

УДК 573.6.086.83:577.21

СЕКРЕТОРНАЯ ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКОВ В *E. COLI*

Аксамбаева А.С., Шустов А.В.

Национальный центр биотехнологии
ул. Ш. Валиханова, 13/1, Астана, 010000, Казахстан
altyn-ai@bk.ru

АБСТРАКТ

В статье представлен обзор литературы по теоретическим и прикладным аспектам секреторной экспрессии белков в *Escherichia coli*. Одним из способов получения значительного выхода целевого продукта с правильной третичной структурой, в том числе функционально активного белка, является изменение условий продукции белка таким образом, чтобы продукт выделялся (секретировался) в периплазму или внеклеточную среду. Периплазматическая экспрессия или внеклеточная секреторная экспрессия были использованы для получения рекомбинантных белков, которые не удалось произвести в функционально активной форме в цитоплазму *E.coli*.

Секреторная продукция всё ещё остаётся областью исследований, проводимых путём перебора множества вариантов, методом проб и ошибок. С учётом разнообразия секреторных аппаратов и систем секреции в *E.coli* можно ожидать, что секреторная продукция в *E.coli* однажды достигнет такой же степени популярности для исследовательских целей и для промышленного производства, какую сейчас имеет экспрессия в цитоплазму.

Ключевые слова: секреторная продукция, рекомбинантный белок, сигнальный пептид, система секреции, рефолдинг, транслокация, шаперон.

SECRETORY PROTEIN EXPRESSION IN *ESCHERICHIA COLI*

Aksambaeva A.S., Shustov A.V.

National Center for Biotechnology
13/1 Valikhanova st., Astana, 010000, Kazakhstan
altyn-ai@bk.ru

ABSTRACT

Periplasmic or extracellular secretory expression were used to produce functionally active recombinant proteins that were incorrectly folded in the cytoplasm of *Escherichia coli*. At least six different protein-secretion systems were described in Gram-negative bacteria (s.c. types 1-6 secretion systems, T1SS-T6SS), which differ in complexity and morphology (structures of translocons and membrane complexes). Some secretion systems perform translocation in one step (from cytoplasm directly into the extracellular milieu), while others translocate in two steps: the protein is first translocated from the cytoplasm to the periplasmic space with Sec, Tat, or SRP pathways; secondly, a different export carrier transfers the product out of the cell. This review describes the Sec (general secretory pathway), Tat (twin-arginine pathway for proteins with rapid or complex folding), and SRP (co-translational pathway) machinery for translocation from the cytoplasm to the periplasm.

Despite the current understanding of the mechanisms of protein translocation and extracellular release, there is currently no effective way to theoretically predict how to produce a given recombinant protein in a secretory form other than trial and error. Given the diverse secretory apparatuses and systems in *E. coli*, we expect that secretory expression will be popular in research and industrial applications for cytoplasmic expression.

Keywords: secretory expression, recombinant protein, signal peptide, secretion system, refolding, translocation, chaperone.

ВВЕДЕНИЕ

Секреторная продукция рекомбинантных белков в *E. coli*

Escherichia coli – один из наиболее широко используемых микроорганизмов, в том числе в промышленности, для производства рекомбинантных белков. Этот микроорганизм имеет многие характеристики, желательные для продуцента, в том числе быстрый рост биомассы, легкость управления фенотипом методами генетической инженерии и обилие разнообразных систем экспрессии белков в этом виде бактерий. Для *E. coli* описаны способы получения культур с высокой плотностью клеток и возможность производить рекомбинантные белки с максимально достижимым выходом до 50% от общего клеточного белка. Однако весьма часто белки, природная пространственная укладка которых требует обязательного образования дисульфидных связей, или эукариотические белки, которые подвергаются пост-трансляционным модификациям, не могут быть произведены в *E. coli* в функционально активной форме. Физико-химические свойства продукта экспрессии могут приводить к невозможности образования правильной трёхмерной структуры целевого белка внутри бактерии или к нерастворимости белка в бактериальной цитоплазме в условиях гиперэкспрессии. В условиях рекомбинантной экспрессии такие белки часто накапливаются в клетке в виде телец включения. Из телец включения биологически активные белки могут быть получены с помощью процедуры рефолдинга, однако выход белка после рефолдинга часто низкий [1]. Особенно мала эффективность рефолдинга, если белок в денатурированном виде склонен к агрегации, например, из-за взаимодействий между гидрофобными участками полипептидной цепи. Для увеличения выхода продукта в растворимой (цитозольной) форме применены разные подходы, в том числе подбор промоторов для регулирования уровня экспрессии, подбор штаммов-продуцентов, ко-экспрессия шаперонов, снижение температуры инкубации.

Одним из способов получения значительного выхода целевого продукта с правильной третичной структурой, в том числе функционально-активного белка, является изменение условий продукции белка таким образом, чтобы продукт выделялся (секретировался) в периплазму или внеклеточную среду. Периплазматическая экспрессия или внеклеточная секреторная экспрессия были использованы для получения рекомбинантных белков, которые не удалось произвести в функционально активной форме в цитоплазму *E. coli* [2]. Секреторная продукция имеет ряд преимуществ, в том числе важных для промышленного производства. Указанные преимущества следующие:

1) упрощенная очистка продукта. Известно, что *E. coli* во время роста не выделяет большого количества белков или других высокомолекулярных соединений во внеклеточную среду [3]. Таким образом, во внеклеточной среде концентрации загрязняющих высокомолекулярных веществ существенно меньше, чем в лизате бактериальных клеток. В ходе очистки секреторируемого белка из среды инкубации, без разрушения клеток, контаминация продукта примесными белками клетки-хозяина, а также эндотоксином (бактериальный липополисахарид) и нуклеиновыми кислотами, существенно снижена;

2) сохранение биологической активности и отсутствие потребности в рефолдинге. В периплазме среда имеет большие окислительные свойства, чем в цитоплазме, и это облегчает образование дисульфидных связей. Экспорт белков через периплазматическое пространство приводит к тому, что белок подвергается воздействию окислительной среды и ряда ферментов периплазматического пространства, облегчающих формирование дисульфидных связей, – дисульфид изомераз. Периплазматические шапероны способствуют правильному фолдингу. Секреторная экспрессия позволяет получать рекомбинантный белок, имеющий природную третичную структуру, который не требует

дорогостоящей процедуры восстановления правильной пространственной укладки (рефолдинга);

3) увеличение стабильности продукта. По сравнению с цитоплазмой *E.coli*, в периплазме (и тем более во внеклеточной среде инкубации *E.coli*) меньше протеаз, и это обстоятельство объясняет меньшую протеолитическую деградацию секретируемого продукта;

4) сохранение природной структуры N-конца продукта экспрессии. Секреторная продукция позволяет использовать такую систему экспорта, которая отщепляет от целевого продукта гетерологические последовательности (например, сигнальный пептид), и это позволяет производить целевой белок, не имеющий на концах неприродных аминокислотных остатков. Экспрессия белка в цитоплазму *E.coli* приводит к продукту, который обычно сохраняет на N-конце стартовый метионин.

Системы экспорта белков у грамотрицательных бактерий

Грамотрицательные бактерии имеют две мембраны – цитоплазматическую мембрану (IM) и внешнюю мембрану (OM), разделённые периплазматическим пространством. Такая организация клеточной стенки делает процесс секреции топологически сложным. В грамотрицательных бактериях биологические молекулы, которые должны выделяться во внешнюю среду, должны пересечь два гидрофобных барьера. Для обеспечения транспорта через клеточную стенку в указанных микроорганизмах функционируют как минимум шесть специализированных систем секреции (т.н. системы секреции типов 1-6), и вполне вероятно, в будущем будут обнаружены дополнительные типы [4]. Для секреторной экспрессии рекомбинантных белков наибольшее использование получили системы секреции типов 1 и 2 [2].

Системы секреции можно классифицировать по тому, за один или два этапа происходит транспортировка молекулярной мишени. Один класс систем секреции, включающий типы 1, 3 и 4, обеспечивает одноэтапную секрецию из цитоплазмы сразу во внеклеточную среду. Второй класс систем секреции (типов 2, 4 и 5) предполагает экспорт в два этапа (из цитоплазмы в периплазматическое пространство, и из периплазмы в среду), причём в последовательных этапах транслокации работают разные молекулярные механизмы. Первый этап – транспорт в периплазму – происходит при участии одного из трёх разных путей: Sec, Tat или SRP. Основные особенности этих путей – Sec (SecB-зависимый путь), Tat (твин-аргинин зависимый путь, twin-arginine translocation) и SRP (signal recognition particle) – схематически показаны на рисунке 1.

