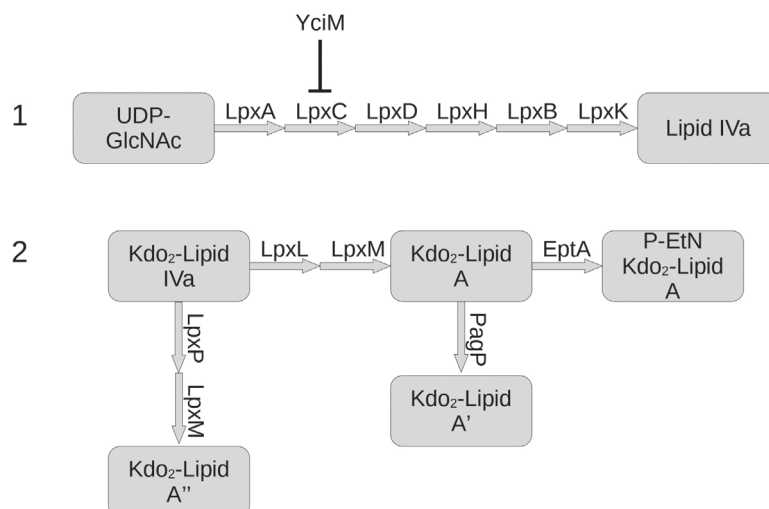


Рис. 1. Схема двух отрезков пути биосинтеза ЛПС у *E. coli*. 1 – Путь образования липида IVa (Lipid IVa) из UDP-N-ацетилглюкозамина (UDP-GlcNAc). Белок YciM подавляет одну из стадий биосинтеза липида IVa за счёт снижения количества фермента LpxC. 2 – Путь образования Kdo₂-липид A (Kdo₂-Lipid A), его производных и вариантов из Kdo₂-липид IVa (Kdo₂-Lipid IVa). P-EtN-Kdo₂-Lipid A – фосфоэтанолламин-Kdo₂-липид A, Kdo₂-Lipid A' – гептацилированный Kdo₂-липид A, Kdo₂-Lipid A'' – вариант Kdo₂-липид A с остатком пальмитолеиновой кислоты вместо остатка лауриновой. Для блокирования синтеза ЛПС были нокаутированы гены всех ферментов, обозначенных на схеме 2, а также гены *kdsD* и *gutQ*, ответственные за синтез Kdo (3-дезоксид-манно-2-октулозоновой кислоты) [4, 7]

очистка белков *in vitro*. Одним из самых эффективных способов её проведения является использование специальных сорбентов с иммобилизованным полимиксином, который специфически связывает бактериальные ЛПС, например, Affi-Prep Polymyxin Support («Bio-Rad», США) или Detoxi-Gel («Thermo Fisher Scientific», США). Другое направление представляет собой использование метаболической инженерии для получения штаммов *E. coli* со сниженным содержанием ЛПС и модификации ЛПС для снижения их токсичности. Молекула ЛПС грамотрицательных бактерий состоит из трёх частей – гидрофобного липида A (который определяет эндотоксические свойства ЛПС), корового олигосахарида и O-антигена [1, 2]. При этом у многих лабораторных штаммов *E. coli* O-антиген отсутствует, у штамма *E. coli* B и его производных отсутствует также дистальная часть корового олигосахарида [3]. Сообщается, что возможна модификация структуры липида A при помощи генно-инженерных методов таким образом, чтобы он не распознавался рецепторами на клетках млекопитающих и, следовательно, терял свою пирогенность [4]. Показано, что количество, длина, положение ацильных остатков, а также наличие или отсутствие остатков фосфорной кислоты в положениях 1 и 4' липида A критичны для активации TLR4/MD-2-комплекса клеток млекопитающих [5, 6]. Mamat et al. были получены модифицированные штаммы *E. coli* K12 и BL21(DE3), у которых во внешней мембране присутствовал только предшественник ЛПС – липид IVa [4].

Для этого был последовательно выключен ряд генов, участвующих в синтезе ЛПС – *kdsD*, *gutQ*, *lpxL*, *lpxM*, *pagP*, *lpxP*, *eptA*, а также введена компенсаторная мутация C52A для штамма K12 или C148A для штамма BL21 (DE3) в гене *msbA*, позволяющая выживать летальному фенотипу с нокаутами генов *kdsD* и *gutQ*.

