

## ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНГИБИТОРА РИБОНУКЛЕАЗ В *E. COLI* ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В СИНТЕЗЕ мРНК *IN VITRO*

М. В. Захарова<sup>1</sup>, А. А. Загоскин<sup>1,2</sup>, Р. А. Иванов<sup>2</sup>, М. О. Нагорных<sup>1,2</sup>✉

<sup>1</sup> Институт биохимии и физиологии микроорганизмов Российской академии наук, Пущино, Россия

<sup>2</sup> Научно-технологический университет «Сириус», Сочи, Россия

Технологии, лежащие в основе получения синтетических мРНК *in vitro*, значительно расширили возможности их исследовательского и терапевтического применения. Флагманской областью применения стала ниша мРНК-вакцин, однако этот класс терапевтических молекул может быть применим к гораздо более широкому кругу задач. В основе процесса получения искусственных молекул РНК лежит реакция ферментативного синтеза *in vitro*, одним из компонентов которой является ингибитор рибонуклеаз. Этот белок необходим для защиты синтезированных РНК от атак рибонуклеаз с целью предотвращения деградации молекул, что критично для РНК. Чаще всего используют ингибитор рибонуклеаз эукариотического происхождения, полученный в виде рекомбинантного белка в клетках бактерий *E. coli*. Однако он является сложной мишенью для наработки в бактериях, что обусловлено его структурой. Целью работы было проверить наработку рекомбинантного ингибитора рибонуклеаз в различных штаммах *E. coli*, а также показать влияние хелперных полипептидов и клеточных шаперонов на этот процесс. При помощи подходов геной инженерии были сконструированы плазмиды, с которых проводили наработку химерных молекул ингибитора рибонуклеаз и вспомогательных полипептидов. Оценку вклада различных компонентов, влияющих на растворимость целевого рекомбинантного белка, проводили в ходе денситометрического анализа результатов электрофореза в ПААГ. Определили, что комбинации вектора с сильным промотором для экспрессии гена ингибитора рибонуклеазы *RNH1* и вспомогательных полипептидов MBP и TIG на фоне повышенной экспрессии клеточных шаперонов *dnaK*, *dnaJ*, *grpE* дают выход целевого продукта 45 мг/л и 60 мг/л соответственно. Подобранные условия дают возможность крупномасштабных наработок этого белка для дальнейшего использования в синтезе РНК *in vitro* при производстве терапевтических препаратов.

**Ключевые слова:** ингибитор рибонуклеаз, продукция рекомбинантных белков, шапероны, вспомогательные полипептиды

**Финансирование:** работа выполнена при поддержке программы Министерства высшего образования и науки РФ (соглашение №. 075-10-2021-113, уникальный номер проекта RF----193021X0001).

**Вклад авторов:** М. В. Захарова — подбор условий наработки рекомбинантных белков, эксперименты по наработке в разных штаммах *E. coli*; А. А. Загоскин — хроматографическая очистка рекомбинантных белков; М. О. Нагорных — концепция работы, создание генетических конструкций, написание статьи; Р. А. Иванов — общее руководство.

✉ **Для корреспонденции:** Максим Олегович Нагорных  
Проспект Науки, д. 5, г. Пущино, 142290, Россия; derbanner@gmail.com

**Статья получена:** 16.11.2023 **Статья принята к печати:** 17.12.2023 **Опубликована онлайн:** 31.12.2023

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2023.058

## PREPARATION OF A RECOMBINANT RIBONUCLEASE INHIBITOR IN *E. COLI* FOR USE IN mRNA SYNTHESIS *IN VITRO*

Zakharova MV<sup>1</sup>, Zagoskin AA<sup>1,2</sup>, Ivanov RA<sup>2</sup>, Nagornykh MO<sup>1,2</sup>✉

<sup>1</sup> Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

<sup>2</sup> Sirius University of Science and Technology, Sirius, Sochi, Russia

Technologies underlying the production of synthetic mRNAs *in vitro* have significantly expanded the possibilities for research and therapeutic use of this class of molecules. The flagship application area has been the niche of mRNA vaccines, but this class of therapeutic molecules has the potential to be applied in a much broader range of situations. The process of *in vitro* production of artificial RNA molecules is based on an enzymatic synthesis reaction, one of the components of which is a ribonuclease inhibitor. This protein protects synthesized RNA from attacks by ribonucleases and prevents degradation of the molecules, which is critically important for RNA. Eukaryotic ribonuclease inhibitor synthesized as a recombinant protein in the cells of *E. coli* bacteria is the most common choice. However, the structure of this protein makes it a difficult product to make in bacteria. This study aimed to test the production of a recombinant ribonuclease inhibitor in various strains of *E. coli*, and to show the effect that helper polypeptides and cellular chaperones have on this process. Using genetic engineering approaches, we constructed plasmids, from which chimeric ribonuclease inhibitor molecules and helper polypeptides were produced. The influence of various components on solubility of the target recombinant protein was assessed with the help of densitometry, to which we have subjected products of the PAGE electrophoresis. It was determined that combinations of a vector with a strong promoter for the expression of the *RNH1* ribonuclease inhibitor gene and helper polypeptides MBP and TIG against the background of increased expression of cellular chaperones *dnaK*, *dnaJ*, *grpE* give the target product yield of 45 mg/l and 60 mg/l, respectively. The selected conditions allow large-scale production of this protein for further use in *in vitro* RNA synthesis in the context of production of medicines.

**Keywords:** ribonuclease inhibitor, production of recombinant proteins, chaperones, fusion polypeptides

**Funding:** the study was financially supported in the context of the program of Ministry of higher education and science of the Russian Federation (agreement #075-10-2021-113, unique project number RF----193021X0001).

**Author contribution:** Zakharov MV — selection of conditions of production of recombinant proteins, production experiments in different *E. coli* strains; Zagoskin AA — chromatographic clearing of recombinant proteins; Nagornykh MO — conceptualization, design of genetic constructs, article authoring; Ivanov RA — general management.

✉ **Correspondence should be addressed:** Maxim O. Nagornykh  
Prospekt Nauki, 5, Pushchino, 142290, Russia; derbanner@gmail.com

**Received:** 16.11.2023 **Accepted:** 17.12.2023 **Published online:** 31.12.2023

**DOI:** 10.24075/brsmu.2023.058

Ингибитор рибонуклеаз, кодируемый геном *RNH1*, — это белок, экспрессируемый в цитозоль, который ингибирует рибонуклеазы панкреатического типа, образуя с ними комплексы и защищая клеточную РНК от преждевременной деградации [1, 2]. Ингибирование происходит за счет нековалентного связывания белковых молекул рибонуклеаз, что приводит к блокированию как РНК-связывающих, так и каталитических доменов рибонуклеаз [3]. Ингибитор рибонуклеаз довольно консервативный белок, со степенью гомологии свыше 70% у таких млекопитающих, как человек, мышь, лошадь и свинья. В состав ингибитора рибонуклеаз входят 15–16 лейцин-богатых повторов (число повторов зависит от вида млекопитающего), причем каждый повтор включает в себя 28–29 аминокислот, имеет одну альфа спираль и один бета-лист. Повторы организованы в подковообразную структуру, общий молекулярный вес которой равен приблизительно 50 кДа [4, 5]. По своим физико-химическим характеристикам ингибитор рибонуклеаз является кислым белком с изоэлектрической точкой в районе 4,5. Еще одна важная особенность ингибитора рибонуклеаз — наличие 32 остатков цистеина, которые нужны для функционирования фермента. В нативном белке цистеины находятся в восстановленном состоянии, участвуя в образовании гидрофобного ядра белка. При окислении остатков цистеина происходит образование дисульфидных мостиков между остатками цистеина и ингибитор рибонуклеаз теряет свою активность в следствии конформационных изменений [6, 7].

