

**Дар'я Вікторавна Копылева<sup>1</sup>, Максим Иосифович Потапович<sup>2</sup>,  
Владимир Антонович Прокулевич<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>аспірант 2-го года обучения, мл. науч. сотрудник  
научно-исследовательской лаб. биотехнологии каф. микробиологии  
Белорусского государственного университета

<sup>2</sup>зав. науч.-исслед. лаб. биотехнологии каф. микробиологии  
Белорусского государственного университета

<sup>3</sup>д-р биол. наук, проф., гл. науч. сотрудник  
науч.-исслед. лаб. биотехнологии каф. микробиологии  
Белорусского государственного университета

**Darya Kopyleva<sup>1</sup>, Maksim Potapovich<sup>2</sup>, Uladzimir Prakulevich<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>2-nd Year Postgraduate Student, Junior Researcher  
of the Laboratory of Biotechnology of the Department of Microbiology  
of Belarusian State University

<sup>2</sup>Head of the Laboratory of Biotechnology of the Department of Microbiology  
of Belarusian State University

<sup>3</sup>Doctor of Biological Science, Professor, Chief Researcher  
of the Laboratory of Biotechnology of the Department of Microbiology  
of Belarusian State University

e-mail: <sup>1</sup>kopyleva.d@gmail.com; <sup>2</sup>mipatapovich@gmail.com; <sup>3</sup>prokulevich@mail.ru

## **СЛИЯНИЕ С ФЬЮЖН-ПАРТНЕРОМ КАК СТРАТЕГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ РАСТВОРИМОЙ ФОРМЫ РЕКОМБИНАНТНОГО ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ИНТЕРЛЕЙКИНА-4 В КЛЕТКАХ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI***

Описаны этапы оптимизации для экспрессии в клетках бактерий *E. coli* кодирующей структурной части нуклеотидной последовательности человеческого гена интерлейкина-4 и клонирования в составе вектора pET24b(+) под контролем промотора бактериофага T7. Осуществлена индукция биосинтеза цитокина в клетках бактерий *E. coli* BL21-Gold (DE3), определено преимущественное накопление нерастворимой формы целевого белка. Представлена схема слияния интерлейкина-4 с фьюжн-партнером SUMO, задетектирован низкий биосинтетический потенциал клеток штамма *E. coli* BL21-Gold (DE3), несущих фьюжн-конструкты, и отсутствие увеличения выхода растворимой формы ИЛ-4.

**Ключевые слова:** *Escherichia coli*, интерлейкин-4, клонирование, тельца включения, фьюжн-партнер, SUMO, индукция биосинтеза, экспрессия.

### ***Fusion Partner Linkage as a Strategy for Obtaining a Soluble Form of Recombinant Human Interleukin-4 in Escherichia Coli Cells***

The article describes the stages of optimization for the expression of the coding sequence of the human interleukin-4 gene in *E. coli* cells and its cloning into the pET24b(+) vector under the control of the bacteriophage T7 promoter. Cytokine biosynthesis was induced in *E. coli* BL21-Gold (DE3) bacterial cells. The target protein was found to accumulate predominantly in the insoluble form. A strategy for interleukin-4 linkage with the fusion partner SUMO is presented. A low biosynthetic potential of *E. coli* BL21-Gold (DE3) cells carrying fusion constructs was detected, along with the absence of an increase in the yield of the soluble form of IL-4.

**Key words:** *Escherichia coli*, interleukin-4, cloning, inclusion bodies, fusion partner, SUMO, induction of biosynthesis, expression.

### **Введение**

Интерлейкин-4 (ИЛ-4) является цитокином плеiotропного действия, оказывающим регуляторное влияние на врожденную и адаптивную иммунную систему. Начиная с 1982 г. количество связанных с ним исследований неуклонно растет.

Роль ИЛ-4 неоспорима при контроле выработки иммуноглобулинов, в реакциях воспаления, аллергии, отмечается его противоопухолевая активность.

