

©Коллектив авторов

## ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОГО МУТАНТНОГО ГОМОЛОГА ХЕМОТАКСИСНОГО БЕЛКА CheY ИЗ ГИПЕРТЕРМОФИЛЬНОГО АНАЭРОБНОГО МИКРООРГАНИЗМА *THERMOTOGA NAPHTHOPHILA*

Д.В. Гришин<sup>\*</sup>, Ю.А. Гладылина<sup>1</sup>, Д.Д. Жданов<sup>1,2</sup>, М.В. Покровская<sup>1</sup>, И.Ю. Торопыгин<sup>1</sup>,  
С.С. Александрова<sup>1</sup>, В.С. Покровский<sup>1,2</sup>, Н.Н. Соколов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,  
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; \*эл. почта: molbiol\_ibm@inbox.ru

<sup>2</sup>Российский университет дружбы народов, Москва

С использованием генно-инженерных методов сконструированы экспрессионные векторные конструкции, обеспечивающие эффективную продукцию рекомбинантных белков TnaCheY и TnaCheY-mut – гомологов хемотаксисного белка CheY гипертермофильного микроорганизма *Thermotoga naphthophila* – в клетках *Escherichia coli* BL21(DE3). Оптимизированы условия культивирования трансформированных штаммов. Изучено влияние эписомальной экспрессии гетерологичного хемотаксисного белка CheY на параметры кинетики роста культуры мезофильного микроорганизма *E. coli*. Предложена оптимальная схема очистки полученных белков с использованием термолитизиса. На основе полученных данных в статье рассмотрены потенциальные области применения рекомбинантных вариантов термостабильного хемотаксисного белка CheY. На примере клеток лабораторного штамма *E. coli* BL21(DE3), экспериментально обоснована возможность использования эписомальной экспрессии подобных белков для управления временем культивирования и продукции фармацевтически и промышленно ценных метаболитов за счёт воздействия на отдельные этапы хемотаксиса бактерий.

**Ключевые слова:** рекомбинантный белок; термостабильность; хемотаксисный белок CheY; штамм-продуцент; экспрессия; биотехнология

DOI: 10.18097/PBMC20196501041

### ВВЕДЕНИЕ

Термостабильный хемотаксисный белок CheY – в нативном состоянии однодоменный адапторный полипептид, представляет собой базовый компонент сигнального пути хемотаксиса многих прокариотических организмов [1-6]. В ответ на взаимодействие аттрактантов с мембранными хеморецепторами белок CheY фосфорилируется гистидинкиназой CheA и активирует базальные тельца клеточных жгутиков и ворсинок [7]. По сути, все эти элементы являются частью клеточного “трансмембранного мотора”, обеспечивающего проявление ответных двигательных реакций, выражающихся в чередовании хаотичного и прямолинейного движения бактерий по градиенту концентрации питательных веществ [1]. Следует отметить, что процессы хемотаксиса весьма консервативны у мезофильных и термофильных прокариот, поэтому различные варианты данных белков могут представлять особый интерес для фундаментальной науки в качестве модельных белков.

Прикладной аспект изучения нативных и рекомбинантных термостабильных белков связан с возможностью их использования для решения многих задач биотехнологии и биомедицины, в виде различных модификаций и химерных белков, для визуализации внутриклеточных структур и процессов, для получения новых лекарственных и пищевых белков с заданными свойствами, для упрощения технологического процесса выделения биотехнологически ценных белков и т.п. [8-10].

Всё это подчеркивает актуальность пополнения банка подобных молекул и углубления знаний об их функционировании и строении.

Данная работа посвящена биотехнологическим аспектам создания и характеристике рекомбинантных гомологов термостабильного белка CheY как полипептида, потенциально ценного в качестве термостабильного “белка-носителя” для нужд биомедицины, сельского хозяйства и пищевой промышленности [11, 12], а также модельного белка, позволяющего расширить фундаментальные научные представления о механизмах трансдукции хемотаксисных сигналов, молекулярной эволюции путей их передачи и влияния на динамические показатели роста клеточных культур мезофильных бактерий.

### МЕТОДИКА

#### Биоинформатический анализ

Поиск гомологичных последовательностей, относящихся к целевым белкам в GenBank, выравнивание двух и более аминокислотных последовательностей, построение дендрограмм и вычисление термодинамических характеристик осуществляли как описано в [10, 11]. Вспомогательное виртуальное клонирование целевых генов и построение карт рекомбинантных плазмид проводили с использованием программы Clone Manager 4.0. (“Scientific & Educational Software”, США). Вычисления термодинамических значений Tm Index осуществляли с помощью аналитической программы “Tm Predictor”

\* - адресат для переписки

(<http://tm.life.nthu.edu.tw>). Для оценки растворимости белков использовали программу “Recombinant Protein Solubility Prediction” (<http://biotech.ou.edu/>).

