

Ренатурация рекомбинантных белков

Т.В.Фёдоров, Т.В.Решетняк, Е.А.Панферцев, С.Ф.Бикетов

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора,
Оболенск, Российская Федерация

Основной проблемой получения рекомбинантных белков является восстановление их нативного состояния на конечном этапе биотехнологической цепи выделения целевого продукта. В работе рассматриваются общие принципы формирования активной структуры молекулы белка, обобщены методы ренатурации белков и факторы, влияющие на эффективность рефолдинга.

Ключевые слова: ренатурация, рефолдинг, рекомбинантные белки

Для цитирования: Фёдоров Т.В., Решетняк Т.В., Панферцев Е.А., Бикетов С.Ф. Ренатурация рекомбинантных белков. Бактериология. 2019; 4(4): 19–28. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-4-19-28

Renaturation of recombinant proteins

T.V.Fedorov, T.V.Reshetnyak, E.A.Panfertsev, S.F.Biketov

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор,
Obolensk, Russian Federation

The main problem of obtaining recombinant proteins is the recovery of their native state at the final stage of the biotechnological chain of isolation of the target product. The paper discusses the general principles of the formation of the active structure of a protein molecule, summarizes methods for protein renaturation and factors affecting the effectiveness of refolding.

Keywords: renaturation, refolding, recombinant proteins

For citation: Fedorov T.V., Reshetnyak T.V., Panfertsev E.A., Biketov S.F. Renaturation of recombinant proteins. Bacteriology. 2019; 4(4): 19–28. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-4-19-28

Метод экспрессии клонированных генов в бактериальных, дрожжевых и клеточных культурах насекомых и млекопитающих позволяет заменить труднодоступные натуральные биологически активные белки и широко используется для получения рекомбинантных белков как для производства фармацевтических препаратов, так и в научных целях. Массивная продукция клетками рекомбинантных белков создает предпосылки для относительно быстрого, недорогого и легко масштабируемого производства, однако нередко на этапе очистки происходит значительная потеря целевого продукта. В качестве иллюстрации можно рассмотреть одну из самых распространенных технологий получения рекомбинантных белков – культивирование рекомбинантного микроорганизма *Escherichia coli* с внутриклеточным накоплением белкового продукта в виде телец включения (inclusion bodies). С одной стороны, процесс желательный, поскольку накопление белка в тельцах включения предохра-

няет его от протеолитической деградации, а клетку – от воздействия чужеродного белка на метаболизм. С другой стороны, это порождает необходимость высвобождения телец из клеток, отмывки от балласта, растворения через денатурацию с помощью мочевины (или другого хаотропного агента) и последующей ренатурации белка. Эффективность первых трех стадий процесса довольно высока и не приводит к значимым потерям как количества белка, так и его биологической активности. Основную же трудность вызывает стадия восстановления нативной структуры и активности, поэтому от успешного решения данной проблемы зависит и конечный выход, и качество целевого белка.

Синтез и фолдинг белка *in vivo*

Целью микробиологического синтеза часто является получение биологически активных белков эукариотического происхождения. У эукариот синтез белка – это многоэтап-

Для корреспонденции:

Фёдоров Тарас Владимирович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПИМБ

Телефон: (4967) 36-0003

E-mail: tfedorov@yandex.ru

Статья поступила 10.11.2019 г., принята к печати 20.12.2019 г.

For correspondence:

Taras V. Fedorov, PhD (Biology), researcher, department of immunobiochemistry of pathogenic microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation

Phone: (4967) 36-0003

E-mail: tfedorov@yandex.ru

The article was received 10.11.2019, accepted for publication 20.12.2019

ный регулируемый процесс, связанный с вовлечением множества сложнейших механизмов и путей их реализации.

На первых этапах биосинтеза белка в клетке при выходе полипептидной цепи из рибосом начинается так называемое котрансляционное сворачивание («фолдинг») белка, что видимо позволяет снизить барьер активации процесса через обход кинетических ловушек и повысить скорость ренатурации белков [1].

После синтеза на рибосомах белок претерпевает посттрансляционную модификацию и фолдинг, в результате приобретая необходимую для активности пространственную структуру. Помимо ряда специфических ферментов, для фолдинга синтезированного белка необходимы малые и большие шапероны. «Малые» шапероны – «белки теплового шока» – предотвращают агрегацию и протеолиз небольших белков, а «большие» шапероны, образуя «ячейку Анфинсена», способствуют фолдингу крупных многодоменных белков. Посттрансляционная модификация (фосфорилирование, ацетилирование, метилирование аминокислотных групп) и фолдинг у эукариот проходят в эндоплазматическом ретикулуме, где условия максимально благоприятствуют этим процессам. Дефектные белки подвергаются протеолизу там же либо в цитозоле под действием протеосом.

Фолдинг белка *in vitro*

Несмотря на сложные внутриклеточные процессы и высокие энергетические затраты клетки в ходе образования зрелого белка, процесс сворачивания белковой молекулы в зрелую структуру может с успехом проходить *in vitro* спонтанно, без участия каких-либо компонентов клеточной среды, поскольку основные затраты клетки по наработке нативного белка в условиях молекулярного краудинга [2] сводятся к регулированию его концентрации, устранению дефектных форм, а также к созданию соответствующего микроокружения, препятствующего взаимодействию белка с другими клеточными структурами.

При благоприятных условиях в ходе снижения концентрации денатурирующего агента в растворе денатурированного белка возможна самоорганизация белковой молекулы в нативную функциональную структуру. Происходит это через стадии образования стабильных и метастабильных интермедиатов, таких как «статистический клубок», «расплавленная и предрасплавленная глобула». Молекула нативного белка в растворе представляет собой относительно жесткую структуру, непроницаемую для молекул воды, окруженную гидратной оболочкой, и имеет как минимум 4 основные метастабильные состояния, или конформации.

1. Нативное состояние. Максимально упорядоченная сформированная конформация, обладающая всеми присущими данному белку свойствами, такими как биологическая активность, физико-химические характеристики.

2. Расплавленная глобула. В этой конформации белок имеет третичную, но более разупорядоченную структуру.

3. Предрасплавленная глобула – менее компактная структура, чем расплавленная глобула.

4. Форма статистического (гауссова) клубка [3, 4].

При переходе белка от нативного состояния к полностью денатурированному глобула увеличивает свой диаметр примерно на порядок [5]. Постепенная утрата третичной

структуры, экспонирование на поверхности молекулы гидрофобных участков увеличивает возможность ассоциации и агрегации белка. Первичная ассоциация белковых молекул происходит без утраты свойств, характерных для нативной структуры, и имеет обратимый характер. Однако из формы предрасплавленных олигомеров белковые ассоциаты способны переходить в амилоидоподобные структуры и агрегировать с частичной или полной потерей нативных свойств.

Максимальный выход продукта при производстве рекомбинантных белков обеспечивается использованием высококопийных плазмид, микроорганизмов-суперпродуцентов и оптимизацией условий их культивирования. Интенсивный синтез целевого белка приводит к его значительному накоплению в клетках продуцента – до 30% биомассы, что запускает агрегационный механизм защиты бактериальной клетки, приводящий к формированию «телец включения», состоящих как из частично денатурированных, так и нативных форм рекомбинантного белка [6, 7].

Тельца включения

Тельца включения представляют собой клеточные инкременты, видимые в световой микроскоп в поляризованном свете как опалесцирующие сферические или овоидные образования, располагающиеся в цитозоле клетки в центре или по полюсам, а иногда в виде внутриклеточных цепочек. Их размеры колеблются от 0,2 до 2,5 мкм, иногда занимая почти весь объем бактериальной клетки.

Образование телец включения – динамический процесс, при котором синтезированный белок может либо переходить в растворимую форму, либо накапливаться в виде инкрементов в зависимости от режима культивирования [8]. Было показано, что белковые агрегаты в тельцах включения представлены в виде амилоидоподобных структур, соответственно богатых содержанием бета-складчатых участков [9]. Помимо рекомбинантного белка в различных конформационных состояниях, тельца включения содержат также небольшие количества таких клеточных компонентов, как бактериальные мембраны, белки цитоплазмы, рибосомы, нуклеиновые кислоты.