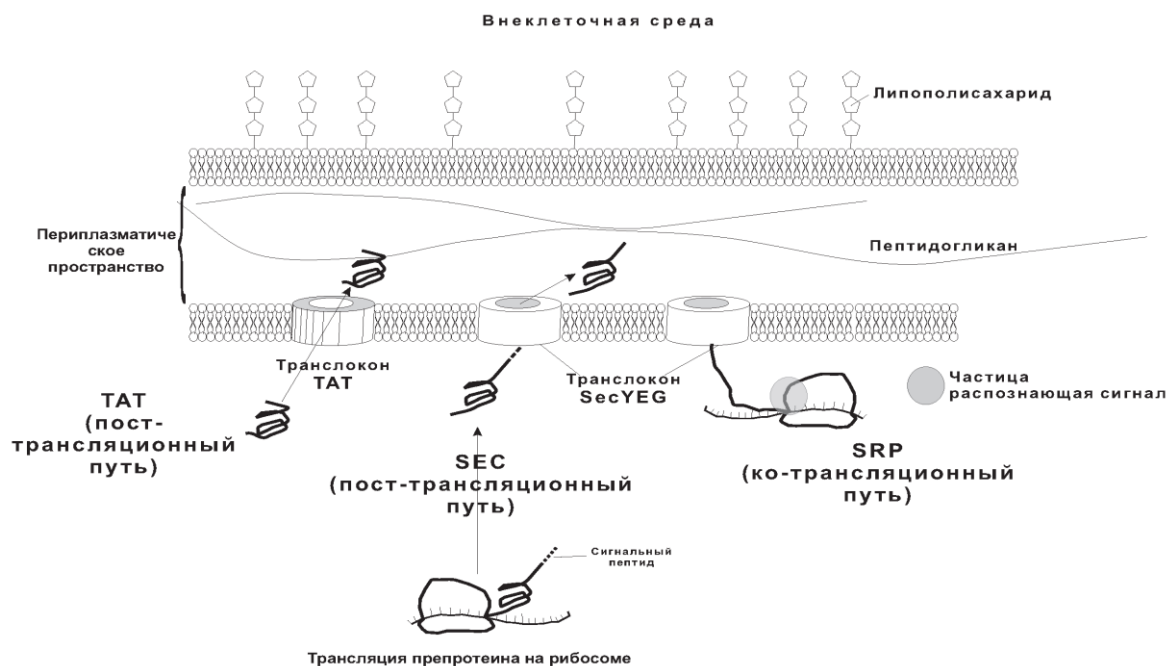


Рис.1. Пути транслокации через плазматическую мембрану

Fig.1. Translocation pathways across the plasma membrane

Все три перечисленных пути используют разные механизмы и приспособлены для транслокации разных белков-мишеней. Транслокация по пути Sec или Tat является пост-трансляционным процессом, в то время как путь SRP является ко-трансляционным. Белки-мишени пути Sec для транслокации должны быть развёрнуты полностью до состояния вытянутой полипептидной цепи (т.е. теряют третичную структуру в ходе транслокации), эти белки подвергаются рефолдингу в периплазме. Белки-мишени пути Tat транслоцируются в свёрнутом состоянии, не теряя третичной структуры, которую они приобретают в цитоплазме [5]. С использованием пути Tat возможно экспортировать функционально активные белки, имеющие сложную третичную структуру. Показано, что флуоресцентные белки не могут быть экспортированы через путь Sec, но могут быть экспортированы через путь Tat. Путь SRP является ко-трансляционным, т.е. осуществляет экспорт полипептидной цепи, которая продолжает синтезироваться на рибосоме. Таким образом, задача создания эффективной системы секреторной продукции в значительной степени зависит от выбора пути и механизма белкового экспорта, которые лучше всего подходят для конкретного белка-мишени.

Путь Sec

Наибольшая доля секретируемых и мембранных белков в *E.coli* используется для транслокации через IM путь Sec, в связи с чем исторически путь Sec получил название основного секреторного пути (general secretory pathway, GSP). Природные белки-мишени пути Sec, как правило, локализуются в периплазматическом пространстве или интегрируются в OM. Секреторный аппарат Sec гомологичен транслокону в эндоплазматическом ретикулуме высших эукариот и транслокону Sec 61 у дрожжей. Центральную роль в транслокационном комплексе Sec играет комплекс из трёх белков SecYEG, который образует канал в IM. Кроме SecYEG, в состав транслоказного комплекса входят другие белки: мембранная АТФаза SecA, цитоплазматический шаперон SecB и акцессорные белки SecD и SecE, YidC и YajC. Белки-мишени пути Sec синтезируются в цитоплазме в виде предшественников (препротеинов), содержащих на N-конце короткий (15-30 а.о.) пептид,

называемый сигнальным пептидом. SecA распознаёт сигнальный пептид и в кооперации с шапероном SecB транспортирует препротейн к транслокону SecYEG. В ходе транслокации белка-мишени, как только С-конец сигнального пептида достигает поверхности IM, сигнальный пептид отщепляется при участии сигнальных пептидаз (пептидазы I (LepB) или пептидазы II (LSPA) [6].

Сигнальные пептиды имеют сильно различающиеся аминокислотные последовательности, но также демонстрируют общие структурные характеристики. Типичный сигнальный пептид имеет на N-конце короткий участок, т.н. N-домен, длиной от 2 до 10 а.о., богатый положительно заряженными аминокислотами; в центре сигнального пептида находится участок (длиной 10-20 а.о.), богатый аминокислотными остатками с гидрофобными боковыми цепями (H-домен); на С-конце сигнального пептида находится С-домен, менее гидрофобный, чем H-домен, и содержащий сайт узнавания сигнальной пептидазы [7]. Во время транспорта белков из цитоплазмы сигнальный пептид отщепляется сигнальной пептидазой с высвобождением зрелого белка. Сайт узнавания сигнальной пептидазы соответствует правилу -3,-1, которое заключается в том, что в положениях -1 и -3 сайта должны быть аминокислотные остатки с небольшими незаряженными боковыми цепями (Ala, Gly, Ser). Наиболее часто в положениях -1 и -3 встречается аминокислотный остаток Ala, образуя так называемый «АХА-бокс». В таблице 1 представлены сигнальные пептиды пути Sec.

Таблица 1. Последовательности сигнальных пептидов белков, секретируемых по пути Sec в *E.coli*

Table 1. Signal peptides of proteins secreted through the Sec pathway in *E. coli*

Сигнальный пептид Signal peptide	Белок, источник сигнального пептида Protein - source of a signal peptide	Аминокислотная последовательность ¹ Aminoacidsequence ¹
Pelb	Пектатлиаза В из <i>Erwinia carotovora</i> Pectate lyase B from <i>Erwinia carotovora</i>	<u>MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA</u>
Ompa	Белок внешней мембраны А Outer membrane protein A	<u>MKKTAIAlAVALAGFATVAQA</u>
Stii	Термостабильный энтеротоксин Heat-stable enterotoxin	<u>MKKNIAFLLASMFVFSIATNAYA</u>
Endoxylanase	Эндоксилаза <i>Bacillus</i> <i>Bacillus endoxylanase</i>	<u>MFKFKKKFLVGLTAAFMSISMFSATASA</u>
Phoa	Щелочная фосфатаза Alkaline phosphatase	<u>MKQSTIALALLPLLFTPVTKA</u>
Ompf	Белок внешней мембраны F Outer membrane protein F	<u>MMKRNILAVIVPALLVAGTANA</u>
Phoe	Белок пор внешней мембраны E	<u>MKKSTLALVVMGIVASASVQA</u>

	Outer membrane pore protein E	
Male	Белок, связывающий мальтозу Maltosebindingprotein	MKIKTGARILALSALTTMMF <u>SASAL</u> <u>A</u>
Ompc	Белок внешней мембраны C Outer membrane protein C	MKVKVLSLLVPALLV <u>AGAANA</u>
Lpp	Липопротеин муреин Murein lipoprotein	MKATKLVLGAVIL <u>GSTLLAG</u>
Lamb	Белок-рецептор фага лямбда Receptorofphagelambda	MMITLRKLPLAVAVAAGV <u>MSAQA</u> <u>MA</u>
OmpT	Протеаза VII Protease VII	MRAKLLGIVL <u>TTPIA</u> <u>ISSFA</u>
LTV	Субъединица В термолабильного энтеротоксина Vsubunitofheat-labileenterotoxin	MNKVKCYVLFTALL <u>SSLYAHG</u>
Примечание: ¹ N-домен сигнального пептида показан жирным шрифтом, H-домен показан обычным шрифтом, C-домен подчеркнут.		
Note: ¹ N-domain is shown in bold, H-domain is depicted in plain typeset and C-domain is under lined.		

Вторичная структура экспортируемого белка играет важную роль в том, насколько эффективно будет отщепляться сигнальный пептид. Получение эффективной транслокации требует подбора сигнального пептида к выбранному белку-мишени. Эукариотические сигнальные пептиды не работают эффективно в *E.coli*, и поэтому для экспрессии многих практически важных белков, в том числе рекомбинантных белков человека с фармакологическим действием, необходимо присоединять к таким белкам сигнальные пептиды *E.coli* [8]. Сигнальный пептид эндоксилаказы *Bacillus* использован для секреторной продукции рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ). Чтобы обеспечить экспрессию в *E.coli* фактора роста нервов (NGF) без N-концевого метионина использована сигнальная последовательность OmpA.