По последним данным, лечебно-профилактический потенциал цитокина связывают с лечением ожирения, последствий инфаркта миокарда, ожоговых поражений, тяжелых воспалений. Вместе с тем ИЛ-4 незаменим в процессах конструирования биомедицинских клеточных продуктов, применение которых в индивидуальной терапии расширяется с каждым днем [1–5].

Потребность в субстанции ИЛ-4 постоянно растет, что обуславливает рост ее производства, необходимого для поддержания и дальнейшего развития отечественной медицины.

Наиболее эффективным способом производства активных белковых субстанций является биотехнологическое получение целевого продукта с применением генноинженерных технологий. Для получения рекомбинантных белков используют различные экспрессионные системы, включающие бактерии, дрожжи, клетки млекопитающих, растений и насекомых [6].

Бактериальные клетки имеют ряд преимуществ перед другими объектами: выращивание продуцента на дешевых питательных средах, простота в управлении процессом ферментации, высокая скорость накопления биомассы, что обеспечивает достаточно эффективное масштабирование производства. Вместе с тем наиболее высокий выход продукта в бактериальных клетках сопряжен преимущественно с внутриклеточной агрегацией белковых молекул, которые становятся неактивными, образуя тельца включения (ТВ) [7;8].

Тельца включения могут быть препятствием при получении растворимого активного белка. Тем не менее образование ТВ часто является предпочтительным, поскольку они устойчивы к протеолизу, легко концентрируются центрифугированием, минимально контаминированы клеточными белками.

Недостатком в производстве, требующим дополнительных затрат и приводящим к потерям продукта, является необходимость проведения процедур восстановления нативной формы получаемого белка, т. е. осуществление рефолдинга с образованием функционально активных белковых форм, который не всегда удается разработать и осуществить.

Накопление гетерологичных рекомбинантных белков в растворимой форме имеет преимущество в том, что появляется возможность прямого получения целевого продукта, обладающего биологической активностью, и отсутствует необходимость разработки протоколов рефолдинга, что обеспечивает минимальные потери в производстве [9; 10].

Значительный прогресс в биосинтезе растворимых гетерологичных белков достигнут при использовании слияния целевого белка с фьюжн-партнером, обеспечивающим стабилизацию синтезированной конструкции и способствующим правильному фолдингу.

Известно, что убиквитин, имеющий высокогидрофобное ядро, является быстро фолдирующимся белком, а фьюжн-конструкции на его основе, к которым относится малый убиквитин-подобный модификатор дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (SUMO), часто способствуют получению растворимого рекомбинантного белка.

Стоит заметить, что для получения активной формы целевого белка такая стратегия зачастую требует этапа отщепления фьюжн-партнера специфической протеазой [11; 12].

Цель исследования – сравнить выход растворимой формы белка при независимом клонировании нуклеотидной последовательности человеческого интерлейкина-4 и при ее слиянии с фьюжн-партнером SUMO.

### Матэрыялы і метады ісследования

В работе использовали следующие бактериальные штаммы, плазмиды, генные конструкции и праймеры: *E. coli* XL-1Blue (*E. coli endA1 gyrA96(Nal<sup>r</sup>) lac hsdR17(rk<sup>-</sup>mk<sup>+</sup>) recA1 relA1 supE44 thi-1 F' [lacI<sup>q</sup> lacZAM15 proAB<sup>+</sup> Tn10(Tet<sup>r</sup>)*]), *E. coli* BL21-Gold (DE3) (*E. coli* B F<sup>-</sup> *ompT hsdS(rb<sup>-</sup>mb<sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> gal λ(DE3) endA Hte*); плазида рЕТ24b(+), («Novagen», Великобритания); синтетическая оптимизированная для экспрессии в клетках *E. coli* структурная часть человеческого гена ИЛ-4 в составе вектора pIDTSmart («Integrated DNA Technologies», США), синтетическая последовательность SUMO в виде gBlock («Integrated DNA Technologies», США); праймеры PCV 1/2-R (gggacagcagttgaggagtagcat), PCV 1-1620 (tttcggcgccatctgtaacgggttc), T7Promoter (taatacagactcactataggg), T7Terminator (gctagtattgctcagcgg).

