

УДК 577.34

РЕКОМБИНАНТНАЯ ЛЮЦИФЕРАЗА ГРИБА *Neonothopanus nambi*: ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА

© 2021 г. А. Ю. Гороховатский¹, Т. В. Чепурных¹, А. С. Щеглов¹, Ю. А. Мокрушина¹,
М. Н. Баранова¹, С. А. Гончарук¹, К. В. Пуртов^{2,*}, В. Н. Петушков²,
Н. С. Родионова², И. В. Ямпольский¹

Представлено академиком РАН И.И. Гительзоном

Поступило 15.10.2020 г.

После доработки 27.10.2020 г.

Принято к публикации 29.10.2020 г.

Ключевым компонентом недавно описанной биолюминесцентной системы высших грибов является люцифераза, относящаяся к новому классу белков. Свойства грибной люциферазы и их взаимосвязь с ее строением интересны как для улучшения уже созданных на ее основе автолюминесцентных систем, так и для создания новых. Поэтому крайне важным является понимание пространственной структуры этого белка. Нами выполнены гетерологическая экспрессия и очистка люциферазы *Neonothopanus nambi*, получен белок, пригодный для последующей кристаллизации, а также определены некоторые биохимические свойства рекомбинантной люциферазы.

Ключевые слова: биолюминесценция, люцифераза, nnLuz, *Neonothopanus nambi*, гетерологическая экспрессия, *Pichia pastoris*

DOI: 10.31857/S2686738921010091

Биолюминесцентные системы широко применяются как в исследовательских целях, так и для разработки лекарств и диагностики [1–6]. Недавно расшифрованная биолюминесцентная система грибов является перспективным инструментом для биомедицинских исследований [7]. На ее основе уже созданы автономно люминесцирующие дрожжи [8] и растения [9]. Однако ключевой компонент этой системы – люцифераза (nnLuz) – остается малоизученной. Отсутствие гомологии с другими ферментами не позволяет смоделировать пространственную структуру этого белка, а сложность выделения из природного источника препятствует получению достаточного количества белка для кристаллизации и характеристики его свойств. Таким образом, получение рекомбинантной люциферазы *N. nambi* сегодня является актуальной задачей.

На первом этапе работы мы сравнили активность люциферазы *N. nambi* при экспрессии в трех стандартных системах: кишечной палочке *E. coli*, дрожжах *Pichia pastoris* и линии клеток человека HEK293T. Максимальную люминесценцию в ответ на добавление люциферина грибов продемонстрировали дрожжи *P. pastoris*. Поэтому для дальнейших экспериментов было решено использовать штамм дрожжей, продуцирующий люциферазу с последовательностью из 6 остатков гистидина на С-конце белка. Культивацию дрожжей проводили по стандартной методике, используя штамм GS115 [10].

Биомассу дрожжей лизировали в 100 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7.0, содержащем 100 мМ NaCl, 5 мМ EDTA, 10 мМ 2-меркаптоэтанол и 1 мМ PMSF, при помощи гомогенизатора высокого давления (600 бар, ИКА НРН). Лизат центрифугировали (8000 g × 30 мин) при 4°C, мембранную фракцию, содержащую люциферазу, осаждали ультрацентрифугированием (150000 g × 90 мин) при 4°C. Для подбора условий солиubilизации люциферазы мембраны суспензировали в 50 мМ NEPES-Na буфере, pH 8.0, содержащем 500 мМ NaCl, 20% глицерин (буфер А) и различные детергенты, при 4°C в течение ночи (рис. 1). Почти все рассмотренные детергенты показали приблизительно одинаковую способность экстрагировать люциферазу, кроме детергента OG (октил-