Путь SRP

Кроме пути Sec, и в бактериях и в эукариотах возможен ко-трансляционный экспорт белков и интеграция мембранных белков в цитоплазматическую мембрану. Ко-трансляционный механизм экспорта происходит при участии рибонуклеопротеинового комплекса, получившего название «частица, распознающая сигнал» (signal recognition particle, SRP) [9]. У бактерий SRP меньше по размеру и проще по организации, чем SRP эукариот. В *E.coli* SRP представляет собой комплекс из белка Ffh и РНК (4.5SRNA). SRP связывается с рибосомами, участвующими в трансляции, и скринирует растущую полипептидную цепь, не препятствуя трансляции до тех пор, пока не оказывается синтезирована гидрофобная сигнальная последовательность. Сигнальная последовательность пути SRP отличается от сигнального пептида Sec; сигнал узнавания SRP – это короткая последовательность из гидрофобных аминокислотных остатков, часто это трансмембранный альфа-спиральный домен в структуре белка-мишени. Когда SRP распознаёт сигнальную последовательность, меняется положение SRP на рибосоме, так что SRP закрывает участок связывания аминоксил-тРНК. Трансляция временно останавливается, но рибосома не диссоциирует с мРНК и не освобождает частично синтезированную полипептидную цепь белка-мишени. Трансляционная пауза

продолжается до тех пор, пока комплекс рибосома-SRP не свяжется с SRP-рецептором на цитоплазматической мембране. В *E.coli* SRP-рецептором является один мембранный белок FtsY. После взаимодействия с SRP-рецептором положение SRP на рибосоме вновь меняется, участок связывания аминоксил-тРНК становится доступен для предшественников белкового синтеза и трансляция возобновляется. В результате описанного процесса рибосома оказывается поблизости от IM, где комплекс рибосома-препротеин переносится на транслокон SecYEG, причём данный процесс протекает без участия обычного сигнал-распознающего компонента пути Sec (SecA). Таким образом, у бактерий Sec и SRP пути сходятся в точке транслокона SecYEG [10]. Путь SRP может быть использован для транслокации белков-мишеней, которые не удалось экспортировать по пути Sec. Например, показано, что только SRP обеспечивает экспорт белков DARPins, особенностью которых является способность очень быстро принимать стабильную третичную структуру [11].

Путь Tat

Принципиально иной механизм транслокации в периплазматическое пространство был обнаружен сначала в мембранах тилакоидов фотосинтезирующих организмов, а затем в бактериях, который получил название пути Tat (Twin-Arginine Translocation) [12]. Путь Tat получил своё название из-за характеристического мотива из двух остатков аргинина (Arg-Arg), который обнаруживается вблизи N-конца лидерного пептида белка-мишени пути Tat. Примечательное отличие пути Tat заключается в том, что транслокационный аппарат пути Tat распознаёт белок-мишень, имеющий сформированную (в том числе зрелую и функционально активную) третичную структуру [5]. Транслокон Tat использует энергию электрохимического градиента (концентрационного градиента ионов H^+ по разные стороны цитоплазматической мембраны) для транслокации свёрнутых белков через мембрану, причём отдельный интерес вызывает то обстоятельство, что во время транслокации мембрана не становится свободно проницаемой для ионов [13]. В *E.coli* компонентами транслокона пути Tat являются мембранные белки TatA, TatB, TatC и TatE. Структурная организация транслокона Tat пока не известна, но понятно, что данный молекулярный механизм должен обладать исключительной гибкостью, поскольку белки-мишени пути Tat демонстрируют значительную вариабельность по размеру, поверхностным свойствам и трёхмерной структуре. После того как препротеин приобретает в цитоплазме трёхмерную структуру зрелого продукта, белок-мишень распознаётся комплексом TatBC. Образовавшийся комплекс препротеин-TatBC приводит к сборке мономеров TatA в транслокационный комплекс, который образует пору в IM. После успешной транслокации комплекс TatABC диссоциирует на субъединицы. Многие природные белки *E.coli* (например, DsbA, TotT, SfmC, TolB, YraI, CcmH, FocC, NikA и FlgI) транспортируются по пути Tat, что, видимо, связано с тем, что эти белки-мишени после трансляции очень быстро приобретают энергетически стабильную пространственную укладку, или они имеют ко-факторы, стабилизирующие трёхмерную структуру [14].

Путь Tat использован для экспорта рекомбинантных белков, которые оказалось невозможно экспортировать по пути Sec. Например, флуоресцентные белки после созревания не могут быть полностью развернуты из-за образования внутримолекулярных ковалентных связей, связывающих разные участки полипептидной цепи (например, в зрелом зелёном флуоресцентном белке (GFP) есть непептидные ковалентные связи между тремя аминокислотными остатками, образующими хромофор). Когда GFP был слит с сигнальным пептидом TotA (Tat-сигнальный пептид фермента триметиламин-N-оксид редуктазы, TMAO) или сигнальным пептидом TAP (Tat-сигнальный пептид щелочной фосфазы *Thermus thermophilus*, TASE), он эффективно секретировался в периплазму *E.coli* [15].

Система секреции типа 1 (T1SS или T0SS)

Система T1SS также известна как система секреции гемолизина или система ABC-транспортёра [16]. Внеклеточный экспорт при участии T1SS происходит в один этап, белок-мишень транслоцируется из цитоплазмы сразу во внеклеточную среду и не накапливается в свободном виде в периплазме. Система T1SS широко распространена среди патогенных и условно-патогенных грамотрицательных бактерий и наиболее хорошо изучена у *E.coli*, *Vibrio cholerae* и *Bordetella pertussis*. Секреторный механизм T1SS прост и состоит всего из трёх белков, которые имеют типовые названия ABC-транспортёр (название ABC-транспортёра происходит от способности связывать аденозин-трифосфат, «ATP-bindingcassettetransporter»), белок MFP (membranefusionprotein) и белок внешней мембраны (OMP). Компоненты ABC и MFP интегрированы в IM, а OMP локализован на внешней мембране. В геноме *E.coli* компоненты T1SS закодированы в локусах Hly и Tol, а сами белки называются HlyB (ABC-транспортёр), HlyD (MFP) и TolC (OMP). Белок TolC является гомотримером и имеет сильно вытянутую трёхмерную структуру (длина 140 ангстрем), позволяющую периплазматическому домену данного белка проходить через всю ширину периплазматического пространства. У поверхности IM три белка (HlyB, HlyD и TolC) образуют транслокационный комплекс. Лocus Hly также содержит ген HlyA, кодирующий экзотоксин *E.coli* – гемолизин. Для транслокации белка с помощью T1SS последний должен иметь на C-конце сигнальную последовательность, называемую сигналом секреции. Наличие в белке-мишени последовательности C-конца HlyA достаточно для транслокации. Сигнал секреции гемолизина специфически связывается с белком HlyB, который в свою очередь взаимодействует с HlyD. Комплекс HlyABD стимулирует конформационные изменения в белке TolC, которые приводят к появлению сквозного канала в тримерном комплексе TolC. Максимальная ширина канала составляет 30 ангстрем. Белок-мишень экспортируется из клетки через образовавшийся канал. У системы T1SS есть определённые ограничения:

1) размер белкового канала ограничен, что лимитирует размер белков-мишеней для экспорта. Считается возможным экспортировать посредством T1SS белки длиной до 200 а.о. [17] и редко больше. Так, с использованием системы T1SS получена эффективная секреторная продукция белка-транспортёра иона железа HasA (20 кДа). В природе данная система обеспечивает транспорт гемолизина HlyA (110 кДа). К числу исключительно больших белков, которые оказалось возможно секретировать при помощи T1SS, является белок адгезии LapA *Pseudomonas fluorescens* (900 кДа);

2) в ходе экспорта при помощи T1SS сигнал секреции не отщепляется от белка-мишени. Если целевой белок не должен иметь на концах чужеродных последовательностей, сигнал секреции должен быть отщеплён контролируемым протеолизом уже после очистки продукта;

3) количество транслокационных комплексов T1SS в клетке *E.coli* в обычных условиях роста очень мало. Для достижения практически значимых уровней транслокации продукта требуется ко-экспрессия совместно с белком-мишенью белков-компонентов системы T1SS.