Белковые препараты ингибитора рибонуклеаз имеют важное биотехнологическое значение как для лабораторного использования в исследовательской работе (синтез РНК *in vitro*, трансляция *in vitro*, получение кДНК), так и при масштабном получении терапевтических средств на основе искусственных молекул РНК, поэтому с момента его открытия были предприняты попытки получения этого фермента в больших количествах. Исторически первыми опробованы подходы, основанные на получении ингибитора рибонуклеаз из тканей млекопитающих [8]. С развитием технологий рекомбинантных ДНК пытались получать большие количества ингибитора рибонуклеаз в наиболее широко используемой бактериальной системе на основе *E. coli*. Однако рекомбинантный ингибитор рибонуклеаз склонен к агрегации в *E. coli*, как и другие белки с большим количеством гидрофобных аминокислот, в частности с цистеиновыми остатками. Ряд других факторов, в том числе высокая скорость трансляции, сопряженная с транскрипцией у бактерий, приводят к накоплению подобных рекомбинантных белков в виде телец включения, сформированных из агрегатов неправильно свернутых белковых молекул [9]. Таким образом, ранние попытки получения функционально активного ингибитора рибонуклеаз в растворимой форме в *E. coli* часто заканчивались тем, что весь белок скапливался в виде неактивных агрегатов, а при попытке провести процесс рефолдинга *in vitro* полученный белок чаще всего терял свою активность и выход белка был очень низким [10].

Для преодоления этой проблемы были разработаны различные подходы. Один из них заключается в использовании для экспрессии гена ингибитора рибонуклеаз вектора со слабым промотором (например, *P<sub>trp</sub>*) и минимальной среды. При таких условиях, существенно снижающих уровень экспрессии гена целевого белка, удалось получить значительные количества рекомбинантного ингибитора в растворимой форме,

однако общий уровень конечного продукта оказался существенно меньшим по сравнению с экспрессионными системами, где целевой ген находится под контролем *T7* промотора [2]. Другой подход включает в себя добавление в культуральную среду ДТТ (дитиотреитол), в результате чего цистеины находятся в восстановленном состоянии, а это положительно сказывается на фолдинге многих белков, склонных к агрегации, в частности ингибитора рибонуклеаз [11]. В качестве развития такого подхода помимо добавления восстановителя в виде ДТТ было предложено проводить культивирование в анаэробных условиях при пониженной температуре и с коэкспрессией клеточного шаперона GroEL. Эти меры позволяют получать продукцию ингибитора рибонуклеаз на довольно высоком уровне [12]. Однако такой прием представляется довольно сложным и требует большого количества дополнительных компонентов, что усложняет технологический процесс при крупных наработках белка. Наконец, еще один подход основан на получении целевого продукта в виде химерной молекулы со вспомогательным полипептидом, повышающим растворимость целевого белка. Ранее было показано, что вспомогательный полипептид MBP положительно влияет на наработку ингибитора рибонуклеаз в растворимой форме в *E. coli* [4].

Целью настоящей работы является подбор условий наработки рекомбинантного человеческого ингибитора рибонуклеаз в *E. coli*, облегчающих технологию получения этого белка в лабораторном и полупромышленном масштабе.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Конструирование плазмид

Генетические конструкции, используемые в этой работе, были получены с использованием рестриктазно-лигазного метода клонирования ДНК. Последовательность ДНК гена *RNH1*, кодирующую ингибитор рибонуклеаз человека, синтезировали *de novo* с проведением кодон-оптимизации для *E. coli* (IDT, <https://www.idtdna.com/>). Амплификацию всех последовательностей ДНК в этой работе проводили с использованием высокоточной полимеразы Q5, согласно протоколу производителя (NEB). Клонирование гена ингибитора рибонуклеаз в набор векторов со вспомогательными полипептидами на основе pET28a (Novagen; США) и pSol (Lucigen; США) проводили по сайтам рестрикции *NdeI* и *NotI* в ферментативной реакции с двумя соответствующими эндонуклеазами рестрикции («Сибэнзим»; Россия) в течение 1 ч при 37 °С. Далее проводили электрофорез в агарозном геле с последующей очисткой ДНК фрагментов из агарозного геля, с использованием коммерческого набора GeneJet Gel Extraction Kit (Thermo; США). Очищенные фрагменты ДНК, соответствующие векторной части и гену ингибитора рибонуклеаз, использовали в реакции лигирования с ферментом T4-ДНК-лигазой (NEB) в течение 30 мин при комнатной температуре. Трансформировали компетентные клетки *E. coli* 10G (Lucigen; США) при помощи электропорации (Bio-Rad; США) по протоколу производителя прибора. Из клонов, содержащих корректные вставки, выделяли плазмидную ДНК и подтверждали корректность в реакции секвенирования по методу Сэнгера.

### Нарботка рекомбинантных белков в *E. coli*

Нарботку белков проводили в следующих штаммах, предназначенных для наработки рекомбинантных белков

в *E. coli*: BL21 (DE3) (Invitrogen; США); KRX (Promega; США); Rosetta (DE3) pLysS (Novagen; США); BL21 Star (DE3) (Invitrogen; США), Origami 2 (DE3) (Novagen; США). Так, плазмидами, содержащими комбинация генов вспомогательных полипептидов и ингибитора рибонуклеаз, трансформировали каждый штамм при помощи электропорации и засеивали трансформационной смесью (100 мкл) жидкую среду LB в пробирках (3–5 мл) с селективными антибиотиками. Инкубировали в течение 12–14 ч при 37 °С и перемешивании в режиме 180 об./мин. Далее пересеивали выросшую культуру в соотношении 1 : 200 в пробирки или колбы, содержащие требуемое количество культуральной среды LB (10–500 мл) с селективными антибиотиками. Нарращивали клеточную культуру до оптической плотности OD = 0,5–0,6 на шейкере при 180 об./мин на 37 °С. После достижения нужной оптической плотности охлаждали культуру на льду 10 мин, добавляли индуктор 1 мМ ИПТГ (в случае векторов на основе pET28a) либо 0,2% L-рамнозы (в случае векторов на основе pSol), инкубировали при разных температурах (16 °С и 37 °С) и перемешивании 120 об./мин в течение 10 ч (16 °С) либо 2 ч (37 °С). В случаях дополнительной коэкспрессии генов клеточных шаперонов их индукцию осуществляли внесением в культуральную среду L-арабинозы (0,5%) либо тетрациклина (5 нг/мл) и предварительной инкубации до внесения индукторов экспрессии целевого гена. Далее бактериальные клетки осаждали центрифугированием в течение 20 мин при 6000 г и 4 °С.

Для оценки степени растворимости полученного белка осажденные клетки переводили в буфер А для разрушения (50 мМ Трис-НСl pH 7,5; 0,3 М NaCl; 0,005 М имидазола) и разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе (Qsonica Q700) до просветления клеточной суспензии на льду (импульсы УЗ в течение 10 с, охлаждение — 60 с). Осаждали разрушенные клетки при помощи центрифугирования (15 000 г) в течение 30 мин при 4 °С. Далее отбирали пробы супернатанта, содержащего растворимую форму целевого белка, а осадок, содержащий агрегированную форму, растворяли в мочевины (2 М) для дальнейшего электрофоретического анализа. Разделение белков проводили при помощи электрофореза в ПААГ (10%) в денатурирующих условиях по стандартным методикам. После окраски красителем Кумасси голубым и отмывания от красителя гели фотографировали и проводили количественную оценку распределения белков между растворимой и нерастворимой формой. Денситометрический анализ гелей осуществляли с помощью приложения Image Lab (Bio-Rad; США).

