

НОВЫЙ РЕКОМБИНАНТНЫЙ ИНГИБИТОР РНКаз LORI ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ *IN VITRO*

Д. А. Сухов^{1,2,3}, И. В. Холощенко^{1,4}, Т. В. Петрова¹, Г. А. Романенко^{1,2}, М. Ю. Мышкин³, В. Ю. Кост³, Д. Ю. Трофимов¹, Н. Ю. Усман⁵✉, Е. В. Барсова^{3,5}

¹ ООО «ДНК-Технология», Москва, Россия

² МИРЭА — Российский технологический университет, Москва, Россия

³ Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Москва, Россия

⁴ Московский государственный технический университет имени Н. Э. Баумана, Москва, Россия

⁵ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Ингибиторы РНКазы давно используют в биотехнологии и лабораторной диагностике. Целью работы было получить и охарактеризовать новый рекомбинантный ингибитор РНКаз LoRI. Полученный новый ингибитор рибонуклеаз LoRI представляет собой рекомбинантный белок массой 63 кДа, оптимизированный для высокопроизводительной экспрессии в *E. coli* и очистки с помощью металлохелатной аффинной хроматографии (IMAC). Продукт получен за счет N-концевого слияния полипептидной последовательности плацентарного ингибитора РНКаз мыши с тиоредаксиновым модулем. Целесообразность данной модификации с точки зрения структуры и функции белка подтверждена *in silico*. Выход очищенного растворимого рекомбинантного продукта в лабораторных условиях составил около 12 мг на 1 л экспрессионной бактериальной культуры. По активности *in vitro* продукт сопоставим с коммерческим аналогом или превосходит его. Кинетические данные соответствуют модели Лайнуивера–Берка.

Ключевые слова: ингибитор рибонуклеаз, тиоредаксин, металлохелатная аффинная хроматография (IMAC), модель Лайнуивера–Берка

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке ООО «ДНК-Технология».

Вклад авторов: Д. А. Сухов, Г. А. Романенко — инженерия, экспрессия и очистка белков; И. В. Холощенко, Т. В. Петрова — характеристика продукта, написание статьи; М. Ю. Мышкин — анализ структуры белка; В. Ю. Кост — дизайн исследования; Д. Ю. Трофимов — руководство проектом; Н. Ю. Усман — написание статьи; Е. В. Барсова — координация проекта, написание статьи.

✉ **Для корреспонденции:** Наталья Юрьевна Усман
ул. Островитянова, д. 1/1, г. Москва, 117997, Россия; n_usman@rambler.ru

Статья получена: 02.09.2024 **Статья принята к печати:** 09.10.2024 **Опубликована онлайн:** 28.10.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.043

LORI, A NEW RECOMBINANT RNase INHIBITOR FOR *IN VITRO* APPLICATIONS

Sukhov DA^{1,2,3}, Kholoshenko IV^{1,4}, Petrova TV¹, Romanenko GA^{1,2}, Myshkin MYu³, Kost VYu³, Trofimov DYu¹, Usman NYu⁵✉, Barsova EV^{3,5}

¹ DNA-Technology LLC, 117587, Moscow, Russia

² MIREA — Russian Technological University, Moscow, Russia

³ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

⁴ Bauman Moscow State Technical University, Moscow, Russia

⁵ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

The novel ribonuclease inhibitor LoRI is a 63 kDa recombinant protein optimized for high-throughput expression in *E. coli* and purification by metal chelate affinity chromatography (IMAC). The product was obtained by N-terminal fusion of mouse placental RNase inhibitor polypeptide to a thioredoxin module. Advantage of the engineering strategy in terms of protein structure and function was predicted *in silico*. Under laboratory settings, the yield of purified soluble recombinant product was about 12 mg per 1 L of expression bacterial culture. By RNase inhibition capacity *in vitro*, the product is comparable or superior to a commercial reference. The kinetic data comply with Lineweaver-Burk model.

Keywords: ribonuclease inhibitor, thioredoxin, immobilized metal chelate affinity chromatography, Lineweaver-Burk model

Funding: The study was funded by DNA-Technology LLC.

Author contribution: Sukhov DA, Romanenko GA — protein engineering, expression and purification; Kholoshenko IV, Petrova TV — product characterization, writing; Myshkin MYu — protein structure analysis; Kost VYu — study design; Trofimov DYu — project supervision; Usman NYu — writing; Barsova EV — project coordination, writing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Natalia Yu. Usman
Ostrovityanova 1/1, Moscow, 117997, Russia; n_usman@rambler.ru

Received: 02.09.2024 **Accepted:** 09.10.2024 **Published online:** 28.10.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.043

Особые белки, напрямую ингибирующие клеточные и внеклеточные рибонуклеазы (РНКазы), экспрессируются различными типами клеток, и их физиологический эффект является цитопротекторным [1]. В исследованиях кинетики ингибирования РНКаз такими белками было использовано несколько модельных мишеней, в частности РНКазы А и ангиогенин — секретлируемая РНКазы с низкой каталитической активностью, способствующая васкуляризации [2]. Эксперименты с ангиогенином и ингибитором плацентарной РНКазы выявили двухступенчатый механизм связывания, при котором быстро образуется свободный комплекс двух белков E-I,

постепенно стягивающийся в стабильный комплекс E-I* за счет медленной изомеризации ($k_2 = 97 \text{ c}^{-1}$) [3].

Ингибиторы РНКазы давно используют в биотехнологии и лабораторной диагностике. От эффективности ингибирования РНКаз зависит точность аналитических методов, основанных на обратной транскрипции, что подтверждается опытом диагностики коронавирусной инфекции в период пандемии SARS-CoV2 [4]. Масштабное производство рекомбинантных ингибиторов РНКазы в бактериальных системах осложняется редокс-чувствительностью этих белков [5], также ухудшающей стабильность при хранении.

