

УДК 577.34

РАЦИОНАЛЬНЫЙ ДИЗАЙН И МУТАГЕНЕЗ ЛЮЦИФЕРАЗЫ ГРИБА *Neonothopanus nambi*

© 2021 г. К. А. Береговая¹, Н. М. Мышкина¹, Т. В. Чепурных¹, А. А. Котлобай¹, К. В. Пуртов^{2,*},
В. Н. Петушков², Н. С. Родионова², И. В. Ямпольский¹

Представлено академиком РАН И.И. Гительзоном

Поступило 28.08.2020 г.

После доработки 09.09.2020 г.

Принято к публикации 11.09.2020 г.

Недавно изученная биолюминесцентная система грибов имеет большой потенциал для создания на ее основе высокоэффективных инструментов для биомедицинских исследований. Ключевым компонентом этой системы является фермент люцифераза. Люцифераза гриба *Neonothopanus nambi* относится к новому, еще не описанному, семейству белков. Данные по структурной организации этого фермента практически отсутствуют. Детальное изучение свойств люциферазы *N. nambi* необходимо для усовершенствования методов детекции, основанных на использовании биолюминесцентной системы грибов. В данной работе, с помощью биоинформатических методов анализа и экспериментальных подходов, установлены положения некоторых ключевых аминокислотных остатков, влияющих на функциональность изучаемого фермента. Полученные данные полезны для дальнейших работ по установлению пространственной структуры люциферазы гриба *N. nambi*.

Ключевые слова: биолюминесценция, люцифераза, *Neonothopanus nambi*, рациональный дизайн

DOI: 10.31857/S2686738921010054

Разнообразные биолюминесцентные системы находят широкое применение в различных областях биологии и медицины, а люциферин-люциферазная реакция лежит в основе множества аналитических методов, применяемых *in vivo* и *in vitro* [1–3]. Несмотря на то что явление биолюминесценции изучается достаточно давно, далеко не все варианты механизмов, лежащих в ее основе, уже описаны. На сегодняшний день путь биосинтеза люциферина из стандартных клеточных метаболитов полностью изучен только для систем морских бактерий и высших грибов порядка *Agaricales* (более 80 видов) [4–7]. Биолюминесцентная система грибов описана недавно, однако возможность ее применения для анализа в различных гетерологических системах уже доказана экспериментально. Так, она послужила основой для создания автономно биолюминесцирующих дрожжей, клеток млекопитающих и растений [5, 8].

Ключевым ферментом для процесса биолюминесценции грибов является люцифераза, которая катализирует окисление люциферина грибов (3-гидроксигиспидина) кислородом. Процесс сопровождается выделением кванта света. Люцифераза гриба *Neonothopanus nambi* (nnLuz) относится к новому семейству белков, представители которого также были найдены в геномах других видов светящихся грибов. Изучение строения и свойств nnLuz позволит усовершенствовать инструментарий на основе биолюминесцентной системы грибов и расширить область ее применения в биомедицинских исследованиях.

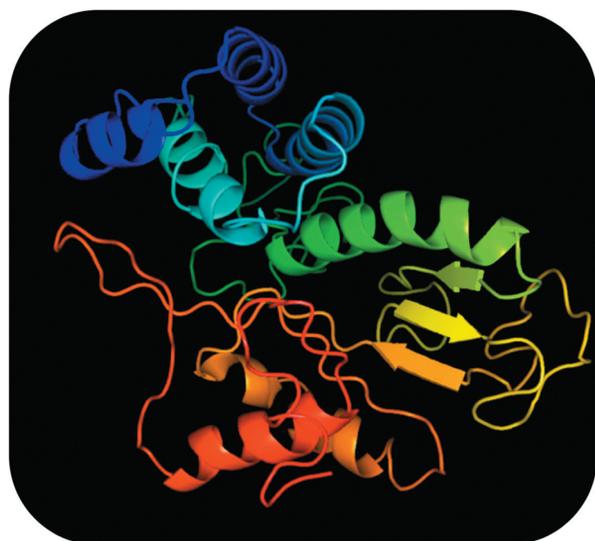
Биоинформатические ресурсы, использующие различные базы данных, могут предсказать пространственную организацию люциферазы грибов, однако отсутствие охарактеризованных гомологов nnLuz снижает достоверность таких предсказаний. Исследования структуры люциферазы гриба *N. nambi* при помощи программного обеспечения TMHMM-server и I-TASSER предсказывают наличие 6 α -спиралей и 6 β -слоев в изучаемом белке (рис. 1).