### Очистка белков с использованием аффинной хроматографии

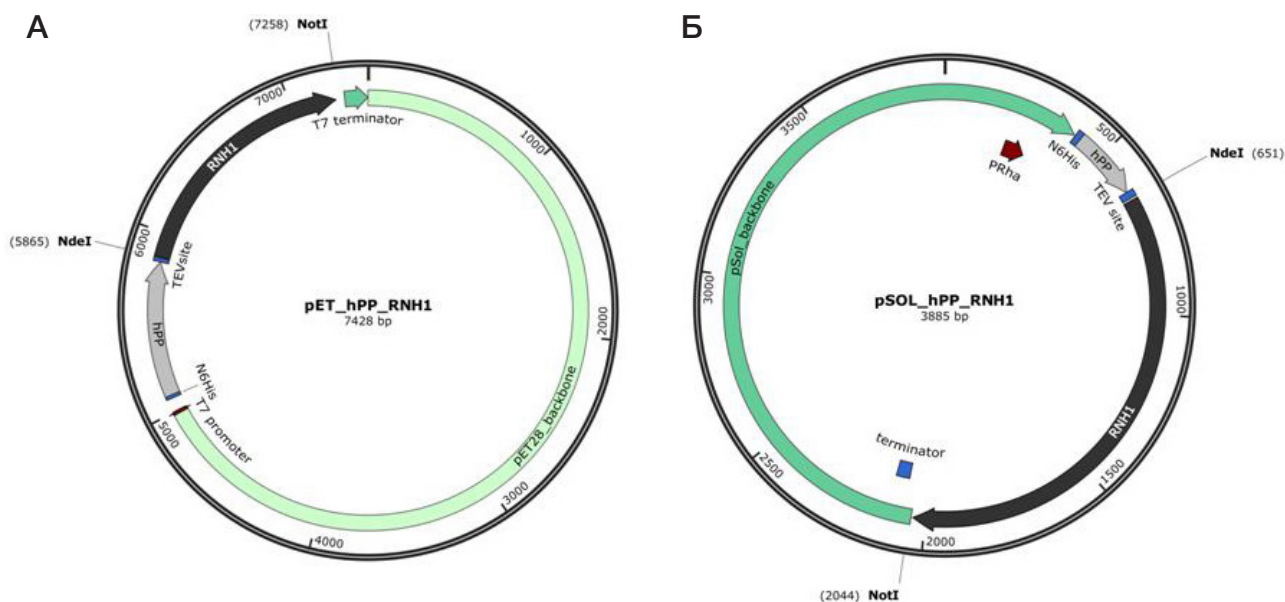
Надосадочную жидкость после ультразвукового разрушения биомассы и центрифугирования клеточного дебриса фильтровали через мембрану с размером пор 0,22 мкм. Таким образом получали препарат для хроматографической очистки, содержащий растворимую фракцию белков в буфере А (50 мМ Трис-НСl pH 7,5; 0,3 М NaCl; 0,005 М имидазола) для нанесения на хроматографический сорбент IMAC (Bio-Rad® Nuviatm IMAC Resin). Белок элюировали хроматографическим буфером В (50 мМ Трис-НСl pH 7,5; 0,5 М имидазола). Препарат, полученный после очистки с использованием IMAC, был сконцентрирован с помощью центрифужного концентратора Spin-X (размером пор 10 кДа) с 5 до 1 мл. При необходимости, далее препарат

очищенного белка обрабатывали TEV-протеазой согласно рекомендациям производителя, в течение ночи при 4 °С, а затем проводили повторную хроматографическую очистку, но собирали уже фракцию, не связавшуюся с сорбентом и содержащую очищенный ингибитор рибонуклеаз. Целевую фракцию диализовали против буфера хранения (40 мМ HEPES-КОН pH 7,6, 100 мМ KCl) при 4 °С. Для длительного хранения при –20 °С добавляли глицерин (50%) и DTT (8 мМ).

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На первом этапе работы по подбору оптимальных условий для наработки растворимой формы рекомбинантного ингибитора рибонуклеаз мы решили расширить скрининг вспомогательных полипептидов, повышающих растворимость этого белка, поскольку такой подход уже был опробован ранее [4]. Для этого мы сконструировали набор из двадцати векторов на основе двух экспрессионных плазмид pET28a (Novagen; США) и pSol (Lucigen; США). Два вектора содержали кодон-оптимизированный для экспрессии в *E. coli* ген человеческого ингибитора рибонуклеаз (*RNH1*) с последовательностью, кодирующей полигистидиновую метку на N-конце белка, что в результате кодировало целевую белковую молекулу с гистидиновым хвостом для аффинной очистки. Остальные плазмиды кодировали химерные белки, состоящие из вспомогательных полипептидов (MBP, TIG, TSF, FH8, PpiB, YrhB, SUMO, TRX, GST) и рекомбинантного ингибитора рибонуклеаз. Индукция экспрессии с T7-промотора (в случае pET28a) либо с рамнозного промотора (в случае pSol) в этих плаزمиде дает в итоге наработку химерных белков, состоящих из комбинаций ингибитора рибонуклеаз с разными вспомогательными полипептидами, содержащими полигистидиновую метку на N-конце для аффинной очистки (рис. 1). Необходимо отметить, что между геном ингибитора рибонуклеаз и генами вспомогательных полипептидов была внесена последовательность, кодирующая сайт протеолиза для TEV-протеазы. Таким образом, после первичной аффинной очистки есть возможность отщепления вспомогательного полипептида и проведения второй стадии аффинной хроматографии для получения чистого препарата ингибитора рибонуклеаз.

Все полученные генетические конструкции были опробованы в работе при типовых условиях наработки рекомбинантных белков в *E. coli*, для этого ими были трансформированы клетки штамма BL21 (DE3), и наработка белков была проверена при 37 °С. Инкубация бактериальных культур при 37 °С, как ожидалось, не дала наработки растворимой формы ингибитора рибонуклеаз — нерастворимые агрегаты формировались независимо от партнерского вспомогательного пептида и промотора, с которого запускалась экспрессия целевого гена (данные не представлены). При снижении температуры инкубации бактериальной культуры до 16 °С варианты без вспомогательных пептидов также образовывали тельца включения, однако несколько химерных белков нарабатывались в растворимой форме (рис. 2). Именно по этой причине все дальнейшие наработки рекомбинантного ингибитора рибонуклеаз в этой работе мы проводили при пониженной температуре (16 °С). В частности, хороший результат был достигнут с такими вспомогательными полипептидами, как MBP (70–75% целевого продукта в растворимой форме), TIG (порядка 90% целевого продукта в растворимой форме) и, в меньшей степени, с PpiB (около 60% целевого продукта в растворимой форме).