#### *Штаммы бактерий E. coli*

Штаммы *E. coli* BL21(DE3) (F<sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-)  $\lambda$ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])) (“Stratagene”, США), культивировали и трансформировали клетки как описано в [13].

#### *Конструирование рекомбинантной ДНК*

При конструировании за основу брали аннотированные в GenBank нативные нуклеотидные и аминокислотные последовательности хемотаксисных белков (KUK23877.1) из термофильного микроорганизма *T. naphthophila*. Генно-инженерные конструкции собирали как описано в [10, 14]. Правильность сборки кодирующих генов подтверждали рестрикционным картированием и ДНК-секвенированием (“Евроген”, Россия).

#### *Выделение и элюция ДНК*

Выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток проводили стандартным методом ДДС-щелочного лизиса [15]. Для элюции фрагментов ДНК из агарозного геля использовали набор “Gel Extraction Kit” (“Qiagen”, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя.

#### *Аэробное культивирование микроорганизмов в контролируемых условиях*

Глубинное культивирование проводили в биореакторе BioFlo110 (“NBS”, США) общим объёмом 10 л. Состав ростовой среды: триптон – 15 г/л; дрожжевой экстракт – 5 г/л; NaCl – 5 г/л; ампициллин – 0,1 г/л; пеногаситель – 0,1 мл/л. Оптимальный уровень pH в среднем составил 7,4, аэрации – 0,5 объёма/об/мин, перемешивания – 350 об/мин. При достижении культурой OD<sub>600</sub> 1–1,2 в качестве подпитки и индуктора асептически вносили смесь лактозы (2 г/л) и ИПТГ (0,02 г/л). После индукции температуру снижали до 28°C. Динамику изменения морфологических характеристик клеток контролировали в фазово-контрастном микроскопе ( $\times 1000$ ). Для определения накопления целевого продукта в биомассе клетки лизировали и проводили электрофорез в 15%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ).

#### *Получение целевых белков методом термолизиса*

Осадки индуцированных клеток *E. coli* суспендировали в буфере “А” (20 мМ Tris-HCl, pH 6,8–8,5, 50 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 0,1% Triton X-100) из расчёта 10% от объёма культуры. Суспензию клеток обрабатывали ультразвуком на приборе УЗДН2Т (Россия) в жестком режиме (22 кГц, 30–50 с), на льду. Пробы прогревали при 65–70°C в течение 30 мин, после чего клеточный дебрис и денатурировавшие белки удаляли центрифугированием (центрифуга Optima-L90, “Beckman Coulter” (США), ротор 50Ti, 15 мин, 9000 об/мин). Для концентрирования

термостабильных белков к супернатанту добавляли кристаллический сульфат аммония до концентрации, составляющей 80% от насыщающей, и смесь оставляли на 18–20 ч при 4°C. Далее раствор осветляли центрифугированием (центрифуга Optima-L90, “Beckman Coulter”, ротор 50Ti, 15 мин, 15000 об/мин), осадок либо лиофилизировали, либо растворяли в буфере “В” (20 мМ Tris-HCl; pH 7,5; 10 мМ EDTA; 10% глицерин) и хранили при -20°C. Концентрацию белка определяли по методу Bradford [16].

#### *Определение молекулярной массы очищенного белка*

Соответствие молекулярных масс изучали с помощью электрофореза и масс-спектрометрии. Электрофорез проводили по методу Laemmli [17]. В качестве маркеров использовали белковые стандарты производства “Thermo Fisher Scientific” (США). Масс-спектрометрический анализ проводили на времяпролетном масс-спектрометре Bruker Ultraflex II (“Bruker Daltonics”, Германия) в режиме положительных ионов с использованием десорбции Nd:YAG лазером (длина волны 355 нм) при ускоряющем напряжении 25 кВ. Регистрацию спектров проводили в режиме рефлектон, для спектров пептидного картирования (идентификации белков) и в линейном режиме для определения молекулярных масс целого белка. Полученные масс-спектры были обработаны с использованием программы Bruker Flex Analysis 3.0.

