

Суперсинтез и очистка метионинаминопептидазы *Escherichia coli*

И. Ю. Славченко, Е. В. Борейко, Н. В. Воробей, Т. Г. Гавриш, Е. Н. Пехота, В. А. Кордюм

ПНИК «Биотехнолог»
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина
biotech@naverex.kiev.ua

Метионинаминопептидазы (МАР) играют важную роль в процессинге белка. Они избирательно удаляют N-концевой метионин у растущего полипептида как в эу-, так и прокариотических клетках. Однако при получении гетерологичных белков в бактериях дополнительный N-концевой метионин часто не отщепляется. Если рекомбинантные белки предназначены для клинического применения, то очень важно, чтобы конечный продукт был идентичен природному аналогу, иначе он может обладать антигенными свойствами. Поэтому дополнительный N-концевой остаток метионина желательно удалить, что можно осуществить in vitro обработкой рекомбинантного белка препаратом очищенной МАР E. coli. В настоящей работе разработан эффективный метод получения данного фермента с использованием системы экспрессии на основе РНК-полимеразы фага T7. Показано, что при культивировании продуцента МАР VL (pET-МАР) при температуре 37 °С целевой белок накапливается преимущественно в нерастворимой форме с выходом 17 % от суммарных клеточных белков. Однако если клетки штамма-продуцента инфицировать фагом лямбда, то полученный лизат будет содержать МАР в растворимой форме в значительно большем количестве, чем неинфицированные клетки. В результате оптимизации таких параметров, как оптическая плотность культуры при заражении и последующая температура культивирования продуцента, достигнут выход целевого белка в количестве, превышающем 40 % от растворимых белков, или 0,8 г/л. Рекомбинантный белок очищен с использованием ионообменной хроматографии до гомогенности более 90 %.

Введение. Метионинаминопептидазы (МАР) играют важную роль в процессинге белка. Они широко представлены у живущих организмов (см. обзор [1]) и удаляют N-концевой метионин у большинства растущих полипептидов на ранних стадиях белкового синтеза. МАР (ЕС 3.4.11.18), осуществляющая данный процесс в клетках *E. coli*, содержит 264 аминокислотных остатка и кодируется геном *map*. В 1987 году этот ген был клонирован и в экспериментах *in vitro* показано, что очищенная МАР *E. coli* удаляет N-концевой метионин у рекомбинантных интерлейкина-2 и рибина А [2].

Трансляция природных мРНК как у про-, так и эукариот начинается, как правило, с триплета AUG, кодирующего метионин. Иницирующий ко-

дон узнается специальными инициаторными тРНК-N-метионил-тРНК у эукариот и N-формил-метионил-тРНК у прокариот. В прокариотах (а также в митохондриях и хлоропластах) инициаторная метионил-тРНК является субстратом специальной формилтрансферазы, которая переносит формильную группу от формилтстрагидрофолата на аминогруппу остатка метионина, давая в результате N-формил-метионил-тРНК (исключением являются архебактерии, у которых N-метионил-тРНК не формилирована). Соответственно первым аминокислотным остатком синтезируемой полипептидной цепи в прокариотической рибосоме является формилметионин. В последующем в процессе элонгации формильный остаток, как правило, удаляется специальным ферментом — деформилазой. У части бактериальных и эукариотических белков метиони-

новый остаток отщепляется с помощью MAP, и аминокислота, следующая за метионином, становится N-концевой. Кроме того, большинство эукариотических и некоторые бактериальные белки синтезируются в виде предшественников, имеющих на N-конце лидерные (сигнальные) последовательности, которые отщепляются специальными эндопептидазами, и образующийся в результате этого белок также не имеет N-концевого метионина.

Как известно, рекомбинантные белки, синтезированные в клетках *E. coli*, часто (в отличие от природного аналога) имеют дополнительный N-концевой метионин, несмотря на наличие в бактериальных клетках эндогенного фермента для его удаления.

В экспериментах *in vivo* и *in vitro* показано, что вероятность отщепления N-концевого метионина определяется размером бокового радикала аминокислоты, следующей за ним [3, 4]. Однако на эффективность процессинга N-концевого метионина *in vivo* в *E. coli* могут влиять и другие факторы, такие как уровень экспрессии, растворимость, свойства целевого белка и т. п. Так, недавно показано, что процессинг N-концевого метионина одних и тех же белков (хлорамфениколацетилтрансферазы и гамма-интерферона человека) в разных штаммах *E. coli* может происходить с различной эффективностью [5]. При этом удаление N-концевого метионина было более эффективным в белке не гомо-, а гетерологичного происхождения.