**Рис. 1.** Схематические карты векторов для наработки ингибитора рибонуклеаз с вспомогательными полипептидами, повышающими растворимость рекомбинантных белков в *E. coli*, для вариантов на основе вектора рЕТ28а с промотором Т7 (**А**), для вариантов на основе вектора рSOL с промотором PRha (**Б**). RNH1 — ген, кодирующий человеческий ингибитор рибонуклеазы; hPP — ген, кодирующий один из хелперных полипептидов (MBP, TIG, TSF, FH8, PpiB, YrhB, SUMO, TRX, GST). Остов вектора рЕТ28а (pET28\_backbone) содержит в себе ген устойчивости к канамицину, ориджин репликации рBR322, а также последовательность, кодирующую репрессор lacI. Остов вектора рSOL (pSOL\_backbone) содержит в себе ген устойчивости к канамицину, ориджин репликации рUC, промотор PRha, индуцируемый рамнозой и терминатор транскрипции

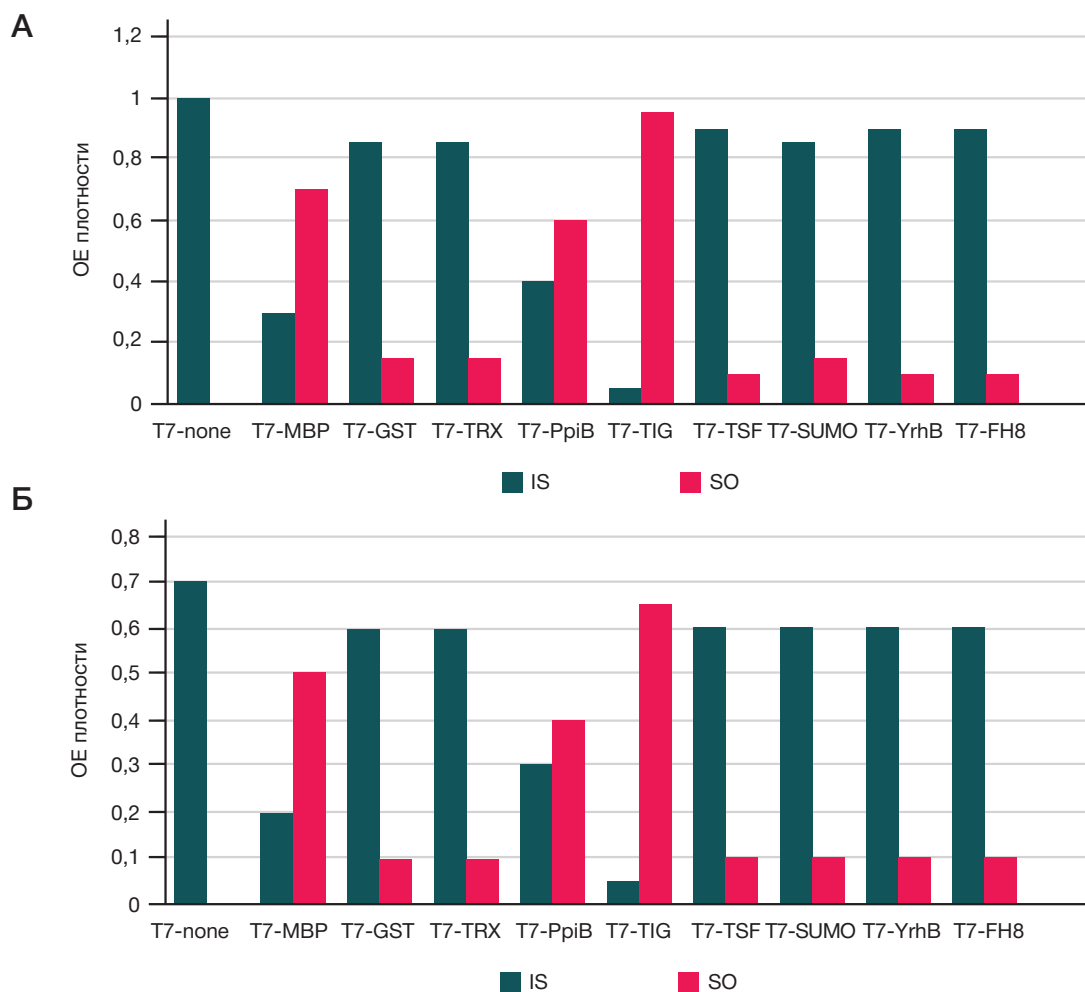
Векторы на основе рЕТ28а дали существенно большую продукцию белка за счет использования сильного промотора Т7, по сравнению с векторной системой рSOL, где используют не такой сильный рамнозный промотор (рис. 2). Тем не менее, часть целевого белка все равно переходила в функционально-неактивное состояние в тельцах включения, что можно было бы скорректировать дальнейшей оптимизацией условий наработки.

Далее мы решили сравнить уровень выхода растворимой формы ингибитора рибонуклеаз в разных штаммах *E. coli*, специально сконструированных для наработки рекомбинантных белков. Предыдущие экспериментальные подходы получения растворимой формы ингибитора рибонуклеаз в *E. coli*, как правило, разрабатывали с учетом опыта получения рекомбинантных продуцентов на основе штамма BL21 (DE3), однако в большинстве случаев этот штамм не является оптимальным для наработки белков, склонных к агрегации и дает существенную долю нерастворимых агрегатов. Поэтому для дальнейшего подбора оптимальных условий получения ингибитора рибонуклеаз мы попробовали сравнить уровень наработки белка еще в четырех штаммах, предназначенных для наработки рекомбинантных белков в *E. coli*. Для этого в дополнение к штамму BL21 (DE3) были выбраны следующие коммерчески доступные штаммы, с различными конструктивными особенностями, обусловленными их предназначением при наработке рекомбинантных белков. Штамм Origami 2 (DE3) имеет мутации в генах тиоредоксинредуктазы (trxB) и глутатионредуктазы (gor), которые способствуют формированию дисульфидных связей и корректному сворачиванию некоторых рекомбинантных белков в цитоплазме бактериальных клеток. Бактерии штамма BL21 Star (DE3) содержат мутацию в гене, кодирующем рибонуклеазу E (*rne131*), что увеличивает стабильность мРНК целевого гена и может повышать уровень наработки рекомбинантных белков. Было интересно еще попробовать в качестве продуцента штамм Rosetta (DE3) pLysS, который кроме возможности наработки белков без оптимизации

кодировочного состава их генов под *E. coli* позволяет также снизить фоновый уровень экспрессии с Т7-промотора за счет дополнительной экспрессии гена Т7 лизоцима — природного ингибитора ДНК-зависимой РНК-полимеразы фага Т7, что особенно важно при наработке потенциально токсичных для бактерий белков. Наконец, штамм *E. coli* KRX имеет хромосомную копию гена Т7 ДНК-зависимой РНК-полимеразы под контролем рамнозного промотора, который существенно лучше контролирует базальную экспрессию, а также хорошо титруется рамнозой, в то же время давая высокую продукцию рекомбинантных белков, которая обеспечивается Т7-промотором [13].