#### *Статистическая обработка*

Вычисления проводили с использованием пакета стандартных программ Statistica 9.0 (“StatSoft Inc.”, США). Данные из серии однотипных экспериментов (не менее трёх) представляли графически в формате среднее  $\pm$  среднее квадратичное отклонение. Оценка статистической значимости различий средних сравниваемых групп для множественных сравнений произведена с использованием критерия Крускала-Уоллиса. Различия считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ . Оценка статистической достоверности при филогенетическом анализе осуществлялась при помощи метода “бутстрэп” [10, 18].

#### *Питательные среды, растворы и реактивы*

При проведении работы использованы коммерческие наборы для элюции, очистки и сборки фрагментов ДНК (“Promega” (США); “Qiagen”; “NEB” (США)); коммерческие векторы серии pET (“Novagen”, США), синтетические фрагменты ДНК (“Евроген”), компоненты питательных сред и реагенты для биохимии производства “Sigma Aldrich” (США), “Panreac” (Испания), “Appllichem” (Германия), “СибЭнзим” (Россия), “Promega” (США), “Merck” (Германия), “Thermo Fisher Scientific”.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

#### *Анализ исходных последовательностей*

Последовательность белка “дикого” типа TnaCheY (GenBank: KUK23877.1) содержала 120 аминокислотных остатков с расчётной молекулярной массой 13,3 кДа.

На рисунке 1 представлено полноразмерное множественное выравнивание последовательностей CheY из различных термофильных микроорганизмов.

При множественном и попарном выравнивании последовательностей выявлены области максимальной гомологии, которые с наибольшей степенью вероятности вовлечены в обеспечение термостабильности белковой молекулы. Данная информация позволяет предсказать инвариантные участки и области, в которые могут вноситься те или иные изменения. Очевидно, что белки CheY различных семейств термофилов обладают высоким содержанием консервативных сайтов на всём

протяжении последовательности. Следует отметить некоторое снижение гомологии на С-конце, что указывает на возможность модификации белковой молекулы в этой области без потери термостабильности и других важных нативных свойств этого белка.

Дендрограммы, отражающие молекулярную эволюцию белков CheY, были построены методами минимальной эволюции (ME) и присоединения соседей (NJ) (рис. 1).

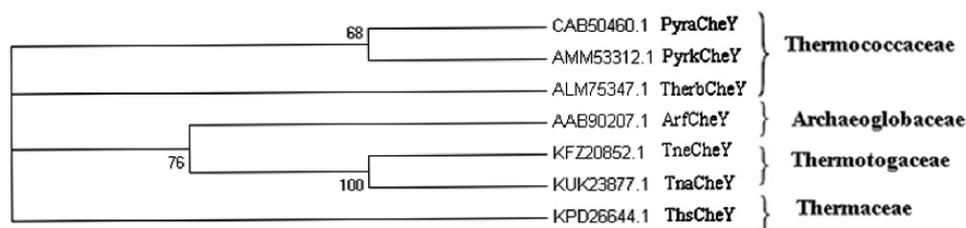
При конструировании дендрограмм в состав анализируемой группы кроме близкородственных семейств термофильных прокариот, таких как *Thermotogaceae*, *Archaeoglobaceae*, *Thermococcaceae*,