Система секреции типа 2 (T2SS)

Грамотрицательные бактерии используют сложную многокомпонентную систему секреции 2 типа (T2SS) для транслокации разнообразных белков через OM из периплазматического пространства во внеклеточную среду. Экспорт при участии системы T2SS происходит в два этапа. Первый этап заключается в транслокации через IM в периплазму (по пути Sec, Tat или SRP), второй этап приводит к высвобождению белка во внеклеточную среду. Второй этап экспорта через T2SS – транспорт из периплазмы во внеклеточное пространство – происходит при участии процесса, который получил

название главного терминального участка основного секреторного пути (mainterminalbranch). Внеклеточный экспорт при участии T2SS требует участия комплекса белков-секретинов (в комплекс входят 40-70 белков, принадлежащих к 12-15 разным функциональным группам)[18], которые образуют поры в ОМ. Особенностью белков-секретинов является то, что они не экспрессируются в клетке *E.coli* в обычных условиях роста. Видимо, по этой причине большинство белков, потенциально способных к экспорту через T2SS, в действительности накапливаются в периплазматическом пространстве. Большинство рекомбинантных белков, секретируемых по пути Sec, также не выделяются во внеклеточную среду, а накапливаются в периплазме.

Предполагается, что полный секреторный аппарат T2SS включает компоненты, интегрированные в обе бактериальные мембраны (ИМ и ОМ), однако полный секреторный аппарат T2SS ещё никогда не был визуализирован в очищенной форме и, возможно, никогда не будет выделен в чистом виде для анализа, поскольку его организация носит динамический характер. Были выделены четыре мультибелковых комплекса (T2SSsubassemblies): псевдопили, комплекс внешней мембраны, платформа цитоплазматической мембраны и секреторная АТФаза. Псевдопили представляют собой волокнистые структуры в периплазматическом пространстве, образованные пятью различными белками-псевдопилинами и включающие множество копий основного псевдопилина. Комплекс внешней мембраны образован в основном мультимерным белком-секретином [19]. Платформа цитоплазматической мембраны является тем компонентом T2SS, который обеспечивает структурную целостность транслокационного комплекса и состоит, по меньшей мере, из четырёх мембранных белков. Платформа цитоплазматической мембраны взаимодействует с комплексом внешней мембраны, псевдопилилами и секреторной АТФазой. Секреторная АТФаза находится в цитоплазме и является Zn-зависимым мультисубъединичным ферментным комплексом.

Система секреции типа 3 (T3SS или TTSS)

Система T3SS по структурной организации подобна базальному комплексу жгутиков грамотрицательных бактерий. У системы секреции T3SS особая функция – через её канал некоторые инвазивные грамотрицательные бактерии (включая бактерии родов *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Vibrio*) экспортируют факторы вирулентности из бактериальной цитоплазмы в цитоплазму эукариотической клетки. В ходе этого процесса T3SS взаимодействует с транслоконом, который собирается из бактериальных белков в цитоплазматической мембране эукариотической клетки.

Система секреции типа 4 (T4SS или TFSS)

Система T4SS гомологична конъюгативному аппарату бактерий. Система T4SS способна транспортировать как белки, так и ДНК. Эта система наилучшим образом описана у бактерии *Agrobacterium tumefaciens*, и используется для введения трансформирующей ДНК (Т-ДНК) бактериальной Ti-плазмиды в клетку растения-хозяина [20]. *Bordetella pertussis*, возбудитель коклюша, секретирует коклюшный токсин через систему T4SS. *Legionella pneumophila*, возбудитель легионеллеза, имеет похожую систему секреции (система типа IVB, также известная как icm/dot (intracellular multiplication/defect in organelle trafficking genes), которая используется бактерией для транслокации многочисленных эффекторных белков в клетки хозяина. Система T4SS представляет собой белковый комплекс из 11-13 белков, который проходит через цитоплазматическую мембрану бактерии и внешнюю мембрану, и образует канал, через который ДНК и белки могут перемещаться из цитоплазмы клетки-донора в цитоплазму клетки-реципиента [21].

Система секреции типа 5 (T5SS)

Система T5SS также называется системой секреции белков-автотранспортёров [22]. Система T5SS использует механизм Sec для транслокации через IM. Белки, которые транслоцируются при участии T5SS, имеют транспортный домен (который имеет характерную конформацию бета-бочонка) и домен-пассажир. С-конец транспортного домена взаимодействует с белками OM. В результате такого взаимодействия транспортный домен отщепляется и остаётся связан с OM, а остаток полипептида (домен-пассажир) выделяется во внеклеточное пространство. Примером белков-автотранспортёров являются тримерные автотранспортёрные адгезины [23].

Система секреции типа 6 (T6SS)

Система T6SS структурно подобна организации «хвоста» ряда бактериофагов, например, фага T4. Гены системы T6SS (15-20 генов) обнаружены в геномах примерно четверти изученных видов протеобактерий (наибольшая по численности несистематическая группа грамотрицательных бактерий) [24]. Примерами белков, секретлируемых из разных видов протеобактерий при участии T6SS, являются белки Hcp и VgrG. Система T6SS играет роль в обеспечении вирулентности, а также в защите бактерий от одноклеточных хищных животных (амеб и др.) [25].

Везикулы внешней мембраны

Кроме вышеописанных систем секреции, грамотрицательные бактерии обладают другим способом высвобождения в среду инкубации специфического для бактерий материала, который заключается в формировании везикул внешней мембраны [26]. Везикулы образуются из-за того, что в процессе роста бактериальной клетки часть внешней мембраны может отщуровываться, образуя наноразмерные сферические частички. Везикулы состоят из липидного бислоя, обогащённого липополисахаридом (LPS). Внутренность везикул содержит материал, захваченный из бактериальной периплазмы.

Стратегии увеличения секреторной продукции рекомбинантных белков в *E.coli*

Промышленное производство секреторных белков в *E.coli* по-прежнему остаётся областью интенсивных исследований, прежде всего из-за того, что выходы секретлируемого белка лимитированы недостаточной мощностью секреторного аппарата *E.coli*. Секреторная продукция в периплазму физически ограничена объемом периплазматического пространства, что в случае гиперпродукции белка может приводить к образованию периплазматических телец включения, нарушению физиологии клетки и снижению скорости роста культуры. Получение целевого продукта в секреторной форме может столкнуться и с другими препятствиями, в числе которых: 1) неполное отщепление сигнальных последовательностей; 2) сильная зависимость эффективности секреции от характеристик белков-мишеней; 3) деградация белка-мишени из-за протеолиза в цитоплазме или в периплазме; 4) формирование телец включения в цитоплазме или в периплазме; 5) неправильная пространственная укладка белка-мишени или неправильное формирование дисульфидных связей в продукте [27].

Для улучшения секреторной продукции применены разные стратегии, среди которых наиболее часто используют подбор оптимального сигнального пептида и экспрессию белка-мишени совместно с шаперонами, компонентами транслокационного аппарата (т.н. транспортными шаперонами) или белками, нарушающими целостность мембран. Для повышения выхода продукта в среду инкубации описаны ко-экспрессия с белками, образующими поры во внешней мембране бактерии, а также добавление в среду инкубации химических агентов, нарушающих целостность внешней мембраны, но не убивающих бактериальную клетку. Другой перспективной стратегией является получение

рекомбинантных белков слияния, в которых целевой белок слит с транспортным компаньоном.

Выбор сигнальных пептидов и модификация последовательностей экспортируемых белков

Транспортировка белков может быть повышена за счет правильного выбора или модификации сигнального пептида. Как видно из таблицы 2, эффективность секреции рекомбинантного белка сильно варьирует в зависимости от используемого штамма, сигнального пептида и белка-мишени. До настоящего времени нет общего правила, позволяющего выбрать наиболее эффективный сигнальный пептид, который бы гарантировал успешность секреции выбранного целевого белка. Выбор наилучшего сигнального пептида осуществляется эмпирическим методом проб и ошибок.

Таблица 2. Характеристики секреторной продукции рекомбинантных белков с использованием пути Sec

Table 2. Characteristics of secretory production of recombinant proteins utilizing the Sec pathway

Секретируемый рекомбинантный белок Secreted recombinant protein	Сигнальный пептид (СП) Signal peptide (SP)	Штамм <i>E.coli</i> <i>E.coli</i> strain	Характеристики продукции (количество продукта в среде инкубации) Characteristics of production (amount of product in the incubation medium)	Ссылки References
А-β-лактамаза A-β-lactamase	СП белка А Protein A SP	HM114	112500 Ед/л 112500 U/L	[28]
Гирудин III Hirudin III	L-аспарагиназа II L-asparaginase II	JM105	60 мг/л 60 mg/ml	[29]
Гормон роста Growth hormone	Npr, ompa	W3110	76 мг/л 76 mg/ml	[30]
Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор Granulocyte colony stimulating factor	СП эндоксилаказы Endoxylanase SP	BL21(DE3)	22% от общего белка в культуре 22% from total protein in culture	[31]
Лептин Leptin	Ompa	MC1061	1,46 мг/мл	[32]
Лептин Leptin	СП эндоксилаказы Endoxylanase SP	BL21(DE3)	41% от общего белка в культуре 41% from total protein in culture	[33,34]

Пептид:N-гликозидаза F	OmpA	BL21(DE3)	8 мг/л	[35]
Peptide:N-glycosidaseF (PNGaseF)			8 mg/L	
Проинсулин	СП белка DabA	RB791	9,2 мг/мл	[36]
Proinsuline			9,2 mg/ml	
Проинсулин	Spa	AF1000	4,6 мг/л	[37]
Proinsuline			4,6 mg/L	
Субъединица В холерного токсина	LTB	TX1	190 мг/мл	[38]
Bsubunitofcholera toxin			190 mg/ml	
Цитохром P450	PhoA	TB1	25 мкг/мл	[39]
Cytochrome P450			25 mcg/ml	
Щелочная фосфатаза	СП эндоксилазы	HB101	5,2 г/л	[40]
Alkaline phosphatase	Endoxylanase SP		5,2 g/L	
Эндостатин	PhoA	DH5a	40 мг/л	[41]
Endostatin			40 mg/L	

Гидрофобность N-домена сигнального пептида и положительный заряд той части транслоцируемого белка, которая примыкает к сигнальному пептиду (т.н. «домен инициации экспорта»), особенно важны для эффективной секреции. Для увеличения секреции увеличивали общий положительный заряд домена инициации экспорта путём добавления основных аминокислотных остатков, или присоединяли к последовательности белка т.н. секреторный энхансер, представляющий собой линкер из гидрофильных аминокислотных остатков [42,43].