В литературе описаны примеры, когда часть молекул рекомбинантного белка на N-конце содержит формилметионин. Например, количество таких молекул у гистона А *Methanothermobacter thermautotrophicus* в *E. coli*, составило около 40 % [6]. Однако удаление формильной группы является обязательным условием для последующего отщепления MAP N-концевого метионина [7]. Поэтому для эффективного деформилирования рекомбинантного белка можно осуществлять ко-экспрессию гена деформилазы с целевым геном [8].

Хотя наличие дополнительного N-концевого метионина, как правило, не приводит к изменению биологической активности белка по сравнению с природным аналогом, такой рекомбинантный белок при его использовании в качестве медицинского препарата может явиться причиной нежелательного иммунного ответа организма больного. Поэтому при получении эукариотических белков микробным синтезом исследователи используют различные подходы, обеспечивающие отсутствие дополнительного N-концевого метионина в рекомбинантных белках, одним из которых является его отщепление *in vitro*.

Однако для использования MAP в процессе крупномасштабного производства рекомбинантных белков данный фермент необходим в значительных количествах и с низкой себестоимостью, что делает актуальным разработку высокоэффективной технологии ее получения.

Целью настоящей работы является разработка технологии биосинтеза и очистки метионинаминопептидазы *E. coli*.

Материалы и методы. В работе использованы следующие штаммы *E. coli* и бактериофага лямбда: BL21 (DE3) (F^- , $ompT$, $hsdSB$ ($rB^- mB^- gal dcm$) (DE3), BL21 (pET-MAP), несущий плазмиду, в которую по *NdeI*-*BamHI*-сайтам встроена последовательность ДНК, кодирующая MAP. Плазида сконструирована на основе вектора *pET-24a(+)* («Novagen», США) и трансформирована в штамм *E. coli* BL21 (DE3). В качестве генетического маркера плазида содержит ген, обеспечивающий устойчивость несущих ее клеток к канамицину.

Для инфицирования продуцента использовали фаг λ cI857Q $^-R^-$ (*cI857Qam117Ram54*), источником которого служил лизогенный штамм *E. coli* K802 ($hsdR^+$, $hsdM^+$, gal^- , met^- , *SupE*) (λ cI857Q $^-R^-$). В качестве индикаторной культуры при титровании фага использовали штамм *E. coli* RLM1 (thr^- , leu^- , lac^- , $tonA$, *SupE*). Штаммы получены из коллекции культур ПНИК «Биотехнолог».

Среды. Бактериальные культуры выращивали в питательной среде ПВ40, содержащей: воду — 1 л, NaCl — 10 г, дрожжевой экстракт (USB) — 5 г, пептон (Винницкий мясокомбинат, Украина) — 40 г. На ее же основе готовили 1,5 %-ю и 0,5 %-ю агаризованные среды. При выращивании плазмидосодержащих клеток в среду добавляли канамицин до конечной концентрации 50 мкг/мл. Для индукции синтеза целевого продукта вносили раствор изопропил- β -D-тиогаляктозида (ИПТГ) до конечной концентрации 1 мМ. При использовании в биотехнологическом процессе бактериофага лямбда в жидкую среду добавляли 1 М раствор $MgSO_4$ из расчета 1 мл на 1 л среды и глицерин до конечной концентрации 2 %.

Получение фаголизата λ cI857Q $^-R^-$. Культивирование продуцента, электрофоретический анализ растворимой и нерастворимой фракций клеточных белков, суммарных белков плазмидосодержащих клеток и их фаголизатов осуществляли, как описано ранее [9].