ПЦР, кальциевую трансформацию, электрофорез ДНК в 1 %-м агарозном геле осуществляли в соответствии с общепринятыми протоколами [13]; рестриктию, лигирование, дефосфорилирование и амплификацию фрагментов ДНК осуществляли с помощью ферментов и соответствующих им буферных систем компании «Thermo Scientific» (США) по инструкции производителя.

Процедуры выделения плазмидной ДНК из клеток (GeneJET Plasmid Miniprep Kit) и агарозного геля, а также очистку ампликонов от компонентов смеси ПЦР (GeneJET Gel Extraction Kit) проводили при помощи готовых наборов фирмы «Thermo Scientific» (США).

Секвенирование по Сэнгеру [14] проводили в Институте биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси с использованием праймеров T7Promoter и T7Terminator на генетическом анализаторе 3500xL (Applied Biosystems, США) с использованием набора для секвенирования BrilliantDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit («NimaGen», Нидерланды).

Для индукции биосинтеза целевого белка ночные культуры бактерий *E. coli* BL21-Gold (DE3), несущие целевые конструкции, разводили в 20 раз и культивировали в колбах с 10 мл LB-бульона (лизогенная среда) и канамицином (30 мкг/мл) при 37 °С в условиях качалочной аэрации при 160 об./мин. до оптической плотности 0,8 при 600 нм. Индукцию экспрессии рекомбинантного гена осуществляли путем добавления в среду культивирования синтетического аналога лактозы – изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) в конечной концентрации 0,5 ммоль/л.

Образцы бактериальных культур, выровненные по оптической плотности, анализировали электрофоретически после четырех часов инкубации в присутствии индуктора.

Анализ белковых профилей осуществляли с помощью электрофореза в 16 %-м полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях с добавлением додецилсульфата натрия (ДСН) по методу Laemmli [15]. Визуализировали месторасположение белковых полос в геле раствором Кумасси синего R-250.

При выделении рекомбинантного белка клетки бактерий разрушали с использованием набора B-PER Bacterial Protein Extraction Reagent («Thermo Scientific», США) по инструкции производителя. Осадочные фракции дополнительно промывали дистиллированной водой с целью избавления от растворимых белковых примесей в соотношении 1 : 10 (на 100 мг осадка 1 мл воды).

Молекулярные массы аминокислотных последовательностей белков рассчитывали на биоинформационном портале ExPASy [16]. Полный транскрипт мРНК человеческого ИЛ-4 взят из базы данных GenBank, код доступа NM\_000589.4. Оптимизацию нуклеотидной последовательности осуществляли с использованием пакета программ DNASTAR [17].



С целью встраивания синтетической структурной части человеческого гена ИЛ-4 в полилинкер рЕТ24b(+) нуклеотидную последовательность дополнительно фланкировали сайтами узнавания рестриктазами *EcoRI* и *NdeI* (старт-кодон ATG в сайте рестрикции *NdeI*). Также вводили тандем стоп-кодонов TAA.

Амплификацию синтетического гена проводили путем полимеразной цепной реакции. На основе оптимизированной нуклеотидной последовательности разработали праймеры (таблица).