Помимо модификации структуры ЛПС, желательнее также добиться общего снижения их количества. Согласно литературным данным, лимитирующей стадией синтеза липида A является стадия деацетилирования UDP-3-O-(R-3-гидроксимиристоил)-N-ацетилглюкозамина, которая катализируется продуктом гена *lpxC* [7]. Описан белок YciM, выключение гена которого приводит к увеличению количества фермента LpxC и значительному возрастанию количества ЛПС, приводящему к гибели клетки. Напротив, повышение синтеза YciM способствует снижению количества ЛПС [7]. В этой работе мы использовали оба подхода с целью сравнить их между собой, а также проверить возможное усиление эффекта при совместном использовании (рис. 1). Для этого мы с помощью системы CRISPR/Cas9 нокаутировали в штамме *E. coli* Rosetta 2(DE3) гены *kdsD*, *gutQ*, *lpxL*, *lpxM*, *pagP*, *lpxP*, *eptA* и ввели мутацию C52A в гене *msbA*. В то же время мы сконструировали рекомбинантную плазмиду для повышения наработки белка YciM. Мы сравнили уровень содержания ЛПС в образцах выделенного из бактерий рекомбинантного зелёного флуоресцирующего белка (eGFP, enhanced GFP) для мутантного штамма и для

штамма с повышенным синтезом YciM, а также используя два этих подхода одновременно.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы, плазмиды, условия культивирования. При конструировании рекомбинантных плазмид использовали штамм *E. coli* Top 10 (F^- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 nupG recA1 araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ^-*) («Invitrogen», США). В качестве исходного штамма для геномной инженерии выступал *E. coli* Rosetta 2(DE3) (F^- *ompT hsdSB(rB⁻ mB⁻) gal dcm* (DE3) *pRARE23 (CamR)*) («Novagen», США). Клетки *E. coli* культивировали в среде LB с повышенным содержанием NaCl в модификации Миллера (1% (m/v) триптона, 0,5% (m/v) дрожжевого экстракта, 1% (m/v) NaCl) при 37 °C или 30 °C. При необходимости добавляли ампициллин (150 мг/л), канамицин (50 мг/л), спектиномицин (50 мг/л) или хлорамфеникол (6 мг/л). Для клонирования структурной части гена *yciM* использовали плазмиду pBAD/Myc-His A («Thermo Fisher Scientific»), для геномного редактирования использовали плазмиды pCas и pTargetT, любезно предоставленные Шенг Янгом [8]. Для продукции модельного белка eGFP использовали плазмиду pET-eGFP(Kan), сконструированную нами ранее (Приложение 1).

Конструирование экспрессионной плазмиды, кодирующей белок YciM. Для получения экспрессионного вектора использовали метод неполного полимеразного удлинения праймера (PIPE) [9]. Фрагмент ДНК, кодирующий YciM, а также плазмиду pBAD/Myc-His A были амплифицированы с использованием пар олигонуклеотидов *yciM*F/*yciM*R и *bad-pipe1/bad-pipe2* соответственно (Приложение 2), и также геномной ДНК *E. coli* Rosetta 2(DE3) в качестве матрицы. С целью избавления от матричной ДНК ампликоны были очищены с помощью электрофореза в агарозном геле, а затем смешаны в приблизительно эквимоллярных количествах. Полученной смесью напрямую трансформировали клетки *E. coli* Top10 и рассевали их на агаризованную среду LB, содержащую 150 мкг/мл ампициллина. Выросшие колонии анализировали на наличие рекомбинантной вставки в плаزمиде путём ПЦР с использованием олигонуклеотидов *badF* и *badR* (Приложение 2). Клоны, содержащие плазмиды со вставкой нужного размера, пересевали в жидкую среду LB, содержащую 150 мкг/мл ампициллина, подращивали и выделяли из

полученной биомассы плазмидную ДНК. Валидацию структуры рекомбинантных плазмид проводили путём секвенирования целевого участка ДНК по Сэнгеру с использованием автоматического капиллярного секвенатора ABI Prism 3500xl («Applied Biosystems», США). В результате получена плаزمида pBAD-YciM, содержащая рекомбинантный ген под контролем промотора арабинозного оперона, кодирующий белок YciM (Приложение 1).

Нокаут генов биосинтеза ЛПС в штамме *E. coli* Rosetta 2(DE3). Для направленного редактирования последовательности геномной ДНК штамма *E. coli* Rosetta 2(DE3) применяли систему CRISPR/Cas9 с использованием плазмид pCas и pTargetT [8]. Все генетические конструкции, а также последовательности протоспейсеров гидовых РНК и схема сборки плазмид приведены в Приложении 3. Конструирование сайт-направляющих векторов pTargetT проводилось по общей схеме для всех выбранных мишеней. На первом этапе с помощью ПЦР получали фрагмент ДНК, кодирующий последовательность гидовой РНК с N20-спейсером, специфичным к гену-мишени, а также донорный фрагмент ДНК, гомологичный гену-мишени, для последующей гомологичной рекомбинации с целью редактирования. Ампликоны очищали с помощью электрофореза в агарозном геле и смешивали в эквимоллярных количествах. Смесью ампликонов использовали в качестве матрицы при ПЦР-амплификации, в результате чего были получены фрагменты ДНК для встраивания в плазмиду pTargetT. Каждый из них имел участок, кодирующий гидовую РНК, специфичную к одному из генов-мишеней, а также область, гомологичную гену-мишени, для последующей рекомбинации. Полученные фрагменты ДНК были очищены и клонированы в составе плазмиды pTargetT. Для этого смесь плазмиды и одного из фрагментов обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *SpeI* и *Sall*, после чего проводили реакцию лигирования. Продуктами реакции трансформировали клетки *E. coli* Top10. Выросшие колонии анализировали на наличие рекомбинантной вставки в плазмиде путём ПЦР с использованием праймеров *pts1* и *pts2* (Приложение 2). Процедуру геномного редактирования проводили согласно описанной ранее методике [8] (Приложение 3). Компетентные клетки *E. coli* Rosetta 2(DE3) трансформировали плазмидой pCas, после чего готовили электрокомпетентные клетки *E. coli* Rosetta 2(DE3)/pCas по методике, описанной в работе Dower et al. [10]. Культивирование клеток осуществлялось