Для проверки влияния штамма на продукцию растворимой формы ингибитора мы отобрали наиболее удачные варианты с предыдущего этапа работы, т. е. векторы на основе рЕТ28а, кодирующие химерные белки, в состав которых входят вспомогательные полипептиды MBP и TIG. Как отмечалось ранее, все сравнительные наработки в этих штаммах проводили при температуре инкубации бактериальной культуры 16 °С. По результатам всех наработок наилучший результат был получен в штамме KRX (рис. 3). Возможно, это связано с более подходящим режимом экспрессии гена Т7 ДНК-зависимой РНК-полимеразы под контролем рамнозного промотора, что дает лучшее дозирование накопления Т7 ДНК-зависимой РНК-полимеразы в клетках, а соответственно экспрессия гена рекомбинантного ингибитора рибонуклеаз так же не «перегружена», как в случае прямой индукции промотора Т7 при помощи ИПТГ с lacUV5-промотора, где возможность снижения экспрессии при помощи титрования индуктора практически отсутствует. Штаммы BL21 (DE3) и BL21 Star (DE3) тоже достаточно хорошо подходят для наработок в комбинации с отобранными вспомогательными полипептидами и культивации на пониженных температурах, но дают более низкий выход итогового продукта в растворимой форме, чем KRX (примерно на 10–15% в зависимости от вспомогательного полипептида). Остальные два штамма давали существенно более низкий уровень белка, причем Origami 2 (DE3)





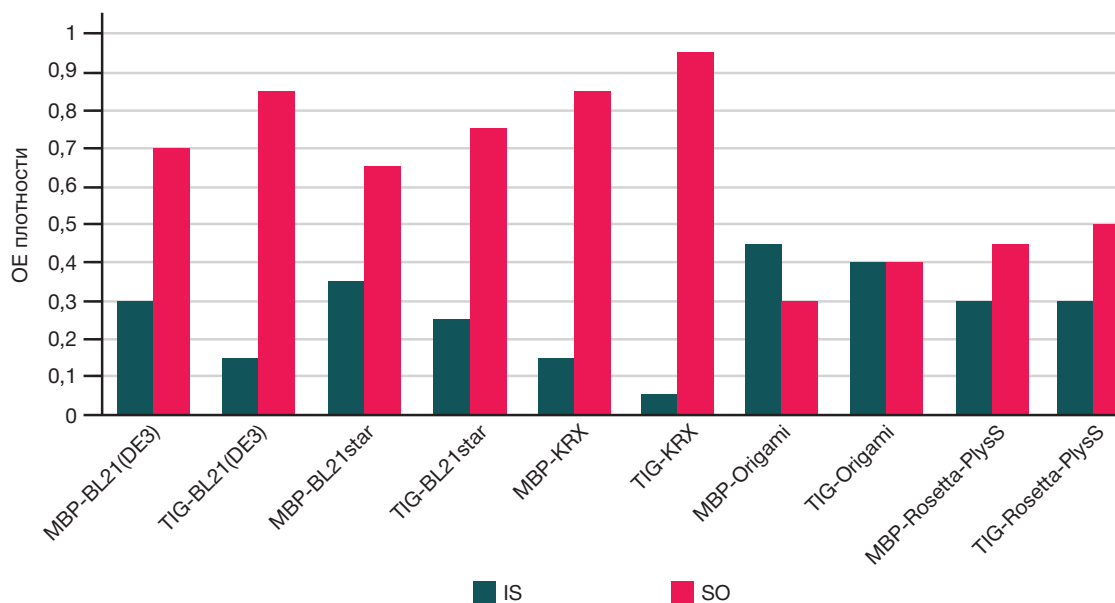
**Рис. 2.** Влияние вспомогательных полипептидов на растворимость ингибитора рибонуклеаз для вариантов на основе вектора pET28a с промотором T7 (A), для вариантов на основе вектора pSol с промотором PRha (B) при наработке в штамме *E. coli* BL21 (DE3) на 16 °С. Относительный уровень нерастворимой фракции (IS) обозначен красным цветом. Синим показан уровень наработки ингибитора рибонуклеаз в растворимой форме (SO). OE плотности — относительные единицы измерения при денситометрии результатов ПААГ

давал худшие результаты, что скорее всего связано со специфичными мутациями в этом штамме, призванными создавать внутриклеточные условия для образования дисульфидных мостиков. Также низкие результаты можно связать с меньшим количеством биомассы, которую дают эти штаммы относительно штаммов KRX, BL21 (DE3) и BL21 Star (DE3) за одно и то же время роста бактериальной культуры, по-видимому, за счет внесенных мутаций, влияющих на жизнеспособность и метаболические процессы в клетках. Таким образом, после второго этапа работы, наилучшими комбинациями «штамм — вспомогательный полипептид» для получения растворимой формы ингибитора рибонуклеаз оказались *E. coli* KRX-MBP, *E. coli* KRX-TIG.

Наконец, еще одним инструментом для борьбы с образованием нерастворимых агрегатов при наработке рекомбинантных белков в *E. coli* является дополнительная ко-экспрессия генов клеточных шаперонов, которые помогают белкам принимать нативную конформацию. Для того чтобы проверить влияние шаперонов на корректный фолдинг ингибитора рибонуклеаз при наработке в *E. coli*, мы попробовали совместную экспрессию с генами таких шаперонов, как *dnaK*, *dnaJ*, *grpE*, *groES* и *groEL*. Ранее было продемонстрировано, что некоторые шапероны положительно влияют на наработку функционального ингибитора рибонуклеаз [14, 15]. Мы решили проверить влияние этих шаперонов на наилучшие комбинации

вспомогательных полипептидов (MBP, TIG, PpiB) и штамма *E. coli* KRX для наработки ингибитора рибонуклеаз. Интересно, что в наших условиях максимальный эффект (около 10% прибавки целевого продукта) влияния дополнительной коэкспрессии генов шаперонов на наработку целевого белка был от генов *dnaK*, *dnaJ*, *grpE* (рис. 4). В то же время было отмечено положительное влияние шаперона GroELS на выход растворимой формы ингибитора рибонуклеаз [12]. Возможные различия скорее всего обусловлены использованием разных штаммов.

Таким образом, лучшей комбинацией для получения высокого выхода растворимой формы ингибитора рибонуклеаз, которую мы выбрали в ходе этой работы, является культивация рекомбинантного штамма *E. coli* KRX при низкой температуре (16 °С), использование вспомогательных полипептидов TIG и MBP при наработке ингибитора рибонуклеаз, а также дополнительная коэкспрессия генов шаперонов *dnaK*, *dnaJ*, *grpE*. Для оценки точного количества выхода целевого белка была проведена хроматографическая очистка для выбранных комбинаций при помощи аффинной хроматографии на металл-хелатном носителе и последующей реакцией протеолиза с TEV-протеазой. Итоговое количество растворимой формы ингибитора рибонуклеаз составило: а) для комбинации *E. coli* KRX-TIG-*dnaK*, *dnaJ*, *grpE* — 60 мг/л; б) для комбинации *E. coli* KRX-MBP-*dnaK*, *dnaJ*, *grpE* — 45 мг/л.