Поскольку тельца включения являются наиболее массивными и плотными клеточными образованиями, они без особого труда могут быть выделены из клеток простым центрифугированием после клеточного лизиса. Лизис биомассы бактериальных клеток проводится разнообразными методами: замораживанием–оттаиванием, ультразвуковой дезинтеграцией, дезинтеграцией под давлением, под действием ферментов. Изолированные тельца включения в дальнейшем промывают растворами детергентов (Тритон X-100) для частичной очистки, в основном от небелкового поверхностного балласта, подготавливая тельца к солиubilизации.

При образовании в бактериальной клетке «неклассических» телец включения, сформированных белками в нативной форме, солиubilизацию проводят в неденатурирующих условиях. В некоторых случаях достаточно растворить тельца в буферном растворе, чтобы получить раствор нативного белка [10].

В других случаях необходимо введение солиubilизирующих агентов в умеренных концентрациях либо органических

растворителей, таких как *n*-пропанол, ДМСО или детергенты [11, 12].

Для солюбилизации «истинных» телец включения применяют довольно высокие концентрации денатурирующих агентов. К ним относятся мочевины и гуанидинхлорид (GdnHCl).

Мочевина оказывает более слабое воздействие на белок. Как правило, ее требуется в 2–2,5 раза больше, чем гуанидинхлорида, для достижения того же эффекта [13], и ее концентрация в растворе может достигать 9М. Мочевина взаимодействует с водой путем образования множественных водородных связей и находится в растворе преимущественно в виде гидратированных цепочек и кластеров, дополнительно образуя межмолекулярные ассоциаты в гидратной оболочке молекулы белка [14]. Взаимодействие мочевины с белковой глобулой происходит по гидрофильным зонам макромолекулы [15] и затрагивает в основном лабильные участки поверхности глобулы, не оказывая воздействия на вторичную структуру белка. При высоких концентрациях она выступает в роли космотропного агента [16].

В отличие от мочевины, GdnHCl является более сильным денатурантом, что связано с его ионной природой и способностью диссоциировать в растворе. Он связывается с неполярными участками поверхности глобулы, образованными остатками триптофана, тирозина и фенилаланина, за счет гидрофобных взаимодействий [17]. Одновременно GdnHCl образует водородные связи с водой и полярными функциональными группами белка, снижая способность глобулы к самостоятельной сборке и увеличивая склонность к гидратации полипептидной цепи [18]. При использовании в качестве денатуранта GdnHCl необходимо учитывать некоторые особенности его взаимодействия с белками. GdnHCl при небольших концентрациях может стабилизировать белки [19, 20] за счет того, что он снимает существующие напряжения, обусловленные электростатическим взаимодействием заряженных групп на его поверхности. Вместе с тем при более высоких концентрациях этот денатурант может оказывать на белки и агрегирующее действие [21]. Полагают, что денатурация белков под действием мочевины протекает с образованием интермедиатов, тогда как денатурация под действием GdnHCl – одностадийная [22].

При использовании высоких концентраций мочевины следует учитывать возможность ее спонтанного гидролиза до иона аммония и цианат-иона. Последний способен вступать в реакцию карбамилрования с аминокруппами белка, изменяя его свойства. Наиболее интенсивно этот процесс проходит при физиологических значениях pH буферных растворов (pH 7) и повышенной температуре, а также при длительном (несколько дней) хранении раствора мочевины [23].

Факторы, влияющие на эффективность ренатурации белка

Целостность белка, а также способность к восстановлению нативной конформации определяется его первичной структурой. Такие процессы в кодирующих генах, как мутации, делеции, рекомбинации, вставки и др., могут препятствовать формированию активной структуры белка и определяются, а также контролируются на стадии создания рекомбинантного продукта (молекулярный дизайн, подбор вектора, штамма продуцента, условий культивирования и др.).

Зависимость ренатурации от характера белка и многих параметров окружения затрудняет достижение воспроизводимости. Несмотря на достигнутое понимание принципов ренатурации, процесс поиска оптимального метода остается достаточно эмпирическим и сводится к подбору состава ренатурирующего буфера, физико-химических условий рефолдинга, поиску эффективной концентрации обрабатываемого белка и применению надлежащих биотехнологических и биохимических методов, соответствующих степени лабильности продукта и его уникальным свойствам.

К примеру, из общих соображений процесс ренатурации стараются вести при пониженной температуре, так как ее повышение теоретически приводит к дестабилизации структуры белка и экспонированию на поверхности гидрофобных участков молекул, что чревато их агрегацией. Однако установлено, что некоторые белки могут ренатурировать при температуре более 30°C [24].

Отметим основные факторы, требующие учета при проведении ренатурации, и наиболее распространенные методические приемы для предупреждения денатурации. К нарушению целостности белковой структуры может приводить процесс замораживания–оттаивания. При этом происходят такие явления, как перекристаллизация, образование поверхностей раздела между льдом и жидкостью, адсорбция и криоконцентрирование белков и солей буфера, что необходимо учитывать при хранении рекомбинантных белков [25].

Значимым фактором в случае некоторых белков является повышение в реакционной системе давления. Исследования по влиянию давления на структуру белков проведены еще в середине 1940-х гг. Было отмечено, что повышение давления может способствовать процессу ренатурации белков, причем повышение температуры в этом случае до 60–65°C положительно влияло на восстановление структуры белков, тогда как пониженные температуры, наоборот, отрицательно сказывались на процессе. Существенное влияние оказывал и pH буферного раствора. Вдали от изоэлектрической точки создавались оптимальные условия для рефолдинга белка при создании в системе давления.

Проводя солюбилизацию телец включения под давлением, достигающим 2,4 Кбар, при температуре –9°C в случае выделения рекомбинантного белка эндостатина была достигнута эффективная солюбилизация телец включения, а снижение давления до 0,4 Кбар с одновременным повышением температуры до 20°C способствовало эффективной ренатурации белка [26].

При рефолдинге белка стараются минимизировать количество солей, чтобы не препятствовать сопутствующим процессам предочистки, например ионообменной хроматографии. Также неоправданное увеличение концентрации солей может привести к экранированию зарядов на поверхности белка, уменьшая силы отталкивания между белковыми молекулами, что увеличивает склонность к агрегации [27].

Величина pH и природа буферного раствора влияют на общий заряд молекулы, степень ионизации поверхностных группировок, водородных связей, степень гидратированности, экспрессию на поверхности молекулы гидрофобных либо гидрофильных группировок, т.е. на факторы, определяющие равновесие между денатурированной формой, переходными состояниями и нативной структурой. Как из-

вестно, при значении рН буферного раствора, близком к изоэлектрической точке белка, происходит снижение биологической активности и склонности макромолекул к ассоциации и агрегации. Так, при различных значениях рН процесс агрегации бычьего сывороточного альбумина протекал различными путями в зависимости от рН раствора. При значениях рН, близких к pI белка и ниже, процесс идет по пути образования аморфных агрегатов, а в более щелочных условиях – с образованием амилоидоподобных фибрилл, образованных β -складчатыми структурами, либо смешанных структур, в зависимости от величины щелочного сдвига рН буферного раствора [28].

Поэтому при выборе значения рН раствора для ренатурации необходимо иметь данные о изоэлектрической точке, рН-профилях растворимости и биологической активности целевого белка.

Способствовать агрегации белка могут примеси, такие как нуклеиновые кислоты, белки продуцента. После предварительной промывки телец раствором, содержащим ПАВ (n-лаурилсаркозин, лаурил глутамат [29, 30]), и солюбилизации телец включения проводят предпочтительную солюбилизацию белка в денатурирующих условиях методами гель-фильтрации, ионообменной хроматографии и другими возможными методами, избавляясь от нежелательного балласта. Рекомендуется в денатурирующий раствор вводить хелатирующие агенты типа ЭДТА для устранения ионов двухвалентных металлов и ингибирования металлопротеаз, способствующих деградации белка в ходе последующей ренатурации.