Кроме того, согласно полученным данным, протяженный α -спиральный участок на N-конце изучаемого белка длиной в 40 аминокислотных остатков предположительно является трансмем-

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия

² Институт биофизики Федерального исследовательского центра «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», Красноярск, Россия

*e-mail: purtovk@mail.ru



C-score = -4.72
 Estimated TM-score = 0.30 ± 0.09
 Estimated RMSD = $15.5 \pm 3.3 \text{ \AA}$

Рис. 1. Предсказание пространственной структуры люциферазы *N. nambi* (I-TASSER).

бранным. Биоинформатические предсказания пространственной структуры белков нуждаются в экспериментальной проверке, однако определение структуры белков, связанных с мембраной методами кристаллографии и ЯМР-спектроскопии, является сложной задачей. Получение функционального фрагмента люциферазы *N. nambi*, лишённого предсказанного трансмембранного домена, позволило бы упростить структурный анализ. Для решения этой задачи мутантные формы *nnLuz*, не содержащие первых 6, 9, 12, 15, 21, 25, 28, 31, 34, 37 и 40 N-концевых аминокислотных остатков, получали методом ПЦР для последующего клонирования в вектор pET-23b, который затем использовали для трансформации клеток *E. coli* штамма BL21-CodonPlus.

Биолюминесцентный анализ лизатов клеток бактерий, несущих указанные мутантные гены, показал, что функциональность люциферазы грибов сохраняется при отсутствии части N-концевых аминокислотных остатков, вплоть до 37. Пример такого анализа можно видеть на рис. 2.

Биолюминесцентный анализ мутантных форм люциферазы *N. nambi*, полученных методом случайного мутагенеза, показал, что замены аминокислот V49R, D127N, R136Q, S144T/R, D173N, R176Q/P, E237K/Q, E238K/R приводят к нарушению функционирования фермента и, вероятно, играют ключевую роль в процессе катализа. Данные мутанты были получены в условиях повышенного содержания ионов марганца (640 мкМ) и неравных концентраций нуклеотид-3-фосфа-

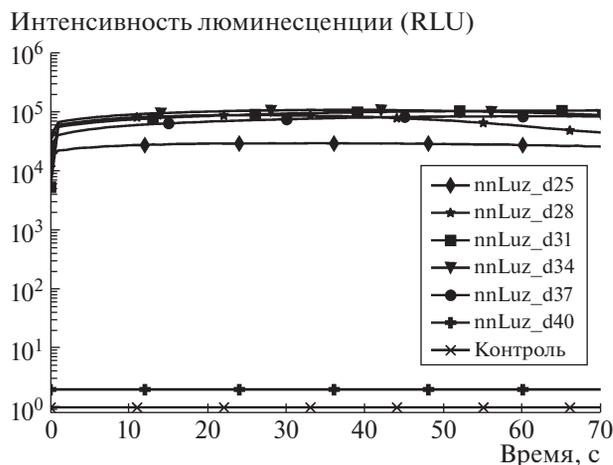


Рис. 2. Анализ биолюминесценции лизатов клеток бактерий, несущих гены мутантных форм *nnLuz*, не содержащих первых 25, 28, 31, 34, 37 и 40 N-концевых аминокислотных остатков. В качестве отрицательного контроля был использован лизат не трансформированных клеток *E. coli* штамма BL21-CodonPlus.