Таблица – Характеристика разработанных праймеров для рЧИЛ-4

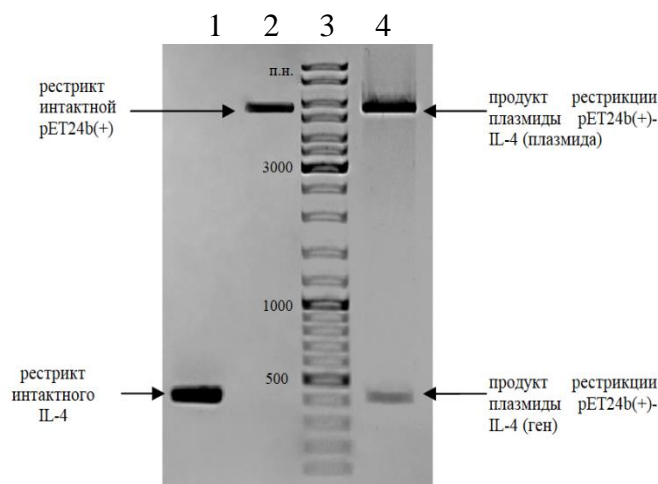
Праймер	Последовательность, 5'→3'	Длина, н.	гс, %
IL-4 F	cgccatatgcacaaatgcgacatca	25	48
IL-4 R	gcggaattcttattaagaagagcat	25	36

Продукт амплификации анализировали электрофоретически в 1 %-м агарозном геле, очищали от компонентов смеси ПЦР и обрабатывали рестриктазами *NdeI* и *EcoRI*. Параллельно данными рестриктазами обрабатывали вектор экспрессии рЕТ24b(+).

После электрофоретического анализа полученные рестрикты с липкими концами лигировали с использованием ДНК-лигазы бактериофага Т4.

Лигазной смесью трансформировали клетки штамма *E.coli* XL-1 Blue и выращивали на селективной среде LB, содержащей канамицин.

Дополнительно наличие в клонах рекомбинантных плазмид с генной вставкой (обозначенные как рЕТ24b(+):IL-4) определяли с помощью ПЦР и обработки выделенных рЕТ24b(+):IL-4 рестриктазами *NdeI* и *EcoRI* (рисунок 2). Отсутствие ошибок в созданной конструкции подтверждали секвенированием.

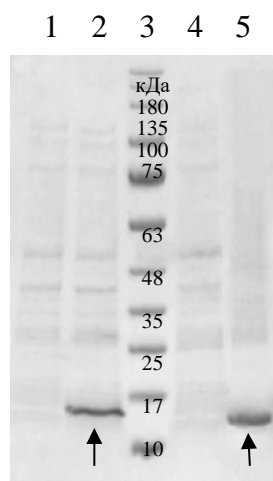


- 1 – продукт амплификации гена ИЛ-4, обработанный рестриктазами *NdeI* и *EcoRI*;  
 2 – плазмида рЕТ24b(+), обработанная рестриктазами *NdeI* и *EcoRI*;  
 3 – маркер молекулярного веса SM0333 («Thermo Scientific», США);  
 4 – рЕТ24b(+):IL-4, обработанная рестриктазами *NdeI* и *EcoRI*, выделенная из клона штамма *E. coli* XL-1 Blue

Рисунок 2 – Электрофореграмма результатов рестрикционного анализа плазмиды рЕТ24b(+):IL-4.

Полученными конструкциями ДНК трансформировали бактерии штамма *E. coli* BL21-Gold (DE3). Трансформантов выборочно проверяли на наличие вставки целевого гена ИЛ-4 методом ПЦР.

Клоны, содержащие рЕТ24b(+):IL-4, отбирали и индуцировали экспрессию гена ИЛ-4 с помощью ИПТГ в конечной концентрации 0,5 ммоль/л (рисунок 3).



Стрелками обозначен ИЛ-4;

- 1 – белковый профиль бактерий *E. coli* BL21-Gold (DE3) без индукции ИПТГ (контроль);  
 2 – белковый профиль бактерий *E. coli* BL21-Gold (DE3) после четырех часов инкубации в присутствии ИПТГ;  
 3 – маркер молекулярного веса Prestained Protein Ladder (10–180 кДа, «neoFroxx», Германия);  
 4 – растворимая фракция белков бактерий *E. coli* BL21-Gold (DE3) после четырех часов инкубации в присутствии ИПТГ;  
 5 – нерастворимая фракция белков бактерий *E. coli* BL21-Gold (DE3) после четырех часов инкубации в присутствии ИПТГ

**Рисунок 3 – ДСН-ПААГ электрофорез клеточных белков бактерий *E. coli* BL21-Gold (DE3), содержащих рЕТ24b(+):IL-4.**

Появление характерных полос на геле в области 15 кДа свидетельствует об индуцируемом синтезе нового для клетки белка по молекулярной массе соответствующего ожидаемому – целевому.