Основные потери целевого белка при ренатурации происходят при его агрегировании. Гидрофобные, ионные, водородные, ковалентные межмолекулярные взаимодействия часто приводят к необратимой денатурации белка при его агрегировании. В связи с этим важную роль играет подбор оптимального соотношения белкового раствора и ренатурирующего буфера. Иногда оно достигает 1:100 и более. При этом немаловажную роль играет скорость и метод введения буфера для ренатурации в белковый раствор. Для склонных к агрегации белков рекомендуется максимальная скорость разбавления.

Введение в буферный раствор для ренатурации различных низкомолекулярных веществ может приводить к стабилизации нативной структуры белка. Так, использование в ходе очистки и ренатурации поверхностно-активных веществ препятствует образованию агрегатов, возникающих при межмолекулярном гидрофобном взаимодействии, стабилизируя нативную структуру белка.

Эффективным солюбилизующим агентом (помимо додецилсульфата натрия) является саркозил – сильный анионный детергент. Обычно для растворения телец включения достаточно 0,3%-го раствора саркозила. Примеси Тритона X-100, формирующего большие мицеллы, способствуют поглощению саркозила с образованием смешанных мицелл. Вследствие этого количество вводимого в раствор саркозила должно быть увеличено. Снижение концентрации саркозила до 0,01% приводит к диссоциации мицеллярного комплекса и формированию нативной конформации белка. Также, связываясь с гидрофобными участками белковой глобулы, низкие концентрации саркозила эффективно пре-

дотвращают ассоциацию и агрегацию белка. Таким образом, саркозил выступает в качестве «химического шаперона», а последующее освобождение белкового раствора от него возможно с помощью катионообменника.

В качестве катионного детергента для солюбилизации и рефолдинга белка показано использование хлорида цетилтриметиламмония [31, 32].

Использование ПАВ также возможно, однако они часто затрудняют дальнейшую очистку белка из-за склонности к мицеллообразованию [33]. Существует ряд других низкомолекулярных веществ-антиагрегантов (аргинин, пролин, циклодекстрин, полиэтиленгликоль) и стабилизаторов, в целом способствующих процессу фолдинга (аммония сульфат, магния хлорид, глицин, полиольные соединения, такие как глицерин, сорбитол) [34]. Например, применение в ренатурирующем растворе 20% глицерина позволило успешно выделить рекомбинантный белок *Mycobacterium tuberculosis* PPE17 [35].

Следует отметить аргинин и его производные, которые используют для подавления агрегации, а также межмолекулярных взаимодействий в ходе ренатурации белка и как стабилизатор белковой структуры при хранении белкового раствора [36, 37]. Пролин обладает криопротекторными, термостабилизирующими и антиагрегирующими свойствами [38].

Подбор протекторов и их количество индивидуально и может быть определено только экспериментальным путем.

Известно, что рефолдинг некоторых белков лучше идет *in vivo* в присутствии N-концевого пропептида и его добавление в ренатурирующую систему увеличивает выход нативного белка [39].

Прямое действие на процесс рефолдинга оказывают ферменты, катализирующие образование нативной структуры белка, а также шапероны [40–44].

Нативная структура множества белков поддерживается внутримолекулярными дисульфидными мостиками, образованными между остатками цистеина и цистина. Образование межмолекулярных дисульфидных связей приводит к накоплению в растворе олиго- и полимеров белка с последующей его агрегацией и преципитацией. Внутримолекулярные образования неправильно связанных дисульфидных групп приводят к нестабильности белковой молекулы. Наличие дитиотреитола, меркаптоэтанола в ренатурирующем буферном растворе позволяет предотвратить межмолекулярные сшивки и образование дефектных форм белка. Замыкание внутримолекулярных дисульфидных связей происходит под действием кислорода воздуха при снижении концентрации восстановителей. Переформирование дисульфидных мостиков проводят в буферном растворе, обладающем окислительно-восстановительным потенциалом, создаваемым за счет содержания окисленной и восстановленной форм глутатиона, а также парами: цистеин/цистин, цистеамин/цистамин, дитиотреитол/глутатион [45–47].

Методы ренатурации

Процесс ренатурации достигается решением нескольких последовательных задач:

- изменение условий белкового окружения;
- переконформация белковой структуры;
- стабилизация нативной формы белка.

В лабораторной практике применяют *метод диализа*. В ходе простого диализа происходит постепенное снижение концентрации денатуранта при неизменной концентрации белка. Процесс рефолдинга занимает длительное время, при котором частично ренатурированные белковые молекулы взаимодействуют своими гидрофобными участками, что нередко приводит к агрегации белка после снижения концентрации денатуранта до некоторого критического уровня. Эту проблему решают, применяя *ступенчатый диализ* [48–51].

Метод разведения основан на снижении концентрации денатурирующего агента путем многократного разведения белкового раствора ренатурирующим буфером. Достижимая малая концентрация белка позволяет минимизировать время рефолдинга, а также избежать агрегирования белковых молекул.

Для этого метода также применим *ступенчатый вариант*, когда снижение концентрации белка и денатурирующего агента производят дискретно. Это снижает количество используемого буферного раствора и повышает выход нативного материала [52].

Техника разведения предполагает несколько вариантов:

- прямое (струйное либо капельное) разведение солюбилизированного белка ренатурирующим буферным раствором. Этот вариант позволяет медленно снижать концентрацию денатуранта, способствуя созданию мягких условий для ренатурации. Остаточная концентрация денатуранта не дает белку агрегировать, хотя при достижении минимальной критической его (денатуранта) концентрации может возникнуть опасность агрегации белка, но, в то же время, увеличивающийся объем раствора препятствует этому процессу;
- реверсивное разведение, при котором белковый раствор вводится при перемешивании в буферный раствор для ренатурации [53];
- моментальное разведение предполагает быстрое введение белкового раствора в ренатурирующий буфер. При этом минимизируется риск агрегации белка, а также экономится время процесса;
- медленное (капельное) введение белка в ренатурирующий раствор способствует не только снижению агрегации белка, но и его фолдингу в максимально благоприятных условиях [54].

Метод температурного шока, или «скачка». Изменяя температуру раствора в ходе ренатурации, можно добиться эффективного выделения нативного продукта. В работе [23] были исследованы температурные условия ренатурации бычьей карбоангидразы. Применяя метод «температурного скачка», удалось увеличить выход активного фермента с 37% (ренатурация при 4°C) до 95%, быстро нагревая раствор до 36°C в течение 30 минут.

Метод ренатурации в щелочных условиях. В некоторых случаях использование буферных растворов с высоким значением (pH >12) при низкой концентрации денатурирующих веществ способствует более эффективному рефолдингу белка [55, 56].

Метод гель-фильтрации позволяет не только сменить буферный раствор, но и провести дополнительную очистку продукта от балласта [57–61]. У данного метода есть свои недостатки, такие как необходимость концентрировать рас-

твор перед нанесением на колонку, что может приводить к необратимой денатурации белка. Данный метод, как правило, продолжительный и проводится в основном на холоде.

Метод сорбции целевого белка на различные поверхности дает возможность устранить протеолитическую деградацию белка, распределить его молекулы, не допуская возникновения локального повышения концентрации и, соответственно, препятствуя его агрегации, а также требует минимума времени на его исполнение. Иммуобилизация на ионообменных носителях [62–65], адсорбционная, гидрофобная [66], обращеннофазовая [67, 68] и аффинная [69–71] хроматографии с успехом используются для эффективной ренатурации белка.

Рефолдинг в обратных мицеллах представляет собой процесс разобщения белковых молекул и ренатурацию в условиях внутренней, гидрофильной области мицеллы ПАВ, сформированной объединением полярных групп в среде неполярного вещества. Малое число агрегации приводит к формированию обратных мицелл меньшего размера, чем мицелл водных растворов ПАВ. Эффективность данного метода была продемонстрирована в процессе ренатурации бычьей панкреатической рибонуклеазы А в качестве модели. Денатурированная рибонуклеаза полностью восстанавливала активность внутри обращенных мицелл в течение 24 ч после добавления смеси восстановленного и окисленного глутатиона для повторного окисления дисульфидных связей [72].

Рефолдинг в водной двухфазной системе (ATPS – Aqueous Two-Phase Systems), например ПЭГ–фосфат, продемонстрирован на примере ренатурации лакказы, металлсодержащего фермента. Результаты экспериментов показали, что эффективность рефолдинга достигала 90%, а введение добавок, таких как L-цистеин, окисленная форма глутатиона, цистамин и ионы Cu^{+2} , улучшало этот процесс почти до 100% [73].