Небольшие белки тиоредоксины (Trx), обнаруженные во всех живых клетках, участвуют в окислительно-восстановительном контроле благодаря способности удерживать электроны цистеиновых остатков в своем активном центре. Поглощая поток электронов от НАДФ-Н (катализируемый Trx-редуктазой), Trx стабилизируют активированные тиолатные группы в различных клеточных белках, тем самым защищая их нативное, активное состояние [6]. В белковой инженерии использование Trx в качестве ковалентно связанного шаперона может существенно улучшить выходы редокс-чувствительного рекомбинантного продукта, не ухудшая его свойств; общая выгода будет зависеть от особенностей экспрессионной системы и целевого продукта. Добавление Trx в качестве домена слияния может эффективно предупреждать неправильную трехмерную укладку целевого продукта в *E. coli* и его переход в неактивную, нерастворимую форму, накапливающуюся в виде тел включения. Транскрипты Trx *E. coli* хорошо транслируются в аутентичных средах, что обеспечивает высокий выход химерного продукта; при этом тиоредоксиновый модуль имеет прочную третичную структуру и может быть дополнительно модифицирован для металл-хелатной очистки [7].

Цель работы — получить и охарактеризовать новый рекомбинантный ингибитор РНКаз LoRI, сконструированный на основе полипептида плацентарного ингибитора РНКазы мыши, дополненного тиоредоксиновым модулем для повышения редокс-устойчивости и His-тэгом для высокотехнологичной очистки посредством металл-хелатной аффинной хроматографии (IMAC).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Белковая инженерия

Последовательность ингибитора РНКазы мыши из базы данных UniProt (*M. musculus* Rnh1; Uniprot Q91V17) была дополнена с N-конца тиоредоксиновым модулем (*E. coli* trxA; Uniprot P0AA25) через линкер, содержащий гексагистидиновый тэг (6H), сайт расщепления тромбином (LVPRGS), S-тэг (KETAAAKFERQH) и сайт расщепления энтерокиназой (DDDDK):

MNHKVMHNSDKIHLTDDSFDTDLKADGAILVDFWAEWCGPCMKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGHMHNNHHSSGLVPRGSGMKETAANKFERQHMDSPDLGTDDDDKAMSLDIQCEQLSDARWTELLPLIQQYEVRLDDCGLTEVRCRDISSAVQANPALTELSLRTNELGDGGVGLVQLQNPCTKIQKLSLQNCGLTEAGCGILPGMLRSLSTLRELHLNDNPMGDAGLKLCEGLQDPQCRLEKLLQLEYCNLTATSCEPLASVLRVKADFKELVLSNNDLHEPGVRILCQGLKDSACQLESCLKENCGITAAACKDLCDVWASKASLQELDLSSNKLGNAGIAALCPGLLLPCKLRLTLVWVWECDAEGCKDLORVLRKQSLKELSLASNELKDEGARLLCESLLEPGCQLESWLKTCSLTAASC PYFCSVLTKSRSLLELQMSNNPLGDEGVQELCKALSQPDTVLRLEWLGDGCDVTNSGCSLANVLLANRSLRELDSLNNCMGGPGVQLQLESCLKQPSCTLQQLVLDIYWTNEVEEQLRALAEERPSLRIS*

В исследовании *in silico* была использована модель для предсказания структуры белков AlphaFold 3 [8].

Молекулярное клонирование и бактериальная экспрессионная система

Кодон-оптимизацию для *E. coli* проводили с учетом частоты встречаемости кодонов у данного организма (NCBI GenBank, Codon Usage Database). Дополнительно корректировали последовательность гена вручную (без

использования специального программного обеспечения): в структуре минимизировали количество GC-богатых участков, сохраняя идентичность аминокислот. Синтез нуклеотидной последовательности *de novo* был выполнен методом сборки с частично перекрывающимися олигонуклеотидами и последующей амплификацией, в качестве услуги от компании Евроген (Москва, Россия), по авторскому протоколу (Фрадков А. Ф., 2021).

Кодон-оптимизированную ДНК-матрицу trxA-6H-Rnh1 клонировали в плазмиду pET32 (Pharmacia). Конструкцию верифицировали секвенированием по Сэнгеру. Для усиления экспрессии активного рекомбинантного белка в системе *E. coli* электрокомпетентные клетки *E. coli* BL21(DE3) (Novagen) трансформировали вспомогательной плазмидой pGro7 (Takara Bio), кодирующей шаперон GroEL-ES, как рекомендовано для рекомбинантных продуктов, богатых цистеином [9]. Полученный штамм-продуцент *E. coli* BL21(DE3)-pGro7 трансформировали конструкцией pET32-trxA-6H-Rnh1.

Бактериальная культура

Штамм-продуцент *BL21(DE3)-pGro7*, трансформированный конструкцией pET32-trxA-6H-Rnh1, выращивали в течение ночи при 37 °C в среде LB, содержащей NaCl (10 г/л), триптон (10 г/л) и дрожжевой экстракт (5 г/л), с добавлением ампициллина и хлорамфеникола в конечных концентрациях 100 мкг/мл и 30 мкг/мл соответственно. Затем культуру пересевали в свежую порцию среды LB с антибиотиками и инкубировали в шейкере (225 об/мин) при 37 °C в течение ночи. На следующий день предварительную культуру разбавляли средой LB, дополненной 2,5 мМ MgCl₂, и выращивали в биореакторе F25L (БИОТЕХНО; Россия) при 37 °C, 400 об./мин, 0,6 бар и 0,25 м³/ч до экспоненциальной фазы, определяемой как OD₆₀₀ = 0,5. Далее культуру индуцировали 1 г/л арабинозы для активации генов шаперонов и оставляли расти при 37 °C до OD₆₀₀ = 0,9. Затем температуру снижали до 20 °C, и культуру индуцировали изопропил β-d-1-тиогалактопиранозидом (IPTG) в конечной концентрации 1 мМ. Через 20 ч после индукции клетки собирали центрифугированием при 4500 об./мин в центрифуге Beckman Coulter Avanti™ J-15R, оснащенной ротором Beckman Coulter Avanti™ JS-4.750 (Beckman Coulter; США).