По данным денситометрического анализа фотографии полиакриламидного геля, выход ИЛ-4 составил  $44,63 \pm 0,55$  % от общего белка клетки.

Высокий выход цитокина характеризует сконструированный штамм как потенциально эффективный продуцент, пригодный для промышленного производства соответствующей субстанции рекомбинантного человеческого ИЛ-4.

Вместе с тем установлено, что белок накапливается в нерастворимой форме с образованием телец включения (рисунок 3, дорожка 5), что требует разработки дополнительных протоколов солюбилизации ТВ и рефолдинга и тем самым усложняет общую схему получения цитокина. Выход растворимой формы денситометрически не детектировался.

При попытке получить растворимую форму целевого белка использовали слияние с фьюжн-партнером SUMO, способствовавшего увеличению выхода растворимых форм для некоторых белков [21].

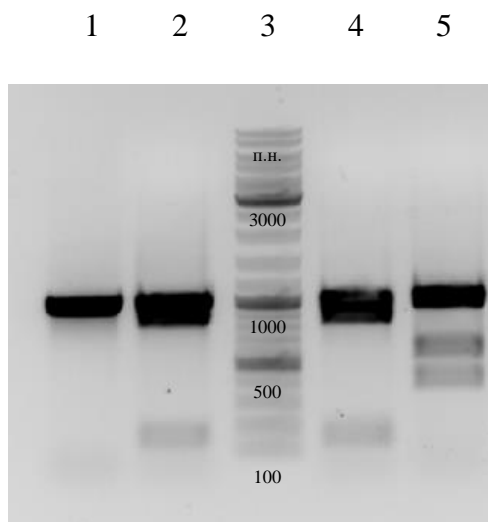
Для получения гибридных конструкций рЕТ24b(+):IL-4-SUMO нуклеотидную последовательность SUMO амплифицировали сетом праймеров PCV 1/2-R и PCV

1-1620 встраивали в плазмиду рЕТ24b(+)::IL-4, обработанную фосфатазой, по сайту рестрикции *NdeI* и трансформировали клетки *E. coli* XL-1 Blue.

Трансформантов проверяли ПЦР с использованием праймеров T7Promoter и T7Terminator для полилинкерной последовательности рЕТ24b(+).

В результате анализа получены ампликоны, соответствующие по размеру ожидаемым 994 п. н.

Правильность ориентации SUMO определяли рестрикционным анализом полученных ампликонов по сайту рестрикции *NheI*, уникальному для последовательности SUMO (рисунок 4).



- 1 – ампликон IL-4-SUMO;  
 2, 4 – ампликоны с правильной ориентацией вставки, обработанные рестриктазой *NheI*;  
 3 – маркер молекулярного веса SM0333 («Thermo Scientific», США);  
 5 – ампликон с неправильной ориентацией вставки, обработанный рестриктазой *NheI*

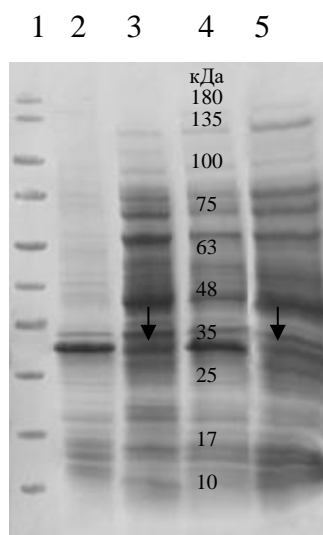
**Рисунок 4 – Электрофореграмма рестрикционного анализа ампликонов IL-4-SUMO, полученных в ходе ПЦР трансформантов *E. coli* XL-1 Blue, содержащих рЕТ24b(+)::IL-4-SUMO**

При правильной ориентации вставки в результате рестрикции *NheI* образуются продукты размером 150 п. н. и 844 п. н., в то время как наличие продуктов размером 411 п. н. и 583 п. н. свидетельствует об обратной ориентации SUMO.