Наиболее оптимальным методом ренатурации и смены буферного раствора является *ультрафильтрация в тангенциальном потоке* (например, на полых волокнах). Метод легко масштабируется, имеется возможность контроля скорости изменения концентрации денатурирующих агентов, требует минимального количества времени по сравнению с другими методами, позволяет проводить ренатурацию в мягких условиях, а также концентрировать ренатурат до необходимой степени в конце процесса. Возможность использования реверсивного снятия слоя белка на ультрафильтрационной мембране способна свести к минимуму его потери в отличие от ультрафильтрации на ячейках.

Уменьшение концентрации денатуранта (мочевины) можно осуществлять *ферментативной деградацией* последней с помощью уреазы [74]. Метод позволяет проводить ренатурацию без изменения объема раствора.

Для лабораторных целей используется метод ренатурации с применением *иммуобилизованных на носителе шаперонинов*. Конечно, данный метод дорог для промышленного применения и используется только как модельная система или в ходе лабораторного выделения ценных в исследовательском отношении белков [75–79].

В лабораторной практике для выбора подходящего метода ренатурации применяется *microfluidic chips*, где измене-

ние концентрации денатуранта идет в изменяющемся ламинарном потоке. Коммерческие фирмы выпускают наборы, содержащие буферные растворы для ренатурации, включающие разнообразные по составу компоненты, для скрининга условий рефолдинга белков.

Контроль нативности белков

Для эффективного подбора ренатурирующих условий необходим ряд методов, позволяющих оценить степень нативности ренатурируемого продукта.

Основными характеристиками нативности белка являются его пространственная структура, характеризующаяся возможным наличием дисульфидных мостиков и количеством доменов, наличие биологической (антигенной, ферментативной и др.) активности, а также доля ди-, тримерных или других его форм.

Наиболее объективной оценкой степени нативности белка является определение удельной активности (для ферментов) или сорбционной (сорбирующей способности) белка, например для таких белков, как иммуноглобулины, альбумины, авидин, белок А. Расчет удельной активности возможен при достижении максимальной чистоты препарата, либо должно быть точно известно количество посторонних мешающих определению концентрации белка примесей. Сорбционные (сорбирующие) свойства белков оценивают с помощью аффинной, адсорбционной хроматографии, а степень связывания белок–субстрат эффективно оценивать методом поверхностного плазмонного резонанса, основанном на использовании полного внутреннего отражения электромагнитных волн от границы раздела двух сред.

В тех случаях, когда активной формой белка является его ди- или тримерная форма, с успехом используются такие методы, как ПЛАГ-электрофорез в неденатурирующих условиях, т.е. при отсутствии меркаптоэтанола либо стадии прогревания образца, а также гель-фильтрация, позволяющая оценить долю мономерной и других форм белка.

К методам определения степени нативности белковой структуры можно отнести определение наличия простетических групп, ионов металлов, входящих в активный центр многих ферментов, а также определение других специфических свойств различных белков. Спектр этих методов велик, как и разнообразие самих белковых структур.

Сохранение нативной структуры белка представляет сложную задачу, касающуюся не только биотехнологических, но и медицинских проблем. Агрегация белков сопровождается формированием в тканях человека и животных внутриклеточных нерастворимых амилоидов, прионов и других структур, вызывающих такие заболевания, как болезни Паркинсона, Альцгеймера, Хантингтона, прионные энцефалопатии, офтальмологические болезни. Поэтому задача восстановления биологически активных белков, изучения их структуры и функций остается чрезвычайно актуальной в процессах создания и разработки новых терапевтических препаратов.

Литература

- Фёдоров АН. Биосинтетическое сворачивание белков. Дисс. ... доктора биологических наук. М.: Рос. ун-т дружбы народов; 2009.
- Medalia O, Weber I, Frangakis AS, Nicastro D, Gerisch G, Baumeister W. Macromolecular architecture in eukaryotic cells visualized by cryoelectron tomography. *Science*. 2002 Nov 8;298(5596):1209-13. DOI: 10.1126/science.1076184
- Ptitsyn OB. Molten globule and protein folding. *Adv. Protein Chem.* 1995;47:83-229. DOI: 10.1016/s0065-3233(08)60546-x
- Uversky VN, Ptitsyn OB. Further evidence on the equilibrium "pre-molten globule state": four-state guanidinium chloride-induced unfolding of carbonic anhydrase B at low temperature. *J Mol Biol.* 1996;225(1):215-228.
- Uversky VN. Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics. *Protein Sci.* 2002;11(4):739-756.
- Ventura S, Villaverde A. Protein quality in bacterial inclusion bodies. *Trends Biotechnol.* 2006 Apr;24(4):179-85. DOI: 10.1016/j.tibtech.2006.02.007
- Wu W, Xing L, Zhou B, Lin Z. Active protein aggregates induced by terminally attached self-assembling peptide ELK16 in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact.* 2011 Feb 15;10:9. DOI: 10.1186/1475-2859-10-9
- Carrio MM, Villaverde A. Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *J Biotechnol.* 2002 Jun 13;96(1):3-12. DOI: 10.1016/s0168-1656(02)00032-9
- Carrio M, Gonzalez-Montalban N, Vera A, Villaverde A, Ventura S. Amyloid-like properties of bacterial inclusion bodies. *J Mol Biol.* 2005 Apr 15;347(5):1025-37. DOI: 10.1016/j.jmb.2005.02.030
- Lu SC, Lin SC. Recovery of active N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase from inclusion bodies by solubilization with non-denaturing buffers. *Enzyme Microb Technol.* 2012 Jan 5;50(1):65-70. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2011.09.010
- Jevsevar S, Gaberc-Porekar V, Fonda I, Podobnik B, Grdadolnik J, Menart V. Production of nonclassical inclusion bodies from which correctly folded protein can be extracted. *Biotechnol Prog.* 2005 Mar-Apr;21(2):632-9. DOI: 10.1021/bp0497839
- Upadhyay AK, Singh A, Mukherjee KJ, Panda AK. Refolding and purification of recombinant L-asparaginase from inclusion bodies of *E. coli* into active tetrameric protein. *Front Microbiol.* 2014 Sep 15;5:486. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00486
- Hédoux A, Krenzlin S, Paccou L. Influence of urea and guanidine hydrochloride on lysozyme stability and thermal denaturation; a correlation between activity, protein dynamics and conformational changes. *Phys Chem Chem Phys.* 2010 Oct 28;12(40):13189-96. DOI: 10.1039/c0cp00602e
- Soper AK, Castner EW, Luzar A. Impact of urea on water structure: a clue to its properties as a denaturant? *Biophys Chem.* 2003 Sep;105(2-3):649-66. DOI: 10.1016/s0301-4622(03)00095-4
- Bennion BJ, Daggett V. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Apr 29;100(9):5142-7. DOI: 10.1073/pnas.0930122100
- Фенелонов ВБ, Пармон ВН. Введение в физическую химию формирования текстуры гетерогенных катализаторов. Промышленный катализ в лекциях. М.: Калвис; 2005, 132 с.
- Mason PE, Neilson GW, Enderby JE, et al. The structure of aqueous guanidinium chloride solutions. *J Am Chem Soc.* 2004;126:11462-70.
- Миляева ОЮ. Динамические поверхностные свойства растворов комплексов белков и полиэлектролитов. Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук. СПб., 2015, 140 с.
- Monera OD, Kay CM, Hodges RS. Protein denaturation with guanidine hydrochloride or urea provides a different estimate of stability depending on the contributions of electrostatic interactions. *Protein Sci.* 1994;3:1984-1991.
- Bhuyan AK. Protein stabilization by urea and guanidine hydrochloride. *Biochemistry.* 2002;41:13386-13394. DOI: 10.1021/bi020371n
- Кузнецова ИМ. Механизмы возникновения и свойства промежуточных, неправильносвернутых и агрегированных форм белков. Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук. СПб., 2006, 303 с.

