



ГЕНО-ИНЖЕНЕРНЫЙ СИНТЕЗ И СВОЙСТВА ГИСПИДИН-3-ГИДРОКСИЛАЗЫ – КЛЮЧЕВОГО ФЕРМЕНТА БИОСИНТЕЗА ЛЮЦИФЕРИНА ГРИБОВ

© 2021 г. А. С. Герасимов*, **, #, С. О. Рогожкин**, Е. С. Шахова*, Т. В. Чепурных*,
А. Ю. Гороховатский*, Н. М. Мышкина*, А. В. Балакирева*, И. В. Ямпольский*
*ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

**Вятский государственный университет, Россия, 610000 Киров, ул. Московская, 36

Поступила в редакцию 28.10.2020 г.

После доработки 11.11.2020 г.

Принята к публикации 16.11.2020 г.

Биолюминесценция — это способность живых организмов испускать свет. В ее основе лежит биохимическая реакция окисления субстрата — люциферина, катализируемая ферментом люциферазой. Гриб *Neonothopanus nambi* — первый эукариотический организм, для которого была расшифрована биолюминесцентная система: были установлены структура люциферина, ген люциферазы, а также описаны интермедиаты и ферменты биосинтеза люциферина. Гиспидин-3-гидроксилаза (nnH3N) представляет собой один из ключевых ферментов данного каскада, катализирующий превращение гиспидина (предшественника люциферина) в 3-гидроксигиспидин — люциферин грибов. Для полного понимания механизма и субстратной специфичности nnH3N необходимо провести структурные исследования молекулы белка. Для этого требуется разработать протокол получения высокоочищенного препарата функционально активной nnH3N в достаточных количествах. Мы показали, что коэкспрессия гена гибридного белка SUMO-nnH3N с геном шаперонина GroEL/ES в клетках бактерии *Escherichia coli* позволяет получить фермент в растворимой и активной форме с выходом 20 мг со 100 мл бактериальной культуры. Также мы впервые продемонстрировали, что FAD — кофактор гиспидин-3-гидроксилазы грибов.

Ключевые слова: биолюминесценция, гиспидин-3-гидроксилаза, гетерологичная экспрессия, гибридный белок, дот-иммуноблоттинг, активность фермента

DOI: 10.31857/S0132342321040096

ВВЕДЕНИЕ

Биолюминесценция — это способность живых организмов испускать свет. В основе биолюминесценции лежит биохимическая реакция окисления субстрата — люциферина, катализируемая ферментом люциферазой. На сегодняшний день известны более сорока различных биолюминесцентных систем, однако только для некоторых из них были установлены структуры люцифераз и люциферинов [1, 2]. Для еще меньшего числа были охарактеризованы пути их биосинтеза и участвующие в них гены. Гриб *Neonothopanus nambi* — первый эукариотический организм с полностью расшифрованной биолюминесцентной системой [3]. Были установлены основные интермедиаты пути биосинтеза люциферина, а также участвующие в

нем ферменты. Основной компонент системы — люциферин — образуется в ходе ключевой реакции гидроксилирования гиспидина, катализируемой ферментом гиспидин-3-гидроксилазой (nnH3N) (рис. 1).

На данный момент гиспидин-3-гидроксилазы высших грибов практически не охарактеризованы как на биохимическом, так и на структурном уровне. Гиспидин-3-гидроксилаза из *N. nambi* состоит из 422 а.о. и обладает молекулярной массой ~46 кДа. С помощью биоинформатических методов нами было предсказано, что nnH3N имеет домен с укладкой Россмана, который содержит β-складчатые структуры [4]. Это позволило предположить, что nnH3N относится к семейству растворимых NAD(P)H/FAD-зависимых монооксигеназ. В литературе нет данных о разрешении пространственной структуры гиспидин-3-гидроксилаз высших грибов. К ближайшим гомологам данного белка (60–67% аминокислотной

Сокращения: nnH3N — гиспидин-3-гидроксилаза; K_d — константа диссоциации.

Автор для связи: (тел.: +7 (912) 724-15-43; эл. почта: asgerasimoff@mail.ru).

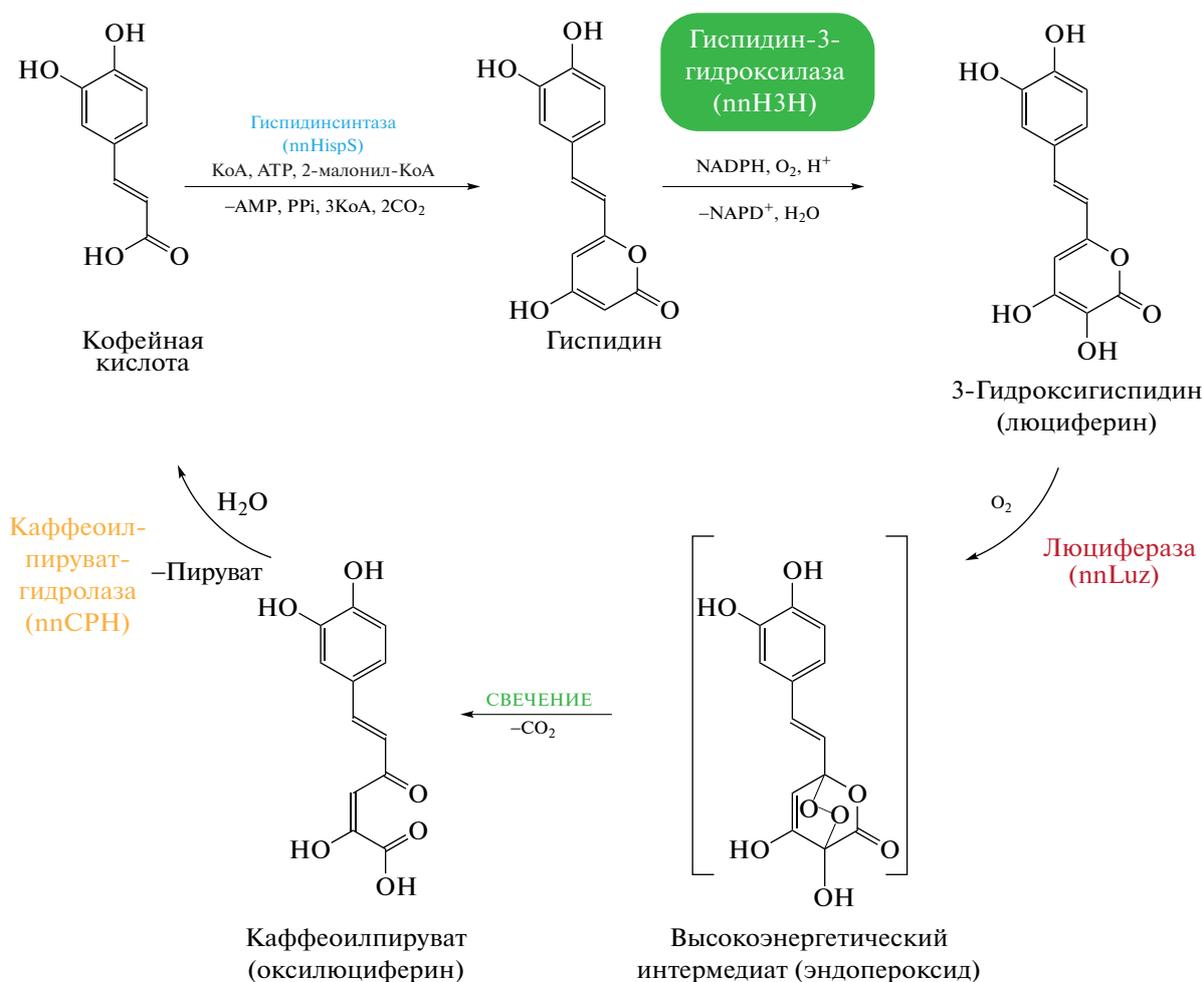


Рис. 1. Путь биосинтеза и утилизации люциферина грибов *Neonothopanus nambi*. Гиспидинсинтаза (nnHispS) катализирует превращение кофейной кислоты в гиспидин, затем гиспидин-3-гидроксилаза (nnH3H) катализирует гидроксирование гиспидина с образованием люциферина грибов. В присутствии молекулярного кислорода люциферин окисляется люциферазой (nnLuz) до высокоэнергетического промежуточного соединения – эндопероксида, который испускает свет, распадаясь до оксилуциферина (каффеоилпирувата). В итоге оксилуциферин разлагается до кофейной кислоты в присутствии каффеоилпируватгидролазы (nnCPH).