Процентное содержание MAP *E. coli* в плазмидосодержащих клетках устанавливали денситометрированием соответствующих дорожек геля с помощью прибора Image Master («Pharmacia Biotech», Швеция). Для определения молекулярной массы

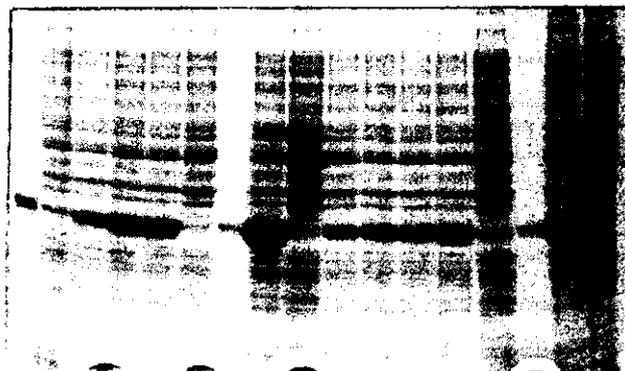
(м. м.) белков применяли программу Image Master ID Prime. В качестве стандарта для электрофореза использовали калибровочный набор белков («Fluka», Швейцария). Набор содержит смесь белков с м. м. 67, 45, 36, 24, 18,4 и 14 кДа. Для подсчета количества целевого белка в исследуемом образце применяли функцию Quantity Calibration программы Image Master ID Prime. Эта функция позволяет построить калибровочную кривую на основе полос стандартного белка (в данной работе — BSA, «Sigma», США) в известном количестве и использовать ее для определения количественного содержания целевого белка в анализируемой полосе. Затем, зная объем пробы исследуемого образца, нанесенного на ПААГ, пересчитать содержание MAP в самом образце.

Результаты и обсуждение. Уровень экспрессии гена MAP под контролем промотора фага T7 исследовали в клетках BL21 (pET-MAP) при следующих условиях ведения процесса. Клетки выращивали при температуре 37 °С до оптической плотности (ОП) 3,0, вносили в среду ИПТГ и продолжали культивирование штамма-продуцента при этой же температуре в течение 4 ч. В контрольный вариант индуктор не добавляли. Электрофоретический анализ плазмидосодержащих клеток показал наличие полипептида с ожидаемой м. м. 32 кДа, соответствующей MAP, содержание которого составляло около 17 % от суммарных белков клетки. В контрольном варианте рекомбинантный белок электрофоретически не определялся.

Анализ значений ОП, зарегистрированных при выращивании клеток штамма-продуцента при 37 °С, показал, что индукция целевого продукта не приводит к уменьшению выхода биомассы по сравнению с контролем (клетки BL21 (pET-MAP) без индукции). Это свидетельствует о том, что целевой продукт не оказывает негативного воздействия на бактериальную клетку даже при таком высоком его выходе.

В следующей серии экспериментов исследовали динамику накопления белка MAP при аналогичных условиях культивирования продуцента. Результаты электрофоретического анализа образцов, отобранных через 1, 2, 3, 4 и 18 ч после индукции синтеза целевого продукта, представлены на рис. 1 (дорожки 8—11, 13). Полученные данные показывают, что уже через 1 ч после добавления ИПТГ рекомбинантный белок присутствует в клетке в значительном количестве (около 13 % от суммарных белков клетки), которое увеличивается, достигая максимума на 18-й ч культивирования продуцента после индукции (рис. 1, дорожка 13).

Однако при высоком уровне биосинтеза реком-



M 1 2 3 4 5 M 6 7 8 9 10 11 12 M 13 14

Рис. 1. Электрофореграмма образцов клеток *E. coli* BL (pET-MAP), культивированных при температуре 21 (1—7) и 37 °С (8—14) после индукции в течение: 1, 8 — 1 ч; 2, 9 — 2 ч; 3, 10 — 3 ч; 4, 11 — 4 ч; 6, 13 — 18 ч; 5, 7, 12, 14 — контрольные образцы клеток без индукции к опытным образцам 4, 6, 11, 13 соответственно. На гель наносили образцы в количестве, эквивалентном 20 мкл клеточной суспензии. M — маркер MAP

бинантных белков в бактериальных клетках некоторые прокариотические белки, как и многие эукариотические, переходят в нерастворимое состояние, образуя так называемые тельца включений, содержащие рекомбинантные белки в денатурированном неактивном состоянии. Поэтому в полученных образцах (2, 3 и 4-й час после индукции) анализировали не только суммарные белки клетки, но и отдельно фракции растворимых и нерастворимых белков. Полученные данные показали (рис. 2, а), что целевой белок в данной системе биосинтеза и при данных условиях культивирования продуцента регистрируется во фракции нерастворимых белков клетки. Причем уже через 2 ч после добавления ИПТГ он преимущественно находится в клетке в нерастворимой форме, хотя в очень незначительном количестве его регистрировали и в растворимой фракции белков. Также установлено (рис. 2, а), что при дальнейшем культивировании клеток штамма-продуцента количество целевого белка увеличивается лишь во фракции нерастворимых белков.