22. Muzammil S, Kumar Y, Tayyab S. Anion-induced stabilization of human serum albumin prevents the formation of intermediate during urea denaturation. *Proteins*. 2000 Jul 1;40(1):29-38.
23. Практическая химия белка. Под ред. А.Дарбре. М.: Мир; 1989, 623 с.
24. Xie Y, Wetlaufer DB. Control of aggregation in protein folding: the temperature-leap tactic. *Protein Sci*. 1996;5:517-23.
25. Strambini GB, Connelly M. Protein stability in ice. *Biophys J*. 2007 Mar 15; 92(6):2131-8. DOI: 10.1529/biophysj.106.099531
26. Chura-Chambi RM, Cordeiro Y, Malavasi NV, Lemke LS, Rodrigues D, Morganti L. An analysis of the factors that affect the dissociation of inclusion bodies and the refolding of endostatin under high pressure. *Process Biochem*. 2013;48:250-259.
27. Olsen SN, Andersen KB, Randolph TW, Carpenter JF, Westh P. Role of electrostatic repulsion on colloidal stability of *Bacillus halmapalus* alpha-amylase. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Jul;1794(7):1058-65. DOI: 10.1016/j.bbapap.2009.02.010
28. Vetri V, D'Amico M, Fodera V, Leone M, Ponzoni A, Sberveglieri G, Militello V. Bovine Serum Albumin protofibril-like aggregates formation: Solo but not simple mechanism. *Arch Biochem Biophys*. 2011 Apr 1;508(1):13-24. DOI: 10.1016/j.abb.2011.01.024
29. Burgess RR. Purification of overproduced *Escherichia coli* RNA polymerase sigma factors by solubilizing inclusion bodies and refolding from Sarkosyl. *Methods Enzymol*. 1996;273:145-9. DOI: 10.1016/s0076-6879(96)73014-8
30. Kudou M, Ejima D, Sato H, Yumioka R, Arakawa T, Tsumoto K. Refolding singlechain antibody (scFv) using lauroyl-L-glutamate as a solubilization detergent and arginine as a refolding additive. *Protein Expr Purif*. 2011 May;77(1):68-74. DOI: 10.1016/j.pep.2010.12.007
31. Puri NK, Crivelli E, Cardamone M, Fiddes R, Bertolini J, Ninham B, Brandon MR. Solubilization of growth hormone and other recombinant proteins from *E. coli* inclusion bodies by using a cationic surfactant. *Biochem J*. 1992;285:871-9.
32. Song J. Insight into insoluble proteins with pure water. *FEBS Lett*. 2009 Mar 18;583(6):953-9. DOI: 10.1016/j.febslet.2009.02.022
33. Santos SF, Zanette D, Fischer H, Itri R. A systematic study of bovine serum albumin (BSA) and sodium dodecyl sulfate (SDS) interactions by surface tension and small angle X-ray scattering. *J Colloid Interface Sci*. 2003 Jun 15;262(2): 400-8.
34. Susan Mir Najd Gerami, Safar Farajnia, Feridoun Mahboudi. Co-solute assistance in refolding of recombinant proteins. *African Journal of Biotechnology*. 2011; 10(53):10811-16.
35. Najaf A, Tafaghod M, Sankian M, et al. Cloning, Expression, and Refolding of PPE17 Protein of *Mycobacterium tuberculosis* as a Promising Vaccine Candidate. *Iran J Med Sci*. 2019;44(1).
36. Creighton TE. Folding of proteins adsorbed reversibly to ion-exchange resins. *UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, New Series*. New York, 1986, Vol. 39, pp. 249-257.
37. Suttner J, Dyr JE, Hamsikova E, Novak J, Vonka V. Procedure for refolding and purification of recombinant proteins from *Escherichia coli* inclusion bodies using a strong anion exchanger. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 1994 Jun 3;656(1): 123-6.
38. Kweon DH, Lee DH, Han NS, Seo JH. Solid-phase refolding of cyclodextrin glycosyltransferase adsorbed on cation-exchange resin. *Biotechnol Prog*. 2004 Jan-Feb;20(1):277-83. DOI: 10.1021/bp0341895
39. Серкина АВ, Шевелев АВ, Честухина ГГ. Структура и функции предшественников бактериальных протеиназ. *Биоорганическая химия*. 2001;27(5): 323-346.
40. Tsumoto K, Umetsu M, Yamada H, Ito T, Misawa S, Kumagai I. Immobilized oxidoreductase as an additive for refolding inclusion bodies: application to antibody fragments. *Protein Eng*. 2003 Jul;16(7):535-41. DOI: 10.1093/protein/gzg064
41. Altamirano MM, Golbik R, Zahn R, Buckle AM, Fersht AR. Refolding chromatography with immobilized mini-chaperones. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:3576-3578.
42. Dong XY, Yang H, Sun Y. Lysozyme refolding with immobilized GroEL column chromatography. *J Chromatogr A*. 2000 May 12;878(2):197-204. DOI: 10.1016/s0021-9673(00)00297-1
43. Dong XY, Yang H, Gan YR, Bai S, Sun Y. Reactivation of denatured lysozyme with immobilized molecular chaperones GroE. 2000;16:169-172.
44. Altamirano MM, Garcia C, Possani LD, Fersht AR. Oxidative refolding chromatography: folding of the scorpion toxin Cn5. *Nat Biotechnol*. 1999;17:187-191.
45. Lilie H, Schwarz E, Rudolph R. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr Opin Biotechnol* 1998; 9:497-501.
46. De Bernardez Clark E. Refolding of recombinant proteins. *Curr Opin Biotechnol*. 1998;9:157-163.
47. De Bernardez Clark E, Schwarz E, Rudolph R. Inhibition of aggregation side reactions during *in vitro* protein folding. *Methods Enzymol*. 1999;309:217-236.
48. Tsumoto K, Ejima D, Kumagai I, Arakawa T. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr. Purif*. 2003;28:1-8.
49. Umetsu M, Tsumoto K, Hara M, Ashish K, Goda S, Adschiri T, Kumagai I. How additives influence the refolding of immunoglobulin-folded proteins in a stepwise dialysis system. Spectroscopic evidence for highly efficient refolding of a single-chain Fv fragment. *J Biol Chem*. 2003 Mar 14;278(11):8979-87. DOI: 10.1074/jbc.M212247200
50. Ho JGS, Middelberg APJ, Ramage P, Kocher HP. The likelihood of aggregation during protein renaturation can be assessed using the second virial coefficient. *Protein Sci*. 2003;12:708-716.
51. Liu W, Cellmer T, Keerl D, Prausnitz JM, Blanch HW. Interactions of lysozyme in guanidinium chloride solutions from static and dynamic light-scattering measurements. *Biotechnol Bioeng*. 2005 May 20;90(4):482-90. DOI: 10.1002/bit.20442
52. Patra AK, Mukhopadhyay R, Mukhija R, Krishnan A, Garg LC, Panda AK. Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 2000 Mar; 18(2):182-92.
53. Gribskov M, Burgess RR. Overexpression and purification of the sigma70 subunit of *E. coli* RNA polymerase. *Gene*. 1983;26:109-118.
54. Singh SM, Panda AK. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body protein. *J Biosci Bioeng*. 2005 Apr;99(4):303-10. DOI: 10.1263/jbb.99.303
55. Singh SM, Panda AK. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng*. 2005 Apr;99(4):303-10. DOI: 10.1263/jbb.99.303
56. Khan RH, Rao KB, Eshwari AN, Totey SM, Panda AK. Solubilization of recombinant ovine growth hormone with retention of native-like secondary structure and its refolding from the inclusion bodies of *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog*. 1998 Sep-Oct;14(5):722-8. DOI: 10.1021/bp980071q
57. Werner MH, Clore GM, Gronenborn AM, Kondoh A, Fisher RJ. Refolding proteins by gel filtration chromatography. *FEBS Lett*. 1994;345:125-130.
58. Batas B, Chaudhuri JB. Protein refolding at high concentration using size-exclusion chromatography. *Biotechnol Bioeng*. 1996 Apr 5;50(1):16-23.
59. Schlegl R, Iberer G, Machold C, Necina R, Jungbauer A. Continuous matrix-assisted refolding of proteins. *J Chromatogr A*. 2003;1009:119-132.
60. Gu Z, Weidenhaupt M, Ivanova N, Pavlov M, Xu B, Su ZG, et al. Chromatographic methods for the isolation of, and refolding of proteins from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Protein Expr Purif*. 2002 Jun;25(1):174-9. DOI: 10.1006/prep.2002.1624
61. Lanckriet H, Middelberg AP. Continuous chromatographic protein refolding. *J Chromatogr A*. 2004 Jan 2;1022(1-2):103-13. DOI: 10.1016/j.chroma.2003.09.013
62. Lange C, Rudolph R. Suppression of protein aggregation by L-arginine. *Curr Pharm Biotechnol*. 2009 Jun;10(4):408-14. DOI: 10.2174/138920109788488851
63. Tsumoto K, Umetsu M, Kumagai I, Ejima D, Philo J, Arakawa T. Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification. *Biotechnol Prog*. 2004;20:1301-1308.