в присутствии 10 мМ L-арабинозы для индукции экспрессии компонентов системы λ -Red. Полученные компетентные клетки трансформировали одной из плазмид серии pTargetT путём электропорации. Для этого 50 мкл клеток смешивали со 100 нг плазмидной ДНК, электропорацию проводили в 1 мм кювете Gene Pulser Xcell («Bio-Rad») при 1,8 кВ. Клетки инкубировали в 1 мл среды LB при 30 °С в течение 1 ч, а затем высевали на LB-агар, содержащий канамицин (50 мг/л) и спектиномицин (50 мг/л), и инкубировали в течение 20–44 ч при 30 °С. Успешность редактирования оценивали с помощью анализа размера продуктов ПЦР с использованием специфичных к мишени пар праймеров и секвенирования ДНК. Полученных мутантов использовали для следующего цикла редактирования.

Подбор условий индукции рекомбинантного гена *yciM*. Клетки *E. coli* Rosetta 2(DE3) (далее Rosetta WT) и клетки *E. coli* Rosetta 2(DE3) *msbA52*, *kdsD*[–], *gutQ*[–], *lpxM*[–], *lpxL*[–], *lpxP*[–], *pagP*[–], *eptA*[–] (далее Rosetta 8m) трансформировали плазмидой pBAD-YciM. В качестве контрольных использовались те же штаммы, трансформированные плазмидой pBAD/Мус-His A. Одиночные колонии переносили в стеклянную пробирку, содержащую 2 мл среды LB (150 мг/л ампициллина, 6 мг/л хлорамфеникола) с различной концентрацией L-арабинозы — от 0,2 до 2000 мг/л с шагом в 10 раз (Приложение 4). Культуры растили в шейкере-инкубаторе при 30 °С в течение 18 ч. Далее измеряли оптическую плотность культуры при длине волны 600 нм (ОП₆₀₀). Определение ОП₆₀₀ проводили с помощью спектрофотометра UV-1900 («Shimadzu», Япония) в кюветах с длиной оптического пути 1 см. Каждая культура наращивалась в трёх независимых повторях. В качестве рабочей концентрации L-арабинозы принимали максимальное значение, не приводящее к полному ингибированию роста культуры для всех исследованных вариантов (Приложение 4).

Наработка и выделение рекомбинантного eGFP в модифицированных штаммах. Клетки *E. coli* Rosetta WT и Rosetta 8m трансформировали плазмидой pET-eGFP(Kan). Из полученных трансформантов готовили компетентные клетки и трансформировали их плазмидой pBAD-YciM или pBAD/Мус-His A. Таким образом, были получены по два варианта штаммов Rosetta WT и Rosetta 8m, несущие плазмиду pET-eGFP(Kan) и в дополнение к ней либо pBAD-YciM, либо pBAD/Мус-His A без вставки. Каждый из вариантов культивировали в трёх независимых повторях, после чего

из биомассы с помощью металл-хелатной хроматографии выделяли eGFP. Для этого единичной колонией бактерий засеивали 2 мл среды LB (150 мг/л ампициллина, 50 мг/л канамицина, 6 мг/л хлорамфеникола) и растили в шейкере-инкубаторе при 30 °С в течение 18 ч при 250 об./мин и амплитуде 25 мм. Далее, 2 мл ночной культуры переносили в 20 мл свежей среды того же состава с добавлением 20 мг/л арабинозы и растили в шейкере-инкубаторе при 30 °С. После достижения культурой оптической плотности при длине волны ОП₆₀₀ = 0,6–0,7 к культуре добавляли раствор изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 0,5 мМ и продолжали рост ещё в течение четырёх часов. Клетки осаждали центрифугированием в течение 10 мин при ускорении 5000 g, ресуспендировали в физрастворе и снова осаждали. К осадку добавляли 2 мл буферного раствора А (20 мМ Tris-HCl, 500 мМ NaCl, 10 мМ имидазол, pH 7,5), после чего разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора Branson 250 Sonifier («Branson», США) при 22 кГц 2 мин на льду. Лизат для удаления остатков клеток центрифугировали 15 мин при ускорении 15 000 g. Полученный раствор наносили на хроматографическую колонку Tricorn 5/50, содержащую 0,3 мл сорбента Ni Sepharose FF («GE Healthcare», США) и уравновешенную тем же буфером. После нанесения колонку промывали раствором А (5 мл), а затем элюировали связавшиеся с сорбентом полипептиды раствором для элюции Е (20 мМ Tris-HCl, 500 мМ NaCl, 500 мМ имидазол, pH 7,5) в объёме 1 мл. Скорость потока раствора через колонку составляла 1 мл/мин, контроль процесса и сбор фракций осуществлялся на основании проточного измерения оптической плотности элюата при длине волны 280 нм. Все операции по хроматографическому разделению выполнялись с помощью хроматографа NGC («Bio-Rad»).