**Рис. 3.** Выбор оптимального штамма *E. coli* для наработки рекомбинантного ингибитора рибонуклеаз в растворимой форме, с использованием векторов, кодирующих химерный белок, состоящий из комбинаций ингибитора рибонуклеаз с двумя вспомогательными полипептидами (MBP, TIG). Относительный уровень нерастворимой фракции (IS) обозначен красным цветом. Синим показан уровень наработки ингибитора рибонуклеаз в растворимой форме (SO). OE плотности — относительные единицы измерения при денситометрии результатов ПААГ

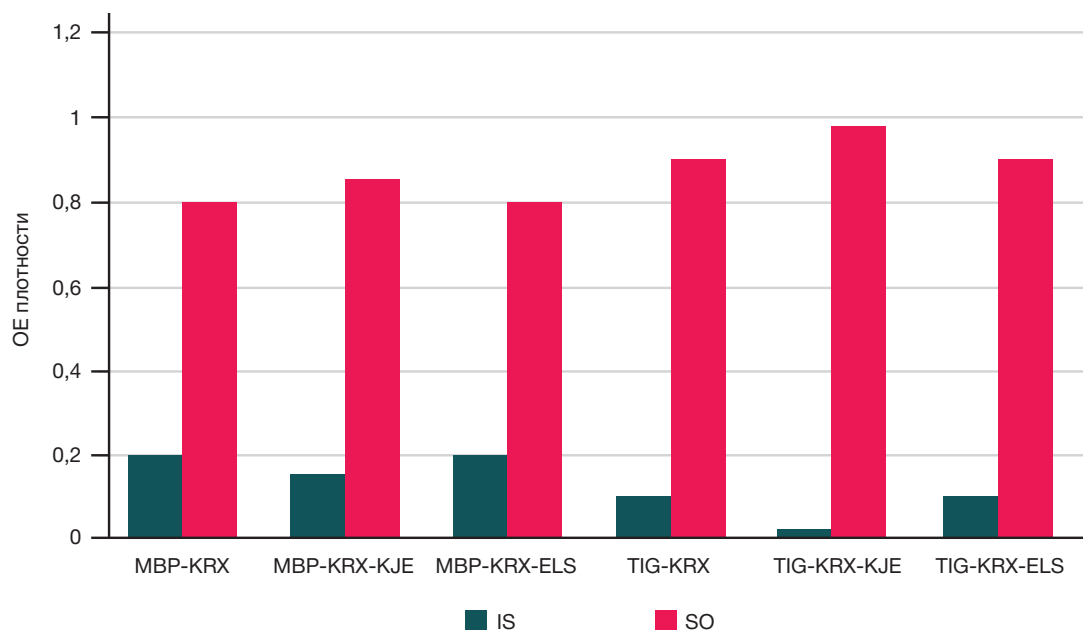
## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Быстрое развитие области терапевтического применения синтетических мРНК диктует потребность в получении препаративных количеств белков для ферментативного получения большого количества РНК *in vitro* [16, 17]. Помимо ферментов, осуществляющих синтез и модификацию РНК *in vitro*, одним из важных компонентов реакционной смеси является ингибитор рибонуклеаз — белок, который предотвращает деградацию молекул РНК, вызванную рибонуклеазами, что особенно критично при получения терапевтических препаратов. Также ингибитор рибонуклеаз широко используют в исследовательской деятельности, в частности в задачах, связанных с синтезом РНК, кДНК, а также трансляцией *in vitro*. Получение этого белка в рекомбинантных штаммах *E. coli* осложняет специфика его структуры, богатой цистеиновыми остатками, а также склонность к агрегации в бактериальных клетках. Ранее были сделаны попытки получения растворимой формы ингибитора рибонуклеаз в *E. coli*, однако предложенные специфические условия наработки существенно усложняют технологический процесс и делают его затратным при масштабировании [11, 12]. В данной работе была поставлена цель найти комбинацию условий и способ для наработки ингибитора рибонуклеаз, подходящие для крупномасштабного получения этого белка, а также экономически выгодные с технологической точки зрения.

В качестве первого этапа работ по оптимизации мы провели скрининг ряда вспомогательных пептидов, которые могли бы повысить долю растворимого ингибитора рибонуклеаз при наработке в *E. coli*. Ранее было показано, что такие полипептиды могут значительно увеличить выход рекомбинантных белков в растворимой форме, в том числе ингибитора рибонуклеаз [4, 18]. Было доказано, что они могут оказывать влияние на увеличение растворимости различных рекомбинантных белков, формируя химерные молекулы, вспомогательную часть которой (хелперный полипептид) можно позже удалить протеолизом [9, 19]. Мы протестировали девять разных вспомогательных полипептидов MBP, TIG, TSF, FH8, PpiB, YrhB, SUMO,

TRX, GST, которые существенно различаются по своим физико-химическим свойствам. Дополнительно к этому мы протестировали эти вспомогательные полипептиды в двух экспрессионных системах — на основе коммерческой плазмиды рЕТ28а, где экспрессия целевого гена находится под контролем сильного промотора Т7, а также на основе вектора рSOL, где экспрессию контролирует рамнозный промотор. Из всех кандидатов наилучшие результаты для наработки ингибитора рибонуклеаз показали такие полипептиды, как MBP, TIG и PpiB. При этом MBP и TIG дали максимальное количество продукта, существенно превышая вариант со вспомогательным полипептидом PpiB (рис. 2). В целом, во всех экспериментах этой работы было замечено, что более крупные полипептиды, такие как MBP (42 кДа) и TIG (49 кДа), дают больше итогового целевого продукта, чем меньшие по молекулярной массе партнеры вроде PpiB (19 кДа). При сравнении количественного выхода целевых продуктов в двух линейках векторов — на основе рЕТ28а и рSol, в случае наработок ингибитора рибонуклеаз можно сделать однозначный выбор в пользу системы, где экспрессия целевого гена находится под контролем сильного промотора Т7 (рис. 2).

С наиболее продуктивными вариантами векторов на основе плазмиды рЕТ28а, кодирующими химерные варианты ингибитора рибонуклеаз со вспомогательными полипептидами MBP и TIG, мы перешли к следующему этапу оптимизации условий наработки — подбору подходящего штамма *E. coli* из некоторых коммерчески доступных вариантов. Для этого этапа был проведен сравнительный анализ продукции ингибитора рибонуклеаз в пяти разных штаммах *E. coli*, специально сконструированных для наработки рекомбинантных белков: BL21 (DE3), Origami 2 (DE3), BL21 Star (DE3), Rosetta (DE3) pLysS и KRX. Выбранные штаммы имеют разную специфику применения при получении целевых рекомбинантных белков в бактериях *E. coli*, что дает возможность сравнить их и выбрать наиболее подходящий для максимальной продукции ингибитора рибонуклеаз в растворимой форме [20]. В наших условиях, наиболее высокие результаты при наработке ингибитора рибонуклеаз показал штамм *E. coli* KRX (рис. 3), и это



**Рис. 4.** Влияние дополнительной коэкспрессии генов клеточных шаперонов *dnaK*, *dnaJ*, *grpE* (на рисунке обозначены как KJE), *groES* и *groEL* (обозначены как ELS) на наработку рекомбинантного ингибитора рибонуклеаз в штамме *E. coli* KRX при 16 °С. Относительный уровень нерастворимой фракции (IS) обозначен красным цветом. Синим показан уровень наработки ингибитора рибонуклеаз в растворимой форме (SO). OE плотности — относительные единицы измерения при денситометрии результатов ПГАГ

может быть связано с тем, что ген T7 ДНК-зависимой РНК-полимеразы в этом штамме стоит под контролем рамнозного промотора, который имеет низкий базальный уровень активности, а также лучше титруется индуктором L-рамнозой. По-видимому, подобная конструктивная особенность позволяет найти оптимальный баланс между подходящими условиями бактериальных наработок токсичных или склонных к агрегации рекомбинантных белков, в то же время достигнуть высокого выхода целевого белка, снижая количество потерь белка в тельцах включения, что часто можно наблюдать при использовании штаммов, где хромосомная копия гена T7 ДНК-зависимой РНК-полимеразы стоит под контролем *lacUV5* промотора и индуцируется ИПТГ [21].