**A**

		10	20	30	40	50	
PyraCheY	1	MA-RILVWDD	AAFMRMLLKK	ILTQAGHEVW	GEASNGKEAW	EKYKQLKPLD	50
PyrkCheY	1	MA-RILVWDD	AAFMRMLLKK	ILTQAGHEVW	GEASNGKEAW	EKYKQLKPLD	50
ArfCheY	1	MPK-VLIVDD	TAFMRKLLRN	ILFSGGFDIA	GEAENGKQAV	EMYKQLKPLD	50
TherbCheY	1	MA-RILVWDD	AAFMRMLLKR	ILTQAGHQIW	GEASNGKEAW	EKYKQLKPLD	50
TnaCheY	1	MGRWLVWDD	AAFMRMLLKD	IIDKAGYEVA	GEATNGREAW	EKYKELKPLD	50
TneCheY	1	MAKRVLVWDD	AAFMRMLLKD	IIDKAGYEVV	GEATNGREAW	EKYKELKPLD	50
ThsCheY	1	MA-RILLWED	EPLVAHMVRR	ILERAGHQVD	W-ASSGQAAI	EKLSE-PYDL	50
		60	70	80	90	100	
PyraCheY	51	VTMDIVMPEN	DGITAVKEIM	KIDPNAKIIM	ITAVGQEARW	MEALKSGARK	100
PyrkCheY	51	VTMDIVMPEN	DGITAVKEIM	KIDPNAKIIM	ITAVGQEARW	MEALKSGARK	100
ArfCheY	51	VTMDIVMPEN	NGIEALKAATK	KIDPSAKVVM	CTAVGQEQMW	KAATKLGAKG	100
TherbCheY	51	VTMDIVMPEN	DGITAVKEIM	KIDPNAKIIM	ITAVGQEARW	MEALKSGARK	100
TnaCheY	51	VTMDIVMPEN	NGIDAIKEIM	KIDPNAKIIV	CSAMGQQAMW	IEAIKAGAKD	100
TneCheY	51	VTMDIVMPEN	NGIDAIKEIM	KIDPNAKIIV	CSAMGQQAMW	IEAIKAGAKD	100
ThsCheY	51	VVCDLVMPGV	SGLEVIQMR	ALGLSMPILA	LSASVSEKSR	REALEAGAQA	100
		110	120	130	140	150	
PyraCheY	101	YIVKPFQAQK	WIEEVNRVLS	-S.....	.....	.....	150
PyrkCheY	101	YIVKPFQAQK	WIEEVNRVLS	-S.....	.....	.....	150
ArfCheY	101	YIVKPFQAQK	WIEELKKV-A	GMG.....	.....	.....	150
TherbCheY	101	YIVKPFQAQK	WVEEVNRVLS	-S.....	.....	.....	150
TnaCheY	101	FIVKPFQPSR	WVEALNKV-S	-K.....	.....	.....	150
TneCheY	101	FIVKPFQPSR	WVEALNKV-S	S-K.....	.....	.....	150
ThsCheY	101	FLGKPFETQT	LLAQVDRLLA	-REEG.....	.....	.....	150

**B**  
**CheY**

Minimum-evolution  
Neighbor joining



**Рисунок 1.** (А) Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей белка CheY из различных термофильных микроорганизмов (затемнённые области свидетельствуют о 100%-ной гомологии последовательности на данном отрезке). (Б) Дендрограмма белков CheY. На кладограмме в процентах отражены показатели бутстрэп-статистики для существенных ветвей. Справа от графика приведены ID аминокислотных последовательностей размещённых в GenBank и соответствующие им аббревиатуры (PyraCheY – CheY из *Pyrococcus abyssi* GE5; PyrkCheY – CheY из *Pyrococcus kulkulkani*; TherbCheY – CheY из *Thermococcus barophilus*; ArfCheY – CheY из *Archaeoglobus fulgidus* DSM 4304; TneCheY – CheY из *Thermotoga neapolitana* LA10; TnaCheY – CheY из *Thermotoga naphthophila*; ThsCheY – CheY из *Thermus scotoductus*).

## МУТАНТНЫЙ ГОМОЛОГ ХЕМОТАКСИСНОГО БЕЛКА CheY *T. NAPHTHOPHILA*

входили также и представители семейства *Thermaceae* в качестве референсной “внешней группы”.

Результаты демонстрируют неплохие параметры кластеризации различных семейств термофильных прокариот: *Thermotogaceae*, *Archaeoglobaceae* и *Thermaceae*. Единственным недостатком является невысокое значение бутстрэп-статистики ( $\leq 50\%$ ) для родов *Thermococcus* и *Pyrococcus*, образующих, по современным научно-практическим данным, единое семейство *Thermococcaceae*. Тем не менее, очевидно, что исследуемая аминокислотная последовательность также может быть использована в фундаментальных исследованиях в качестве весьма информативного филогенетического маркера.

### Оптимизация нуклеотидных последовательностей термофильных белков для их экспрессии в мезофильных микроорганизмах

Нуклеотидную последовательность, кодирующую исходный термостабильный белок TnaCheY, подвергали кодоновой оптимизации [10, 19-21] в соответствии с особенностями строения и работы системы нуклеинового обмена клеток мезофильной бактерии *E. coli*. В процессе такой оптимизации часть редких для этого микроорганизма минорных кодонов заменяли на синонимичные мажорные кодоны (рис. 2). Подобная оптимизация гена, однако, незначительно

повлияла на конечный вид кодируемого им белка CheY, что проявилось в возникновении гомологичных замен 93 (A→G), 113 (E→D), 114 (A→G).