Определение бактериальных эндотоксинов (ЛАЛ-тест). Грубую оценку содержания бактериальных эндотоксинов в препаратах выделенного модельного рекомбинантного белка проводили путём проведения гель-тромб теста с использованием лизата амёбоцитов мечехвостов рода *Tachypleus* PYROSTAR ES-F («Wako Chemicals», США). Количественное определение содержания эндотоксинов в образцах проводили с помощью хромогенного теста по конечной точке («BioEndo», Китай). Чувствительность теста определялась выбранным диапазоном калибровочной кривой (от 0,1 до 1 ЕЭ/мл, ЕЭ — единицы эндотоксина).

В качестве отрицательного контроля использовали воду для ЛАЛ-теста AL-WATER («Альгимед Техно», Республика Беларусь) и буферный раствор для элюции Е. Раствор белка в буферном растворе Е напрямую использовали для определения содержания эндотоксинов. Рабочие разведения образцов составляли от 10^3 до 10^8 раз, что полностью нивелировало влияние компонентов буфера на результаты теста, что подтверждается одинаковыми результатами для контрольных образцов с использованием воды и разведённого буферного раствора. Детекцию результатов осуществляли на планшетном сканере Multiscan Ascent («Thermo Fisher Scientific») при длине волны 405 нм.

Перед определением содержания эндотоксинов образцы выделенного eGFP выравнивались по концентрации на основании измерения флуоресценции раствора. Определение флуоресценции проводили с помощью флуориметра Qubit 4 Fluorometer («Thermo Fisher Scientific») в режиме fluorometer (blue, 470 нм).

Статистический анализ проводили с использованием U-критерия Манна–Уитни. Статистические вычисления выполняли на языке Python (версия 3.11.4) в среде для разработки Jupyter Notebook (6.5.4).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Подбор условий индукции рекомбинантного гена *yciM*. Было показано, что высокое содержание арабинозы в культуральной среде ведёт к сильному ингибированию и даже полному прекращению роста клеток, содержащих плазмиду pBAD-*YciM*. В случае штамма с восемью мутациями (Rosetta 8m) ингибирование роста было более выражено по сравнению с Rosetta WT и достигалось при концентрациях арабинозы на два порядка меньших (Приложение 4).

При этом полного ингибирования роста клеток Rosetta WT/pBAD-*YciM* не наблюдалось, в то время как рост Rosetta 8m/pBAD-*YciM* при концентрациях арабинозы 2 и 0,2 г/л полностью подавлялся. Также было отмечено незначительное подавление роста как Rosetta 8m, так и Rosetta WT, трансформированных плазмидой pBAD/Мyc-His A при высоких концентрациях арабинозы. Для дальнейшей работы было выбрано максимальное значение концентрации арабинозы, которое не ведёт к полному подавлению роста самого чувствительного штамма — Rosetta 8m/pBAD-*YciM*, оно составило 20 мг/л.

Уровень накопления рекомбинантного eGFP в различных исследуемых штаммах. Для каждого из двенадцати выделенных образцов eGFP определялся уровень флуоресценции в условных единицах и концентрация белка по методу Брэдфорда относительно бычьего сывороточного альбумина с использованием реагентов Bio-Rad Protein Assay («Bio-Rad»). В результате было установлено, что оба этих значения чётко коррелируют между собой (коэффициенты корреляции 0,92–0,99) (рис. 2).

Установлено, что коэкспрессия *YciM* и eGFP в клетках Rosetta WT не приводит к снижению выхода eGFP. В случае Rosetta 8m наблюдалась другая ситуация: совместная экспрессия обоих рекомбинантных генов приводит к снижению выхода eGFP на 40%, что соотносится со снижением общей плотности бактериальной культуры (табл. 1).

Содержание эндотоксинов в препаратах очищенного eGFP. Результаты измерения содержания эндотоксинов в образцах очищенного eGFP с помощью хромогенного теста приведены на рис. 3 и в табл. 2.