Выделение белка

Биомассу бактерий (50 г), экспрессирующих целевой рекомбинантный продукт, ресуспендировали в 10-кратном объеме буферного раствора Ni-A (500 мМ NaCl, 20 мМ Tris-Cl, 10 мМ имидазола (ImH), 0,1% Твин 20, 10 мМ 2-меркаптоэтанол (2-bme); pH 7,6) с 1 мМ PMSF. Лизис проводили с использованием ультразвукового гомогенизатора Q500 (Qsonica; США) при амплитуде 60, импульс вкл./выкл. 05/05 с в течение 10 мин на льду. Лизат осветляли в центрифуге HERMLE Z-36HK, оснащенной ротором HERMLE 12/035 (HERMLE Labortechnik GmbH; Германия), при 21 000 об./мин в течение 40 мин. Для осаждения растворимых белков очищенный лизат дополняли 15% w/w (NH₄)₂SO₄ и центрифугировали в HERMLE Z-36HK с ротором HERMLE 12/035 при 21 000 об./мин в течение 10 мин, затем дополняли 10% w/w (NH₄)₂SO₄ и центрифугировали в том же режиме. Осадок растворяли в пятикратном объеме Ni-A; раствор пропускали через полиэфирсульфонный мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм (Vacuum Filtration „rapid“-Filtermax; TPP; Швейцария).

Хроматография

Отфильтрованный продукт наносили на хроматографическую колонку (Cytiva; США) с наполнителем Ni-INDIGO (Cube Biotech GmbH; Германия). Объем колонки (CV, 20 мл) предварительно уравнивали 15 CV буфера Ni-A со скоростью 5 мл/мин, продукт наносили со скоростью 4 мл/мин. Загруженную колонку промывали 10 CV буфера Ni-A. Для элюирования использовали 5 CV 0,5X буфера Ni-B и 5 CV 1X буфера Ni-B (500 мМ NaCl, 20 мМ Tris-Cl, 500 мМ ImH, 0,1% Твин 20, 10 мМ 2-bme; pH 7,6) (рис. 1).

Элюат анализировали электрофорезом в 10%-м полиакриламидном геле с SDS (SDS-PAGE; рис. 2). Фракции, содержащие рекомбинантный целевой продукт, объединяли и диализовали в буфере Q-A (20 мМ Tris-Cl, 120 мМ KCl, 0,1% Твин 20, 10 мМ 2-bme; pH 7,2) при соотношении объемов 1 : 40 в течение 12 ч.

Для высокоэффективной анионообменной хроматографии II использовали колонку HiScale™ 16/10, заполненную Q Sepharose Fast Flow (CV = 10 мл; Cytiva, США), предварительно уравниваемую 15 CV буфера Q-A. Отфильтрованный диализат наносили на колонку со скоростью 3 мл/мин (рис. S1). После нанесения колонку промывали 10 CV буфера Q-A. Продукт элюировали 20 CV 0–15% буфера Q-B (20 мМ Tris-Cl, 1 М KCl, 0,1% Твин 20, 10 мМ 2-bme; pH 7,2).

Фракции, содержащие рекомбинантный продукт, определяли с помощью SDS-PAGE (7–26; рис. S2), объединяли и диализовали в буфере хранения (50 мМ KCl, 20 мМ Нерес-К, 0,1% Твин 20, 8 мМ дитиотреитол, 50% глицерин; pH 7,2), 1 : 40 по объему, в течение 12 ч. После диализа концентрацию и чистоту продукта оценивали спектрофотометрически по Бредфорду и методом SDS-PAGE с бычьим сывороточным альбумином в качестве стандарта (рис. S3). Полученный стоковый раствор продукта разбавляли буфером хранения (pH = 7,0) до 1 мг/мл (15,75 мкМ), аликвотировали и хранили при температуре –25...–18 °С.

Коммерческий эталон активности

Thermo Scientific™ RiboLock RNase Inhibitor 40 U/μL (#EO0381) был выбран в качестве эталона активности ингибитора РНКаз. Молекулярная масса белка (49,6 кДа)

указана в данных производителя. Концентрацию белка в поставляемых аликвотах, 1 мг/мл (20,16 мкМ), измеряли методом Бредфорда.

РНК-субстраты

В качестве субстратов были использованы два типа РНК-препаратов: 1) суммарная РНК человека, выделенная из клеточных культур HEK 293 с использованием реагента ExtractRNA (Евроген; Россия); 2) синтетическая одноцепочечная РНК (1,7 кб), полученная методом транскрипции *in vitro* с использованием набора HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis Kit (NEB #E2040S). Концентрации РНК измеряли в приборе NanoDrop™ 2000/2000с при коэффициентах поглощения 260/280 и 260/230; целостность РНК подтверждали электрофорезом.

Анализ стабильности РНК

Активность ингибитора РНКаз оценивали по степени деградации РНК в присутствии РНКазы А.

РНКазы Monarch® RNase A 20 мг/мл (NEB #T3018L) была выбрана в качестве модельной мишени для ингибирующего связывания. Рабочий раствор мишени получали разбавлением исходного раствора чистой деионизированной водой до 5 нг/мкл. Активность ингибирования РНКаз измеряется в единицах: одна единица соответствует количеству агента, способного снизить активность 5 нг РНКазы А до 50% от исходного значения.

Реакции проводили в объеме 10 мкл с 0,3–1,0 мкг суммарной РНК человека, 2,5–5,0 нг РНКазы А и 0,0–4,0 мкг ингибитора (LoRI или RiboLock) в буфере (10 мМ TrisHCl, 2 мМ MgCl₂, 10 мМ KCl, pH 8,0 при 25 °С). В ходе приготовления реакционных смесей ингибитор и РНКазу смешивали друг с другом и затем добавляли к РНК. Реакционные смеси инкубировали при различных условиях, базово при 37 °С в течение 30 мин, и анализировали электрофорезом в 1,2%-м агарозном геле. Каталитическое расщепление РНКазой А останавливали добавлением 2-bme до 0,5 М; образцы помещали на лед или замораживали. Перед электрофорезом образцы смешивали с буфером для нанесения (#PB020; Евроген, Россия). Для обратной транскрипции аликвоты отбирали до добавления 2-bme и немедленно анализировали.