Совместная экспрессия секреторного продукта с периплазматическими шаперонами

Многие продукты рекомбинантной экспрессии содержат дисульфидные связи, которые, чтобы целевой белок обладал биологической активностью, должны быть сформированы правильным образом. Цитоплазма *E. coli* является восстановительной средой и препятствует образованию дисульфидных связей. Формирование дисульфидных связей в цитоплазме катализируется окисленными формами тиоредоксинов TtxA и TtxC, однако в бактериальной цитоплазме тиоредоксины находятся преимущественно в восстановленной форме из-за активности тиоредоксин редуктазы TtxB. Большинство секретируемых белков приобретают функционально активную пространственную структуру в окислительной среде периплазматического пространства, под воздействием ферментов, которые катализируют образование дисульфидных связей. Шапероны семейства Dsb (disulfide bond formation) DsbA и DsbB являются дисульфид оксидоредуктазами, которые катализируют окисление остатков Cys в белках мишенях, тогда как перегруппировка дисульфидных связей катализируется дисульфид изомеразой DsbC и DsbD (рисунок 1). Белки Dsb содержат один или несколько высоко консервативных тиоредоксиновых мотивов (C-X-X-C), которые важны для их активности.

Было продемонстрировано, что совместная экспрессия шаперонов Dsb с белком-мишенью повышает эффективность фолдинга целевого белка, его растворимость и эффективность секреции. Ещё один набор шаперонов в периплазматическом пространстве

представляют собой белки SurA, FkpA и Skp. Шапероны SurA и FkpA являются белками теплового шока, имеют мотивы, характерные для пептидилпролил цис/транс изомераз (PPI), и участвуют в фолдинге белков внешней мембраны OmpA, OmpF, и LamB (этот фолдинг происходит в периплазме). В условиях гетерологической экспрессии SurA способствует правильному фолдингу нестабильных белков-мишеней (например, фолдингу А-Ь-лактамазы) и белков, склонных к агрегации. В других исследованиях во время секреторной продукции мальтоза-связывающего белка (MalE31) или рекомбинантных одноцепочечных антител (scFv) ко-экспрессия FkpA подавляла образование телец включения.

Уменьшение протеолиза продукта

Выход продукта, секретируемого в периплазму, может оказаться низким из-за деградации рекомбинантного белка периплазматическими протеазами, такими как DegP, OmpT, протеаза III и Tsp. Описанные протеазы разрушаются с нарушенной пространственной укладкой. Способы минимизации протеолиза включают подбор условий культивирования штамма-производителя и использование протеазо-дефицитных штаммов.

Внеклеточная продукция рекомбинантных белков

Внеклеточная продукция рекомбинантных белков позволяет использовать высокоплотные бактериальные культуры, непрерывно нарабатывать продукт и снизить контаминацию исходного материала внутриклеточными белками, ДНК и эндотоксином [44]. Стратегии внеклеточной продукции в *E.coli* показаны на рисунке 2.

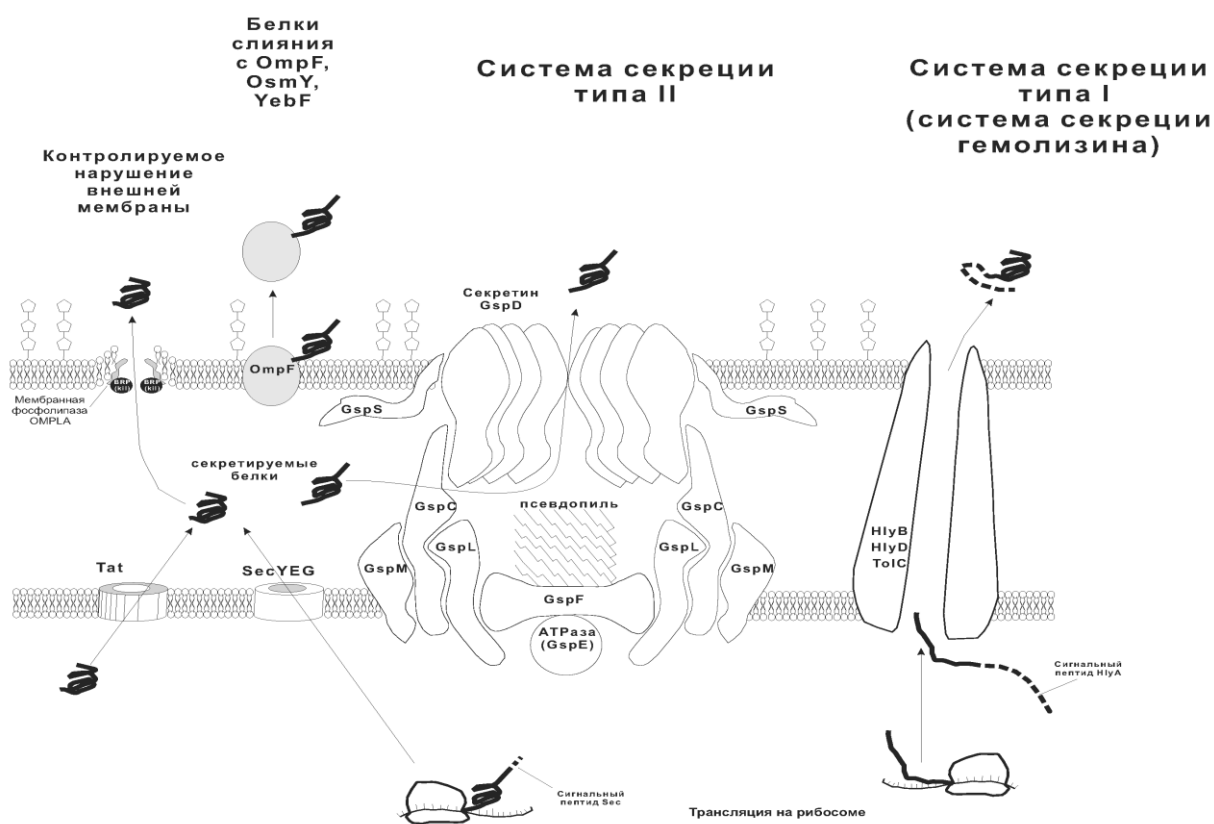


Рис. 2. Стратегии внеклеточной продукции рекомбинантных белков

Fig. 2. Strategies for the extracellular production of recombinant proteins

В норме *E. coli* выделяет во внеклеточную среду очень небольшое количество белков, природные белки *E. coli*, секретируемые во внеклеточное пространство – это в первую очередь токсины и гемолизины. Разработаны способы улучшения внеклеточной продукции посредством контролируемого нарушения целостности внешней мембраны, которое не вызывает гибель клеток. Небольшие рекомбинантные белки, секретируемые в периплазму, иногда могут высвобождаться в культуральную среду. Добавление в среду инкубации глицина или Тритона X-100 подавляет образование периплазматических телец включения и увеличивает высвобождение белков во внеклеточную среду. Добавление глицина в культуру индуцирует морфологические изменения клеток *E. coli* (увеличение размеров и появление шаровидных клеток) вследствие того, что включение остатков глицина в полимер внешней мембраны *E. coli* (пептидогликан) нарушает образование поперечных связей в пептидогликане. Другая интересная стратегия внеклеточной секреции заключается в экспрессии белка слияния, включающего белок-мишень и белок-переносчик. В качестве белка-переносчика используют белок *E. coli*, обладающий природной способностью к выделению во внешнюю среду. Белком-переносчиком может быть гемолизин HlyA, или некоторые белки ОМ (например, OmpF). Продемонстрирована внеклеточная секреция антител scFv и интерлейкина-6 после слияния с гемолизином. Рекомбинантный бета-эндорфин секретируется в культуральную среду в случае его слияния с белком-переносчиком OmpF.