идентичности) можно отнести гидроксилазы других биолюминесцентных грибов, в частности родов *Armillaria* и *Mycena* [3], однако их структура также не изучена. Ближайшие гомологи с известной пространственной структурой обладают сходством с nnH3H по аминокислотной последовательности не более чем на 28%, что исключает возможность проведения на их основе структурного моделирования и предсказания эффектов аминокислотных замен. Также мало изучены биохимические особенности гидроксилаз данного семейства, включая их субстратную специфичность.

На сегодняшний день существует недостаточное количество экспериментальных исследований, посвященных изучению гиспидин-3-гидроксилаз грибов. Для понимания механизма действия и субстратной специфичности nnH3H следует провести структурные исследования молекулы белка. Для

этого необходимо разработать протокол получения высокоочищенного препарата функционально активной nnH3H в достаточных для проведения анализа количествах. Поэтому целью данной работы стало получение рекомбинантной, высокоочищенной и ферментативно активной гиспидин-3-гидроксилазы из гриба *N. nambi* путем гетерологической экспрессии в клетках бактерии *Escherichia coli*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспрессия гена гибридного белка SUMO-nnH3H в клетках *E. coli*. Для наработки nnH3H мы выбрали бактериальную экспрессионную систему. Бактерии *E. coli* способны производить рекомбинантные белки с выходом >1 г/л. Более того, способность роста этих бактерий на минеральных

Таблица 1. Характеристика белков-партнеров, использованных для получения гиспидин-3-гидроксилазы гриба *Neonothopanus nambi*

Название белка-партнера	Суммарный размер белка-партнера, кДа	Назначение белка-партнера	Ссылка
His ₆ -TrxA	13.67	Способен накапливаться в больших количествах в цитоплазме и в растворимой форме. Как N-, так и C-конец белка находятся на поверхности молекулы и достаточно подвижны, что делает его “удобным” партнером	[6]
DsbA-His ₆	4.08	Лидерный пептид периплазматического белка <i>E. coli</i> DsbA, необходимый для транслокации целевого белка в периплазму	[7]
NSP4-His ₆	4.07	Синтетическая лидерная последовательность для транслокации целевого белка в периплазму, полученная путем комбинации лидерного пептида периплазматического белка <i>E. coli</i> DsbA и пектиназы PelB <i>E. carotovora</i>	[7]
His ₆ -SUMO	12.07	При синтезе целевого белка, слитого с SUMO, наблюдается заметное увеличение экспрессии целевого полипептида и его растворимости. Внешняя гидрофильная оболочка и внутренний гидрофобный кор могут оказывать тот же эффект, что и детергенты при солюбилизации	[8]

средах делает *E. coli* подходящим организмом для продукции меченых белков для изучения при помощи ЯМР-спектроскопии. Однако известно, что клетки *E. coli* не способны проводить ряд посттрансляционных модификаций, в частности образование S—S-связей. Это приводит к формированию так называемых телец включения. Для получения функционально активного фермента требуется проведение ренатурации *in vitro*, разработка и осуществление которой зачастую трудоемки и малоэффективны.

Также активно применяются технологии гибридной экспрессии генов: целевой продукт получают в виде гибрида с белком-партнером, который улучшает физико-химические показатели молекулы белка, такие как растворимость, и его биологические свойства, например, активность, а также снижает токсическое воздействие на клетку. Использование соответствующих белков-партнеров, а также подбор оптимальных экспрессионных векторов, условий культивирования и индукции, коэкспрессия целевых генов с генами шаперонов — все это сделало возможным применение *E. coli* для получения сложных белков с правильной структурой [5].

Сначала мы использовали стратегию прямой экспрессии гена, используя систему на основе промотора РНК-полимеразы фага T7. Уровень биосинтеза nnH3N согласно результатам дот-иммуноблоттинга составил ~100 мг/л. Подбор условий культивирования показал, что снижение температуры культивирования вплоть до 15°C, а также варьирование состава среды и концентрации индуктора не оказали влияния на растворимость

целевого продукта. Таким образом, было принято решение перейти к использованию гибридной экспрессии гена. В качестве белков-партнеров были выбраны варианты, представленные в табл. 1. Согласно данной литературе, перечисленные белки-партнеры были успешно применены для повышения выхода и растворимости многих рекомбинантных белков [6–8].

Для экспрессии генов гибридных белков в клетках бактерий были созданы генетические конструкции на основе экспрессионного вектора pET39b(+), который имеет в своем составе ген репрессора *lac*-оперона *lacI*, предназначенного для дополнительного контроля транскрипции целевого гена. Мы установили, что гибридная экспрессия целевого гена значительно повышает выход продуцируемого белка (рис. 2). В случае использования конструкций, в которых целевой белок синтезируется в виде гибрида с SUMO или TrxA, выход составил >1 г/л, но только в виде телец включения. Изменение концентрации индуктора и температуры культивирования с 37 до 15°C не привели к увеличению растворимости целевого белка. При использовании лидерных последовательностей DsbA и NSP4 белок также накапливался в виде телец включения и отсутствовал во фракции периплазматических белков.

Максимальный уровень биосинтеза целевого продукта был достигнут при 30°C при использовании белка-партнера SUMO и составил ~2 г/л. С целью получения nnH3N в растворимой форме были созданы генетические конструкции, кодирующие гиспидин-3-гидроксилазу с различными партнерами, на основе экспрессионного вектора