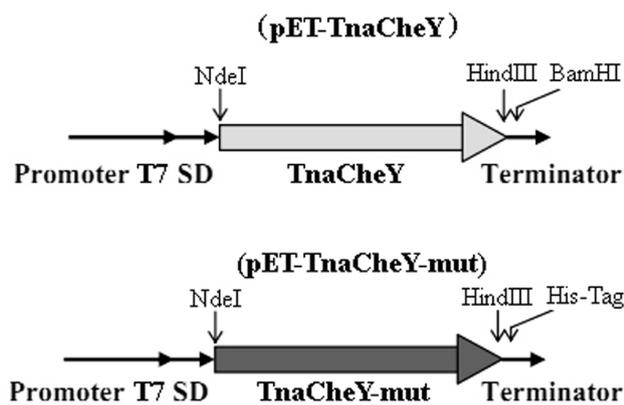
### Конструирование экспрессионных векторов и молекулярное клонирование

Первым этапом работы было клонирование нуклеотидных последовательностей, кодирующих аутентичный TnaCheY. Для этого на основе экспрессионного вектора pET11a (“Novagen”, США), содержащего высокоэффективные регуляторные элементы – промотор фага T7, специфично узнаваемый T7-РНК-полимеразой, и T7-терминатор транскрипции получали генно-инженерные конструкции pET-TnaCheY (рис. 3). Для оптимизации последующей процедуры субклонирования в начале гена был запланирован сайт узнавания для эндонуклеазы рестрикции NdeI (его частью в теле гена стал старт-кодон), в то время как на конце гена были добавлены сайты узнавания для рестриктаз HindIII и BamHI.

Все олигонуклеотиды для получения целевого гена были спланированы на основе известной последовательности гена *CheY* из *T. naphthophila*, аннотированного в базе данных GenBank (No. KUK23877.1). Синтез олигонуклеотидов проведён фирмой “Евроген”.

		10	20	30	40	50	
TnaCheY-mut	1	ATGGGCAAAC	GTGTGCTGAT	TGTGCGATGAT	GCGGCCGTTTA	TCGGTATGAT	50
TnaCheY	1	ATGGGAAAGA	GAGTITTTGAT	AGTCCGATGAT	GCAGCGTTCA	TCAGGATGAT	50
		60	70	80	90	100	
TnaCheY-mut	51	GTGAAAGAT	ATATTACCA	AAGCGGGCTA	TGAAGTGGCA	GCCGAAGCGA	100
TnaCheY	51	GTGAAAGAT	ATCATCACAA	AAGCGGGATA	CGAAGTGGCA	GGGGAAGCAA	100
		110	120	130	140	150	
TnaCheY-mut	101	CCAATGGCCG	TGAAGCCGTT	GACAAATACA	AAGAACTCAA	ACCGGATATT	150
TnaCheY	101	CAAACGGTCG	TGAAGCCGTT	GAAAAATACA	AGGAACTCAA	ACCGGACATC	150
		160	170	180	190	200	
TnaCheY-mut	151	GTGACCATGG	ATATTACCAT	GCCCGAAATG	AATGGCATTG	ATGCGATTAA	200
TnaCheY	151	GTGACCATGG	ACATCACCAT	GCCCGAGATG	AACGGTATCG	ATGCGATCAA	200
		210	220	230	240	250	
TnaCheY-mut	201	AGAAATTATG	AAGATTGATC	CGAATGGCAA	AATCATTTGT	TGCTCCGGCA	250
TnaCheY	201	AGAGATCATG	AAGATCGACC	CCAACGCCAA	GATCATCGTC	TGCAGTGGCA	250
		260	270	280	290	300	
TnaCheY-mut	251	TGGGCCAGCA	GCCGATGTTG	ATTCAAGGCA	TAAAGCGGG	CCGAAAAGAC	300
TnaCheY	251	TGGGACAGCA	GCCAATGTTG	ATAGAAGCTA	TAAAAGCTGG	AGCGAAAAGAC	300
		310	320	330	340	350	
TnaCheY-mut	301	TTTCATTGTGA	AACCGTTTCA	GCCGTCCCGT	GTGGTGGATG	GCCTCAAATA	350
TnaCheY	301	TTTCATTGTGA	AACCCTTTCA	GCCGTCCAGG	GTGGTAGAGG	CTCTCAAATA	350
		360	370	380	390	400	
TnaCheY-mut	351	ACTGTTCAAA	AAGCTTGGCG	CCGCACTCGA	GCACCACCAC	CACCACCAC	400
TnaCheY	351	GCTTTTCGAA	G-----	-----	-----	-----	400
		410	420	430	440	450	
TnaCheY-mut	401	GA.....	.....	.....	.....	.....	450
TnaCheY	401	GA.....	.....	.....	.....	.....	450

**Рисунок 2.** Выравнивание нуклеотидных последовательностей, кодирующих белок TnaCheY и оптимизированный вариант его мутантного гомолога TnaCheY-mut (затемнённые области обозначают 100% идентичность последовательности на данном отрезке).