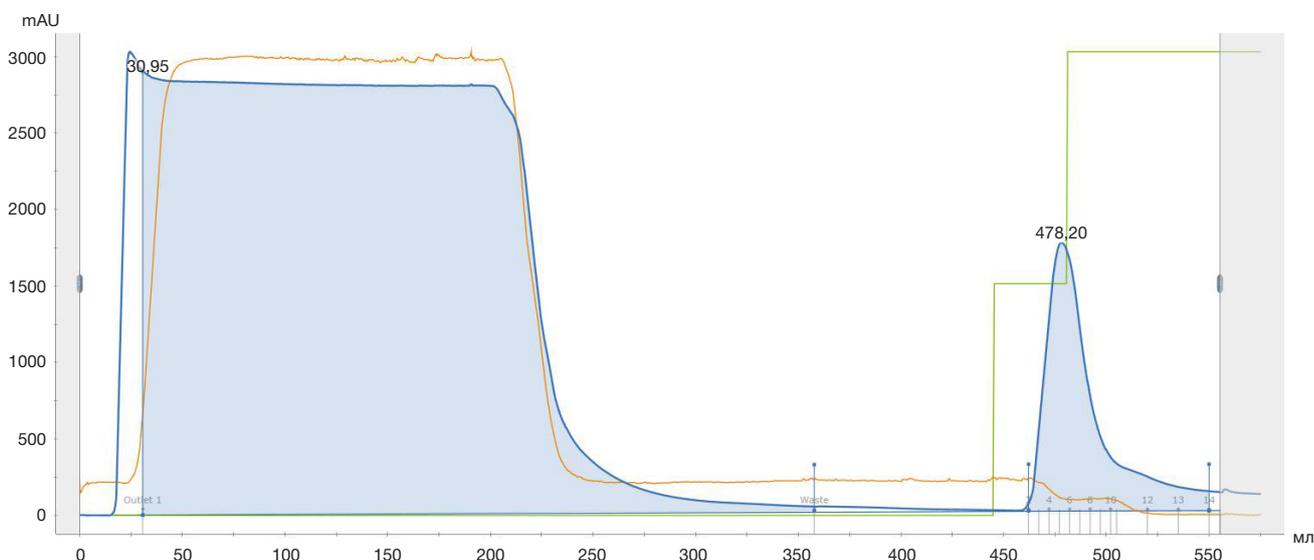


Рис. 1. Профиль хроматографии I (IMAC на Ni-INDIGO, Cube Biotech)

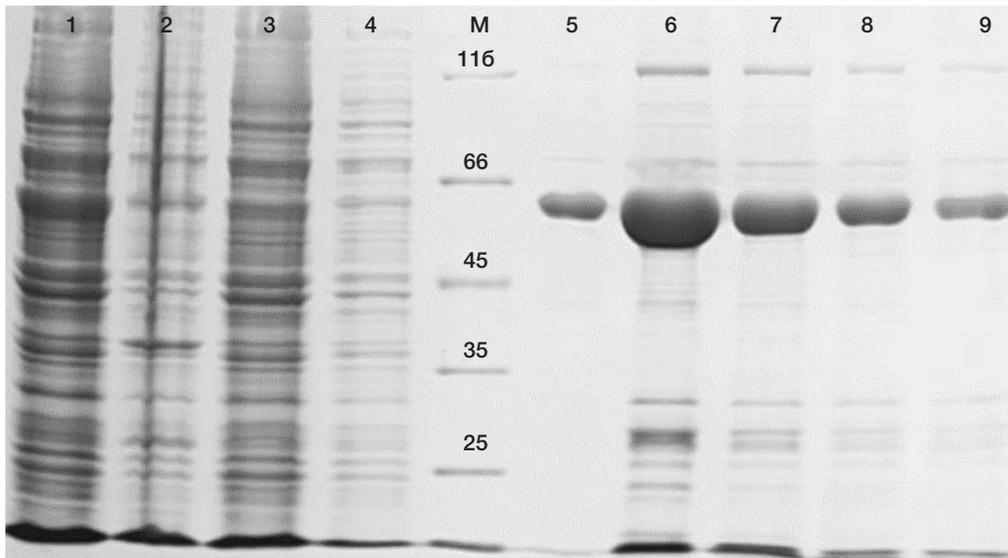


Рис. 2. Образцы хроматографии I, 10% SDS-PAGE. Дорожки: 1 — супернатант; 2 — нерастворимый остаток; 3 — проскок; 4 — промывка; M — маркер молекулярной массы белка со значениями полос, кДа; 5–9 — элюат, фракции 2, 5, 8, 10 и 11 соответственно

Флуориметрия

Для мониторинга стабильности РНК использовали флуоресцентный краситель Ribo488 (код продукта 11510; Lumiprobe, Россия). Кинетические кривые деградации РНК строили на микропланшетном считывателе CLARIOstar® Plus (BMG LABTECH; Германия) в режиме ферментативной кинетики AMC.

Для определения специфической активности ингибитора использовали краситель QuDye ssDNA (код продукта 17102; Lumiprobe, Россия). Реагент инкубировали с синтетической одноцепочечной РНК в присутствии 2,5 нг РНКазы А и 0,5–4,0 мкг ингибитора в объеме 40 мкл при 37 °С в течение 1 ч. Измерения проводили на микропланшетном считывателе Hidex Sense 425-311 (HIDEX; Финляндия).

В кинетическом исследовании использовали суммарную РНК человека и краситель QuDye ssDNA. Смеси готовили с использованием 10X реакционного буфера (300 мМ TrisHCl, 50 мМ MgCl₂, 500 мМ KCl; pH 7,9–8,0 при 25 °С) и варьирующих количеств РНК (150, 300, 600 нг) и LoRI (1, 0,9, 0,8 мкг — соответственно, 197, 177, 157 нМ в объеме реакции 80 мкл). Измерения проводили на CLARIOstar® Plus. Коммерческий эталон активности ингибитора РНКаз Thermo Fisher™ RiboLock использовали в конечной концентрации 252 нМ. В качестве мишени использовали РНКазу А (5 нг на реакцию); серия включала в себя контрольные постановки без РНКазы и без ингибитора.

ПЦР-тесты

Для количественного определения РНК методом ПЦР с обратной транскрипцией использовали наборы OneTube RT-PCR TaqMan (#SK031; Евроген, Россия) с праймерами, фланкирующими 130 п. н. фрагмент кДНК B2M, (5'-ATTATAACCCTACATTTTGTGC, 5'-TGTAAGCAGCATCATGGAGGTT, по 0,2 мкМ каждого) и зондом TaqMan, покрывающим стык экзонов для исключения неспецифического сигнала от остаточной геномной ДНК (5'-FAM-GCCGCATTTGGATTGGATGAATCCCA-BHQ1, 0,1 мкМ).