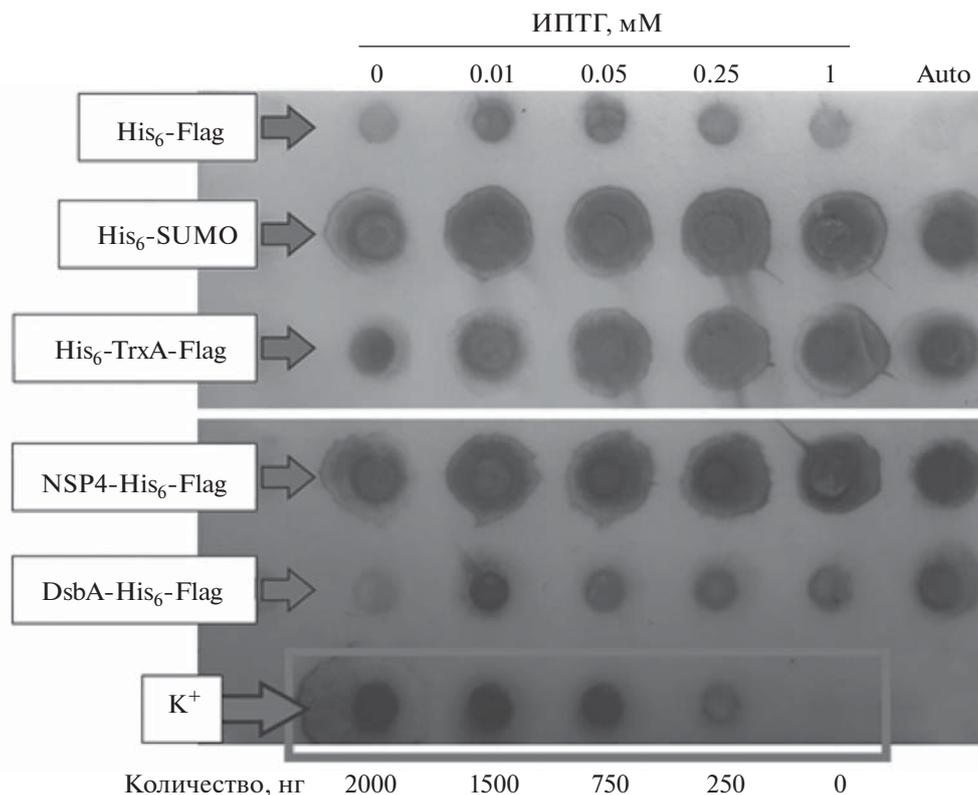


Рис. 2. Анализ уровня экспрессии гена *nnh3h* и его вариантов в клетках *E. coli* BL21(DE3) при помощи дот-иммуноблоттинга. Указаны названия белков-партнеров и концентрация индуктора ИПТГ. K^+ – положительный контроль – препарат белка, содержащего гистидиновую метку, с известной концентрацией; Auto – культивирование клеток на автотиндукционной среде TBP-5052 [12].

pCOLDIII [9]. При использовании вектора pCOLDIII происходит селективная индукция синтеза целевого белка при низкой температуре (15–20°C), что подавляет экспрессию других клеточных белков и снижает активность протеаз. С целью получения белка в растворимой форме нами были исследованы следующие условия: температура культивирования (20, 15, 13, 10°C), концентрация индуктора экспрессии – изопропил-β-D-1-тиогактопиранозида (ИПТГ), концентрация посевного материала и специальных шоковых добавок, таких как этанол (1–3%, V/V), сорбитол (0.1–0.5 М), аргинин (0.1–0.3 М), KCl (0.05–0.2 М). Однако данные модификации условий культивирования не оказали положительное влияние на растворимость целевого белка.

На рис. 3а представлен общий уровень экспрессии *nnh3h* при оптимальных условиях культивирования и индукции с использованием разных конструкций в клетках *E. coli* BL21(DE3). Оптимальная концентрация ИПТГ составила 0.05 мМ для гибридной конструкции SUMO-*nnh3h*. По экспериментальным данным, выход целевого фермента составил ~1 г/л. В дальнейшем результаты фракционирования внутриклеточного белка показали, что в случае SUMO-*nnh3h* наблюда-

лось появление полосы с заданной молекулярной массой в области, соответствующей размеру целевого продукта, во фракции растворимых белков (рис. 3б). Как и ожидалось, растворимость целевого продукта была выше при меньшей концентрации ИПТГ. Также в ходе экспериментов по подбору оптимальных условий культивирования продуцента SUMO-*nnh3h* мы выяснили, что добавление в среду 60–180 мМ KCl значительно повышало растворимость рекомбинантного фермента. Лизаты демонстрировали специфическую активность *nnh3h* – способность конвертировать гиспидин в люциферин, однако в нерастворимой форме содержание фермента было значительно больше.

Мы заключили, что SUMO-*nnh3h* может быть наработан в клетках *E. coli* в функционально активном состоянии. При оптимизации условий культивирования (температура 15°C, время – 48 ч, среда TBP + 60 мМ KCl + 0.05 мМ ИПТГ) удалось значительно увеличить долю растворимого белка. Однако большая доля целевого фермента (~90%) агрегировала в тельца включения. Стоит также отметить то, что SUMO-*nnh3h* растворимой фракции склонен к выпадению в осадок. Агрегация белка может происходить из-за того, что во

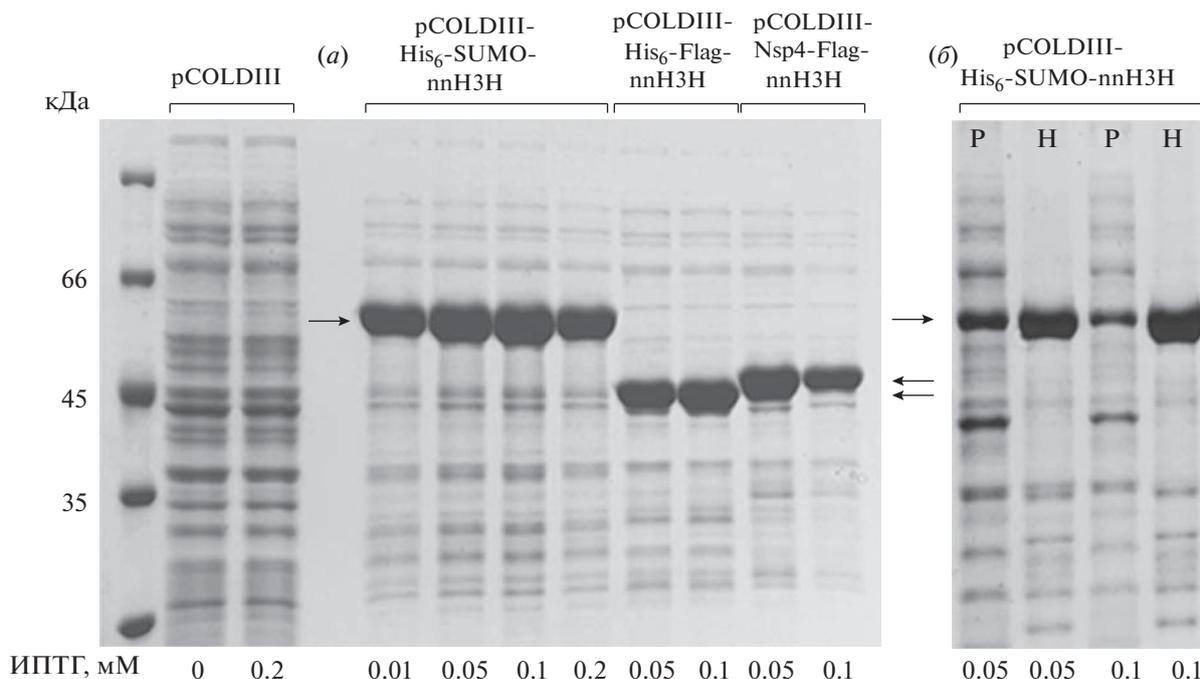


Рис. 3. (а) – Общий уровень экспрессии гена *nnh3h* в составе разных конструкций в *E. coli* BL21(DE3) при подборе среды для индукции; (б) – фракционирование белков в клетках *E. coli* BL21(DE3), продуцирующих SUMO-*nnH3H*. P – фракция растворимого клеточного белка, H – фракция нерастворимого белка. Стрелками отмечено положение целевого белка.

время синтеза он не успевает приобрести правильную пространственную структуру, поэтому было решено коэкспрессировать целевой ген в присутствии шаперонина GroEL/ES.