**Рисунок 3.** Схемы генно-инженерных конструкций pET-TnaCheY и pET-TnaCheY-mut: Promoter T7 – промотор бактериофага T7; SD – сайт связывания рибосом или последовательность Шайна-Дальгарно; *TnaCheY* – нуклеотидная последовательность, кодирующая аутентичный хемотаксисный белок CheY *T. naphthophila*; *TnaCheY-mut* – нуклеотидная последовательность, кодирующая мутантный гомолог белка CheY *T. naphthophila*; Terminator – T7-терминатор транскрипции.

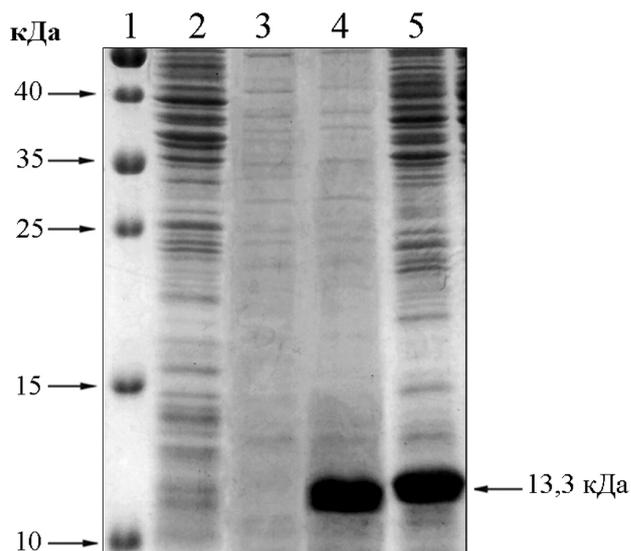
Синтетический ген *TnaCheY* был собран из олигонуклеотидных дуплексов, и клонирован в вектор pET11a (см. раздел “Методика”).

На втором этапе, с целью стабилизации белкового продукта и оптимизации процедуры его очистки, рабочий ген был интегрирован, по рестрикционным сайтам NdeI/HindIII в вектор pET21a. В результате данной процедуры в единой рамке считывания в концевой части гена появились новые сайты рестрикции XhoI и NotI, а также область, кодирующая шесть последовательно расположенных остатков гистидина (*His-Tag*-последовательность). Таким образом, в составе экспрессионной плазмиды pET-TnaCheY-mut был получен ген *TnaCheY-mut* нового мутантного гомолога белка *TnaCheY* (рис. 2).

#### Изучение экспрессии *TnaCheY* и *TnaCheY-mut*

Компетентные клетки *E. coli* BL21(DE3) трансформировали экспрессионными плазмидами pET-TnaCheY и pET-TnaCheY-mut (см. раздел “Методика”). Правильность субклонирования была проверена рестрикционным скринингом и секвенированием. Для культивирования бактерий использовали среду Лоури-Бертани (LB). Индуцибельность рекомбинантных штаммов и уровень экспрессии целевых белков были проверены после внесения в среду индуцирующей смеси ИПТГ и лактозы (см. раздел “Методика”).

Анализ экспрессии конструкций в 15-17% ДСН-ПААГ показал присутствие зон ожидаемого молекулярного веса (13,3–14,6 кДа) в индуцированных клетках и их отсутствие в клетках без индукции (рис. 4, 5). Выход мутантного белка *TnaCheY-mut* из 8-10 часовых культур клеток *E. coli* не уступал таковому для нативного гомолога (*TnaCheY*), составив около 150 мг/л (рис. 4, 5).



**Рисунок 4.** Контроль экспрессии белка *TnaCheY* в 17%-ом ДСН-ПААГ (объем наносимых на одну дорожку проб 5-6 мкл).

1 – Маркер молекулярной массы Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (“Thermo Scientific”);

2 – BL21(DE3)[pET-TnaCheY]

(до индукции, без прогрева);

3 – BL21(DE3)[pET-TnaCheY]

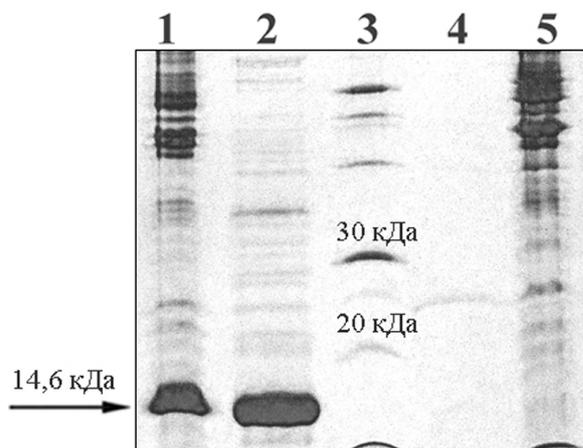
(до индукции+прогрев 75°C);

4 – BL21(DE3)[pET-TnaCheY]

(индукция+прогрев 75°C);

5 – BL21(DE3)[pET-TnaCheY-mut]

(индукция, без прогрева).