64. Troitzsch RZ, Tulip PR, Crain J, Martyna GJ. A simplified model of local structure in aqueous proline amino acid revealed by first-principles molecular dynamics simulations. *Biophys J*. 2008;95:5014-5020.
65. Li M, Zhang G, Su Z. Dual gradient ion-exchange chromatography improved refolding yield of lysozyme. *J Chromatogr A*. 2002;959:113-120.
66. Wang S, Gao D, Wang W, Zhang N, Wang L. Refolding with Simultaneous Purification of Recombinant Core Streptavidin Using Single-step High-performance Hydrophobic Interaction Chromatography. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2019;24:658-665.
67. Ling M, Xu X, Shi F, Zhu Y, Long N. Refolding of recombinant human interleukin-2 by reverse phase high performance liquid chromatography. *Chin J Biotechnol*. 1997;13:180-183.
68. Li M, Su Z-G, Janson J-C. *In vitro* protein refolding by chromatographic procedures. *Protein Exp. and Purif*. 2003;33:1-10.
69. Glynou K, Ioannou PC, Christopoulos TK. One-step purification and refolding of recombinant photoprotein aequorin by immobilized metal-ion affinity chromatography. *Protein Expr Purif*. 2003 Feb;27(2):384-90. DOI: 10.1016/s1046-5928(02)00614-9
70. Yin SM, Zheng Y, Tien P. On-column purification and refolding of recombinant bovine prion protein: using its octarepeat sequences as a natural affinity tag. *Protein Expr Purif*. 2003;32:104-109.
71. Zahn R, von S.C, Wuthrich K. Human prion proteins expressed in *Escherichia coli* and purified by high-affinity column refolding. *FEBS Lett*. 1997;417:400-404.
72. Hagen AJ, Hatton TA, Wang DI. Protein refolding in reversed micelles. *Biotechnol Bioeng*. 2006;95(2):285-294.
73. Sánchez-Trasvina C, Mayolo-Deloisa K, González-Valdez J, Rito-Palomares M. Refolding of laccase from *Trametes versicolor* using aqueous two phase systems: Effect of different additives. *J Chromatogr A*. 2017 Jul 21;1507:25-31. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.05.023
74. Okada J, Maruyama T, Motomura K, Kuroki K, Maenaka K, Sakono M, et al. Enzyme-mediated protein refolding. *Chem Commun (Camb)*. 2009;46:7197-7199.
75. Tsumoto K, Umetsu M, Yamada H, Ito T, Misawa S, Kumagai I. Immobilized oxidoreductase as an additive for refolding inclusion bodies: application to antibody fragments. *Protein Eng*. 2003 Jul;16(7):535-41. DOI: 10.1093/protein/gzg064
76. Altamirano MM, Golbik R, Zahn R, Buckle AM, Fersht AR. Refolding chromatography with immobilized mini-chaperones. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 15; 94(8):3576-8. DOI: 10.1073/pnas.94.8.3576
77. Dong XY, Yang H, Sun Y. Lysozyme refolding with immobilized GroEL column chromatography. *J Chromatogr A*. 2000 May 12;878(2):197-204. DOI: 10.1016/s0021-9673(00)00297-1
78. Dong XY, Yang H, Gan YR, Bai S, Sun Y. Reactivation of denatured lysozyme with immobilized molecular chaperones GroE. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 2000;16:169-172.
79. Altamirano MM, Garcia C, Possani LD, Fersht AR. Oxidative refolding chromatography: folding of the scorpion toxin Cn5. *Nat Biotechnol*. 1999;17:187-191.
5. Uversky VN. Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics. *Protein Sci*. 2002;11(4):739-756.
6. Ventura S, Villaverde A. Protein quality in bacterial inclusion bodies. *Trends Biotechnol*. 2006 Apr;24(4):179-85. DOI: 10.1016/j.tibtech.2006.02.007
7. Wu W, Xing L, Zhou B, Lin Z. Active protein aggregates induced by terminally attached self-assembling peptide ELK16 in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*. 2011 Feb 15;10:9. doi: 10.1186/1475-2859-10-9
8. Carrio MM, Villaverde A. Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *J Biotechnol*. 2002 Jun 13;96(1):3-12. DOI: 10.1016/s0168-1656(02)00032-9
9. Carrio M, Gonzalez-Montalban N, Vera A, Villaverde A, Ventura S. Amyloid-like properties of bacterial inclusion bodies. *J Mol Biol*. 2005 Apr 15;347(5):1025-37. DOI: 10.1016/j.jmb.2005.02.030
10. Lu SC, Lin SC. Recovery of active N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase from inclusion bodies by solubilization with non-denaturing buffers. *Enzyme Microb Technol*. 2012 Jan 5;50(1):65-70. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2011.09.010
11. Jevsevar S, Gaberc-Porekar V, Fonda I, Podobnik B, Grdadolnik J, Menart V. Production of nonclassical inclusion bodies from which correctly folded protein can be extracted. *Biotechnol Prog*. 2005 Mar-Apr;21(2):632-9. DOI: 10.1021/bp0497839
12. Upadhyay AK, Singh A, Mukherjee KJ, Panda AK. Refolding and purification of recombinant L-asparaginase from inclusion bodies of *E. coli* into active tetrameric protein. *Front Microbiol*. 2014 Sep 15;5:486. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00486
13. Hédoux A, Krenzlin S, Paccou L. Influence of urea and guanidine hydrochloride on lysozyme stability and thermal denaturation; a correlation between activity, protein dynamics and conformational changes. *Phys Chem Chem Phys*. 2010 Oct 28; 12(40):13189-96. DOI: 10.1039/c0cp00602e
14. Soper AK, Castner EW, Luzar A. Impact of urea on water structure: a clue to its properties as a denaturant? *Biophys Chem*. 2003 Sep;105(2-3):649-66. DOI: 10.1016/s0301-4622(03)00095-4
15. Bennion BJ, Daggett V. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 29;100(9):5142-7. DOI: 10.1073/pnas.0930122100
16. Fenelonov VB, Parmon VN. Vvedenie v fizicheskuyu khimiyu formirovaniya tekstury geterogennykh katalizatorov. *Promyshlennyy kataliz v lektsiyakh*. Moscow: "Kalvis" Publ.; 2005, 132 p. (In Russian).
17. Mason PE, Neilson GW, Enderby JE, et al. The structure of aqueous guanidinium chloride solutions. *J Am Chem Soc*. 2004;126:11462-70.
18. Milyaeva OYu. Dinamicheskie poverkhnostnye svoystva rastvorov kompleksov belkov i polielektrolitov. *Dissertatsiya na soiskanie uchenoi stepeni kandidata khimicheskikh nauk*. St. Petersburg, 2015, 140 p. (In Russian).
19. Monera OD, Kay CM, Hodges RS. Protein denaturation with guanidine hydrochloride or urea provides a different estimate of stability depending on the contributions of electrostatic interactions. *Protein Sci*. 1994;3:1984-1991.
20. Bhuyan AK. Protein stabilization by urea and guanidine hydrochloride. *Biochemistry*. 2002;41:13386-13394. DOI: 10.1021/bi020371n
21. Kuznetsova IM. Mekhanizmy vozniknoveniya i svoystva promezhutochnykh, nepravil'nosvernutykh i agregirovannykh form belkov. *Diss*. St. Petersburg, 2006, 303 p. (In Russian).
22. Muzammil S, Kumar Y, Tayyab S. Anion-induced stabilization of human serum albumin prevents the formation of intermediate during urea denaturation. *Proteins*. 2000 Jul 1;40(1):29-38.
23. *Prakticheskaya khimiya belka*. Edited by A.Darbre. Moscow: "Mir" Publ.; 1989, 623 p. (In Russian).
24. Xie Y, Wetlaufer DB. Control of aggregation in protein folding: the temperature-leap tactic. *Protein Sci*. 1996;5:517-23.
25. Strambini GB, Connelli M. Protein stability in ice. *Biophys J*. 2007 Mar 15;92(6):2131-8. DOI: 10.1529/biophysj.106.099531