В тестах на (не)ингибирование ПЦР (ПЦР-нейтральность) использовали готовую смесь компонентов ПЦР 5X qPCRmix-HS PCR (#PK145; Евроген, Россия) с системой FAM-BHQ1 TaqMan. Фрагмент гена GAPDH размером 90 п. н.

был амплифицирован с 100 пг человеческой геномной ДНК в объеме реакции 25 мкл. Тесты проводили в приборе для ПЦР в реальном времени BioRad CFX 96 (BioRad; США) в пяти технических повторах.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Структурное исследование *in silico*

Немодифицированный ингибитор РНКаз Rnh1 содержит несколько структурных мотивов, обозначаемых как «повторы, богатые лейцином», и в активной форме напоминает подкову, высланную отрицательно заряженными остатками. На рис. 3А показан комплекс Rnh1 с РНКазой А (RibA) — небольшим белком из ~120 аминокислот, стабилизированным четырьмя дисульфидными связями. Во взаимодействии участвует С-концевая область ингибитора, в частности, позиции V405, V428, Y430, D431, Y433 и E436 [10]. Механизм ингибирования основан на стерическом затруднении доступа к активному сайту в RibA. N-концевая область ингибитора не участвует во взаимодействии и является благоприятным местом для точки слияния в химерном белке (тем более, С-концевое положение исключило бы Trx как *цис*-шаперонный модуль, который должен быть уже на месте к моменту синтеза Rnh1). Кроме того, согласно результатам моделирования, помещение His-тэга на С-конце Rnh1 препятствует ингибирующему связыванию (рис. 3В), что в итоге и определило стратегию инженерии.

На рис. 4А представлен химерный белок Trx::Rnh1 с двумя компактными функциональными модулями, предсказанными с высокой точностью, соединенными рыхлым неупорядоченным линкером. Моделирование комплекса Trx::Rnh1/RibA в AlphaFold3 демонстрирует сближение участков Trx и RibA при взаимодействии с РНКазой (рис. 4В).

Таким образом, модуль Trx может стабилизировать комплекс, «прижимая» RibA к ингибитору; данный эффект поддерживается отрицательным поверхностным потенциалом на Trx. Суммарный заряд модуля Trx оценивается как –4, тогда как молекула РНКазы имеет суммарный заряд +4 и электростатически положительную поверхность (для притяжения РНК), за исключением

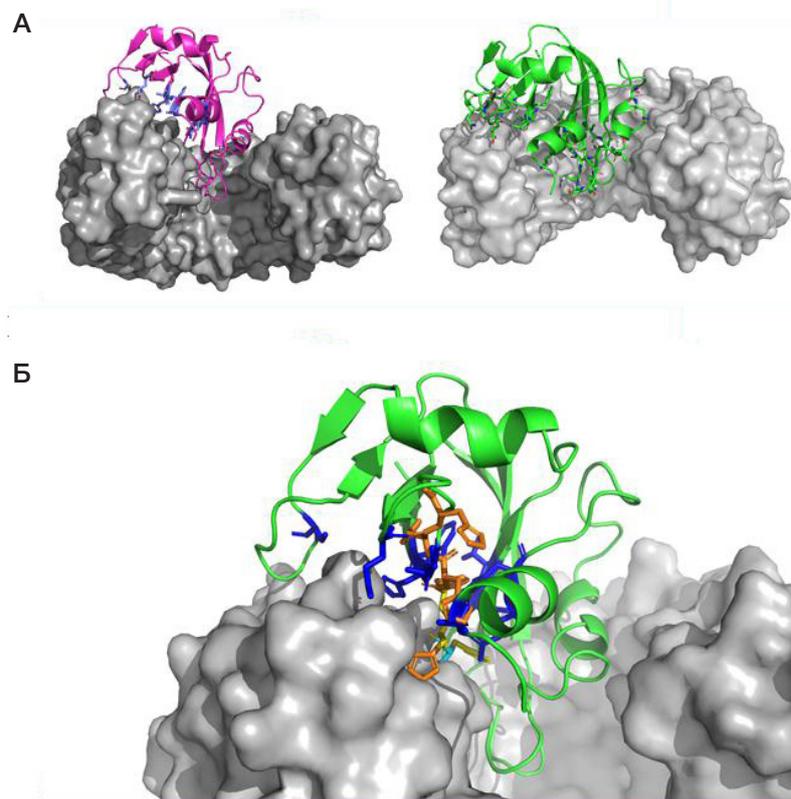


Рис. 3. Рибонуклеаза А (RibA) взаимодействует с коровым ингибитором Rnh1 (серая поверхность). **А.** Фермент контактирует с ингибитором своей лиганд-связывающей бороздкой; остатки, образующие активный центр, выделены цветом (PDB id: 1DFJ) [10]. **Б.** Увеличенное изображение С-конца Rnh1 в тесном контакте с остатками активного центра РНКазы (показано синим), стерически препятствующем связыванию РНК. С-концевой His-тэг (показано оранжевым) нарушает взаимодействие, «врезаясь» в RibA; наложение модели ингибитора с His-тэгом на С-конце и кристаллической структуры комплекса Rnh1/RibA в AlphaFold3 (PDB id: 1DFJ)

одного кластера отрицательно заряженных остатков. Помимо этого, Trx модуль может сам по себе действовать как фермент, размыкая доступные дисульфиды в молекуле рибонуклеазы, находящейся в комплексе с ингибитором, и тем самым нарушая ее структуру (рис. S4).

Выходы продукта

Добавление модуля Trx позволило повысить продукцию растворимого рекомбинантного белка в 3–5 раз по сравнению с немодифицированной последовательностью Rnh1. Выходы составили около 2,7–3 мг целевого белка на 1 г биомассы *E. coli*. После всех этапов очистки потери белка составили приблизительно 25–30%. Выход очищенного продукта в лабораторных условиях составил 2 мг на 1 г биомассы *E. coli* или около 12 мг на 1 л экспрессионной культуры.

Анализ стабильности РНК

Пилотные испытания с использованием 1 мкг суммарной РНК человека в сочетании с 5 нг РНКазы А и 1 мкг LoRI в реакционном объеме 10 мкл выявили превосходные защитные свойства продукта по отношению к РНК (рис. 5).