Для получения растворимых рекомбинантных белков из телец включений приходится применять мощные денатурирующие агенты, такие как гуанидинхлорид, мочевины и детергенты. Солюбилизованный в таких жестких условиях целевой белок для восстановления нативной конформации требует

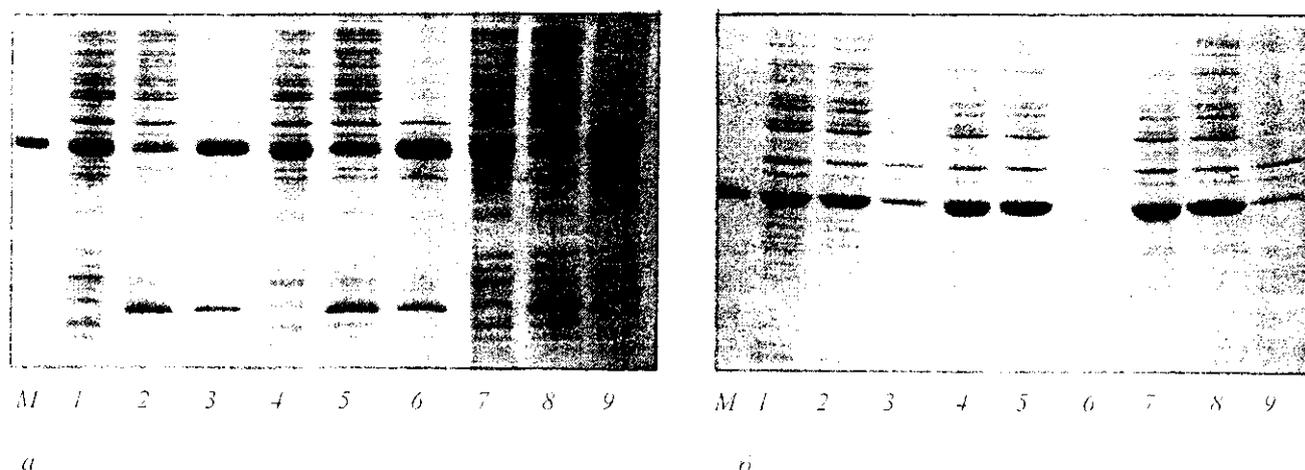


Рис. 2. Электрофореграмма образцов белковых фракций клеток *E. coli* BL21 (pET-MAP), культивированных после индукции при температуре 37 (а) и 21 (б) °С в течение: 1–3 — 2 ч; 4–6 — 3 ч; 7–9 — 4 ч; 1, 4, 7 — суммарные белки клетки; 2, 5, 8 — фракция растворимых белков; 3, 6, 9 — фракция нерастворимых белков. Нагель нанесили образцы в количестве, эквивалентном 20 мкл клеточной суспензии. М — маркер MAP

ренатурации. Поэтому при разработке технологии биосинтеза того или иного рекомбинантного белка исследователи стремятся создать условия, обеспечивающие накопление растворимого целевого продукта. Универсального метода, позволяющего получать рекомбинантные белки в растворимом виде, не существует. Однако в некоторых случаях этому способствует понижение температуры культивирования штаммов-продуцентов, несущих плазмиды с генами как гомо-, так и гетерологического происхождения [9, 10].

Поэтому нами было изучено влияние температуры культивирования клеток BL21 (pET-MAP) после индукции на выход целевого продукта и его растворимость. В данном эксперименте клетки после внесения в среду ИПТГ культивировали при 21 °С в течение 18 ч. Образцы для электрофоретического анализа отбирали через 1, 2, 3, 4 и 18 ч после индукции. Сравнительный анализ динамики синтеза MAP при температуре 21 и 37 °С показал (рис. 1), что при более низкой температуре через 1 ч после индукции его выход значительно меньше, чем при 37 °С. Однако на 2-й час после добавления ИПТГ количество белка в обоих вариантах сравнимо, а через 18 ч выход с единицы объема выше при культивировании продуцента при 21 °С (рис. 1, дорожки 6 и 13).