Транслокация через клеточную стенку также может быть облегчена путём контролируемого увеличения проницаемости ОМ. Белки, которые образуют области в ОМ, через которые возможна миграция белков, – это, например, белок высвобождения бактериоцина (BRP, продукт гена *kil*) [45], или трансмембранный белок TolA (или только один его третий топологический домен TolAIII). BRP – это липопептид, длиной всего 28 а.о., который активирует бактериальную мембранную фосфолипазу А, в результате чего в ОМ образуются зоны, проницаемые для белков [46]. Совместная экспрессия с BRP использована в ходе секреторной продукции рекомбинантной стрептокиназы, которая является фармакологически важным ферментом, применяемым в фармакологии [47]. Высокие уровни экспрессии гена *kil* вызывают лизис бактериальной клетки, поэтому способ облегчения секреции посредством совместной экспрессии с BRP требует подбора промотора и условий индукции экспрессии. Гены секреторных систем других бактерий иногда работают в *E. coli* и могут обеспечить внеклеточную продукцию. Секреция эндоклюканазы *Erwinia chrysanthemi* из рекомбинантного штамма *E. coli* в среду инкубации была достигнута путём ко-экспрессии гена эндоклюканазы с продуктом гена *outE. chrysanthemi*, который отвечает за внеклеточную секрецию ферментов гидролиза пектина.

Другой подход к внеклеточной продукции рекомбинантных белков заключается в секреции продукта из L-форм *E. coli*. L-формы представляют собой бактериальные клетки с дефектами клеточной стенки. С использованием L-форм получена внеклеточная продукция мини-антитела scFv, присоединенного к сигнальной последовательности OmpA, причём мини-антитело секретирувалось в среду инкубации в виде димера субъединиц с правильной третичной структурой.

Транспорт с белком-переносчиком

Белки *E. coli*, которые в нормальных условиях роста секретируются во внеклеточную среду, можно использовать в качестве белков-переносчиков для экспорта белков-мишеней. Данная стратегия предусматривает получение в *E. coli* белка слияния, аминокислотная последовательность которого включает белок-мишень, и белка-партнёра для транслокации. Особенно впечатляющие результаты получены с использованием в

качестве белков-переносчиков порина OmpF, осмотически индуцируемого белка OsmY [48] и белка YebF [49].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Достигнутый рост в понимании механизмов секреции белков в *E. coli* привели к созданию различных стратегий для продукции рекомбинантных белков в периплазматическое пространство или в среду инкубации. Тем не менее, секреторная продукция всё ещё остаётся областью эмпирических исследований. С учётом разнообразия секреторных аппаратов и систем секреции в *E. coli* можно ожидать, что секреторная продукция в *E. coli* однажды достигнет такой же степени популярности для исследовательских целей и для промышленного производства, какую сейчас имеет экспрессия в цитоплазму.

Финансирование

Работа по созданию обзора поддержана из средств проекта «Получение рекомбинантных антигенов VP1, VP2 и VP3 вируса ящура серотипов А, О, ASIA-1 для использования в качестве вакцины против ящура» в рамках Межгосударственной целевой программы ЕврАзЭС «Инновационные биотехнологии» на 2012-2014 гг.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yamaguchi H., Miyazaki M. Refolding Techniques for Recovering Biologically Active Recombinant Proteins from Inclusion Bodies // *Biomolecules*. – 2014.
2. Yoon S.H., Kim S.K., Kim J.F. Secretory production of recombinant proteins in *Escherichia coli* // *Recent Pat Biotechnol*. – 2010, Aug. – №4(1). – P. 23-29.
3. Choi J.H., Keum K.C., Lee S. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli* // *ChemEng Sci*. – 2006, Aug. – №61. – P. 876-885.
4. Cascales E., Cambillau C. Structural biology of type VI secretion systems // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. – 2012, Apr. – №367(1592). – P. 1102-1111.
5. Bruser T. The twin-arginine translocation system and its capability for protein secretion in biotechnological protein production // *ApplMicrobiolBiotechnol*. – 2007, Aug. – №76(1). – P. 35-45.
6. Peterson J.H., Szabady R.L., Bernstein H.D. An unusual signal peptide extension inhibits the binding of bacterial presecretory proteins to the signal recognition particle, trigger factor, and the SecYEG complex // *J Biol Chem*. – 2006, Apr. – №281(14). – P. 9038-9048.
7. Choi J.H., Lee S.Y. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli* // *ApplMicrobiolBiotechnol*. – 2004, Aug. – №64. – P. 625-635.
8. Joe B., Jeff G., Kumar V.U. Eukaryotic signal sequences for polypeptide expression and polypeptide display libraries // *Google Patents*. – 2003.
9. Kostakioti M., Newman C.L., Thanassi D.G., Stathopoulos C. Mechanisms of protein export across the bacterial outer membrane // *J Bacteriol*. – 2005, Jul. – №187(13). – P. 4306-4314.
10. Halic M., Gartmann M., Schlenker O., et al. Signal recognition particle receptor exposes the ribosomal translocon binding site // *Science*. – 2006, May. – №312(5774). – P. 745-747.
11. Steiner D., Forrer P., Stumpp M.T., Pluckthun A. Signal sequences directing cotranslational translocation expand the range of proteins amenable to phage display // *Nat Biotechnol*. – 2006, Jul. – №24(7). – P.823-831.

12. Jack R.L., Buchanan G., Dubini A., Hatzixanthis K., Palmer T., Sargent F. Coordinating assembly and export of complex bacterial proteins // *EMBO J.* – 2004, Oct. – №23(20). – P. 3962-3972.
13. Berks B.C., Palmer T., Sargent F. Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway // *Curr Opin Microbiol.* – 2005, Apr. – №8(2). – P. 174-181.
14. Lee P.A., Tullman-Ercek D., Georgiou G. The bacterial twin-arginine translocation pathway // *Annu Rev Microbiol.* – 2006, Aug. – №60. – P. 373-395.
15. Barrett C.M., Ray N., Thomas J.D., Robinson C., Bolhuis A. Quantitative export of a reporter protein, GFP, by the twin-arginine translocation pathway in *Escherichia coli* // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2003, May. – №304(2). – P. 279-284.
16. Holland I.B., Schmitt L., Young J. Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (review) // *Mol Membr. Biol.* – 2005, Jan-Apr. – №22(1-2). – P. 29-39.
17. Sapriel G., Wandersman C., Delepelaire P. The SecB chaperone is bifunctional in *Serratiamarcescens*: SecB is involved in the Sec pathway and required for HasA secretion by the ABC transporter // *J Bacteriol.* – 2003, Jan. – №185(1). – P. 80-88.
18. Korotkov K.V., Sandkvist M., Hol W.G. The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism // *Nat Rev Microbiol.* – 2012, May. – №10(5). – P.336-351.
19. Korotkov K.V., Gonen T., Hol W.G. Secretins: dynamic channels for protein transport across membranes // *Trends Biochem Sci.* – 2011, Aug. – №36(8). – P.433-443.
20. Christie P.J., Atmakuri K., Krishnamoorthy V., Jakubowski S., Cascales E. Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems // *Annu Rev Microbiol.* – 2005, Aug. – №59. – P. 451-485.
21. Lawley T.D., Klimke W.A., Gubbins M.J., Frost L.S. F factor conjugation is a true type IV secretion system // *FEMS Microbiol Lett.* – 2003, Jul. – №224(1). – P. 1-15.
22. Thanassi D.G., Stathopoulos C., Karkal A., Li H. Protein secretion in the absence of ATP: the autotransporter, two-partner secretion and chaperone/usher pathways of gram-negative bacteria (review) // *Mol Membr Biol.* – 2005, Jan-Apr. – №22(1-2). – P. 63-72.
23. Gerlach R.G., Hensel M. Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens // *Int J Med Microbiol.* – 2007, Oct. – №297(6). – P. 401-415.
24. Cascales E. The type VI secretion toolkit // *EMBO Rep.* – 2008, Aug. – №9(8). – P. 735-41.
25. Coulthurst S.J. The Type VI secretion system - a widespread and versatile cell targeting system // *Res Microbiol.* – 2013, Jul-Aug. – №164(6). – P. 640-654.
26. Schertzer J.W., Whiteley M. Bacterial outer membrane vesicles in trafficking, communication and the host-pathogen interaction // *J Mol Microbiol Biotechnol.* – 2013, Aug. – №23(1-2). – P. 118-130.
27. Wong W.K., Ali A.B., Ma M.C. Cloning, expression, and characterization of diuretic hormone Manducadiuresin from *Manducasexta* in *Escherichia coli* // *Protein Expr Purif.* – 2003, May. – №29(1). – P. 51-57.
28. Park S.J., Georgiou G., Lee S.Y. Secretory production of recombinant protein by a high cell density culture of a protease negative mutant *Escherichia coli* strain // *Biotechnol Prog.* – 1999, Mar-Apr. – №15(2). – P.164-167.
29. Tan S., Wu W., Liu J., Kong Y., Pu Y., Yuan R. Efficient expression and secretion of recombinant hirudin III in *E. coli* using the L-asparaginase II signal sequence // *Protein Expr Purif.* – 2002, Aug. – №25(3). – P. 430-436.
30. Uchida H., Naito N., Asada N., et al. Secretion of authentic 20-kDa human growth hormone (20K hGH) in *Escherichia coli* and properties of the purified product // *J Biotechnol.* – 1997, Jun. – №55(2). – P.101-112.