GroEL/ES представляет собой сложную гетеромерную молекулу цилиндрической формы размером 145 Å в высоту и 135 Å в диаметре. Неправильно свернутый белок попадает в пространство цилиндра GroEL/ES – центральный канал диаметром ~45 Å, в котором создаются оптимальные условия для сворачивания белковой молекулы. Для экспериментов по коэкспрессии был использован экспрессионный вектор pACYC-TF-GroEL/ES [10]. Уровень биосинтеза SUMO-*nnH3H* в условиях коэкспрессии снизился до 1 г/л, однако ~30% целевого продукта находилось в растворимой форме.

Выделение SUMO-*nnH3H* из клеток *E. coli*. Для предотвращения агрегации целевого белка клеточную биомассу лизировали в буферном растворе, содержащем 300 мМ аргинина или 2 М мочевины или 1 М гидрохлорида гуанидина. Как видно из электрофореграммы (рис. 4а), добавление хаотропных агентов по-разному влияло на эффективность выделения и очистки. Показано значительное различие в поведении молекулы белка при адсорбции на сорбенте Ni-sepharose HP. Использование аргинина не только способствовало повышению динамической емкости сор-

бента, но также препятствовало неспецифическому связыванию. Для предотвращения неспецифического связывания с сорбентом хроматографию проводили в условиях перегрузки колонки. В результате за одну стадию хроматографической очистки удалось получить препарат целевого фермента с чистотой >95%, которая удовлетворяет требованиям к чистоте препаратов для структурных исследований. Стоит отметить, что лизаты, полученные на буферных растворах с добавлением гидрохлорида гуанидина или мочевины, имели активность, соответственно, в 20 и 10 раз меньше по сравнению с лизатом, содержащим аргинин.

Следующим шагом стало отщепление SUMO от *nnH3H* при помощи протеазы Ulp1 [11]. В ходе экспериментов по подбору условий гидролиза SUMO были проанализированы различные соотношения фермента и субстрата (от 1 : 1 до 1 : 10000), разное время реакции (0.5–48 ч), температура (4–37°C) и pH (7.0–8.5). Также было проанализировано влияние различных компонентов на эффективность расщепления: аргинина (0.05–1 М), мочевины (0.1–2 М), тритона X100 (0.01–0.5%), CHAPS (5–50 мМ), дитиотреитола (0.1–5 мМ), триметиламиноксида (0.1–0.5 М), KCl (50–200 мМ) и гиспидина (0.5–10 мкМ). Тем не менее получить гиспидин-3-гидроксилазу грибов без белка-партнера SUMO не удалось. Объяснений данно-

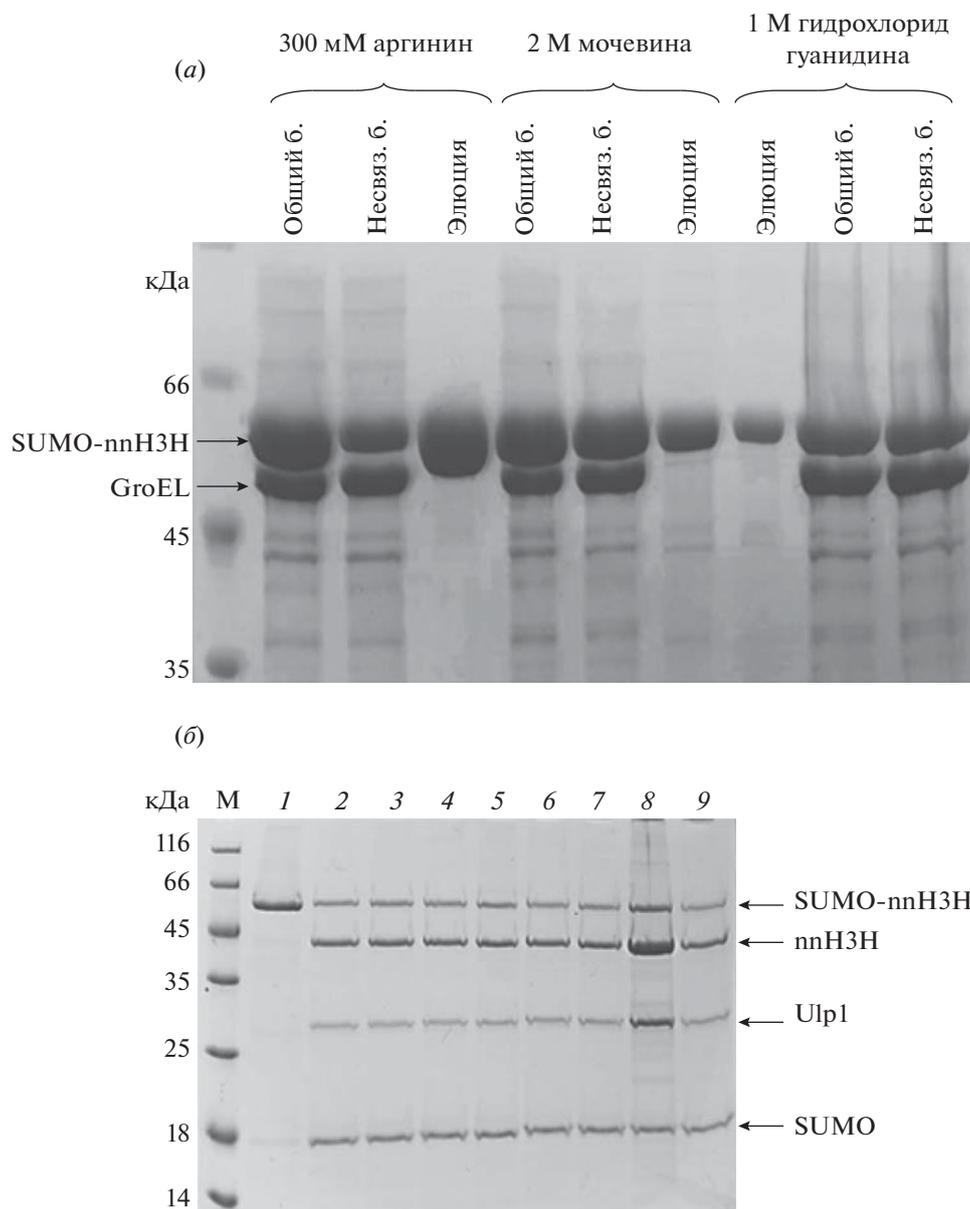


Рис. 4. (а) – Выделение SUMO-nnH3N из клеток *E. coli* BL21(DE3), трансформированных векторами pCOLDIII-His₆-SUMO-nnH3N и pACYC-TF-GroEL/ES, в присутствии 300 мМ аргинина, 2 М мочевины и 1 М гидрохлорида гуанидина. Общий б. – общий растворимый белок; Несвяз. б. – фракция белков, не связавшихся с сорбентом; Элюция – элюированный белок; (б) – расщепление очищенного SUMO-nnH3N (в 50 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 150 мМ NaCl, 50 мМ аргинин, 20 мМ имидазол). М – маркер; 1 – очищенный SUMO-nnH3N; 2–9 – образцы после расщепления (1 ч, комнатная температура) в условиях добавления 0.5 мМ DTT (2), 2 мМ DTT (3), 0.2% IGEPAL (4), 0.4% IGEPAL (5), 0.5 М аргинина (6), 1 М аргинина (7), 5% глицерина (8) и 10% глицерина (9).