Как совместная экспрессия *YciM* и eGFP, так и использование клеток Rosetta 8m с нокаутированными генами пути биосинтеза ЛПС

Таблица 1. Концентрация белка, флуоресценция образцов выделенного eGFP и оптическая плотность исходных бактериальных культур

Образец	RFU·10 ⁴	С, мг/мл	ОП ₆₀₀
Rosetta 8m/pBAD- <i>YciM</i>	18,5 ± 6,5	0,6 ± 0,3	1,5 ± 0,1
Rosetta 8m/pBAD/Мyc-His A	27,7 ± 2,5	1,0 ± 0,1	1,8 ± 0,1
Rosetta WT/pBAD- <i>YciM</i>	37,7 ± 7,0	1,3 ± 0,2	2,3 ± 0,2
Rosetta WT/pBAD/Мyc-His A	36,9 ± 9,2	1,4 ± 0,2	2,4 ± 0,2

Примечание. RFU — флуоресценция в условных единицах; С — концентрация белка по методу Брэдфорда; ОП₆₀₀ — оптическая плотность исходной культуры. Приведено усреднённое значение для трёх образцов каждого вида с 95%-ными доверительными интервалами. Объём каждого образца составлял 1 мл, концентрации численно соответствуют общему количеству выделенного белка.

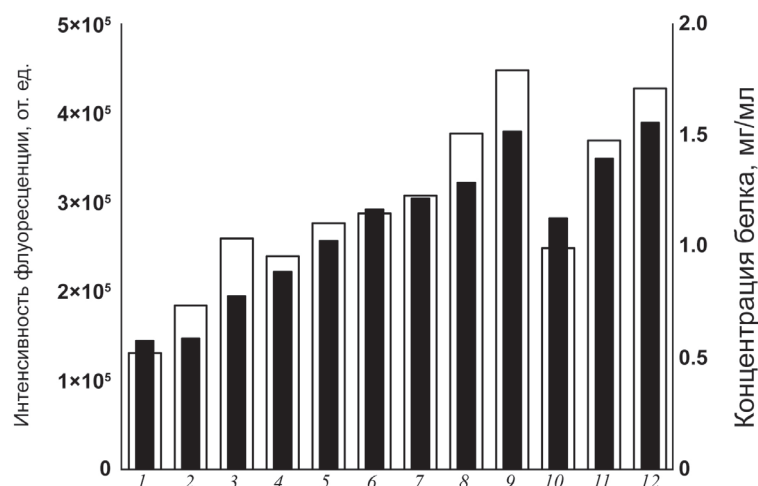


Рис. 2. Уровень флуоресценции и концентрация выделенного рекомбинантного eGFP, определённая по методу Брэдфорда. На гистограмме отложены значения концентраций (мг/мл) чёрным цветом, а флуоресценции eGFP (отн. ед.) — белым цветом для каждого выделенного образца. Образцы 1–3 — белок, выделенный из Rosetta 8m/pBAD-YciM; образцы 4–6 — белок, выделенный из Rosetta 8m/pBAD-Myc-His A; образцы 7–9 — белок, выделенный из Rosetta WT/pBAD-YciM; образцы 10–12 — белок, выделенный из Rosetta WT/pBAD-Myc-His A

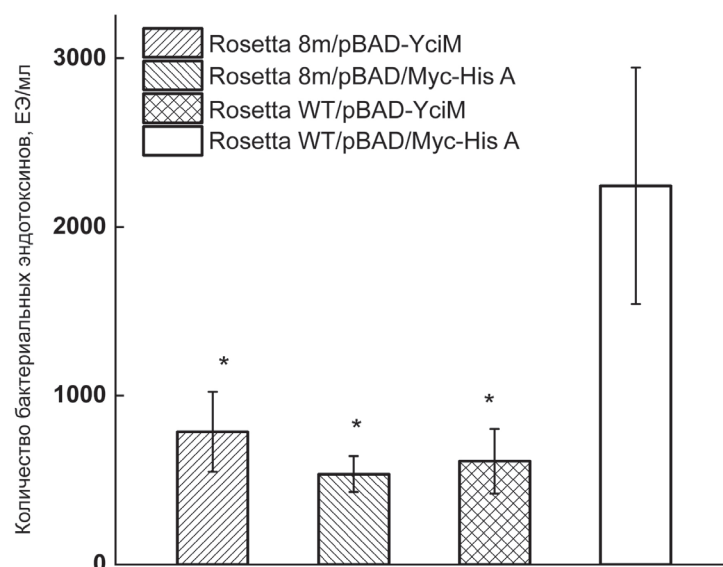


Рис. 3. Содержание эндотоксинов в препаратах очищенного eGFP. Содержание бактериальных эндотоксинов определяли с помощью хромогенного ЛАЛ-теста по конечной точке. Для определения содержания эндотоксинов в образцах строили калибровочную кривую, используя контрольный стандарт эндотоксина. Данные представлены в виде медианных значений содержания бактериальных эндотоксинов в образцах выделенных рекомбинантных eGFP из штаммов Rosetta 8m/pBAD-YciM, Rosetta 8m/pBAD-Myc-His A, Rosetta WT/pBAD-YciM и Rosetta WT/pBAD-Myc-His A с 95%-ными доверительными интервалами. Отличия от контрольного штамма Rosetta WT/pBAD-Myc-His A считали достоверными при уровне значимости меньше 0,027 (*)