На следующем этапе конструкциями с правильной ориентацией вставки трансформировали бактерии штамма *E. coli* BL21-Gold (DE3) и индуцировали биосинтез белка, как было описано ранее (рисунок 5).

Присутствие на электрофореграмме продуктов размером около 30 кДа свидетельствует об успешной экспрессии фьюжн-конструкта рЕТ24b(+)::IL-4-SUMO.

Наличие растворимой формы гибридного белка не удалось задетектировать денситометрически, при этом выход продукта составил  $18,62 \pm 0,78$  % от общего клеточного белка, что, по-видимому, связано с затруднением биосинтеза удлиненной формы гетерологического белка.



Стрелками обозначен ИЛ-4-SUMO

- 1 – маркер молекулярного веса Prestained Protein Ladder (10–180 кДа, «neoFroxx», Германия);  
 2 – нерастворимая фракция белков бактерий *E. coli* BL21-Gold (DE3), несущих рЕТ24b(+):IL-4-SUMO, после четырех часов инкубации в присутствии ИППГ;  
 3 – растворимая фракция белков бактерий *E. coli* BL21-Gold (DE3), несущих рЕТ24b(+):IL-4-SUMO, после четырех часов инкубации в присутствии ИППГ;  
 4 – белковый профиль бактерий *E. coli* BL21-Gold (DE3), несущих рЕТ24b(+):IL-4-SUMO, после четырех часов инкубации в присутствии ИППГ;  
 5 – белковый профиль бактерий *E. coli* BL21-Gold (DE3), несущих рЕТ24b(+):IL-4-SUMO, без индукции ИППГ (контроль)

**Рисунок 5 – ДСН-ПААГ электрофорез клеточных белков бактерий *E. coli* BL21-Gold (DE3), содержащих рЕТ24b(+):IL-4-SUMO**

### Заключение

В результате исследования сконструирована оптимизированная для экспрессии в клетках бактерий *E. coli* последовательность структурной части человеческого гена интерлейкина-4 и разработаны праймеры для ее амплификации. Целевая последовательность клонирована в составе вектора рЕТ24b(+) и экспрессирована в клетках бактерий *E. coli* BL21-Gold (DE3). Обнаружен высокий биосинтетический потенциал штамма, выраженный в способности накапливать целевой белок в количестве, превышающем 40 % от общего белка клетки. Установлена неспособность клеток штамма *E. coli* BL21-Gold (DE3) продуцировать ИЛ-4 в растворимой форме.

Слияние гена ИЛ-4 с фьюжн-партнером SUMO не привело к ожидаемому накоплению продукта в растворимой форме; кроме того, общий выход целевого белка уступает таковому при индукции отдельного гена.

С учетом терапевтического потенциала интерлейкина-4 планируется разработка протоколов выделения цитокина из телец включения, синтезируемых в клетках штамма *E. coli* BL21-Gold (DE3), несущего рЕТ24b(+):IL-4, характеризующегося достаточно высоким выходом целевого белка.

### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ (REFERENCES)

1. Keegan, A. D. Recent advances in understanding the role of IL-4 signaling / A. D. Keegan, W. J. Leonard, J. Zhu // *Fac Rev.* – 2021. – Vol. 10 – P. 71.
2. IL-4 as a Repurposed Biological Drug for Myocardial Infarction through Augmentation of Reparative Cardiac Macrophages: Proof-of-Concept Data in Mice / Y. Shintani, T. Ito, L. Fields [et al.] // *Sci Rep.* – 2017. – Vol. 7, nr 1. – P. 68–77.