му явлению может быть несколько. Во-первых, nnH3N оказался склонным к агрегации, и после добавления протеазы Ulp1 часть фермента выпадала в осадок (данные не представлены). Также отщепление SUMO от гибридного белка может быть затруднено стерической недоступностью сайта. Чтобы проверить эту гипотезу, была создана генетическая конструкция, в которой между белком-партнером и ферментом был вставлен

гибкий линкер GSG₄SG₄. Также ген *nnh3h* в этой конструкции был укорочен с N- и C-концов, т.к. по данным молекулярного моделирования структуры гиспидин-3-гидроксилазы первые и последние 5 а.о. не влияют на структурные особенности целевой молекулы. Введение дополнительного линкера не повлияло на схему наработки, выделения и очистки фермента. Негативного влияния на активность не наблюдалось, однако эффектив-

ность расщепления также не изменилась. Расщепление очищенного SUMO-*nnH3H* было возможно лишь при значительном разведении целевого белка до концентрации 0.1–0.2 мг/мл и использовании относительно высокого количества протеазы Ulp1 (1 : 5 – 1 : 10). Расщепление протекало в течение 1 ч. Любая попытка масштабировать протокол заканчивались выпадением весомой части целевого белка в осадок (рис. 4б). Активность протеазы Ulp1 была подтверждена расщеплением модельного гибрида SUMO-DTX (данные не представлены).

Полученный рекомбинантный фермент *nnH3H* в виде гибрида с белком-партнером SUMO – функционально активный и пригодный для проведения структурных исследований. Имеющиеся в литературе данные позволяют предположить, что разница в молекулярных массах и наличие SUMO не будут препятствовать проведению таких исследований [8]. В результате выделения и очистки, которая включала в себя металл-хелатную аффинную хроматографию, мы получили очищенный фермент с выходом ~20 мг со 100 мл бактериальной культуры.

Оценка функциональной активности очищенного рекомбинантного фермента SUMO-*nnH3H*. Помимо гетерологичной экспрессии гена *nnh3h*, важной задачей стала оценка функциональной активности полученного фермента. Нами был разработан протокол, основанный на люциферин-люциферазной реакции грибов. При добавлении фермента к раствору гиспидина (предшественника люциферина, рис. 1) и NAD(P)H протекает реакция гидроксирования субстрата с образованием люциферина. Последний, в свою очередь, можно идентифицировать при помощи люциферазы *N. nambii* по эмиссии квантов света. Разработанный биолюминесцентный метод – чувствительный и позволяет быстро осуществить оценку активности фермента *nnH3H*.

Оказалось, что при выделении и очистке гибридного белка SUMO-*nnH3H* активность фермента существенно снижается. Мы предположили, что это происходит из-за диссоциации определенных кофакторов из молекулы активного фермента. Данными кофакторами, вероятнее всего, не выступают катионы двухвалентных металлов, т.к. фермент сохраняет аналогичную активность в буферном растворе, содержащем 10 мМ ЭДТА. При сравнении аминокислотных последовательностей с гомологами можно отметить, что *nnH3H* с большей долей вероятности имеет сайты связывания с FAD. Сам фермент относится к семейству NAD(P)H-зависимых монооксигеназ, катализирующих реакцию: $\text{NAD(P)H} + \text{R-H} + \text{O}_2 \rightarrow \text{NAD(P)}^+ + \text{R-OH} + \text{H}_2\text{O}$, а также он, вероятнее всего, относится к семейству РНВН-подобных гидроксилаз, таких как *p*-гид-

роксibenзоатгидроксилаза *Pseudomonas fluorescens* (UniProt: P00438), монооксигеназа *Pseudomonas aeruginosa* (UniProt: Q9HWG9) и дигидропиридин-гидроксилаза *Paenarthrobacter nicotinovorans* (UniProt: Q93NG3). С помощью биоинформатического анализа последовательности *nnH3H* были предсказаны предположительные сайты связывания FAD, помимо сайтов связывания с NAD(P)H. Действительно, оказалось, что добавление FAD на несколько порядков повышает активность фермента, в отличие от его флавиновых предшественников (рис. 5).

Чтобы оценить специфичность взаимодействия FAD и SUMO-*nnH3H*, мы определили константу диссоциации (K_d) этого комплекса. Исследование проводили по методу, предложенному Loomans et al. (табл. 2) [12]. По нашим оценкам, K_d для FAD составляет ~0.78 мкМ. Таким образом, мы впервые показали, что молекула FAD не только связывается с молекулой фермента, но и важна для его активности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы *E. coli*. Для создания генетических конструкций использовали штамм *E. coli* XL1-Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [*F'**proAB lacI^qZΔM15 Tn10* (Tet^r)] (Stratagene, США), для бактериальной экспрессии гена *nnh3h* – штамм BL21(DE3) [*F*⁻ *ompT hsdS_B(rB⁻ mB⁻) gal dem* (DE3)] (Novagen, США).

Конструирование экспрессионных векторов для получения белка *nnH3H*. Приготовление компетентных клеток и трансформацию *E. coli*, выделение плазмидной ДНК, гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции, лигирование и другие генно-инженерные манипуляции проводили согласно стандартным методикам [13]. Химический синтез небольших фрагментов дцДНК, олигонуклеотидов, а также контрольное секвенирование полученных конструкций проведены ЗАО “Евроген” (Россия). Создание генетической конструкции с последовательностью гена *nnh3h* было описано в предыдущей работе [4]. Для получения экспрессионных векторов с целью продукции целевого фермента в бактериях использовали плазмиды pET39b(+) (Novagen, США) и pCOLDIII (Takara Bio, Япония). Для создания генетических конструкций His₆-Flag-*nnH3H*, HELIX-His₆-Flag-*nnH3H*, DsbA-His₆-Flag-*nnH3H* и NSP4-His₆-Flag-*nnH3H* амплификацию гена *nnh3h* производили с использованием 3–4 олигонуклеотидов (табл. 3) методом step-out ПЦР. Для создания конструкции His₆-Flag-*nnH3H* были использованы олигонуклеотиды, последовательности которых приведены в табл. 3.

Полученные фрагменты ДНК клонировали в вектор pET39b(+), pCOLDIII по двум сайтам ре-