ведёт к снижению содержания эндотоксинов в образцах очищенного eGFP относительно значения, полученного для eGFP, выделенного из клеток Rosetta WT/pBAD/Myc-His A. Для Rosetta WT/pBAD-YciM это снижение составляет 3,7 раза, для Rosetta 8m/pBAD/Myc-His A — 4,2 раза, а в случае Rosetta 8m/pBAD-YciM — 2,9 раза. Количества эндотоксинов в этих трёх случаях статистически достоверно отличаются от таковых для образца Rosetta WT/pBAD/Myc-His A ($p < 0,027$) и не отличаются между собой.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Снижение количества эндотоксинов в препаратах рекомбинантных белков, синтезируемых в *E. coli*, является обязательным при их медицинском применении. Одним из подходов к решению этой проблемы является получение специальных штаммов со сниженным содержанием ЛПС или с модификацией ЛПС для снижения пирогенности. Самым известным подобным штаммом является проприетарный ClearColi BL21(DE3), который позволяет

Таблица 2. Содержание бактериальных эндотоксинов в препаратах выделенного eGFP из разных штаммов *E. coli*

Штамм	Rosetta 8m/ pBAD-YciM	Rosetta 8m/ pBAD-Myc-His A	Rosetta WT/ pBAD-YciM	Rosetta WT/ pBAD-Myc-His A
Медиана	785	535	611	2243
95%-ный ДИ	548–1022	430–640	421–801	1543–2943
Изменение по сравнению с контролем, раз	2,85	4,19	3,67	1
<i>p</i>	0,027	0,0035	0,0081	

Примечание. Данные представлены в виде медианных значений содержания бактериальных эндотоксинов в единицах ЕЭ в образцах выделенных рекомбинантных eGFP из штаммов Rosetta 8m/pBAD-YciM, Rosetta 8m/pBAD-Myc-His A, Rosetta WT/pBAD-YciM, Rosetta WT/pBAD-Myc-His A. Образцы нормированы по уровню флуоресценции eGFP. Различия между группами оценивали с помощью 95%-ных доверительных интервалов. Дополнительно использовали U-критерий Манна–Уитни для определения уровня значимости различий между группами (*p*). Изменение количества бактериальных токсинов оценивали относительно контрольного штамма Rosetta WT/pBAD-Myc-His A.

экспрессировать рекомбинантные гены под контролем промотора бактериофага T7. По сообщениям в научной литературе [4], в ClearColi BL21(DE3) проведён нокаут семи генов, участвующих в биосинтезе ЛПС, и введена компенсаторная мутация С148А в гене *msbA*. С помощью технологии редактирования генома мы нокаутировали эти семь генов в широко известном экспрессионном штамме *E. coli* Rosetta 2(DE3) и ввели мутацию в ген *msbA*. В качестве альтернативного подхода мы воспользовались описанным ранее явлением [7], которое заключается в снижении общего уровня ЛПС при повышении экспрессии гена *yciM* [7]. Мы предположили, что при совместной экспрессии целевого белка и рекомбинантного YciM возможно снижение содержания ЛПС, и решили экспериментально сравнить результат этого возможного снижения с достигаемым при использовании штамма с семью нокаутированными генами пути биосинтеза ЛПС. Для этого мы сконструировали экспрессионную плазмиду pBAD-YciM, содержащую рекомбинантный ген под контролем промотора арабинозного оперона, кодирующий белок YciM.

В качестве модельного белка для экспрессии, очистки и последующего определения содержания эндотоксинов мы использовали мутантный вариант eGFP с повышенной светимостью [11]. Мы сконструировали экспрессионную плазмиду pET-eGFP(Kan), содержащую рекомбинантный ген под контролем промотора бактериофага T7, кодирующий eGFP, слитый с С-концевым гексагистидиновым мотивом. Несмотря на то, что плазмиды pBAD-YciM и pET-eGFP(Kan) относятся к одной группе совместимости, возможно их устойчивое совместное наследование в клетках ввиду того,

что первая из них обеспечивает устойчивость к ампициллину, а вторая — к канамицину. Использование двух разных плазмид с разными промоторно-операторными областями рекомбинантных генов вызвано в нашем случае необходимостью обеспечить сильно несбалансированный уровень их экспрессии. Как описано в разделе «Подбор условий индукции рекомбинантного гена *yciM*», высокое содержание арабинозы в культуральной среде ведёт к сильному ингибированию и даже полному прекращению роста клеток. Как видно из таблицы и графика в Приложении 4, сильная индукция гена, кодирующего YciM, приводит к фатальным последствиям для культуры клеток. В то же время eGFP должен нарабатываться в максимально возможном количестве. Это ведёт к тому, что необходимо обеспечивать разный уровень экспрессии рекомбинантных генов — максимально возможный для гена, кодирующего eGFP, и небольшой и гибко регулируемый для гена, кодирующего YciM.