References

1. Fedorov AN. Biosinteticheskoe svorachivanie belkov. *Diss*. Moscow: RUDN University; 2009. (In Russian).
2. Medalia O, Weber I, Frangakis AS, Nicastro D, Gerisch G, Baumeister W. Macromolecular architecture in eukaryotic cells visualized by cryoelectron tomography. *Science*. 2002 Nov 8;298(5596):1209-13. DOI: 10.1126/science.1076184
3. Ptitsyn OB. Molten globule and protein folding. *Adv. Protein Chem*. 1995;47:83-229. DOI: 10.1016/s0065-3233(08)60546-x
4. Uversky VN, Ptitsyn OB. Further evidence on the equilibrium "pre-molten globule state": four-state guanidinium chloride-induced unfolding of carbonic anhydrase B at low temperature. *J Mol Biol*. 1996;225(1):215-228.

26. Chura-Chambi RM, Cordeiro Y, Malavasi NV, Lemke LS, Rodrigues D, Morganti L. An analysis of the factors that affect the dissociation of inclusion bodies and the refolding of endostatin under high pressure. *Process Biochem.* 2013;48: 250-259.
27. Olsen SN, Andersen KB, Randolph TW, Carpenter JF, Westh P. Role of electrostatic repulsion on colloidal stability of *Bacillus halmapalus* alpha-amylase. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Jul;1794(7):1058-65. DOI: 10.1016/j.bbapap.2009.02.010
28. Vetri V, D'Amico M, Fodera V, Leone M, Ponzone A, Sberveglieri G, Militello V. Bovine Serum Albumin protofibril-like aggregates formation: Solo but not simple mechanism. *Arch Biochem Biophys.* 2011 Apr 1;508(1):13-24. DOI: 10.1016/j.abb.2011.01.024
29. Burgess RR. Purification of overproduced *Escherichia coli* RNA polymerase sigma factors by solubilizing inclusion bodies and refolding from Sarkosyl. *Methods Enzymol.* 1996;273:145-9. DOI: 10.1016/s0076-6879(96)73014-8
30. Kudou M, Ejima D, Sato H, Yumioka R, Arakawa T, Tsumoto K. Refolding singlechain antibody (scFv) using lauroyl-L-glutamate as a solubilization detergent and arginine as a refolding additive. *Protein Expr Purif.* 2011 May;77(1):68-74. DOI: 10.1016/j.pep.2010.12.007
31. Puri NK, Crivelli E, Cardamone M, Fiddes R, Bertolini J, Ninham B, Brandon MR. Solubilization of growth hormone and other recombinant proteins from *E. coli* inclusion bodies by using a cationic surfactant. *Biochem J.* 1992;285:871-9.
32. Song J. Insight into insoluble proteins with pure water. *FEBS Lett.* 2009 Mar 18;583(6):953-9. DOI: 10.1016/j.febslet.2009.02.022
33. Santos SF, Zanette D, Fischer H, Itri R. A systematic study of bovine serum albumin (BSA) and sodium dodecyl sulfate (SDS) interactions by surface tension and small angle X-ray scattering. *J Colloid Interface Sci.* 2003 Jun 15;262(2): 400-8.
34. Susan Mir Najd Gerami, Safar Farajnia, Feridoun Mahboudi. Co-solute assistance in refolding of recombinant proteins. *African Journal of Biotechnology.* 2011;10(53):10811-16.
35. Najaf A, Tafaghod M, Sankian M, et al. Cloning, Expression, and Refolding of PPE17 Protein of *Mycobacterium tuberculosis* as a Promising Vaccine Candidate. *Iran J Med Sci.* 2019;44(1).
36. Creighton TE. Folding of proteins adsorbed reversibly to ion-exchange resins. *UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, New Series.* New York, 1986, Vol. 39, pp. 249-257.
37. Suttner J, Dyr JE, Hamsikova E, Novak J, Vonka V. Procedure for refolding and purification of recombinant proteins from *Escherichia coli* inclusion bodies using a strong anion exchanger. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1994 Jun 3; 656(1):123-6.
38. Kweon DH, Lee DH, Han NS, Seo JH. Solid-phase refolding of cyclodextrin glycosyltransferase adsorbed on cation-exchange resin. *Biotechnol Prog.* 2004 Jan-Feb;20(1):277-83. DOI: 10.1021/bp0341895
39. Serkina AV, Shevelev AB, Chestukhina GG. Structures and Functions of Precursors of Bacterial Proteases. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry.* 2001;27(5): 285-305. (In Russian).
40. Tsumoto K, Umetsu M, Yamada H, Ito T, Misawa S, Kumagai I. Immobilized oxidoreductase as an additive for refolding inclusion bodies: application to antibody fragments. *Protein Eng.* 2003 Jul;16(7):535-41. DOI: 10.1093/protein/gzg064
41. Altamirano MM, Golbik R, Zahn R, Buckle AM, Fersht AR. Refolding chromatography with immobilized mini-chaperones. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:3576-3578.
42. Dong XY, Yang H, Sun Y. Lysozyme refolding with immobilized GroEL column chromatography. *J Chromatogr A.* 2000 May 12;878(2):197-204. DOI: 10.1016/s0021-9673(00)00297-1
43. Dong XY, Yang H, Gan YR, Bai S, Sun Y. Reactivation of denatured lysozyme with immobilized molecular chaperones GroE. 2000;16:169-172.
44. Altamirano MM, Garcia C, Possani LD, Fersht AR. Oxidative refolding chromatography: folding of the scorpion toxin Cn5. *Nat Biotechnol.* 1999;17:187-191.
45. Lilie H, Schwarz E, Rudolph R. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr Opin Biotechnol* 1998; 9:497-501.
46. De Bernardez Clark E. Refolding of recombinant proteins. *Curr Opin Biotechnol.* 1998;9:157-163.
47. De Bernardez Clark E, Schwarz E, Rudolph R. Inhibition of aggregation side reactions during *in vitro* protein folding. *Methods Enzymol.* 1999;309:217-236.
48. Tsumoto K, Ejima D, Kumagai I, Arakawa T. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr. Purif.* 2003;28:1-8.
49. Umetsu M, Tsumoto K, Hara M, Ashish K, Goda S, Adschiri T, Kumagai I. How additives influence the refolding of immunoglobulin-folded proteins in a stepwise dialysis system. Spectroscopic evidence for highly efficient refolding of a single-chain Fv fragment. *J Biol Chem.* 2003 Mar 14;278(11):8979-87. DOI: 10.1074/jbc.M212247200
50. Ho JGS, Middelberg APJ, Ramage P, Kocher HP. The likelihood of aggregation during protein renaturation can be assessed using the second virial coefficient. *Protein Sci.* 2003;12:708-716.
51. Liu W, Cellmer T, Keerl D, Prausnitz JM, Blanch HW. Interactions of lysozyme in guanidinium chloride solutions from static and dynamic light-scattering measurements. *Biotechnol Bioeng.* 2005 May 20;90(4):482-90. DOI: 10.1002/bit.20442
52. Patra AK, Mukhopadhyay R, Mukhija R, Krishnan A, Garg LC, Panda AK. Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 2000 Mar;18(2):182-92.
53. Gribskov M, Burgess RR. Overexpression and purification of the sigma 70 subunit of *E. coli* RNA polymerase. *Gene.* 1983;26:109-118.
54. Singh SM, Panda AK. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body protein. *J Biosci Bioeng.* 2005 Apr;99(4):303-10. DOI: 10.1263/jbb.99.303
55. Singh SM, Panda AK. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng.* 2005 Apr;99(4):303-10. DOI: 10.1263/jbb.99.303
56. Khan RH, Rao KB, Eshwari AN, Totey SM, Panda AK. Solubilization of recombinant ovine growth hormone with retention of native-like secondary structure and its refolding from the inclusion bodies of *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog.* 1998 Sep-Oct;14(5):722-8. DOI: 10.1021/bp980071q
57. Werner MH, Clore GM, Gronenborn AM, Kondoh A, Fisher RJ. Refolding proteins by gel filtration chromatography. *FEBS Lett.* 1994;345:125-130.
58. Batas B, Chaudhuri JB. Protein refolding at high concentration using size-exclusion chromatography. *Biotechnol Bioeng.* 1996 Apr 5;50(1):16-23.
59. Schlegl R, Iberer G, Machold C, Necina R, Jungbauer A. Continuous matrix-assisted refolding of proteins. *J Chromatogr A.* 2003;1009:119-132.
60. Gu Z, Weidenhaupt M, Ivanova N, Pavlov M, Xu B, Su ZG, et al. Chromatographic methods for the isolation of, and refolding of proteins from, *Escherichia coli* inclusion bodies. *Protein Expr Purif.* 2002 Jun;25(1):174-9. DOI: 10.1006/prep.2002.1624
61. Lanckriet H, Middelberg AP. Continuous chromatographic protein refolding. *J Chromatogr A.* 2004 Jan 2;1022(1-2):103-13. DOI: 10.1016/j.chroma.2003.09.013
62. Lange C, Rudolph R. Suppression of protein aggregation by L-arginine. *Curr Pharm Biotechnol.* 2009 Jun;10(4):408-14. DOI: 10.2174/138920109788488851
63. Tsumoto K, Umetsu M, Kumagai I, Ejima D, Philo J, Arakawa T. Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification. *Biotechnol Prog.* 2004;20:1301-1308.
64. Troitzsch RZ, Tulip PR, Crain J, Martyna GJ. A simplified model of local structure in aqueous proline amino acid revealed by first-principles molecular dynamics simulations. *Biophys J.* 2008;95:5014-5020.
65. Li M, Zhang G, Su Z. Dual gradient ion-exchange chromatography improved refolding yield of lysozyme. *J Chromatogr A.* 2002;959:113-120.
66. Wang S, Gao D, Wang W, Zhang N, Wang L. Refolding with Simultaneous Purification of Recombinant Core Streptavidin Using Single-step High-perfor-