Наконец, для наиболее удачных комбинаций «штамм — вспомогательный полипептид» (*E. coli* KRX-MBP и *E. coli* KRX-TIG) мы решили проверить влияние на итоговый выход белкового продукта от дополнительной коэкспрессии генов клеточных шаперонов. Для этих целей мы использовали коммерческий набор (Takara; США), который включает векторы, несущие гены таких шаперонов, как *dnaK*, *dnaJ*, *grpE*, *groES* и *groEL*. Этот набор включает в себя гены основных клеточных шаперонов, дополнительная продукция которых в клетках *E. coli* часто помогает «проблемным» рекомбинантным белкам принять корректную конформацию, снижая образование нерастворимых агрегатов [14, 15]. В случае рекомбинантного ингибитора рибонуклеаз уже было показано положительное влияние *groES* и *groEL* на наработку белка в анаэробных условиях [12], что не всегда удобно при масштабировании технологических процессов получения рекомбинантных белков. Интересно, что в наших экспериментальных условиях при аэробном культивировании *E. coli* на пониженной температуре (16 °С) наилучшие результаты по наработке ингибитора рибонуклеаз были достигнуты для двух комбинаций компонентов: а) вспомогательный полипептид MBP, дополнительная коэкспрессия генов шаперонов *dnaK*, *dnaJ*, *grpE*, штамм *E. coli* KRX; б) вспомогательный

полипептид TIG, дополнительная коэкспрессия генов шаперонов *dnaK*, *dnaJ*, *grpE*, штамм *E. coli* KRX (рис. 4). Для точной количественной оценки наработки рекомбинантного ингибитора рибонуклеаз в таких комбинациях была проведена стадия аффинной очистки, после которой сравнивали выход целевого продукта для обоих вариантов (MBP и TIG). Первая комбинация дает выход белкового продукта на уровне 45 мг/л. Однако максимальный выход конечного продукта, т. е. растворимой формы ингибитора рибонуклеаз, был достигнут при аэробном культивировании штамма *E. coli* KRX на пониженной температуре (16 °С), трансформированного экспрессионным вектором на основе pET28a с кодон-оптимизированным геном ингибитора рибонуклеаз, в комбинации с геном вспомогательного полипептида TIG на фоне дополнительной коэкспрессии генов шаперонов *dnaK*, *dnaJ*, *grpE*. Такой вариант дает выход 60 мг/л при культивировании бактерий в колбах на стандартной среде LB. Что существенно выше, чем результаты, достигнутые ранее, а также проще с точки зрения технологий культивирования продуцента [4, 11, 12, 22].

Полученные данные еще раз подтверждают необходимость комплексного подхода при поиске оптимальных условий для наработки рекомбинантных белков, склонных к агрегации, в бактериальных продуцентах *E. coli*, особенно если это касается условий для масштабирования технологических процессов при получении ферментов, терапевтических белков, таких как препараты цитокинов или антигенов для вакцин [23].

## ВЫВОДЫ

Результаты этой работы демонстрируют, что при системном подборе комбинации условий и компонентов при наработках ферментов и терапевтических рекомбинантных белков в *E. coli*, которые склонны к агрегации и формируют тельца включения при обычных условиях культивации бактерий, можно добиться существенно большего выхода целевого белка в растворимой форме. При этом можно найти баланс условий и компонентов, приемлемый для

полупромышленных и промышленных масштабов получения рекомбинантного белка, минимизировать потери белка в виде накопления нерастворимых агрегатов. Необходимо отметить, что итоговый протокол наработки ингибитора рибонуклеаз, который был подобран в ходе этого исследования, все еще можно оптимизировать, учитывая опыт более ранних работ и возможный подбор

питательных сред, отличных от стандартной LB, и переход на культивирование в ферментере, что еще больше увеличит итоговый выход продукта. Однако даже в таком виде схема наработки применима для масштабирования при полупромышленных наработках этого белка в препаративных количествах для дальнейшего применения в ферментативном синтезе РНК *in vitro*.

## Литература

1. Moenner M, Vosoghi M, Ryazantsev S, Glitz DG. Ribonuclease inhibitor protein of human erythrocytes: characterization, loss of activity in response to oxidative stress, and association with Heinz bodies. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 1998; 24 (2): 149–64. DOI: 10.1006/bcmd.1998.0182.
2. Klink TA, Vicentini AM, Hofsteenge J, Raines RT High-level soluble production and characterization of porcine ribonuclease inhibitor. *Protein expression and purification*. 2001; 22 (2): 174–79. DOI: 10.1006/prep.2001.1422.
3. Kobe B, Deisenhofer J. Mechanism of ribonuclease inhibition by ribonuclease inhibitor protein based on the crystal structure of its complex with ribonuclease A. *Journal of molecular biology*. 1996; 264 (5): 1028–43. DOI: 10.1006/jmbi.1996.0694.
4. Guo W, Cao L, Jia Z, Wu G, Li T, Lu F, et al. High level soluble production of functional ribonuclease inhibitor in *Escherichia coli* by fusing it to soluble partners. *Protein expression and purification*. 2011; 77 (2): 185–92. DOI: 10.1016/j.pep.2011.01.015.
5. Dickson KA, Haigis MC, Raines RT. Ribonuclease inhibitor: structure and function. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*. 2005; 80: 349–74. DOI: 10.1016/S0079-6603(05)80009-1.
6. Fominaya JM, Hofsteenge J. Inactivation of ribonuclease inhibitor by thiol-disulfide exchange. *Journal of Biological Chemistry*. 1992; 267 (34): 24655–60.
7. Kobe B, Kajava AV. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Current opinion in structural biology*. 2001; 11 (6): 725–32. DOI: 10.1016/S0959-440x(01)00266-4.
8. Blackburn P. Ribonuclease inhibitor from human placenta: rapid purification and assay. *Journal of Biological Chemistry*. 1979; 254 (24): 12484–7.
9. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology*. 2014; 5: 172. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00172.
10. Lee FS, Vallee BL. Expression of human placental ribonuclease inhibitor in *Escherichia coli*. *Biochemical and biophysical research communications*. 1989; 160 (1): 115–20. DOI: 10.1016/0006-291x(89)91628-8.
11. Šiurkus J, Neubauer P. Reducing conditions are the key for efficient production of active ribonuclease inhibitor in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*. 2011; 10 (1): 1–15. DOI: 10.1186/1475-2859-10-31.
12. Šiurkus J, Neubauer P. Heterologous production of active ribonuclease inhibitor in *Escherichia coli* by redox state control and chaperonin coexpression. *Microbial cell factories*. 2011; 10: 1–11. DOI: 10.1186/1475-2859-10-65.
13. Ohana RF, Encell LP, Zhao K, Simpson D, Slater MR, Urh M, et al. HaloTag7: A genetically engineered tag that enhances bacterial expression of soluble proteins and improves protein purification. *Protein Expression and Purification*. 2009; 68 (1): 110–20. DOI: 10.1016/j.pep.2009.05.010.
14. Nishihara K, Kanemori M, Kitagawa M, Yanagi H, Yura, T. Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, CryJ2, in *Escherichia coli*. *Appl. Environ Microbiol*. 1998; 64: 1694–99. DOI: 10.1128/AEM.64.5.1694-1699.
15. Nishihara K, Kanemori M, Yanagi H, Yura T. Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Environ Microbiol*. 2000; 66: 884–89. DOI: 10.1128/AEM.66.3.884-889.2000.
16. Захарова М. В., Нагорных М. О. Получение бактериального продуцента ДНК-зависимой РНК-полимеразы бактериофага T7 для синтеза РНК *in vitro*. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2022; 12: 9–14. DOI: 10.17513/mjpf.13476.
17. Fuchs AL, Neu A, Sprangers R. A general method for rapid and cost-efficient large-scale production of 5' capped RNA. *RNA*. 2016; 22 (9): 1454–66. DOI: 10.1261/rna.056614.116.
18. Ortega C, Oppezzo P, Correa A. Overcoming the Solubility Problem in *E. coli*: Available Approaches for Recombinant Protein Production. *Methods Mol Biol*. 2022; 2406: 35–64. DOI: 10.1007/978-1-0716-1859-2\_2.
19. Jia B, Jeon CO. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. *Open biology*. 2016; 6 (8): 160196. DOI: 10.1098/rsob.160196.
20. Morão LG, Manzi LR, Clementino LOD, Wrenger C, Nascimento AS. A scalable screening of *E. coli* strains for recombinant protein expression. *PLOS ONE* 2022; 17 (7): e0271403. DOI: 10.1371/journal.pone.0271403.
21. Zhang ZX, Nong FT, Wang YZ, Yan CX, Gu Y, Song P, et al. Strategies for efficient production of recombinant proteins in *Escherichia coli*: alleviating the host burden and enhancing protein activity. *Microb Cell Fact*. 2022; 21 (191). DOI: 10.1186/s12934-022-01917-y.
22. Flachner B, Dobi K, Benedek A, Cseh S, Lőrincz Z, Hajdú I. Robust Recombinant Expression of Human Placental Ribonuclease Inhibitor in Insect Cells. *Biomolecules*. 2022; 12 (2): 273. DOI: 10.3390/biom12020273.
23. Mital S, Christie G, Dikicioglu D. Recombinant expression of insoluble enzymes in *Escherichia coli*: a systematic review of experimental design and its manufacturing implications. *Microb Cell Fact*. 2021; 20 (1): 208. DOI: 10.1186/s12934-021-01698-w.