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

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

*e-mail: purtovk@mail.ru

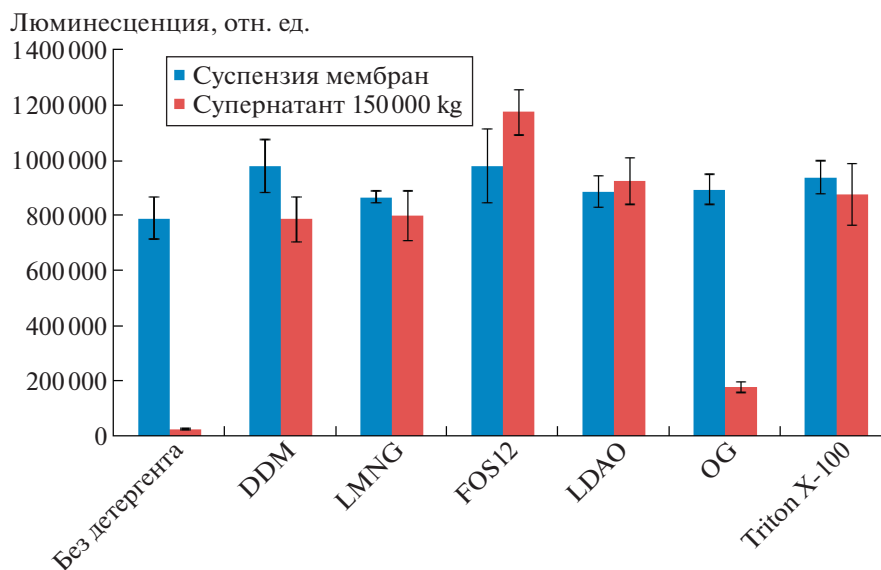


Рис. 1. Солюбилизация люциферазы ppLuz из мембран *P. pastoris*, суспендированных в буфере (см. текст) с добавками различных детергентов в концентрации 10 мМ (100 мМ для OG) в течение 16 ч при 4°C. После центрифугирования (150 000 g × 90 мин) при 4°C биолюминесцентную активность люциферазы в супернатанте измеряли в 200 мМ Na-фосфатном буфере, pH 8.0, содержащем 500 мМ Na₂SO₄, 0.1% DDM и 50 мкМ люциферина грибов. Представлены средние значения ± стандартное отклонение.

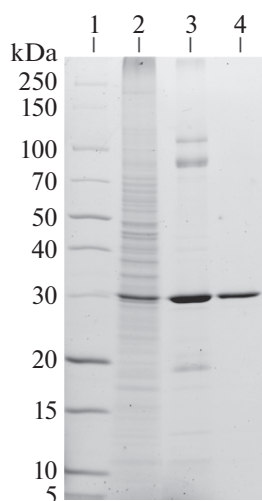


Рис. 2. Электрофорез в денатурирующих условиях фракций в ходе выделения рекомбинантной люциферазы *N. nambi*. 1 – маркеры молекулярной массы; 2 – мембранная фракция клеток *P. pastoris*; 3 – фракция, содержащая рекомбинантную люциферазу *N. nambi*, после металл-хелатной хроматографии; 4 – фракция, содержащая рекомбинантную люциферазу *N. nambi*, после гель-фильтрационной хроматографии. Гель окрашен Кумасси G250.

гликозида). Для препаративной экстракции был использован именно DDM в концентрации 10 мМ, ввиду его доступности и хорошей применимости для хроматографии с УФ-детекцией. Все хроматографии проводили на холоду. Детергент-солюбилизованную фракцию мембран наносили на колонку с сорбентом TALON для металл-аффинной хроматографии, уравновешенную бу-

фером А с 0.02% DDM, и промывали колонку этим же буфером. Далее колонку промывали 20 мМ MES-Na, 0.5 М NaCl, 10% глицерин буфером, pH 6.2 (буфер В), содержащим 0.02% DDM. Сорбированную люциферазу элюировали буфером В, содержащим 0.1% DDM и 200 мМ имидазол. Фракции с наибольшей люминесцентной активностью наносили на колонку с Sephacryl S-300

Таблица 1. Анализ полученного спектра кругового дихроизма

Число а.о.	Альфа-спираль, %	Бета-структура, %	Поворот, %	Неупоряд., %	NRMSD
275	21.5	26.8	22.5	29.1	0.05

в 50 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7.0, содержащем 150 мМ NaCl и 0.04% DDM, для гель-фильтрации. В результате была получена рекомбинантная люцифераза *N. nambi* с чистотой более 95% (рис. 2) и с выходом 10 мг с литра культуры *P. pastoris*.

При гель-фильтрации на колонке Superdex200 в присутствии мицелл детергента DDM люцифераза элюируется одним пиком, соответствующим молекулярной массе около 60 кДа. С одной стороны, люцифераза может представлять собой димер, так как расчетная масса мономера, определенная по аминокислотной последовательности, 31.4 кДа. Однако с учетом размеров мицеллы DDM (40–70 кДа) и условий гель-фильтрации, люцифераза более вероятно является мономером, связанным с детергентом, хотя точная стехиометрия такого комплекса остается неизвестной.