**Рисунок 5.** Контроль экспрессии белка *TnaCheY-mut* в 15%-ом ДСН-ПААГ (объем наносимых на одну дорожку проб 5-6 мкл).

1 – BL21(DE3)[pET-TnaCheY-mut]

(индукция, без прогрева);

2 – BL21(DE3)[pET-TnaCheY-mut]

(индукция+прогрев 70°C);

3 – Маркер молекулярной массы PageRuler™

Broad Range Protein Ladder (“Thermo Scientific”);

4 – BL21(DE3)[pET-TnaCheY-mut]

(до индукции+прогрев 70°C);

5 – BL21(DE3)[pET-TnaCheY-mut]

(до индукции, без прогрева).

*Изучение термостабильности рекомбинантных белков*

Известно, что сайт-направленный мутагенез и гибридизация исходных белков с чужеродными пептидными доменами и Tag-последовательностями различным образом отражается на таких свойствах результирующего белка как внутриклеточная растворимость, термостабильность, и т.п. [22, 23]. Поэтому целью данного этапа работ стало изучение того, как внесённые в нуклеотидную последовательность TnaCheY изменения отразились на некоторых важных свойствах мутантного белкового продукта TnaCheY-mut.

Предварительная теоретическая оценка растворимости и термостабильности белка по его первичной аминокислотной последовательности была проведена при помощи аналитических программ “Recombinant Protein Solubility Prediction” и “Tm Predictor (TI)” (см. раздел “Методика”). Для мутантного белка TnaCheY-mut расчётные значения растворимости были невысокими, в то время как значения TI были выше единицы, что свидетельствовало о потенциально высокой термостабильности. Для проверки этих данных индуцированные клетки подвергали ультразвуковой дезинтеграции и термолизу (термолизу) в буфере “А” (см. раздел “Методика”) в течение 20-40 мин при температуре 68-80°C с последующим осаждением денатурировавших белков клетки-хозяина центрифугированием.

По результатам проделанной практической работы стало очевидно, что и природный аналог, и белок TnaCheY-mut обладают достаточно высокой внутриклеточной растворимостью. По данным, полученным при помощи программ Gel-Analysis (“Helicon”, Россия) и Adobe Photoshop cs2 (histogram option) (“Adobe Systems”, США), после термолиза почти 95% белка концентрируются в растворимой фракции. В то же время внесённые в его структуру изменения привели к небольшому падению термостабильности: с 75-80°C в нативном состоянии до 68-72°C в мутантной форме. Следует отметить, что указанные факты плохо согласуются с результатами предварительного биоинформатического прогнозирования.

*Определение молекулярной массы и идентификация очищенного белка*

Как уже было отмечено, анализ экспрессии конструкций в 15-17% ДСН-ПААГ показал присутствие зон ожидаемого молекулярного веса

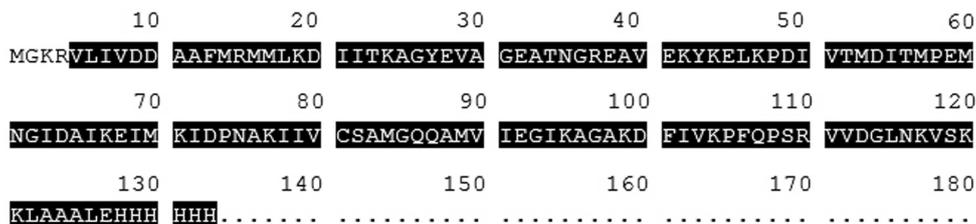
в индуцированных клетках (рис. 4, 5). На следующем этапе был проведён масс-спектрометрический анализ белка, очищенного методом термолиза для уточнения молекулярной массы и идентификации его аминокислотной последовательности. Для этого исходный раствор исследуемого рекомбинантного полипептида разбавляли до концентрации 4 мкг/мл 50 мМ буферным раствором NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> в H<sub>2</sub>O. Гидролиз полипептида проводили в растворе с концентрацией трипсина 0,2 мкг/мл.