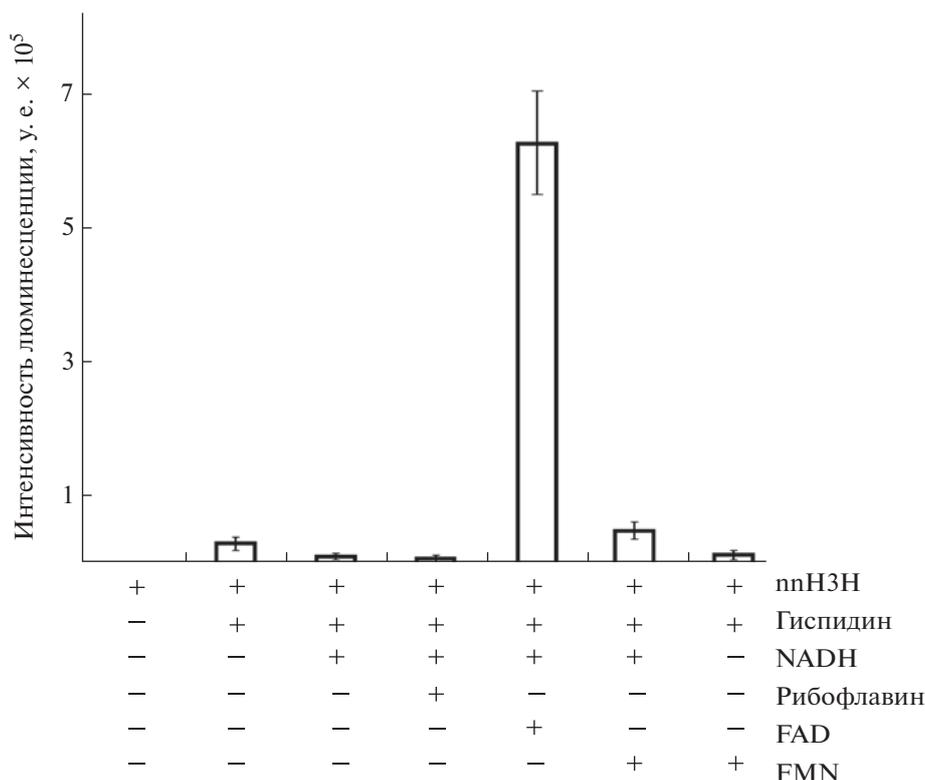


Рис. 5. Определение влияния кофактора FAD и его флавиновых предшественников на активность гиспидин-3-гидроксилазы *N. nambi* путем измерения биолюминесценции сопряженной реакции в присутствии люциферазы *N. nambi*, гиспидина и NADH.

стрикции (XbaI и HindIII). Для создания конструкций His₆-SUMO-nnH3N и His₆-TrxA-Flag-nnH3N проводили отжиг частично комплементарных ПЦР-продуктов, их амплификацию и вставку в вектор по двум сайтам рестрикции (XbaI и HindIII). Для создания конструкций His₆-SUMO-nnH3N использовали олигонуклеотиды His-Sumo XbaI, Sumo-partH3N rev, H3N-partSumo dir, для

конструкции His₆-TrxA-Flag-nnH3N – His-Trx XbaI dir, Trx-flag rev, flag-H3N dir (табл. 3). Для создания всех конструкций использовали олигонуклеотид H3N HindIII rev (табл. 3).

Оценка уровня экспрессии гена *nnh3h* в клетках *E. coli*. Трансформацию бактериальных клеток *E. coli* для синтеза белка проводили согласно стандартному протоколу [14], затем добавляли

Таблица 2. Результаты измерения интенсивности биолюминесценции, использованные для расчета константы диссоциации комплекса FAD–SUMO–nnH3N

Интенсивность свечения, ед.	Концентрация FAD, мкМ						
	0	0.0333	0.3333	3.333	16.667	33.333	83.333
Без разведения SUMO-nnH3N (<i>n</i> = 1 для оценки <i>K_d</i>)	101	2954	13212	38494	118121	129877	133289
	118	3120	12876	41198	115736	132816	134783
	143	3016	13561	40182	115967	129765	134536
	121 ± 21	3030 ± 84	13216.3 ± 343	39958 ± 1366	116608 ± 1315	130819 ± 1730	134203 ± 801
При 4-кратном разведении (<i>n</i> = 4 для оценки <i>K_d</i>)	123	1923	6441	14573	68820	76465	78746
	129	1753	6262	15001	67121	75983	77391
	156	1801	6495	14323	68191	76010	78425
	136 ± 18	1826 ± 88	6399 ± 122	14632 ± 343	68044 ± 859	76153 ± 271	78187 ± 708

Примечание: представлены данные трех независимых экспериментов и средние значения ± s.d.

Таблица 3. Последовательности олигонуклеотидов, используемых при создании экспрессионных векторов для получения гиспидин-3-гидроксилазы

Название конструкции	Название олигонуклеотида	Последовательность олигонуклеотида (5'–3')
pCOLDIII_His ₆ -Flag-nnH3H, pET39b_His ₆ -Flag-nnH3H	His-Flag-H3H dir1	GGTTCCGACTACAAAGACGATGACGATAAAGCATCGTTTGAGAATTCTCTAAG
	His-Flag-H3H XbaI dir2	ATGCTCTAGAGAAGGAGATATACATATGGGCCACCATCATCACCACCATGGTCCGACTACAAAGACGAT
pCOLDIII_DsbA-His ₆ -Flag-nnH3H, pET39b_DsbA-His ₆ -Flag-nnH3H	His-flag-H3H dir1	CACCACCATGGTTCCGACTACAAAGACGATGACGATAAAGCATCGTTTGAGAATTCTCTAAG
	DsbA-His-flag-H3H dir2	TGGCTGGTTTAGTTTTAGCGTTTAGCGCATCGGCGGCGGGCCACCATCATCACCATGGTTCCGACTA
	DsbA-His-flag-H3H XbaI dir3	ATGCTCTAGAGAAGGAGATATACATATGAAAAAGATTTGGCTGGCGCTGGCTGGTTTAGTTTTAGCGTT
pCOLDIII_NSP4-His ₆ -Flag-nnH3H, pET39b_NSP4-His ₆ -Flag-nnH3H	His-flag-H3H dir1	CACCACCATGGTTCCGACTACAAAGACGATGACGATAAAGCATCGTTTGAGAATTCTCTAAG
	Nsp4-His-flag-H3H dir2	GTCTGCTGCTCCTCGCTGCCAGCCGGCGATGGCGGCGGGCCACCATCATCACCATGGTTCCGACTA
	Nsp4-His-flag-H3H XbaI dir3	ATGCTCTAGAGAAGGAGATATACATATGAAAAAGATTACCGCTGCGGCGGGTCTGCTGCTCCTCGCTGC
pCOLDIII_His ₆ -SUMO-nnH3H, pET39b_His ₆ -SUMO-nnH3H	His-Sumo XbaI dir	ATGCTCTAGAGAAGGAGATATACATATGGGCCACCATCATCACCACCATGGTCCGATTCTGAAGTGAACCAG
	Sumo-partH3H rev	ACGATGCGCCACCAATCTGCTCACGG
	H3H-partSumo dir	ATTGGTGGCGCATCGTTTGAGAATTCCTAAG
pCOLDIII_His ₆ -TrxA-Flag-nnH3H, pET39b_His ₆ -TrxA-Flag-nnH3H	His-Trx XbaI dir	ATGCTCTAGAGAAGGAGATATACATATGGGTCACCATCACCATCACCACGGTAGCGATAAAATTATTCACCTGACT
	Trx-flag rev	TCATCGTCTTTGTAGTCGGAACCGGC-CAGGTTAGCGTTCGAGG
	flag-H3H dir	CGACTACAAAGACGATGACGATAAAGCATCGTTTGAGAATTCTCTAAG
Для всех конструкций	H3H HindIII rev	GCATAAGCTTATTAGGCAGAATTAGAGCTTCTTAGGAGCGTCTCGAGAAC

раствор ИПТГ до конечных концентраций 0, 0.01, 0.05, 0.25 и 1 мМ. Клетки выращивали при температуре 10–37°C в течение 1–3 сут. Содержание целевого белка анализировали методами электрофореза по Лэммли [15] и дот-иммуноблоттинга [16], используя моноклональные антитела мыши

против полигистидинового тэга, конъюгированные с пероксидазой хрена (A7058, Sigma, США). Анализируемые образцы наносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C (Cytiva, Швеция). Мембрану высушивали на воздухе и блокировали 5%-ным раствором сухого обезжиренного молока

в TBS-Tween 80 в течение 1 ч. Мембрану инкубировали с моноклональными антителами к гистициновою тэгу, конъюгированными с пероксидазой хрена, в разведении 1 : 1000 (A7058, Sigma, США). Визуализацию проводили с помощью готового хромогенного субстрата для мембран (T0565, Sigma, США). Денситометрический анализ мембраны осуществляли при помощи программы ImageJ (www.imagej.net).