Полученный после гель-фильтрации препарат люциферазы был исследован методом спектроскопии кругового дихроизма. Спектр получен в 20 мМ Na-фосфатном буфере, содержащем 100 мМ NaCl, 0.04% DDM, pH 7.4, 5°C на спектрополяриметре J-810 (JASCO, Япония) при концентрации белка 11 мкМ в кювете толщиной 0.01 см. Для обсчета данных использованы программа CONTINLL (пакет CDPPro), набор референсных спектров: SMP56. Результат анализа полученного спектра представлен в табл. 1. Наличие представленных в таблице бета-структур и альфа-спиральных участков говорит о высокой вероятности наличия белка с нативной структурой в очищенном препарате люциферазы.

Активность люциферазы *in vitro* радикально зависит от наличия детергентов в среде (рис. 3). Мы провели сравнение биоломинесцентной активности рекомбинантной nnLuz в присутствии Tween-20, Triton X-100, NP-40, дигитонина,

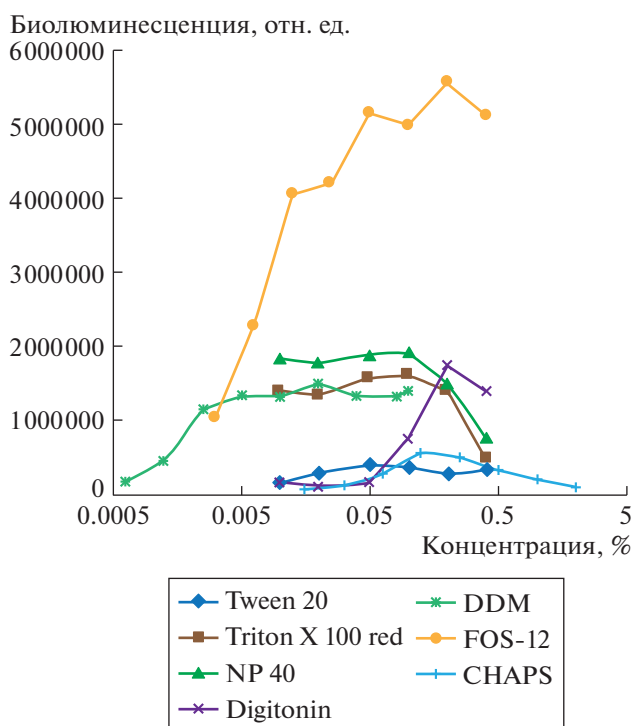


Рис. 3. Влияние детергентов на биоломинесценцию люциферазы. Реакцию проводили в 200 мМ Na-фосфатном буфере pH 8.0, содержащем указанную концентрацию детергента и 50 мкМ люциферина грибов. Измерения проводили в течение 30 сек. Представлены интегрированные значения интенсивности света.

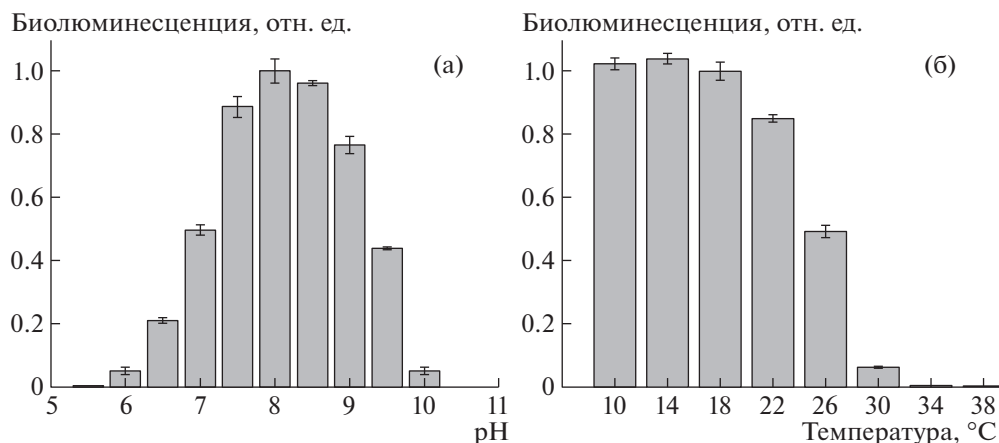


Рис. 4. pH-зависимость (а) и термостабильность (б) биолюминесценции люциферазы *N. nambi*. Измерение люминесценции проводили после инкубации в течение 10 мин при указанной температуре в 100 мМ Na-фосфатном буфере pH 7.0. Реакцию проводили в 100 мМ буфере указанного pH, содержащем 0.1% DDM и 50 мкМ люциферина грибов при комнатной температуре. Свет интегрировали в течение 60 с. Представлены средние значения \pm стандартное отклонение.