тов (dATP – 200 мкМ, dGTP – 400 мкМ, dTTP – 1 мМ, dCTP – 1 мМ). Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей описанных люцифераз высших грибов с помощью ресурса Uniprot демонстрирует наличие консервативных участков, общих для всех белков данного семейства (рис. 3), при этом данные консервативные участки включают в себя некоторые указанные выше положения (R136, D173, R176, E237, E238). Согласно описанному ранее механизму биолюминесцентной реакции грибов [9], субстрат сначала депротонируется в процессе основного катализа и только потом вступает в реакцию с кислородом.

Как правило, в процессе такого катализа ключевую роль играют заряженные аминокислотные остатки лизина, гистидина, аспартата или глутамата, поэтому нельзя исключить, что аминокислотные остатки в положениях R136, D173, R176, E237, E238 входят в состав активного центра люциферазы. Для оценки роли конкретных аминокислотных остатков для структуры и функционирования *nnLuz* было решено использовать методику аланинового скрининга, подразумевающую замену аминокислотных остатков в определенных положениях на аланин.

Для получения мутантных форм *nnLuz* в генетическую последовательность люциферазы дикого типа (*nnLuz WT*) вносили изменения с помощью ПЦР по методу Quick change [10]. Указанные генетические последовательности входили в состав векторов, содержащих также промотор глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (pGAP), терминатор алкогольоксидазы (AOXt) и предназначенных для трансформации клеток дрожжей

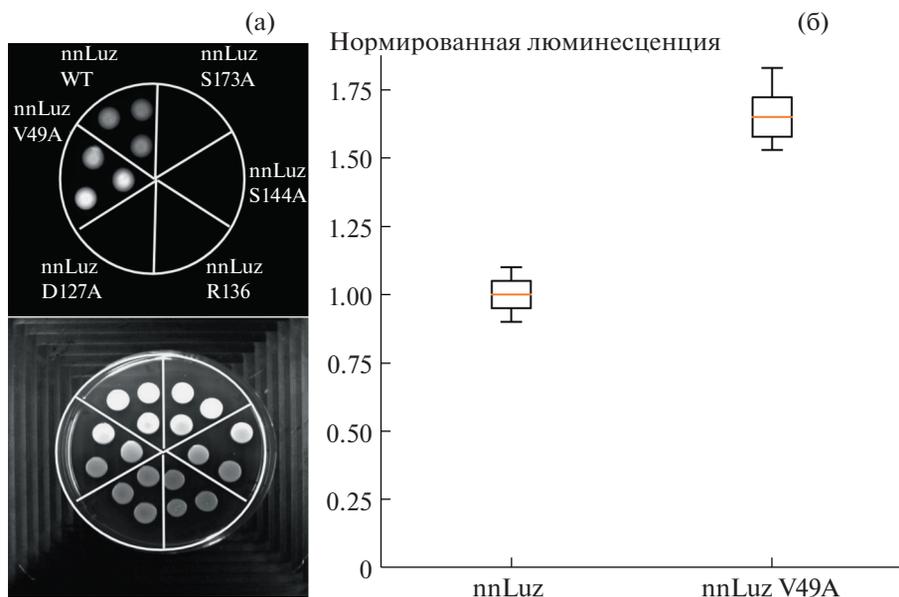


Рис. 4. Сравнение мутантов nnLuz в дрожжевой культуре *Pichia pastoris*. (а) Свечение дрожжевых колоний, экспрессирующих мутантные и нативную формы nnLuz в ответ на добавление люциферина (верхнее фото), эти колонии в видимом свете (нижнее фото); (б) Нормированная люминесценция nnLuz дикого типа (nnLuz WT) и мутантной формы nnLuz V49A в ответ на добавление люциферина. Полученный сигнал был нормирован на значения сигнала nnLuz WT.

ет на активность изучаемого фермента. Полученные результаты могут быть в дальнейшем использованы для получения образца nnLuz, пригодного для исследования методами кристаллографии и ЯМР-спектроскопии, с целью экспериментального установления пространственной структуры люциферазы гриба *N. nambii*.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ.