Фракционирование белков из клеток *E. coli*.

Биомассу *E. coli*, собранную с 1 мл культуры, размораживали и суспендировали в 500 мкл лизирующего буфера (50 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 250 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 0.5% Тритона X-100). Суспензию переносили в пробирки (2 мл), добавляли 5 мкл раствора лизоцима (10 мг/мл) и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем добавляли PMSF до концентрации 0.5 мМ. Образец трижды обрабатывали ультразвуком в течение 3–5 с, перерыв между циклами 2–3 мин. Во время всего процесса пробирки находились во льду. Обработанный образец затем центрифугировали в течение 10 мин при 12000 g и 4°C. Супернатант (растворимый белок) отбирали в отдельную пробирку. Для получения раствора белка из телец включения осадок растворяли в 500 мкл TES-буфера (100 мМ Трис-НСl, рН 6.8, 1% SDS, 10 мМ ЭДТА). Фракцию периплазматических белков получали согласно методике Goffin et al. [17]. Локализацию целевого белка оценивали методом денатурирующего гель-электрофореза по методу Лэммли (12%-ный разделяющий и 8%-ный формирующий гели) [15].

Выделение целевого фермента из клеток *E. coli*.

Среду TBP объемом 100 мл, содержащую ампициллин (200 мкг/мл) и хлорамфеникол (140 мкг/мл), инокулировали 50 колониями штамма *E. coli* BL21(DE3), трансформированного векторами pCOLDIII-His₆-SUMO-nnH3N и pACYC-TF-GroEL/ES. Культуру выращивали при 37°C, 300 об/мин в течение 2–4 ч до достижения OD_{550} 1.0–1.5. Затем добавляли ИПТГ до конечной концентрации 0.05 мМ и снижали температуру культивирования до 15°C. Индукцию проводили в течение 24 ч. Биомассу отделяли с помощью центрифугирования при 8000 g в течение 5 мин, после чего осадок суспендировали в 25 мл лизирующего буфера (100 мМ KPi, рН 7.5, 300 мМ NaCl, 20 мМ имидазол, 300 мМ аргинин, 0.5 мМ 2-меркаптоэтанол) и разрушали при помощи ультразвука (5 циклов по 30 с, перерывы по 2 мин). После разрушения в полученный лизат добавляли 0.1% (V/V) полиэтиленimina для удаления ДНК и центрифугировали в течение 25 мин при 12000 g. Супернатант разводили в 2 раза водой Milli-Q, пропускали через фильтр с диаметром пор 0.22 мкм и наносили на колонку HiTrap Ni-sepharose HP (Cytiva, Швеция) объемом 5 мл, пред-

варительно уравновешенную буфером А (50 мМ KPi, рН 7.5, 200 мМ NaCl, 10 мМ имидазол, 150 мМ аргинин). Затем осуществляли промывку сначала буфером А (не менее трех объемов сорбента), а затем буфером В: 50 мМ KPi, рН 7.5, 200 мМ NaCl, 40 мМ имидазол (не менее трех объемов сорбента). Элюцию проводили буфером С (50 мМ KPi, рН 7.5, 200 мМ NaCl, 200 мМ имидазол). Элюат переводили в буферный раствор (50 мМ KPi, рН 7.5, 200 мМ NaCl) на колонке PD10 (Cytiva, Швеция), содержащей сорбент Сефадекс G25 (Cytiva, Швеция), и использовали для проведения тестов на активность.

Определение активности nnH3N. Все стоковые растворы компонентов для измерения активности были приготовлены непосредственно перед экспериментом и находились во льду: 0.2 мМ гиспидин, 0.5 мМ FAD и 10 мМ NADPH в 10 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7.5), 2%-ный раствор додецилмальтозида (DDM). Раствор nnH3N стандартизировали по концентрации белка методом Бредфорда до концентрации 0.1 мг/мл. Реакционная смесь для гидроксирования гиспидина содержала 1 мкл раствора фермента, 10 мкМ гиспидин, 500 мкМ NADPH, 25 мкМ FAD. Объем реакции доводили до 10 мкл при помощи 10 мМ калий-фосфатного буфера, рН 7.5. Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 10 мин. Концентрацию образовавшегося 3-гидроксигиспидина оценивали по интенсивности свечения, используя рекомбинантную люциферазу *N. nambi*. Для данных целей 10 мкл мембранной фракции, содержащей люциферазу, сольубилизировали в 10 мкл 2% DDM и добавляли 80 мкл 10 мМ калий-фосфатного буфера, рН 7.0. Затем 20 мкл раствора люциферазы добавляли к 10 мкл реакционной смеси для гидроксирования гиспидина и сразу же проводили измерение интенсивности биолюминесценции на планшетном ридере CLARIOstar (BMG Labtech, Германия) в спектральном диапазоне 500 ± 50 нм. В качестве положительного контроля использовали очищенный препарат 3-гидроксигиспидина (люциферин грибов – субстрат люциферазы) в эквивалентной концентрации [18]. В качестве отрицательного контроля вместо раствора nnH3N использовали раствор бычьего сывороточного альбумина с концентрацией 0.1 мг/мл. K_d для FAD определяли по методу Loomans et al. [11]. Все эксперименты по определению активности проводили в 3–5 независимых повторах.

Методика расчета константы диссоциации SUMO-nnH3N и FAD. Специфичность взаимодействия FAD и SUMO-nnH3N определяли путем оценки K_d комплекса. Исследование проводили в 96-луночных планшетах по методу, предложенному Loomans et al. [12]. Равновесие в системе FAD–SUMO-nnH3N в случае нековалентного бимоле-

кулярного взаимодействия можно описать с помощью закона действующих масс:

$$K_a = \frac{[ES]}{[E][S]}; \begin{cases} [E] = [E]_0 - [ES] \\ [S] = [S]_0 - [ES], \end{cases}$$

где E – исследуемый фермент; S – кофактор; ES – их комплекс; $[E]$, $[S]$ – равновесные концентрации фермента и кофактора в системе; $[E]_0$, $[S]_0$ – начальные концентрации фермента и кофактора.

При условии, что с SUMO-nnH3N связалось количество FAD, равное половине максимального, и подставляя все найденные значения, приходим к выражению для константы аффинности (K_a):

$$\begin{cases} [S] = \frac{[S]_{\max}}{2} \\ [ES] = \frac{[E]_0}{2} \Rightarrow K_a = \frac{2}{2[S] - [E]_0} \\ K_a = \frac{[ES]}{([E]_0 - [ES])([S]_0 - [ES])}. \end{cases}$$

При этом зависимость активности фермента, прямо пропорциональная количеству образовавшегося гиспидина, а значит, и интенсивности биолюминесценции, от концентрации кофактора будет иметь характерную сигмовидную форму. При заданных сериях разведений фермента E , E_1 , E_2 , ..., E_n константа реакции не будет зависеть от его концентрации и легко выражается в следующее тождество:

$$\begin{cases} K_a = \frac{2}{2[S] - [E]_0} \\ K_a = \frac{2}{2[S_n] - n[E]_0} \end{cases} \Rightarrow [R]_0 = \frac{2n([S] - [S_n])}{n-1} \Rightarrow K_a = \frac{n-1}{n[S_n] - [S]}$$

С учетом того, что K_d – обратная величина K_a , получаем:

$$K_d = \frac{n[S_n] - [S]}{n-1},$$

где n – заданное разведение фермента; $[S]$ и $[S_n]$ – концентрации связанного лиганда при интенсивности биолюминесценции, равной половине максимальной, мкМ.