Как правило, при понижении температуры культивирования продуцента снижается и выход биомассы, и уровень синтеза целевого продукта, чего мы в данном эксперименте не наблюдали. Электрофоретический анализ растворимой и нера-

створимой фракций белков клетки показал, что MAP при культивировании продуцента при температуре 21 °С накапливается в клетке преимущественно в растворимом виде. Причем это имело место как через 2, 3 и 4 ч (рис. 2, б), так и 18 ч после индукции (данные не представлены).

Таким образом, используя систему экспрессии на основе РНК-полимеразы фага T7 и манипулируя температурным режимом культивирования продуцента, нам удалось добиться высокого уровня биосинтеза целевого белка MAP и накопления его в клетках в растворимом виде.

Для выделения рекомбинантного белка из бактериальных клеток их необходимо разрушить, для чего исследователи применяют как физические, так и химические способы, использование которых в крупномасштабном производстве связано с рядом технологических сложностей. Нами разработан способ биосинтеза белков с использованием бактериофага лямбда, обеспечивающий накопление целевого продукта непосредственно в культуральной среде, куда он высвобождается в результате лизиса инфицированных фагом клеток штамма-продуцента. Такой метод с успехом использован нами при разработке технологии биосинтеза ряда белков, например, интерферона альфа-2b и основного фактора роста фибробластов человека [9, 11]. В данной работе он применен также при создании технологии получения MAP. Выход целевого продукта в системах биосинтеза рекомбинантных белков с использованием бактериофага лямбда зависит как от эффективности синтеза целевого продукта, так и

от продуктивности литического развития фага, заканчивающегося лизисом клетки и накоплением целевого белка в культуральной среде. При этом эффективность подобных систем во многом определяется оптимальностью условий ведения процесса.

В представленной работе нами исследованы такие параметры ведения процесса, как значение ОП в момент инфицирования клеток — продуцента BL21 (pET-MAP) фагом λ cI857Q⁻R и температурный режим ведения процесса. Для этого культуру выращивали в условиях интенсивной аэрации при температуре 37 °С до заданной ОП, добавляли ИПТГ, инфицировали фагом с множественностью 5—10 корпускул на клетку и продолжали культивирование при 37, 28 или 21 °С. Через 18 ч отбирали образцы для электрофоретического анализа. Электрофореграмма одного из экспериментов представлена на рис. 3.

Электрофоретический анализ супернатантов фаголизатов клеток BL21 (pET-MAP) показал, что чем ниже температура культивирования продуцента после фаговой инфекции, тем выше количество целевого продукта (рис. 3). Однако выход растворимой MAP при температуре 37 °С также достаточно высокий (дорожки 2—4). Интересным является то, что он значительно выше, чем в плазмидосодержащих клетках, культивированных при 37 °С и не инфицированных фагом лямбда. В настоящей работе мы не исследовали природы данного явления. Однако можно сделать следующее предположение. Как известно, литическое развитие бактериофагов в бактериальных клетках, в частности, фага лямбда влияет на метаболизм клетки-хозяина, изменяя уровень синтеза РНК, ДНК и белков [12]. И хотя уровень синтеза большинства белков *E. coli* угнетается после фаговой инфекции, синтез некоторых — стимулируется. К таким белкам клетки-хозяина относятся шапероны DnaK и GroEL [13, 14], необходимые для репликации фаговой ДНК и морфогенеза. Эти молекулы в бактериальной клетке участвуют в процессе восстановления белков после термального шока, а также предотвращают агрегацию вновь синтезированных белков (см. обзор [15]). В ряде работ показано, что ко-экспрессия белков GroEL/GroES и/или DnaK/DnaJ способствует накоплению рекомбинантного белка в бактериальной клетке в растворимом виде [16—21]. Поэтому увеличенная концентрация данных шаперонов, повышенный синтез которых индуцируется фаговой инфекцией, и могла способствовать накоплению MAP в растворимой форме при температуре 37 °С. В неинфицированных клетках при такой температуре он накапливается преимущественно в нерастворимом виде.