- mance Hydrophobic Interaction Chromatography. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2019;24:658-665.
67. Ling M, Xu X, Shi F, Zhu Y, Long N. Refolding of recombinant human interleukin-2 by reverse phase high performance liquid chromatography. *Chin J Biotechnol*. 1997;13:180-183.
68. Li M, Su Z-G, Janson J-C. *In vitro* protein refolding by chromatographic procedures. *Protein Exp. and Purif*. 2003;33:1-10.
69. Glynn K, Ioannou PC, Christopoulos TK. One-step purification and refolding of recombinant photoprotein aequorin by immobilized metal-ion affinity chromatography. *Protein Expr Purif*. 2003 Feb;27(2):384-90. DOI: 10.1016/s1046-5928(02)00614-9
70. Yin SM, Zheng Y, Tien P. On-column purification and refolding of recombinant bovine prion protein: using its octarepeat sequences as a natural affinity tag. *Protein Expr Purif*. 2003;32:104-109.
71. Zahn R, von S.C, Wuthrich K. Human prion proteins expressed in *Escherichia coli* and purified by high-affinity column refolding. *FEBS Lett*. 1997;417:400-404.
72. Hagen AJ, Hatton TA, Wang DI. Protein refolding in reversed micelles. *Biotechnol Bioeng*. 2006;95(2):285-294.
73. Sánchez-Trasvina C, Mayolo-Deloisa K, González-Valdez J, Rito-Palomares M. Refolding of laccase from *Trametes versicolor* using aqueous two phase systems: Effect of different additives. *J Chromatogr A*. 2017 Jul 21;1507:25-31. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.05.023
74. Okada J, Maruyama T, Motomura K, Kuroki K, Maenaka K, Sakono M, et al. Enzyme-mediated protein refolding. *Chem Commun (Camb)*. 2009;46:7197-7199.
75. Tsumoto K, Umetsu M, Yamada H, Ito T, Misawa S, Kumagai I. Immobilized oxidoreductase as an additive for refolding inclusion bodies: application to antibody fragments. *Protein Eng*. 2003 Jul;16(7):535-41. DOI: 10.1093/protein/gzg064
76. Altamirano MM, Golbik R, Zahn R, Buckle AM, Fersht AR. Refolding chromatography with immobilized mini-chaperones. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 15; 94(8):3576-8. DOI: 10.1073/pnas.94.8.3576
77. Dong XY, Yang H, Sun Y. Lysozyme refolding with immobilized GroEL column chromatography. *J Chromatogr A*. 2000 May 12;878(2):197-204. DOI: 10.1016/s0021-9673(00)00297-1
78. Dong XY, Yang H, Gan YR, Bai S, Sun Y. Reactivation of denatured lysozyme with immobilized molecular chaperones GroE. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 2000;16:169-172.
79. Altamirano MM, Garcia C, Possani LD, Fersht AR. Oxidative refolding chromatography: folding of the scorpion toxin Cn5. *Nat Biotechnol*. 1999;17:187-191.

Информация об авторах:

Решетняк Татьяна Викторовна, научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболensk, ФБУН ГНЦ ПМБ

Телефон: (4967) 36-0003
E-mail: tvr_obolensk@mail.ru

Панферцев Евгений Александрович, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболensk, ФБУН ГНЦ ПМБ

Телефон: (4967) 36-0003
E-mail: panfera62@mail.ru

Бикетов Сергей Фёдорович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболensk, ФБУН ГНЦ ПМБ

Телефон: (4967) 36-0003
E-mail: biketov@mail.ru

Information about authors:

Tatiana V. Reshetnyak, researcher, department of immunobiochemistry of pathogenic microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation

Phone: (4967) 36-0003
E-mail: tvr_obolensk@mail.ru

Evgeny A. Panfertsev, MD, PhD, senior researcher department of immunobiochemistry of pathogenic microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation

Phone: (4967) 36-0003
E-mail: panfera62@mail.ru

Sergey F. Biketov, PhD (Biology), leading researcher department of immunobiochemistry of pathogenic microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation

Phone: (4967) 36-0003
E-mail: biketov@mail.ru

НОВОСТИ НАУКИ**Антибиотикоустойчивость *Mycobacterium tuberculosis* на Ближнем востоке**

Опубликовано первое обзорное исследование в регионе Ближнего Востока с целью определения уровней устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам первой линии как среди новых, так и ранее пролеченных случаев.

За период с 1981 по 2014 гг. было собрано в общей сложности 480 статей об уровне устойчивости к антибиотикам *M. tuberculosis* в разных странах ближневосточного региона. Около 63 соответствующих статей были отобраны с применением критериев включения и исключения.

С помощью метаанализа были определены уровни моно-лекарственной устойчивости, любой лекарственной устойчивости и множественной лекарственной устойчивости (МЛУ-ТБ) как у новых, так и у ранее леченных больных туберкулезом, живущих в разных частях Ближнего Востока. Были также проанализированы другие аспекты, связанные с пациентами, резистентностью к противомикробным препаратам и методами, используемыми для оценки уровня резистентности.

Показано, что по сравнению со средним мировым показателем, показатель распространенности лекарственно-устойчивого ТБ, особенно МЛУ-ТБ, может увеличиваться на Ближнем Востоке. Следовательно, для предотвращения распространения изолятов, устойчивых к лекарствам, необходимо выявление первичной устойчивости к противотуберкулезным препаратам с использованием новых методов быстрой диагностики.

Khademi F. et al.

Middle East Mycobacterium tuberculosis Antibiotic Resistance: A Systematic Review and Meta-Analysis. Infection, Epidemiology and Medicine. 2017;3(1):25-35.