В ходе выполнения данной работы были подобраны оптимальное разведение, которое составило 4, и концентрация FAD – 0–80 мкМ (табл. 2). Далее зависимость связывания анализировали при помощи программы SigmaPlot (<http://www.sigmaplot.co.uk/>) и определяли концентрации FAD при интенсивности

биолюминесценции, равной половине максимальной. Для образца без разведения концентрация FAD составила 12.18 мкМ, а для разведения в 4 раза – 3.63 мкМ. Таким образом, оценочное значение K_d составляет $(4 \times 3.63 - 12.18)/3 = 0.78$ мкМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что гиспидин-3-гидроксилаза тропического гриба *Neonothopanus nambi* может эффективно нарабатываться в клетках *E. coli* в виде гибрида с белком-партнером SUMO в функционально активном состоянии. При оптимизации условий культивирования и коэкспрессии с геном шаперона GroEL/ES удалось достичь уровня биосинтеза ~1 г/л, причем ~30% целевого продукта находились в растворимой форме. Очищенный гибридный белок проявляет свою специфическую активность в отношении гиспидина. Оказалось, что добавление FAD на несколько порядков увеличивает активность фермента, в отличие от его флавиновых предшественников. По нашим оценкам, K_d для FAD составляет ~0.78 мкМ. Более того, мы впервые показали, что молекула FAD не только связывается с молекулой фермента в качестве кофактора, но и выступает субстратом.

Полученные результаты – важный шаг на пути изучения биохимических и структурных особенностей гидроксилаз данного семейства, а также механизмов биолюминесценции.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование проведено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-34-20134) и гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации № НШ-2605.2020.4.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов данной работы, с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

И.В. Ямпольский – учредитель ООО “Планта”. Компания “Планта” подала заявки на патенты, связанные с использованием компонентов биолюминесцентной системы грибов.

А.С. Герасимов, С.О. Рогожкин, Е.С. Шахова, Т.В. Чепурных, А.Ю. Гороховатский, Н.М. Мышкина и А.В. Балакирева заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kaskova Z.M., Tsarkova A.S., Yampolsky I.V. // Chem. Soc. Rev. 2016. V. 45. P. 6048–6077. <https://doi.org/10.1039/C6CS00296J>
2. Oba Y., Stevani C.V., Oliveira A.G., Tsarkova A.S., Chepurnykh T.V., Yampolsky I.V. // Photochem. Photobiol. 2017. V. 93. P. 405–415. <https://doi.org/10.1111/php.12704>
3. Kotlobay A.A., Sarkisyan K.S., Mokrushina Y.A., Marcet-Houben M., Serebrovskaya E.O., Markina N.M., Somermeyer L.G., Gorokhovatsky A.Y., Vvedensky A., Purtov K.V., Petushkov V.N., Rodionova N.S., Chepurnykh T.V., Fakhranurova L.I., Guglya E.B., Ziganshin R., Tsarkova A.S., Kaskova Z.M., Shender V., Abakumov M., Abakumova T.O., Povolotskaya I.S., Eroshkin F.M., Zarskiy A.G., Mishin A.S., Dolgov S.V., Mitouchkina T.Y., Kopantzev E.P., Waldenmaier H.E., Oliveira A.G., Oba Y., Barsova E., Bogdanova E.A., Gabaldón T., Stevani C.V., Lukyanov S., Smirnov I.V., Gitelson J.I., Kondrashov F.A., Yampolsky I.V. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2018. V. 115. P. 12728–12732. <https://doi.org/10.1073/pnas.1803615115>
4. Medvedev K.E., Kinch L.N., Schaeffer R.D., Grishin N.V. // PLoS Comput. Biol. 2019. V. 15. P. e1007569. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007569>
5. Rosano G.L., Ceccarelli E.A. // Front. Microbiol. 2014. V. 5. P. 172. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
6. McCoy J., Lavallie E. // Curr. Protoc. Mol. Biol. 2001. Chapter 16. Unit 16.8. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1608s28>
7. Zhang W., Lu J., Zhang S., Liu L., Pang X., Lv J. // Microb. Cell Fact. 2018. V. 17. P. 50. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0894-y>
8. Butt T.R., Edavettal S.C., Hall J.P., Mattern M.R. // Protein Expr. Purif. 2005. V. 43. P. 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.03.016>
9. Kobayashi H., Yoshida T., Inouye M. // Appl. Environ. Microbiol. 2009. V. 75. P. 5356–5362. <https://doi.org/10.1128/AEM.00691-09>
10. Lamppa J.W., Tanyos S.A., Griswold K.E. // J. Biotechnol. 2013. V. 164. P. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.11.007>
11. Mossessova E., Lima C.D. // Mol. Cell. 2000. V. 5. P. 865–876. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80326-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80326-3)
12. Loomans E.E., Roelen A.J., Van Damme H.S., Bloemers H.P., Gribnau T.C., Schielen W.J. // J. Immunol. Methods. 1995. V. 184. P. 207–217. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(95\)00089-s](https://doi.org/10.1016/0022-1759(95)00089-s)
13. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. // Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 4th edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
14. Kurien B.T., Scofield R.H. // Biotechniques. 1995. V. 18. P. 1023–1026.
15. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
16. Zeder-Lutz G., Cherouati N., Reinhart C., Pattus F., Wagner R. // Protein Expr. Purif. 2006. V. 50. P. 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2006.05.017>
17. Goffin P., Dewerchin M., De Rop P., Blais N., Dehottay P. // Biotechnol. J. 2017. V. 12. <https://doi.org/10.1002/biot.201700168>
18. Bubyrev A.I., Tsarkova A.S., Kaskova Z.M. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 183–185. <https://doi.org/10.1134/S106816201902002X>

Recombinant Production of Hispidin-3-Hydroxylase – the Key Enzyme in Fungal Luciferin Biosynthesis

A. S. Gerasimov*, **, #, S. O. Rogozhkin**, E. S. Shakhova*, T. V. Chepurnykh*, A. Y. Gorokhovatsky*, N. M. Myshkina*, A. V. Balakireva*, and I. V. Yampolsky*

#Phone: +7 (912) 724-15-43; e-mail: asgerasimoff@mail.ru

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

**Vyatka State University, ul. Moskovskaya 36, Kirov, 610000 Russia

Bioluminescence is a phenomenon of light emission resulting from oxidation of a substrate, luciferin, catalyzed by an enzyme – luciferase. The fungus *Neonothopanus nambi* is the first eukaryotic organism with the fully deciphered bioluminescent system: the structure of luciferin was established, luciferase gene was described, and intermediates and enzymes involved in the luciferin biosynthesis pathway were identified. One of the crucial reactions in this pathway is the formation of luciferin by hydroxylation of hispidin catalyzed by hispidin-3-hydroxylase (nnH3H). To fully understand the mechanism of action and substrate specificity of the enzyme, it is necessary to carry out structural studies of the molecule. To do that, it is necessary to develop a protocol for obtaining a highly purified and functionally active nnH3H in the appropriate quantities. We describe a robust approach to produce a soluble and enzymatically active nnH3H fused with SUMO and co-expressed with GroEL/ES chaperonin at low temperature in *Escherichia coli*. The yield of recombinant nnH3H achieved was 20 mg per 100 mL of bacterial culture. Additionally, we show for the first time that FAD is a cofactor of fungal hispidin-3-hydroxylase.

Keywords: bioluminescence, hispidin-3-hydroxylase, heterologous gene expression, fusion protein, dot-blot, enzyme activity