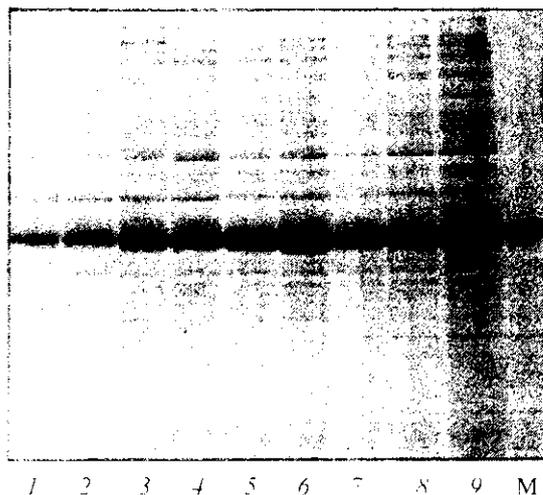


Рис. 3. Электрофореграмма супернатантов фаголизатов клеток *E. coli* BL (pET-MAP), полученных инфицированием фагом продуцента при оптической плотности 0,5 (1, 4, 7), 1,0 (2, 5, 8) и 2,0 (3, 6, 9) и последующем культивировании при температуре 37 (1—3), 28 (4—6) и 21 (7—9) °С. На гель наносили 5 мкл супернатанта. М — маркер MAP

В ходе работы также установлено, что на конечный выход целевого продукта при инфицировании фагом клеток продуцента влияет и значение ОП. Так, наибольшее количество растворимого MAP в супернатанте фаголизата получено при инфицировании клеток BL21 (pET-MAP) при ОП 2,0, меньшее — при ОП 1,0 и еще меньшее — при 0,5. Причем такая зависимость имеет место при всех трех температурных режимах культивирования продуцента (рис. 3). Инфицирование продуцента MAP при более высоких плотностях (3,0; 4,0; 5,0; 6,0 и 7,0) не привело к повышению выхода рекомбинантного белка (данные не представлены).

Таким образом, самый высокий выход MAP *E. coli* наблюдается при культивировании клеток BL21 (pET-MAP) при температуре 21 °С после их инфицирования бактериофагом λ cI857Q⁻R и величине ОП 2,0. Разработанная нами технология биосинтеза MAP *E. coli* с использованием бактериофага лямбда обеспечивает выход целевого продукта более 40 % от растворимых белков клетки и 0,8 г на 1 л культуральной среды.

Поскольку данная технология обеспечивает накопление рекомбинантного белка в растворимом виде непосредственно в культуральной среде, то для его хроматографической очистки не нужны стадии дезинтеграции клеток и солюбилизации теллец включений, что значительно упрощает техно-

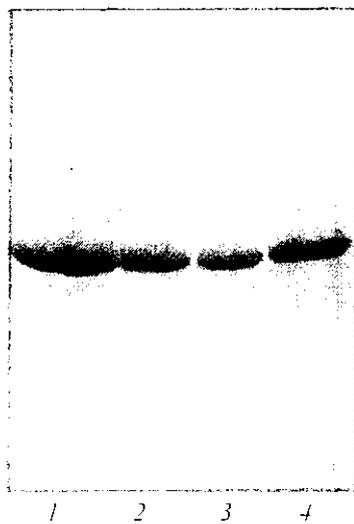


Рис. 4. Электрофоретическая картина образцов МАР на разных стадиях хроматографической очистки: 1—супернатант фаголизата клеток BL (pET-MAP). Элюаты, полученные после очистки МАР на сорбентах: 2 — DEAE-целлюлозе; 3 — Q-сефарозе; 4 — Bio-Rex 70

логический процесс. Поэтому очистка целевого продукта может осуществляться непосредственно из культуральной среды.

Для этого фаголизат, содержащий МАР *E. coli*, центрифугировали при 8 тыс. об/мин в течение 20 мин. Осадок удаляли, а целевой белок, содержание которого в супернатанте составляло более 40 %, последовательно очищали ионообменной хроматографией на колонках с DEAE-целлюлозой («Pharmacia Biotech», Швеция), Q-сефарозой («Pharmacia Biotech») и Bio-Rex 70 («Bio-Rad», США) (рис. 4).

Благодаря оптимизации условий нанесения и элюирования белка нам удалось очистить МАР до гомогенности не менее 90 %. Чистоту препарата определяли с помощью электрофоретического анализа при нанесении на дорожку 40 мкг очищенного белка.

Таким образом, используя в биотехнологическом процессе получения МАР систему экспрессии на основе РНК-полимеразы фага Т7 и бактериофага лямбда, изучив особенности синтеза целевого белка и оптимизировав условия процессов его биосинтеза и очистки, нами разработана высокоэффективная технология получения метионинаминопептидазы *E. coli*. Это позволяет в дальнейшем использовать данный белок для проведения работ как научного, так и прикладного характера.