Эффективный температурный диапазон ингибирования определяли с использованием температурного градиента 40–57 °С, запрограммированного в термоблоке. В постановке использовали 1 мкг общей человеческой РНК, объединенной с 2,5 нг РНКазы А и 2 мкг LoRI в объеме реакции 10 мкл. Для сравнения идентично приготовленные смеси суммарной РНК с LoRI инкубировали в течение 30 мин в том же диапазоне фиксированных температур

без добавления РНКазы. После 30-минутной инкубации отбирали по 1 мкл для ПЦР-анализа целостности РНК, запускавшегося немедленно (рис. 6). Оставшиеся объемы реакций обрабатывали 2-bme и анализировали электрофорезом (рис. 7, рис. S5).

Как показало варьирование параметров реакции, LoRI эффективно защищает РНК от каталитического расщепления при температурах до 46,6 °С; дальнейшее увеличение температуры приводит к частичной деградации РНК (рис. S6–S14). При 54,1 °С электрофореграммы показывают диффузно распределенный материал, смещенный в область с низкой молекулярной массой (рис. 7, дорожка 4), в то время как Ct увеличивается на три цикла, что соответствует уменьшению эффективной концентрации матрицы размером 130 п. н. на один порядок величины (рис. 6). При 57,0 °С защитные свойства LoRI являются остаточными: электрофореграммы показывают полную деградацию образца РНК с ΔCt , достигающей семи циклов по сравнению с исходным значением.

ПЦР-нейтральность

Полученные данные указывают на отсутствие изменений в эффективности ПЦР в присутствии до 4,0 мкг LoRI в объеме реакции 25 мкл (рис. S15).

Анализ специфической активности

Калибровочная кривая для анализа показана на рис. S16. Учитывая диапазон линейного отклика 0,1–0,6 мкг, все измерения проводили с 1,0 мкг РНК для повышения точности графика кинетики ингибирования в сравнении

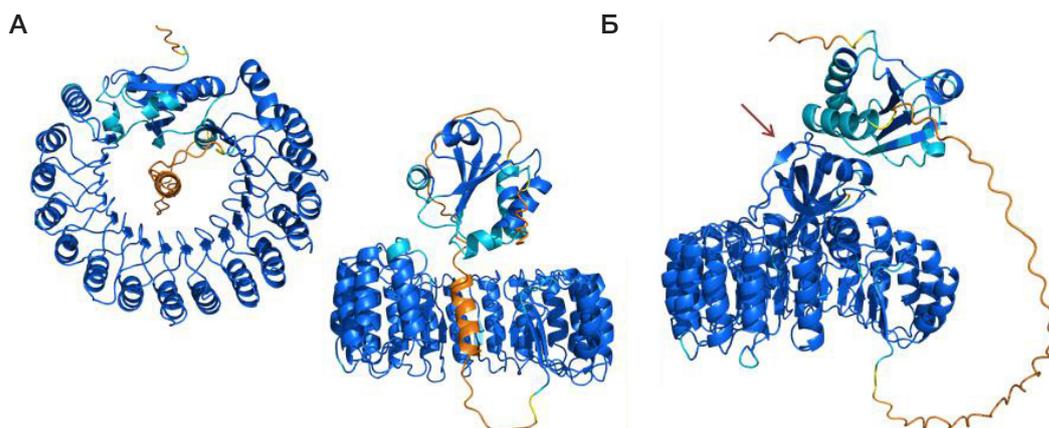


Рис. 4. Структурное моделирование химерного ингибитора Ttx::Rnh1 в AlphaFold3. **А.** Нативный и несвязанный продукт, состоящий из подковообразного корового ингибитора, соединенного линкером с компактным Ttx. Цветовая схема соответствует индексу достоверности модели из расчета на аминокислотный остаток: pLDDT > 90 (синий), моделирование с высокой степенью точности; pLDDT 70–90 (светло-голубой), высокая точность для основной цепи; pLDDT 50–70 (желтый) представление нестабильной структуры с низкой степенью точности; pLDDT < 50 (оранжевый), неупорядоченная область. Соответственно, функциональные модули Rnh1 и Ttx отображены с высокой точностью, тогда как представление линкера является условным: он может быть ориентирован и расположен по-разному, например, снаружи подковы. **Б.** Рибонуклеаза А (показана стрелкой), взаимодействующая с химерным ингибитором, выглядит зажатой между модулями Ttx и Rnh1

с коммерческим эталоном Thermo Fisher™ RiboLock (40 U/мкл ~ 1 мкг/мкл). Измерения флуоресценции для избытка ингибитора были приняты за 100%. На основании полученных данных установлено, что 1 мкг LoRI соответствует 50 U активности (рис. S17).

Сравнительное кинетическое исследование

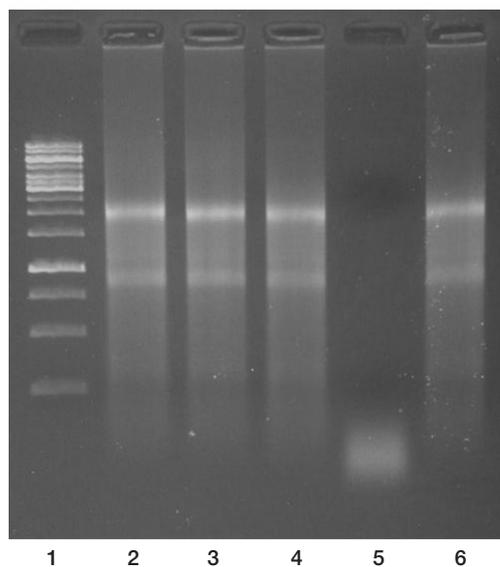
Графическая модель Лайнуивера–Берка, предполагающая смешанный механизм ингибирования РНКазы, представлена на рис. S18.