В результате экспериментов мы установили, что оба использованных подхода ведут к статистически достоверному снижению содержания эндотоксинов в образцах выделенного eGFP. При этом экспрессия YciM в штамме Rosetta 8m приводит к значительному подавлению его роста вплоть до полной остановки при высоких концентрациях арабинозы. Экспрессия YciM в штамме Rosetta WT тоже подавляет рост культуры, но в гораздо меньшей степени и при более высоких концентрациях индуктора. При этом удельный выход рекомбинантного белка на единицу биомассы во всех случаях отличался незначительно (табл. 1).

При экспрессии YciM в Rosetta 8m дополнительного усиления эффекта не наблюдалось. Более того, среднее значение содержания

эндотоксинов в этом случае даже выше, чем при использовании Rosetta 8m с контрольной плазмидой pBAD/Мус-His A, однако статистически это различие не достоверно.

В литературных источниках имеется весьма ограниченная информация о содержании эндотоксинов в препаратах рекомбинантных белков, выделенных из штаммов ClearColi. При использовании штамма ClearColi BL21(DE3) сообщается о снижении содержания эндотоксинов в выделенных препаратах в 750 раз для белка АроА1 [12] и в 36 раз — для белка Hsp70 [4]. При этом для АроА1, выделенного из ClearColi K12, это снижение составляет 4–18 раз [4], а для выделенного домена тяжёлой цепи иммуноглобулина G VHm36 — 35 раз. В последнем случае сообщение приведено не в рецензируемом журнале, а в рекламной презентации фирмы-разработчика [https://clearcoli.com/wp-content/uploads/2013/04/RCT_lucigen-Aug-2016.pptx]. Данные о содержании эндотоксинов в белках, полученных с использованием штаммов ClearColi, которые удалось найти авторам, обобщены в Приложении 5.

В ходе нашего исследования мы провели нокаут генов, описанных для ClearColi, в штамме *E. coli* Rosetta 2(DE3) и добились снижения содержания эндотоксинов в препарате eGFP в четыре раза. Ввиду фрагментарности литературных данных прямое сравнение с коммерческим штаммом ClearColi BL21(DE3) представляется затруднительным. В целом, создаётся впечатление, что ClearColi BL21(DE3) с теми же нокаутированными генами, что и полученный нами Rosetta 8m, обеспечивает большее снижение концентрации эндотоксинов. Однако надо учитывать, что на этот параметр может влиять множество факторов, начиная от природы рекомбинантного белка и кончая параметрами культивирования и очистки. Также следует отметить, что ClearColi BL21(DE3) является проприетарным штаммом и может быть описан в литературных источниках недостаточно полно.

Таким образом, оба использованных подхода дают сходные результаты, приводя к снижению содержания эндотоксинов в препаратах выделенного рекомбинантного eGFP. Использование коэкспрессии с YciM имеет некоторое преимущество из-за того, что с помощью трансформации плазмидой можно модифицировать широкий круг уже существующих штаммов *E. coli*. Но это преимущество относится, скорее, к лабораторной практике, так как в биофармацевтических приложениях предпочтительнее использовать более стабильные штаммы с модифицированным геномом,

не требующие применения дополнительного антибиотика.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Снижение количества эндотоксинов в препаратах рекомбинантных белков, получаемых в *E. coli*, является важным условием их медицинского применения. Один из подходов к решению этой проблемы — использование специальных штаммов, продуцирующих меньшее количество ЛПС или модифицированные ЛПС со сниженной пирогенностью. Мы сравнили два подхода к решению этой задачи. Первый подход заключается в нокауте генов пути биосинтеза ЛПС с помощью геномного редактирования и повторяет способы получения ранее известных коммерческих штаммов. Второй подход ранее не встречался в литературных источниках. Он заключается в совместной экспрессии целевого рекомбинантного белка и белка кишечной палочки YciM. Проведённые эксперименты показали, что и использование штамма с нокаутом генов, и коэкспрессия с белком YciM приводят к снижению содержания эндотоксинов в выделенном модельном рекомбинантном белке eGFP на сравнимую величину. Коэкспрессия с YciM имеет преимущество в гибкости и возможности модифицировать уже существующие штаммы. В биофармацевтических же приложениях представляется предпочтительным использование стабильных штаммов с модифицированным геномом.