I. Yu. Slavchenko, E. V. Boreyko, N. V. Vorobey, T. G. Gavrysh, E. N. Pehota, V. A. Kordyum

Overexpression and purification of methionine aminopeptidase from *Escherichia coli*

Summary

Methionine aminopeptidases (MAPs) play an important role in protein processing. In both eukaryotic and prokaryotic cells MAPs selectively remove methionine residue from the N-termini of a nascent polypeptide. However, an extra N-terminal methionyl residue frequently remains in heterologous proteins being produced in bacteria. In case of recombinant proteins destined for clinical application, it is utmost important that the final product has an N-terminal identical to that of a natural counterpart, as otherwise it may possess antigenic properties. An extra N-terminal methionine residue of a recombinant polypeptide may be removed *in vitro* by treatment with methionine aminopeptidase from *E. coli*. In the present work, an effective method of this enzyme production has been developed using an expression system based on the bacteriophage T7 polymerase. It was shown, that upon the cultivation of the MAP producer BL (pET-MAP) at 37 °C the target protein mainly accumulated in an insoluble form with a yield 17 % of the total cellular protein. However, if the producer cells are infected by phage λ, a lysate obtained contains MAP in a soluble form with higher yield compared with non infected cells. Optimization of the conditions such as cells density at the phage infection and temperature of the producer cultivation resulted in the target product yield exceeding 40 % of the soluble cell proteins, or 0,8 g/l. The recombinant protein has been purified by ion-exchange chromatography to homogeneity not less than 90 %.