DDM, FOS-12 и CHAPS. Различные детергенты в разной степени способствуют люминесцентной реакции. Наибольшая активность люциферазы наблюдалась в присутствии FOS-12 (n-Dodecylphosphocholine). Однако нами было показано, что при хранении в присутствии детергента FOS-12 очищенная nnLuz теряет активность, при хранении в присутствии DDM потери активности люциферазы не наблюдалось. Поэтому очистку и измерение ее активности производили также в DDM, чтобы избежать образования смешанных мицелл при измерении.

Оптимальный pH для биолюминесцентной реакции составляет 8.0 (рис. 4а). Рекombинантная люцифераза является термочувствительным ферментом, инкубация в течение 10 мин при температуре 30°C практически полностью инактивирует фермент (рис. 4б).

Была определена константа Михаэлиса-Ментен для реакции окисления люциферина, катализируемой рекомбинантной люциферазой *N. nambi*. Реакцию проводили при концентрации люциферазы 50 нМ в 200 мМ Na-фосфатном буфере, pH 8.0, содержащем 500 мМ Na₂SO₄, 0.1% DDM при комнатной температуре, концентрацию люциферина грибов варьировали от 2 нМ до 50 мкМ. Значения начальной интенсивности биолюминесценции аппроксимировали функцией Михаэлиса-Ментен при помощи программного пакета Origin. Km составила 1.09 ± 0.06 мкМ.

Таким образом, в результате проделанной работы получена и охарактеризована рекомбинантная люцифераза *N. nambi*. Разработанная методика выделения этого фермента будет далее использована для наработки достаточных количеств белка для

кристаллизации и исследования пространственной структуры люциферазы методом ЯМР.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена за счет средств гранта РФФ № 16-14-00052-П. Создание штамма дрожжей, продуцирующего люциферазу nnLuz, поддержано грантом 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. Shimomura O. *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods*. // World Scientific Publishing, Singapore. 2006. 470 p. <https://doi.org/10.1142/6102>
5. van Leeuwen F.W., Hardwick J.C., van Erkel A.R. Luminescence-based Imaging Approaches in the Field of Interventional Molecular Imaging. // *Radiology*. 2015. V. 276 (1). P. 12–29. <https://doi.org/10.1148/radiol.2015132698>
6. England C.G., Ehlerding E.B., Cai W. NanoLuc: A Small Luciferase Is Brightening Up the Field of Bioluminescence. // *Bioconjugate Chemistry*. 2016. V. 27

- (5). P. 1175–1187.
<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00112>
7. Ямпольский И.В., Осипова З.М., Щеглов А.С. Новая биолюминесцентная система грибов: перспективы использования в медицинских исследованиях. // Вестник РГМУ. 2018. V. 1. P. 80–83.
<https://doi.org/10.24075/vrgmu.2018.004>
8. 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 U S A. 2018. V. 115. P.12728–12732.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1803615115>
9. 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>
10. Pichia expression kit. A manual of methods for expression of recombinant proteins using pPICZ and PICZ-alpha in Pichia pastoris. // Invitrogen ES. Catalog. 2009.

THE RECOMBINANT LUCIFERASE OF THE FUNGUS *Neonothopanus nambi*: OBTAINING AND PROPERTIES

A. Yu. Gorokhovatsky^a, T. V. Chepurnykh^a, A. S. Shcheglov^a, Yu. A. Mokrushina^a, M. N. Baranova^a, S. A. Goncharuk^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 SB RAS, Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center SB Russian Academy of Sciences”, Krasnoyarsk, Russian Federation

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

Presented by the academician of the RAS I.I. Gitelzon

A key component of the recently described bioluminescent system of higher fungi is luciferase, a new class of proteins. The properties of fungal luciferase and their relationship with its structure are interesting both for improving the autoluminescent systems already created on its basis, and for creating new ones. Therefore, it is extremely important to understand the spatial structure of this protein. We have performed heterologous expression and purification of *Neonothopanus nambi* luciferase, obtained a protein suitable for subsequent crystallization, and determined some biochemical properties of recombinant luciferase.

Keywords: bioluminescence, luciferase, nnLuz, *Neonothopanus nambi*, heterologous expression, *Pichia pastoris*