## References

1. Moenner M, Vosoghi M, Ryazantsev S, Glitz DG. Ribonuclease inhibitor protein of human erythrocytes: characterization, loss of activity in response to oxidative stress, and association with Heinz bodies. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 1998; 24 (2): 149–64. DOI: 10.1006/bcmd.1998.0182.
2. Klink TA, Vicentini AM, Hofsteenge J, Raines RT High-level soluble production and characterization of porcine ribonuclease inhibitor. *Protein expression and purification*. 2001; 22 (2): 174–79. DOI: 10.1006/prep.2001.1422.
3. Kobe B, Deisenhofer J. Mechanism of ribonuclease inhibition by ribonuclease inhibitor protein based on the crystal structure of its complex with ribonuclease A. *Journal of molecular biology*. 1996; 264 (5): 1028–43. DOI: 10.1006/jmbi.1996.0694.
4. Guo W, Cao L, Jia Z, Wu G, Li T, Lu F, et al. High level soluble production of functional ribonuclease inhibitor in *Escherichia coli* by fusing it to soluble partners. *Protein expression and purification*. 2011; 77 (2): 185–92. DOI: 10.1016/j.pep.2011.01.015.



- 2011; 77 (2): 185–92. DOI: 10.1016/j.pep.2011.01.015.
5. Dickson KA, Haigis MC, Raines RT. Ribonuclease inhibitor: structure and function. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*. 2005; 80: 349–74. DOI: 10.1016/S0079-6603(05)80009-1.
  6. Fominaya JM, Hofsteenge J. Inactivation of ribonuclease inhibitor by thiol-disulfide exchange. *Journal of Biological Chemistry*. 1992; 267 (34): 24655–60.
  7. Kobe B, Kajava AV. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Current opinion in structural biology*. 2001; 11 (6): 725–32. DOI: 10.1016/S0959-440x(01)00266-4.
  8. Blackburn P. Ribonuclease inhibitor from human placenta: rapid purification and assay. *Journal of Biological Chemistry*. 1979; 254 (24): 12484–7.
  9. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology*. 2014; 5: 172. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00172.
  10. Lee FS, Vallee BL. Expression of human placental ribonuclease inhibitor in *Escherichia coli*. *Biochemical and biophysical research communications*. 1989; 160 (1): 115–20. DOI: 10.1016/0006-291x(89)91628-8.
  11. Šiurkus J, Neubauer P. Reducing conditions are the key for efficient production of active ribonuclease inhibitor in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*. 2011; 10 (1): 1–15. DOI: 10.1186/1475-2859-10-31.
  12. Šiurkus J, Neubauer P. Heterologous production of active ribonuclease inhibitor in *Escherichia coli* by redox state control and chaperonin coexpression. *Microbial cell factories*. 2011; 10: 1–11. DOI: 10.1186/1475-2859-10-65.
  13. Ohana RF, Encell LP, Zhao K, Simpson D, Slater MR, Urh M, et al. HaloTag7: A genetically engineered tag that enhances bacterial expression of soluble proteins and improves protein purification. *Protein Expression and Purification*. 2009; 68 (1): 110–20. DOI: 10.1016/j.pep.2009.05.010.
  14. Nishihara K, Kanemori M, Kitagawa M, Yanagi H, Yura T. Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. *Appl. Environ Microbiol*. 1998; 64: 1694–99. DOI: 10.1128/AEM.64.5.1694-1699.
  15. Nishihara K, Kanemori M, Yanagi H, Yura T. Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Environ Microbiol*. 2000; 66: 884–89. DOI: 10.1128/AEM.66.3.884-889.2000.
  16. Zaharova MV, Nagornyh MO. Poluchenie bakterial'nogo producenta DNK-zavisimoy RNK-polimerazy bakteriofaga T7 dlja sinteza RNK in vitro. *Mezhdunarodnyj zhurnal prikladnyh i fundamental'nyh issledovaniy*. 2022; 12: 9–14. DOI: 10.17513/mjpf.13476. Russian.
  17. Fuchs AL, Neu A, Sprangers R. A general method for rapid and cost-efficient large-scale production of 5' capped RNA. *RNA*. 2016; 22 (9): 1454–66. DOI: 10.1261/ma.056614.116.
  18. Ortega C, Oppezzo P, Correa A. Overcoming the Solubility Problem in *E. coli*: Available Approaches for Recombinant Protein Production. *Methods Mol Biol*. 2022; 2406: 35–64. DOI: 10.1007/978-1-0716-1859-2\_2.
  19. Jia B, Jeon CO. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. *Open biology*. 2016; 6 (8): 160196. DOI: 10.1098/rsob.160196.
  20. Morão LG, Manzi LR, Clementino LOD, Wrenger C, Nascimento AS. A scalable screening of *E. coli* strains for recombinant protein expression. *PLOS ONE* 2022; 17 (7): e0271403. DOI: 10.1371/journal.pone.0271403.
  21. Zhang ZX, Nong FT, Wang YZ, Yan CX, Gu Y, Song P, et al. Strategies for efficient production of recombinant proteins in *Escherichia coli*: alleviating the host burden and enhancing protein activity. *Microb Cell Fact*. 2022; 21 (191). DOI: 10.1186/s12934-022-01917-y.
  22. Flachner B, Dobi K, Benedek A, Cseh S, Lőrincz Z, Hajdú I. Robust Recombinant Expression of Human Placental Ribonuclease Inhibitor in Insect Cells. *Biomolecules*. 2022; 12 (2): 273. DOI: 10.3390/biom12020273.
  23. Mital S, Christie G, Dikicioglu D. Recombinant expression of insoluble enzymes in *Escherichia coli*: a systematic review of experimental design and its manufacturing implications. *Microb Cell Fact*. 2021; 20 (1): 208. DOI: 10.1186/s12934-021-01698-w.