31. Jeong K.J., Lee S.Y. Secretory production of human granulocyte colony-stimulating factor in *Escherichia coli* // *Protein ExprPurif.* – 2001, Nov. – №23(2). – P. 311-318.

32. Guisez Y., Fache I., Campfield L.A., et al. Efficient secretion of biologically active recombinant OB protein (leptin) in *Escherichia coli*, purification from the periplasm and characterization // *Protein ExprPurif.* – 1998, Mar. – №12(2). – P. 249-258.

33. Jeong K.J., Lee P.C., Park I.Y., Kim M.S., Kim S.C. Molecular cloning and characterization of an endoxylanase gene of *Bacillus* sp. in *Escherichia coli* // *Enzyme Microb Technol.* – 1998, May. – №22(7). – P. 599-605.

34. Jeong K.J., Lee S.Y. Secretory production of human leptin in *Escherichia coli* // *BiotechnolBioeng.* – 2000, Feb. – №67(4). – P. 398-407.

35. Loo T., Patchett M.L., Norris G.E., Lott J.S. Using secretion to solve a solubility problem: high-yield expression in *Escherichia coli* and purification of the bacterial glycoamidase PNGase F // *Protein ExprPurif.* – 2011, Feb. – №24(1). – P. 90-98.

36. Winter J., Neubauer P., Glockshuber R., Rudolph R. Increased production of human proinsulin in the periplasmic space of *Escherichia coli* by fusion to DsbA // *J Biotechnol.* – 2001, Nov. – №84(2). – P.175-185.

37. Mergulhao F.J., Monteiro G.A., Larsson G., et al. Medium and copy number effects on the secretion of human proinsulin in *Escherichia coli* using the universal stress promoters *uspA* and *uspB* // *ApplMicrobiolBiotechnol.* – 2003, Jun. – №61(5-6). – P. 495-501.

38. Jobling M.G., Palmer L.M., Erbe J.L., Holmes R.K. Construction and characterization of versatile cloning vectors for efficient delivery of native foreign proteins to the periplasm of *Escherichia coli*. *Plasmid.* – 1997, Aug. – №38(3). – P.158-173.

39. Kaderbhai N., Karim A., Hankey W., Jenkins G., Venning J., Kaderbhai M.A. Glycine-induced extracellular secretion of a recombinant cytochrome expressed in *Escherichia coli* // *BiotechnolApplBiochem.* – 1997, Feb. – №25 (1). – P.53-61.

40. Choi J.H., Jeong K.J., Kim S.C., Lee S.Y. Efficient secretory production of alkaline phosphatase by high cell density culture of recombinant *Escherichia coli* using the *Bacillus* sp. endoxylanase signal sequence // *ApplMicrobiolBiotechnol.* – 2000, Jun. – №53(6). – P. 640-645.

41. Xu R., Du P., Fan J.J., Zhang Q., Li T.P., Gan R.B. High-level expression and secretion of recombinant mouse endostatin by *Escherichia coli* // *Protein ExprPurif.* – 2002, Apr. – №24(3). – P. 453-459.

42. Inouye S. Process for production of proteins as soluble proteins // *Google Patents.* – 2007.

43. Lee S.J., Kim Y.O., Nam B.H. Production of a soluble native form of recombinant protein by the signal sequence and secretional enhancer // *Google Patents.* – 2009.

44. Shokri A., Sanden A.M., Larsson G. Cell and process design for targeting of recombinant protein into the culture medium of *Escherichia coli* // *ApplMicrobiolBiotechnol.* – 2003, Feb. – №60(6). – P. 654-664.

45. Kleist S., Miksch G., Hitzmann B., Arndt M., Friehs K., Flaschel E. Optimization of the extracellular production of a bacterial phytase with *Escherichia coli* by using different fed-batch fermentation strategies // *ApplMicrobiolBiotechnol.* – 2003, Jun. – №61(5-6). – P. 456-462.

46. Orr V., Scharer J., Moo-Young M., et al. Integrated development of an effective bioprocess for extracellular production of penicillin G acylase in *Escherichia coli* and its subsequent one-step purification // *J Biotechnol.* – 2012, Sep. – №161(1). – P. 19-26.

47. Kuppusamy M., Srinivas V.K., Lahiri S., Ella K., Khatri G.S. DNA expression construct of a lambda promoter operationally linked to a DNA sequence encoding streptokinase; an amino acid sequence encoded by the DNA sequences; enzymatically active upon solubilization of the inclusion bodies // *Google Patents.* – 2006.

48. Qian Z.G., Xia X.X., Choi J.H., Lee S.Y. Proteome-based identification of fusion partner for high-level extracellular production of recombinant proteins in *Escherichia coli* // *BiotechnolBioeng.* – 2008, Aug. – №101(3). – P. 587-601.
49. Zhang G., Brokx S., Weiner J.H. Extracellular accumulation of recombinant proteins fused to the carrier protein YebF in *Escherichia coli* // *Nat Biotechnol.* – 2006, Jan. – №24(1). – P.100-104.

REFERENCES

1. Yamaguchi H., Miyazaki M. Refolding Techniques for Recovering Biologically Active Recombinant Proteins from Inclusion Bodies. *Biomolecules*, 2014.
2. Yoon S.H., Kim S.K., Kim J.F. Secretory production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Recent Pat Biotechnol*, 2010, vol. 1, no. 4, pp. 23-29.
3. Choi J.H., Keum K.C., Lee S. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *ChemEng Sci*, 2006, vol. 1, no. 61, pp. 876-885.
4. Cascales E., Cambillau C. Structural biology of type VI secretion systems *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2012, vol. 1592, no. 367, pp. 1102-1111.
5. Bruser T. The twin-arginine translocation system and its capability for protein secretion in biotechnological protein production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, vol. 1, no. 76, pp. 35-45.
6. Peterson J.H., Szabady R.L., Bernstein H.D. An unusual signal peptide extension inhibits the binding of bacterial presecretory proteins to the signal recognition particle, trigger factor, and the SecYEG complex. *J Biol Chem*, 2006, vol. 14, no. 281, pp. 9038-9048.
7. Choi J.H., Lee S.Y. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, vol. 1, no. 64, pp. 625-635.
8. Joe B., Jeff G., Kumar V.U. Eukaryotic signal sequences for polypeptide expression and polypeptide display libraries. US Patent, no. 20110224102, 2011.
9. Kostakioti M., Newman C.L., Thanassi D.G., Stathopoulos C. Mechanisms of protein export across the bacterial outer membrane. *J Bacteriol*, 2005, vol. 13, no. 187, pp. 4306-4314.
10. Halic M., Gartmann M., Schlenker O., et al. Signal recognition particle receptor exposes the ribosomal translocon binding site. *Science*, 2006, vol. 5774, no. 312, pp. 745-747.
11. Steiner D., Forrer P., Stumpp M.T., Pluckthun A. Signal sequences directing cotranslational translocation expand the range of proteins amenable to phage display. *Nat Biotechnol*, 2006, vol. 7, no. 24, pp. 823-831.
12. Jack R.L., Buchanan G., Dubini A., Hatzixanthis K., Palmer T., Sargent F. Coordinating assembly and export of complex bacterial proteins. *EMBO J*, 2004, vol. 20, no. 23, pp. 3962-3972.
13. Berks B.C., Palmer T., Sargent F. Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway. *Curr Opin Microbio.*, 2005, vol. 2, no. 8, pp. 174-181.
14. Lee P.A., Tullman-Ercek D., Georgiou G. The bacterial twin-arginine translocation pathway. *Annu Rev Microbiol*, 2006, no. 60, pp. 373-395.
15. Barrett C.M., Ray N., Thomas J.D., Robinson C., Bolhuis A. Quantitative export of a reporter protein, GFP, by the twin-arginine translocation pathway in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, vol. 2, no. 304, pp. 279-284.
16. Holland I.B., Schmitt L., Young J. Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (review). *Mol Membr Biol*, 2005, vol. 1, no. 22, pp. 29-39.
17. Sapriel G., Wandersman C., Delepelaire P. The SecB chaperone is bifunctional in *Serratiamarcescens*: SecB is involved in the Sec pathway and required for HasA secretion by the ABC transporter. *J Bacteriol*, 2003, vol. 1, no. 185, pp. 80-88.
18. Korotkov K.V., Sandkvist M., Hol W.G. The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nat Rev Microbiol*, 2012, vol. 5, no. 10, pp. 336-351.