Вклад авторов. П.А. Бобровский — генная инженерия, подготовка текста; Д.Д. Харлампиева — анализ содержания эндотоксинов, подготовка текста; С.А. Кириллин — генная инженерия; К.А. Бровина — микробиологическая работа; Е.Н. Графская — микробиологическая работа; В.Н. Лазарев — общее руководство; В.А. Манувера — очистка рекомбинантных белков, подготовка текста.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 23-24-00080, <https://rscf.ru/project/23-24-00080/>.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Raetz, C. R., and Whitfield, C. (2002) Lipopolysaccharide endotoxins, *Annu. Rev. Biochem.*, **71**, 635-700, doi: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414.
2. Bos, M. P., Robert, V., and Tommassen, J. (2007) Biogenesis of the gram-negative bacterial outer membrane, *Annu. Rev. Microbiol.*, **61**, 191-214, doi: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093245.
3. Yoon, S. H., Jeong, H., Kwon, S. K., and Kim, J. F. (2009) Genomics, Biological Features, and Biotechnological Applications of *Escherichia coli* B: "Is B for better?!", in *Systems Biology and Biotechnology of Escherichia coli* (Lee, S. Y., ed), Springer, Dordrecht, doi: 10.1007/978-1-4020-9394-4_1.
4. Mamat, U., Wilke, K., Bramhill, D., Schromm, A. B., Lindner, B., Kohl, T. A., Corchero, J. L., Villaverde, A., Schaffer, L., Head, S. R., Souvignier, C., Meredith, T. C., and Woodard, R. W. (2015) Detoxifying *Escherichia coli* for endotoxin-free production of recombinant proteins, *Microb. Cell Fact.*, **14**, 1-15, doi: 10.1186/s12934-015-0241-5.
5. Kayagaki, N., Wong, M. T., Stowe, I. B., Ramani, S. R., Gonzalez, L. C., Akashi-Takamura, S., Miyake, K., Zhang, J., Lee, W. P., Muszyński, A., Forsberg, L. S., Carlson, R. W., and Dixit, V. M. (2013) Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4, *Science*, **130**, 1246-1249, doi: 10.1126/science.1240248.
6. Park, B. S., Song, D. H., Kim, H. M., Choi, B. S., Lee, H., and Lee, J.-Oh (2009) The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex, *Nature*, **458**, 1191-1195, doi: 10.1038/nature07830.
7. Mahalakshmi, S., Sunayana, M. R., Saisree, L., and Reddy, M. (2014) YciM is an essential gene required for regulation of lipopolysaccharide synthesis in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.*, **91**, 145-157, doi: 10.1111/mmi.12452.
8. Jiang, Y., Chen, B., Duan, C., Sun, B., Yang, J., and Yang, S. (2015) Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system, *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 2506-2514, doi: 10.1128/AEM.04023-14.
9. Klock, H. E., and Lesley, S. A. (2009) The Polymerase Incomplete Primer Extension (PIPE) method applied to high-throughput cloning and site-directed mutagenesis, *Methods Mol. Biol.*, **498**, 91-103, doi: 10.1007/978-1-59745-196-3_6.
10. Dower, W. J., Miller, J. F., and Ragsdale, C. W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation, *Nucleic Acids Res.*, **16**, 6127-6145, doi: 10.1093/nar/16.13.6127.
11. Cormack, B. P., Valdivia, R. H., and Falkow, S. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP), *Gene*, **173**, 33-38, doi: 10.1016/0378-1119(95)00685-0.
12. Mamat, U., Woodard, R. W., Wilke, K., Souvignier, C., Mead, D., Steinmetz, E., Terry, K., Kovacich, Ch., Zegers, A., and Knox, C. (2013) Endotoxin-free protein production – ClearColi™ technology, *Nat. Methods*, **10**, 916, doi: 10.1038/nmeth.f.367.

UPREGULATION OF YciM EXPRESSION REDUCES ENDOTOXIN CONTAMINATION OF RECOMBINANT PROTEINS PRODUCED IN *Escherichia coli* CELLS

P. A. Bobrovsky^{1,2}, D. D. Kharlampieva¹, S. A. Kirillin¹, K. A. Brovina^{1,2}, E. N. Grafkskaia¹, V. N. Lazarev^{1,2}, and V. A. Manuvera^{1,2*}

¹ Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, 119435 Moscow, Russia; e-mail: vmanuvera@yandex.ru

² Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University)", 141701 Dolgoprudny, Russia

Recombinant proteins produced in *Escherichia coli* are often contaminated with endotoxins, which can be a serious problem for their further application. One of the possible solutions is the use of modified strains with reduced lipopolysaccharide (LPS) levels. We compared two approaches to engineering such strains. The first commonly known approach was modification of LPS biosynthesis pathway by knocking out seven genes in the *E. coli* genome. The second approach, which has not been previously used, was to increase expression of *E. coli* protein YciM. According to the published data, elevated expression of YciM leads to the reduction in the amount of the LpxC enzyme involved in LPS biosynthesis. We investigated the impact of YciM coexpression with eGFP on the content of endotoxins in the purified recombinant eGFP samples. Both approaches provided similar outcomes, i.e., decreased the endotoxin levels in the purified protein samples.

Keywords: recombinant protein, lipopolysaccharide, endotoxin, expression strain, lipid IVa, CRISPR, Cas9