I. Ю. Славченко, О. В. Борейко, Н. В. Воробей, Т. Г. Гавриш, Е. Н. Пехота, В. А. Кордюм

Суперсинтез та очищення метіонінамінопептидази *Escherichia coli*

Резюме

Метіонінамінопептидази (МАР) відіграють важливу роль у процесінгу білка. Вони вибірково видаляють N-кінцевий метіонін у поліпептиду як *in vivo*, так і прокаріотичних клітинах. Однак при отриманні гетерологічних білків у бактеріях додатковий N-кінцевий метіонін часто не відщеплюється. Якщо рекомбінантні білки передбачається застосовувати у клініці, то дуже важливо, щоб кінцевий продукт був ідентичним природному аналогу, інакше в нього можуть бути антигенні властивості. Тому додатковий N-кінцевий залишок метіоніну бажано видалити, що можна здійснити *in vitro*, обробивши рекомбінантний білок препаратом очищеної МАР *E. coli*. У цій роботі розроблено ефективний метод отримання даного ферменту з використанням системи експресії на основі РНК-полімераз фага Т7. Показано, що при культивуванні продуцента МАР BL (pET-MAP) за температури 37 °C цільовий білок накопичується переважно в нерозчинній формі з виходом 17 % від сумарних клітинних білків. Однак якщо клітини штаму-продуцента інфікувати фагом лямбда, то одержаний лізат буде вміщувати МАР у розчинній формі в значно більшій кількості, ніж неінфіковані клітини. В результаті оптимізації таких параметрів, як оптична густина культури при зараженні і наступна температура культивування продуцента, досягнуто вихід цільового білка в кількості, що перевищує 40 % від розчинних білків, або 0,8 г/л. Рекомбінантний білок очищено з використанням іонообмінної хроматографії до гомогенності більше 90 %.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Datta B. MAPs and POEP of the roads from prokaryotic to eukaryotic kingdoms // *Biochimie*.—2000.—82, N 2.—P. 95—107.
2. Ben-Bassat A., Bauer K., Chang S. Y., Myambo K., Boosman A., Chang S. Processing of the initiation methionine from proteins: properties of the *Escherichia coli* methionine aminopeptidase and its gene structure // *J. Bacteriol.*—1987.—169, N 2.—P. 751—757.
3. Hirel P. H., Schmitter M. J., Dessen P., Fayat G., Blanquet S. Extent of N-terminal methionine excision from *Escherichia coli* proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1989.—86, N 21.—P. 8247—8251.
4. Dalboge H., Bayne S., Pedersen J. *In vivo* processing of N-terminal methionine in *E. coli* // *FEBS Lett.*—1990.—266, N 1—2.—P. 1—3.
5. Yassileva-Atanasova A., Mironova R., Nacheva G., Ivanov I. N-terminal methionine in recombinant proteins expressed in two different *Escherichia coli* strains // *J. Biotechnol.*—1999.—69, N 1.—P. 63—67.
6. Sandman K., Grayling R. A., Reeve J. N. Improved N-terminal processing of recombinant proteins synthesized in *Escherichia coli* // *Biotechnology*.—1995.—13, N 5.—P. 504—506.
7. Solbiati J., Chapman-Smith A., Miller J. L., Miller C. G., Cronan J. E., Jr. Processing of the N termini of nascent polypeptide chains requires deformylation prior to methionine removal // *J. Mol. Biol.*—1999.—290, N 3.—P. 607—614.
8. Warren W. C., Bentle K. A., Schlittler M. R., Schwane A. C., O'Neil J. P., Bogosian G. Increased production of peptide deformylase eliminates retention of formylmethionine in bovine somatotropin overproduced in *Escherichia coli* // *Gene*.—1996.—174, N 2.—P. 235—238.
9. Славченко И. Ю., Борейко Е. В., Гавриш Т. Г., Костюченко И. П., Кордюм В. А. Биосинтез основного фактора роста фибробластов человека в клетках *Escherichia coli* и его очистка // *Биополимеры и клетина*.—2003.—19, № 2.—С. 179—184.
10. Chalmers J. J., Kim E., Telford J. N., Wong E. Y., Tacon W. C., Shuler M. L., Wilson D. B. Effects of temperature on *Escherichia coli* overproducing beta-lactamase or human epidermal growth factor // *Appl. Environ. and Microbiol.*—1990.—56, N 1.—P. 104—111.
11. Славченко И. Ю. Влияние температуры на выход растворимого альфа интерферона человека в системе суперсинтеза рекомбинантных белков с использованием бактериофага лямбда // *Биополимеры и клетина*.—2002.—18, № 5.—С. 436—441.
12. Cohen S. N., Chang A. C. Genetic expression in bacteriophage lambda. 3. Inhibition of *Escherichia coli* nucleic acid and protein synthesis during lambda development // *J. Mol. Biol.*—1970.—49, N 3.—P. 557—575.
13. Drahos D. J., Hendrix R. W. Effect of bacteriophage lambda infection on synthesis of groE protein and other *Escherichia coli* proteins // *J. Bacteriol.*—1982.—149, N 3.—P. 1050—1063.
14. Kochan J., Murialdo H. Stimulation of groE synthesis in *Escherichia coli* by bacteriophage lambda infection // *J. Bacteriol.*—1982.—149, N 3.—P. 1166—1170.
15. Polissi A., Goffin L., Georgopoulos C. The *Escherichia coli* heat shock response and bacteriophage lambda development // *FEMS Microbiol. Rev.*—1995.—17, N 1—2.—P. 159—169.
16. Lee K. H., Kim H. S., Jeong H. S., Lee Y. S. Chaperonin GroESL mediates the protein folding of human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase in *Escherichia coli* // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—2002.—298, N 2.—P. 216—224.
17. Chao Y. P., Chiang C. J., Lo T. E., Fu H. Overproduction of D-hydantoinase and carbamoylase in a soluble form in *Escherichia coli* // *Appl. Microbiol. and Biotechnol.*—2000.—54, N 3.—P. 348—353.
18. Caspers P., Stieger M., Burn P. Overproduction of bacterial chaperones improves the solubility of recombinant protein tyrosine kinases in *Escherichia coli* // *Cell. and Mol. Biol.*—1994.—40, N 5.—P. 635—644.
19. Luo Z. H., Hua Z. C. Increased solubility of glutathione S-transferase-P16 (GST-p16) fusion protein by co-expression of chaperones GroES and GroEL in *Escherichia coli* // *Biochem. Mol. Biol. Int.*—1998.—46, N 3.—P. 471—477.
20. Machida S., Yu Y., Singh S. P., Kim J. D., Hayashi K., Kawata Y. Overproduction of beta-glucosidase in active form by an *Escherichia coli* system coexpressing the chaperonin GroEL/ES // *FEMS Microbiol. Lett.*—1998.—159, N 1.—P. 41—46.
21. Widersten M. Heterologous expression in *Escherichia coli* of soluble active-site random mutants of haloalkane dehalogenase from *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 by coexpression of molecular chaperonins GroEL/ES // *Protein. Exp. and Purif.*—1998.—13, N 3.—P. 389—395.

УДК 579.258 + 577.124
Надійшла до редакції 15.11.02