Работа выполнена за счет средств гранта РФФ № 16-14-00052-П, аланиновый скрининг проводили за счет гранта Президента для государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации НШ-2605.2020.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yan Y., Shi P., Song W., Bi S. Chemiluminescence and Bioluminescence Imaging for Biosensing and Therapy: *in vitro* and *in vivo* Perspectives. // *Theranostics*. 2019. V. 9. P. 4047–4065. <https://doi.org/10.7150/thno.33228>
2. Fleiss A., Sarkisyan K.S. A brief review of bioluminescent systems. // *Current Genetics*. 2019. V. 65. P. 877–882. <https://doi.org/10.1007/s00294-019-00951-5>
3. Pomper M.G., Gelovani J.G. *Molecular Imaging in Oncology*. // CRC Press. 2008. 744 p. <https://doi.org/10.1102/1470-7330.2004.0060>
4. Chew A.L.C., Desjardin D.E., Tan Y.-S., et al. Bioluminescent fungi from Peninsular Malaysia—a taxonomic and phylogenetic overview. // *Fungal Divers*. 2015. V. 70. P. 149–187. <https://doi.org/10.1007/s13225-014-0302-9>
5. Shimomura O. *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods*. // World Scientific Publishing, Singapore. 2006. 470 p. <https://doi.org/10.1142/6102>
6. Kotlobay A.A., Sarkisyan K.S., Mokrushina Y.A., et al. Genetically encodable bioluminescent system from fungi. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA*. 2018. V. 115. P. 12728–12732. <https://doi.org/10.1073/pnas.1803615115>
7. Mitiouchkina T., Mishin A.S., Somermeyer L.G., et al. Plants with genetically encoded autoluminescence. // *Nature Biotechnology*. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0500-9>
8. Oliveira A.G., Desjardin D.E., Perry B.A., Stevani C.V. Evidence that a single bioluminescent system is shared by all known bioluminescent fungal lineages. // *Photochemical and Photobiological Sciences*. 2012. V. 11. P. 848–852. <https://doi.org/10.1039/c2pp25032b>
9. Kaskova Z.M., Dörr F.A., Petushkov V.N., et al. Mechanism and color modulation of fungal bioluminescence. // *Science Advances*. 2017. P. e1602847. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1602847>
10. Bok J.W., Keller N.P. Fast and easy method for construction of plasmid vectors using modified quick-change mutagenesis. // *Methods of Biochemical Analysis*. 2012. V. 944. P. 163–174. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-122-6_11

11. Pichia expression kit. A manual of methods for expression of recombinant proteins using pPICZ and PICZ-alpha in *Pichia pastoris* Catalog. // 2009. http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/pich_man.pdf.
12. *Kwolek-Mirek M., Zadrąg-Tecza R.* Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. // FEMS yeast research. 2014. V. 14. P. 1068–1079. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12202>

RATIONAL DESIGN AND MUTAGENESIS OF FUNGAL LUCIFERASE FROM *Neonothopanus nambi*

**K. A. Beregovaja^a, N. M. Myshkina^a, T. V. Chepurnykh^a, A. A. Kotlobay^a, K. V. Purtoy^{b,#},
V. N. Petushkov^b, N. S. Rodionova^b, and I. V. Yampolsky^a**

^a *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

^b *Institute of Biophysics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences,
Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center SB RAS”, Krasnoyarsk, Russian Federation*

[#]*e-mail: purtovk@mail.ru*

Presented by academician of the RAS I.I. Gitelzon

The recently described bioluminescent system from fungi has great potential for developing highly efficient tools for biomedical research. Luciferase enzyme is one of the most crucial components of this system. The luciferase from *Neonothopanus nambi* fungus belongs to the novel still undescribed protein family. The structure data for this protein is almost absent. A detailed study of the *N. nambi* luciferase properties is necessary for the improvement of analytical methods based on the fungal bioluminescent system. Here we present the positions of key amino acid residues and their effect on enzyme function described using bioinformatic and experimental approaches. These results are useful for further fungal luciferase structure determination.

Keywords: bioluminescence, luciferase, *Neonothopanus nambi*, rational design