19. Korotkov K.V., Gonen T., Hol W.G. Secretins: dynamic channels for protein transport across membranes. *Trends Biochem Sci*, 2011, vol. 8, no. 36, pp. 433-443.

20. Christie P.J., Atmakuri K., Krishnamoorthy V., Jakubowski S., Cascales E. Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu Rev Microbiol*, 2005, no. 59, pp. 451-485.

21. Lawley T.D., Klimke W.A., Gubbins M.J., Frost L.S. F factor conjugation is a true type IV secretion system. *FEMS Microbiol Lett*, 2003, vol. 1, no. 224, pp. 1-15.

22. Thanassi D.G., Stathopoulos C., Karkal A., Li H. Protein secretion in the absence of ATP: the autotransporter, two-partner secretion and chaperone/usher pathways of gram-negative bacteria (review). *Mol Membr Biol*, 2005, vol. 1, no. 22, pp. 63-72.

23. Gerlach R.G., Hensel M. Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int J Med Microbiol*, 2007, vol. 6, no. 297, pp. 401-415.

24. Cascales E. The type VI secretion toolkit. *EMBO Rep*, 2008, vol. 8, no. 9, pp. 735-41.

25. Coulthurst S.J. The Type VI secretion system - a widespread and versatile cell targeting system. *Res Microbiol*, 2013, vol. 6, no. 164, pp. 640-54.

26. Schertzer J.W., Whiteley M. Bacterial outer membrane vesicles in trafficking, communication and the host-pathogen interaction. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2013, vol. 1-2, no. 23, pp. 118-30.

27. Wong W.K., Ali A.B., Ma M.C. Cloning, expression, and characterization of diuretic hormone Manducadiuresin from *Manducasexta* in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2003, vol. 1, no. 29, pp. 51-57.

28. Park S.J., Georgiou G., Lee S.Y. Secretory production of recombinant protein by a high cell density culture of a protease negative mutant *Escherichia coli* strain. *Biotechnol Prog*, 1999, vol. 2, no. 15, pp. 164-167.

29. Tan S., Wu W., Liu J., Kong Y., Pu Y., Yuan R. Efficient expression and secretion of recombinant hirudin III in *E. coli* using the L-asparaginase II signal sequence. *Protein Expr Purif*, 2002, vol. 3, no. 25, pp. 430-436.

30. Uchida H., Naito N., Asada N., et al. Secretion of authentic 20-kDa human growth hormone (20K hGH) in *Escherichia coli* and properties of the purified product. *J Biotechnol*, 1997, vol. 2, no. 55, pp. 101-112.

31. Jeong K.J., Lee S.Y. Secretory production of human granulocyte colony-stimulating factor in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2001, vol. 2, no. 23, pp. 311-318.

32. Guisez Y., Fache I., Campfield L.A., et al. Efficient secretion of biologically active recombinant OB protein (leptin) in *Escherichia coli*, purification from the periplasm and characterization. *Protein Expr Purif*, 1998, vol. 2, no. 12, pp. 249-258.

33. Jeong K.J., Lee P.C., Park I.Y., Kim M.S., Kim S.C. Molecular cloning and characterization of an endoxylanase gene of *Bacillus* sp. in *Escherichia coli*. *Enzyme Microb Technol*, 1998, vol. 7, no. 22, pp. 599-605.

34. Jeong K.J., Lee S.Y. Secretory production of human leptin in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 2000, vol. 4, no. 67, pp. 398-407.

35. Loo T., Patchett M.L., Norris G.E., Lott J.S. Using secretion to solve a solubility problem: high-yield expression in *Escherichia coli* and purification of the bacterial glycoamidase PNGase F. *Protein Expr Purif*, 2011, vol. 1, no. 24, pp. 90-98.

36. Winter J., Neubauer P., Glockshuber R., Rudolph R. Increased production of human proinsulin in the periplasmic space of *Escherichia coli* by fusion to DsbA. *J Biotechnol*, 2001, vol. 2, no. 84, pp. 175-185.

37. Mergulhao F.J., Monteiro G.A., Larsson G., et al. Medium and copy number effects on the secretion of human proinsulin in *Escherichia coli* using the universal stress promoters *uspA* and *uspB*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, vol. 5, no. 61, pp. 495-501.

38. Jobling M.G., Palmer L.M., Erbe J.L., Holmes R.K. Construction and characterization of versatile cloning vectors for efficient delivery of native foreign proteins to the periplasm of *Escherichia coli*. *Plasmid*, 1997, vol. 3, no. 38, pp. 158-173.

39. Kaderbhai N., Karim A., Hankey W., Jenkins G., Venning J., Kaderbhai M.A. Glycine-induced extracellular secretion of a recombinant cytochrome expressed in *Escherichia coli*. *Biotechnol Appl Biochem*, 1997, vol. 1, no. 25, pp. 53-61.

40. Choi J.H., Jeong K.J., Kim S.C., Lee S.Y. Efficient secretory production of alkaline phosphatase by high cell density culture of recombinant *Escherichia coli* using the *Bacillus* sp. endoxylanase signal sequence. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, vol. 6, no. 53, pp. 640-645.

41. Xu R., Du P., Fan J.J., Zhang Q., Li T.P., Gan R.B. High-level expression and secretion of recombinant mouse endostatin by *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2002, vol. 3, no. 24, pp. 453-459.

42. Inouye S. Process for production of proteins as soluble proteins. US Patent, no. 20070287171, 2007.

43. Lee S.J., Kim Y.O., Nam B.H. Production of a soluble native form of recombinant protein by the signal sequence and secretional enhancer. US Patent, no. 20090011995, 2009.

44. Shokri A., Sanden A.M., Larsson G. Cell and process design for targeting of recombinant protein into the culture medium of *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, vol. 6, no. 60, pp. 654-664.

45. Kleist S., Miksch G., Hitzmann B., Arndt M., Friehs K., Flaschel E. Optimization of the extracellular production of a bacterial phytase with *Escherichia coli* by using different fed-batch fermentation strategies. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, vol. 5-6, no. 61, pp. 456-462.

46. Orr V., Scharer J., Moo-Young M., et al. Integrated development of an effective bioprocess for extracellular production of penicillin G acylase in *Escherichia coli* and its subsequent one-step purification. *J Biotechnol*, 2012, vol. 1, no. 161, pp. 19-26.

47. Kuppusamy M., Srinivas V.K., Lahiri S., Ella K., Khatri G.S. DNA expression construct of a lambda promoter operationally linked to a DNA sequence encoding streptokinase; an amino acid sequence encoded by the DNA sequences; enzymatically active upon solubilization of the inclusion bodies. US Patent, no. 7105327, 2006.

48. Qian Z.G., Xia X.X., Choi J.H., Lee S.Y. Proteome-based identification of fusion partner for high-level extracellular production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 2008, Aug., vol. 3, no. 101, pp. 587-601.

49. Zhang G., Brokx S., Weiner J.H. Extracellular accumulation of recombinant proteins fused to the carrier protein YebF in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol*, 2006, vol. 1, no. 24, pp. 100-104.

***ESCHERICHIA COLI* КЛЕТКАСЫНДАҒЫ АҚУЫЗДАРДЫҢ СЕКРЕТОРЛЫ ЭКСПРЕССИЯСЫ**

Ақсамбаева А.С., Шустов А.В.

Ұлттық биотехнология орталығы
Ш. Уалиханов к-сі, 13/1, Астана, 010000, Қазақстан
altyn-ai@bk.ru

ТҮЙІН

Мақалада *Escherichia coli* клеткасында жүретін ақуыздардың секреторлық экспрессиясы жөнінде теориялық әдебиеттерге және қолданбалы аспектілеріне шолу

жасалған. Тиімді әрі үшіншілік құрылымы дұрыс мақсатты өнімді, соның ішінде функционалды белсенді ақуызды көп мөлшерде алудың бір тәсілі өнімді периплазма немесе жасушадан тыс ортаға шығару (секреттеу) арқылы ақуыз өндірудің шарттарын өзгерту болып табылады. Периплазмалық экспрессия немесе жасушадан тыс секреторлық экспрессия рекомбинанттық белоктарды алуда қолданылды, алайда, оларды *E.coli* цитоплазмасына активті формада шығару мүмкін болмады.

Секреторлық өнімдер әлі күнге дейін көптеген тәсілдер, сынап көру мен жаңылысу секілді әдіс түрлері арқылы ғылыми зерттеулердің негізгі мақсаты болып отыр. *E.coli* секреторлық аппараттары мен жүйелері алуан түрлі екенін ескере отырып, болашақта *E.coli* секреторлық өндірісі ғылыми-зерттеулерде айтарлықтай жоғары дәрежеде танымал болатынына және қазіргі кездегі цитоплазмаға экспрессиялау сияқты өнеркәсіп өндірісіне қолданылатынын күтуге болады.

Негізгі сөздер: секреторлық экспрессия, рекомбинантты ақуыз, сигналдық пептид, секреция жүйесі, рефолдинг, транслокация, шаперон.