Значение константы ингибирования K_i , определенное методом графического представления, согласуется с расчетными данными для модели смешанного ингибирования [11]. Расчетная константа ингибирования

для LoRI по отношению к РНКазе А составила 0,825 пМ. Подход был далее применен аналогичным образом для расчета константы ингибирования Thermo Fisher™ RiboLock, составившей 1,199 пМ. Согласно полученным данным, LoRI превосходит коммерческий эталон по ингибирующей способности благодаря образованию более устойчивого комплекса с ферментом-мишенью.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследование было направлено на разработку ингибитора РНКазы для использования в прецизионной молекулярной медицине, в частности, в диагностических тест-системах на основе ПЦР с обратной транскрипцией и при подготовке библиотек для РНК-секвенирования. Предложенная



	2	3	4	5	6
РНКазы А	–	–	5 нг	5 нг	5 нг
LoRI		1 мкг	1 мкг	–	–
Thermo Scientific™ RiboLock	–	–	–	–	1 мкг

Рис. 5. Анализ стабильности РНК, пилотный эксперимент. Дорожка 1: маркер длин Thermo Scientific™ GeneRuler 1kb DNA Ladder. Дорожки 2–6: 1 мкг РНК + Обработка проведена при температуре 37 °С в течение 30 мин

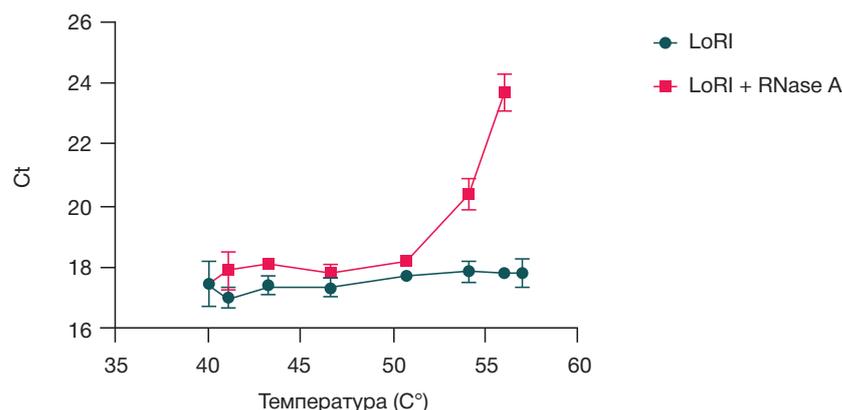


Рис. 6. Данные ПЦР с обратной транскрипцией для анализа стабильности РНК при 40–57 °С с использованием 1 мкг РНК + 2 мкг LoRI с РНКазой А (2,5 нг) или без нее; время обработки — 30 мин

стратегия линейного добавления тиоредоксинового модуля в сочетании с His-тэгом оказалась успешной. Продукт предназначен для широкого спектра исследовательских и диагностических приложений.

Растущий спрос на эффективные ингибиторы РНКаз молекулярно-биологического уровня качества связан с текущим интересом к РНК как ключевому носителю информации в молекулярной медицине и связанной с ней медицинской биотехнологии. Плацентарный ингибитор РНКаз Rnh1 — идеальный прототип агента, обеспечивающего сохранность РНК, выделенной из клеточных культур или тканей. Основным препятствием для его промышленного производства является редокс-чувствительность: этот богатый лейциновыми повторами белок содержит около 30 остатков цистеина на молекулу. В нативном ингибиторе все цистеины должны сохранять восстановленную форму в виде SH-групп и не вступать в образование дисульфидных связей внутри молекулы [12]. Пространственная укладка рекомбинантного немодифицированного полипептида Rnh1 в *E. coli* может быть нарушена в силу особенностей окислительно-восстановительной среды, субоптимальных параметров синтеза и отсутствия аутентичных шаперонов. Неправильно фолдированный рекомбинантный белок имеет тенденцию к необратимой секвестрации в тела включения. Был успешно экспрессирован ген ингибитора

РНКаз свиньи в *E. coli* с использованием промотора *trp* и минимальной питательной среды. После аффинной хроматографии с иммобилизованной РНКазой А выходы составили ~10 мг очищенного активного продукта на 1 л культуры [13]. Еще одной исторической альтернативой стало выделение ингибитора из тканей животных; выходы составили ~6 мг ингибитора на 1 кг сырой печени с использованием аффинной хроматографии на колонках с иммобилизованной РНКазой и доочистки методом анионообменной хроматографии [14]. В настоящее время аффинная хроматография на РНКазе не используется из-за высокой себестоимости и рисков загрязнения конечного продукта (ингибитора) следами РНКазной активности.

ВЫВОДЫ

Использование модуля Trx в качестве внутримолекулярного шаперона в бактериальной системе экспрессии позволило получить высокие выходы рекомбинантного ингибитора рибонуклеаз на основе прототипа млекопитающих в растворимой активной форме после очистки с помощью ИМАС. Продукт демонстрирует превосходные свойства сохранения целостности препаратов РНК в широком диапазоне условий, актуальных для молекулярных исследований и лабораторной диагностики.

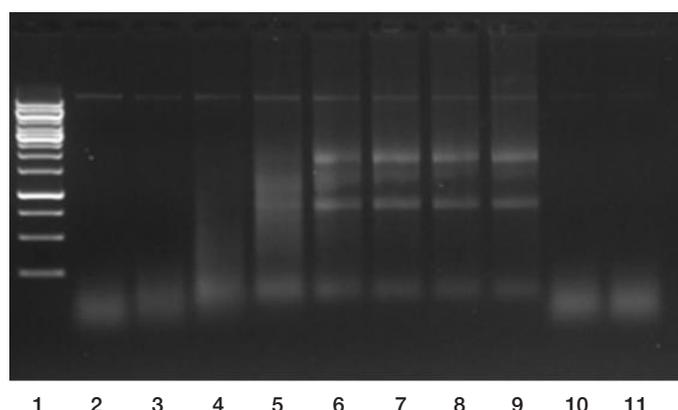


Рис. 7. Анализ стабильности РНК при 40–57 °С, время обработки — 30 мин. Дорожка 1: маркер длин Thermo Scientific™ GeneRuler 1kb DNA Ladder. Дорожки 2–9: 1 мкг РНК + 2,5 нг РНКазы А + 2 мкг LoRI при

2	3	4	5	6	7	8	9
57,0 °С	56,0 °С	54,1 °С	50,7 °С	46,6 °С	43,3 °С	41,1 °С	40,0 °С

Дорожки 10–11: 1 мкг РНК + 2,5 нг РНКазы А без добавления ингибитора, инкубация при 57,0 и 40,0 °С соответственно