3. Interleukin-4 Treatment Restores Cellular Immunity After Ethanol Exposure and Burn Injury / K. A. N. Messingham, S. A. Heinrich, E. M. Schilling, E. J. Kovacs // *Alcoholism Clin Exp Res.* – 2002. – Vol. 26, nr 4. – P. 519–526.
4. Fabrication of Interleukin-4 Encapsulated Bioactive Microdroplets for Regulating Inflammation and Promoting Osteogenesis / Y. Zhang, J. Cao, M. Jian [et al.] // *IJN.* – 2023. – Vol. 18 – P. 2019–2035.
5. Advanced therapy medicinal products: current and future perspectives / E. Hanna, C. Rémuzat, P. Auquier, M. Toumi // *J Mark Access Health Policy.* – 2016. – Vol. 4. – P. 103–113.
6. Schmidt, F. R. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry / F. R. Schmidt // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2004. – Vol. 65, nr 4. – P. 363–372.
7. Jia, B. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives / B. Jia, C. O. Jeon // *Open Biol.* – 2016. – Vol. 6, nr 8. – P. 160–196.
8. Overton, T. W. Recombinant protein production in bacterial hosts / T. W. Overton // *Drug Discovery Today.* – 2014. – Vol. 19, nr 5. – P. 590–601.
9. Baneyx, F. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli* / F. Baneyx, M. Mujacic // *Nat Biotechnol.* – 2004. – Vol. 22, nr 11. – P. 1399–1408.
10. Brondyk, W. H. Chapter 11 Selecting an Appropriate Method for Expressing a Recombinant Protein / W. H. Brondyk // *Methods in Enzymology* // Elsevier, 2009. – Vol. 463. – P. 131–147.
11. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins / T. R. Butt, S. C. Edavettal, J. P. Hall, M. R. Mattern // *Protein Expr Purif.* – 2005. – Vol. 43, nr 1. – P. 1–9.
12. Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: Enhanced expression and solubility with SUMO / J. G. Marblestone, S. C. Edavettal, Y. Lim [et al.] // *Protein Sci.* – 2006. – Vol. 15, nr 1. – P. 182–189.
13. *Current protocols in molecular biology* // ed. by F. M. Ausubel. – New York : Wiley, 1987. – Vol. 1.
14. Sanger, F. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors / F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1977. – Vol. 74, nr 12. – P. 5463–5467.
15. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.
16. Protein Identification and Analysis Tools on the ExpASY Server / E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker [et al.] // *The Proteomics Protocols Handbook.* – New Jersey : Humana Press, 2005. – P. 571–607.
17. Burland, T. G. DNASTAR's Lasergene Sequence Analysis Software / T. G. Burland // *Bioinformatics Methods and Protocols.* – New Jersey : Humana Press, 1999. – Vol. 132. – P. 71–91.
18. Quantifying Western blots: Pitfalls of densitometry / M. Gassmann, B. Grenacher, B. Rohde, J. Vogel // *Electrophoresis.* – 2009. – Vol. 30, nr 11. – P. 1845–1855.
19. Schneider, C. A. NIH Image to ImageJ: 25 years of Image Analysis / C. A. Schneider, W. S. Rasband, K. W. Eliceiri // *Nat Methods.* – 2012. – Vol. 9, nr 7. – P. 671–675.
20. Expression of recombinant human IL-4 in *Pichia pastoris* and relationship between its glycosylation and biological activity / R. Li, C. Xie, Y. Zhang [et al.] // *Protein Expression and Purification.* – 2014. – Vol. 96. – P. 1–7.
21. Enhanced soluble expression of active recombinant human interleukin-29 using champion pET SUMO system / A. Munir, N. Ahmed, M. Akram [et al.] // *Biotechnol Lett.* – 2023. – Vol. 45, nr 8. – P. 1001–1011.