Литература

1. Thomas SP, Kim E, Kim JS, Raines RT. Knockout of the ribonuclease inhibitor gene leaves human cells vulnerable to secretory ribonucleases. *Biochemistry*. 2016; 55 (46): 6359–62. DOI: 10.1021/acs.biochem.6b01003.
2. Abel RL, Haigis MC, Park C, Raines RT. Fluorescence assay for the binding of ribonuclease A to the ribonuclease inhibitor protein. *Anal Biochem*. 2002; 306 (1): 100–07. DOI: 10.1006/abio.2002.5678.
3. Lee FS, Shapiro R, Vallee BL. Tight-binding inhibition of angiogenin and ribonuclease A by placental ribonuclease inhibitor [published correction appears in *Biochemistry* 1989 Mar 7; 28 (5): 2354]. *Biochemistry*. 1989; 28 (1): 225–30. DOI: 10.1021/bi00427a031.
4. Nishibata Y, Koshimoto S, Ogaki K, Ishikawa E, Wada K, Yoshinari M, Ishizu A. RNase in the saliva can affect the detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 by real-time one-step polymerase chain reaction using saliva samples. *Pathol Res Pract*. 2021; 220: 153381. DOI: 10.1016/j.prp.2021.153381.
5. Šiurkus J, Neubauer P. Heterologous production of active ribonuclease inhibitor in *Escherichia coli* by redox state control and chaperonin coexpression. *Microb Cell Fact*. 2011; 10: 65. DOI: 10.1186/1475-2859-10-65.
6. Lee S, Kim SM, Lee RT. Thioredoxin and thioredoxin target proteins: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxid Redox Signal*. 2013; 18 (10): 1165–207. DOI: 10.1089/ars.2011.4322.
7. LaVallie ER, Lu Z, Diblasio-Smith EA, Collins-Racie LA, McCoy JM. Thioredoxin as a fusion partner for production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol*. 2000; 326: 322–40. DOI: 10.1016/s0076-6879(00)26063-1.
8. Abramson J, Adler J, Dunger J, et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*. 2024; 630: 493–500 DOI: 10.1038/s41586-024-07487-w.
9. Kyratsous CA, Silverstein SJ, DeLong CR, Panagiotidis CA. Chaperone-fusion expression plasmid vectors for improved solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Gene*. 2009; 440 (1–2): 9–15. DOI: 10.1016/j.gene.2009.03.011.
10. Kobe B, Deisenhofer J. A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. *Nature*. 1995; 374 (6518): 183–6. DOI: 10.1038/374183a0.
11. Dixon M, Webb EC. *Enzymes*. 2nd Edition. New York: Academic Press, 1964.
12. Fominaya JM, Hofsteenge J. Inactivation of ribonuclease inhibitor by thiol-disulfide exchange. *J Biol Chem*. 1992; 267 (34): 24655–60.
13. Klink TA, Vicentini AM, Hofsteenge J, Raines RT. High-level soluble production and characterization of porcine ribonuclease inhibitor. *Protein Expr Purif*. 2001; 22 (2): 174–9. DOI: 10.1006/prep.2001.1422.
14. Dickson KA, Haigis MC, Raines RT. Ribonuclease inhibitor: structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2005; 80: 349–74. DOI: 10.1016/S0079-6603(05)80009-1.

References

1. Thomas SP, Kim E, Kim JS, Raines RT. Knockout of the ribonuclease inhibitor gene leaves human cells vulnerable to secretory ribonucleases. *Biochemistry*. 2016; 55 (46): 6359–62. DOI: 10.1021/acs.biochem.6b01003.
2. Abel RL, Haigis MC, Park C, Raines RT. Fluorescence assay for the binding of ribonuclease A to the ribonuclease inhibitor protein. *Anal Biochem*. 2002; 306 (1): 100–07. DOI: 10.1006/abio.2002.5678.
3. Lee FS, Shapiro R, Vallee BL. Tight-binding inhibition of angiogenin and ribonuclease A by placental ribonuclease inhibitor [published correction appears in *Biochemistry* 1989 Mar 7; 28 (5): 2354]. *Biochemistry*. 1989; 28 (1): 225–30. DOI: 10.1021/bi00427a031.
4. Nishibata Y, Koshimoto S, Ogaki K, Ishikawa E, Wada K, Yoshinari M, Ishizu A. RNase in the saliva can affect the detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 by real-time one-step polymerase chain reaction using saliva samples. *Pathol Res Pract*. 2021; 220: 153381. DOI: 10.1016/j.prp.2021.153381.
5. Šiurkus J, Neubauer P. Heterologous production of active ribonuclease inhibitor in *Escherichia coli* by redox state control and chaperonin coexpression. *Microb Cell Fact*. 2011; 10: 65. DOI: 10.1186/1475-2859-10-65.
6. Lee S, Kim SM, Lee RT. Thioredoxin and thioredoxin target proteins: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxid Redox Signal*. 2013; 18 (10): 1165–207. DOI: 10.1089/ars.2011.4322.
7. LaVallie ER, Lu Z, Diblasio-Smith EA, Collins-Racie LA, McCoy JM. Thioredoxin as a fusion partner for production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol*. 2000; 326: 322–40. DOI: 10.1016/s0076-6879(00)26063-1.
8. Abramson J, Adler J, Dunger J, et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*. 2024; 630: 493–500 DOI: 10.1038/s41586-024-07487-w.
9. Kyratsous CA, Silverstein SJ, DeLong CR, Panagiotidis CA. Chaperone-fusion expression plasmid vectors for improved solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Gene*. 2009; 440 (1–2): 9–15. DOI: 10.1016/j.gene.2009.03.011.
10. Kobe B, Deisenhofer J. A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. *Nature*. 1995; 374 (6518): 183–6. DOI: 10.1038/374183a0.
11. Dixon M, Webb EC. *Enzymes*. 2nd Edition. New York: Academic Press, 1964.
12. Fominaya JM, Hofsteenge J. Inactivation of ribonuclease inhibitor by thiol-disulfide exchange. *J Biol Chem*. 1992; 267 (34): 24655–60.
13. Klink TA, Vicentini AM, Hofsteenge J, Raines RT. High-level soluble production and characterization of porcine ribonuclease inhibitor. *Protein Expr Purif*. 2001; 22 (2): 174–9. DOI: 10.1006/prep.2001.1422.
14. Dickson KA, Haigis MC, Raines RT. Ribonuclease inhibitor: structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2005; 80: 349–74. DOI: 10.1016/S0079-6603(05)80009-1.