Продолжительность расщепления составляла 18 ч при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 0,7% трифторуксусной кислоты (ТФУ) (“Merck”). Подготовка образца для масс-спектрометрии: на мишени смешивали по 0,5 мкл раствора образца и раствора 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (“Sigma-Aldrich”) с концентрацией 10 мг/мл в 50% ацетонитриле в 0,7% водном растворе ТФУ, полученную смесь высушивали на воздухе. Масс-спектры были получены на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре Bruker Ultraflex II (“Bruker Daltonics”), оснащённом УФ лазером (Nd:YAG) в режиме положительных ионов. Анализ спектров проводили с использованием браузера для работы с масс-спектрами Bruker FlexAnalysis 3.0. (“Bruker”, Германия). Сравнение полученных масс пептидов с расчётными для сконструированных белков проводили при помощи программного пакета GPMW 6.10 (“LightHouse Data”, Дания). Совпадение с заданной последовательностью составило более 92% (рис. 6).

Анализ аминокислотной последовательности TnaCheY-mut позволил построить для данного белка аминокислотный профиль и карту узнавания для основных протеолитических ферментов (рис. 7, 8).

*Изучение кинетики роста трансформированных клеток E. coli*

Время выхода роста контрольной культуры E. coli BL21(DE3)[pET-TnaDBP-mut], продуцирующей ДНК-связывающий белок, индифферентный для хемотаксиса, на стационарную фазу при культивировании в жидкой питательной среде составило более 10 ч после внесения индуктора, что почти на 5 ч позже, чем для культуры продуцирующей TnaCheY-mut в тех же условиях (рис. 9). Этот эффект может быть связан с тем, что гетерологичные хемотаксисные белки термофилов активно используются клетками E. coli для реализации собственных сигнальных механизмов.



**Рисунок 6.** Совпадения аминокислотных последовательностей, обнаруженных в исследуемом образце, с теоретической последовательностью белка TnaCheY-mut при проведении MALDI масс-спектрометрии. Совпадающие последовательности выделены чёрным цветом.

Известно, что CheY обеспечивает пространственную переориентировку клеток *E. coli* по градиенту концентрации аттрактантов, взаимодействуя, по крайней мере, с тремя различными молекулярными партнерами: CheZ, CheA и FliM [24, 25]. Рекомбинантный TnaCheY-mut может конкурировать с собственным CheY клеток кишечной палочки за участки связывания с CheA, базальными

тельцами или с фосфатазой CheZ. При этом, полноценно взаимодействовать с этими молекулами данный белок, по-видимому, не в состоянии. В результате может нарушаться физиологическое чередование “тамблинга” (спонтанное вращательное переориентирование) и прямолинейного движения, что приводит к изменениям в процессах хемотаксиса. Бактерии, длительное время пребывающие

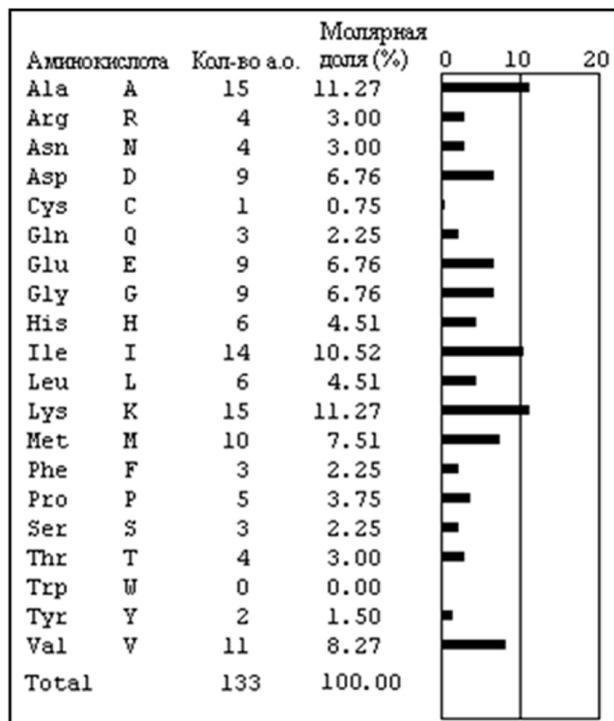


Рисунок 7. Аминокислотный профиль белка TnaCheY-mut. Диаграммы получены на основе расчётов в программе DNASIS v 2.5 (“Hitachi Software Engineering Co., Ltd”, Япония).

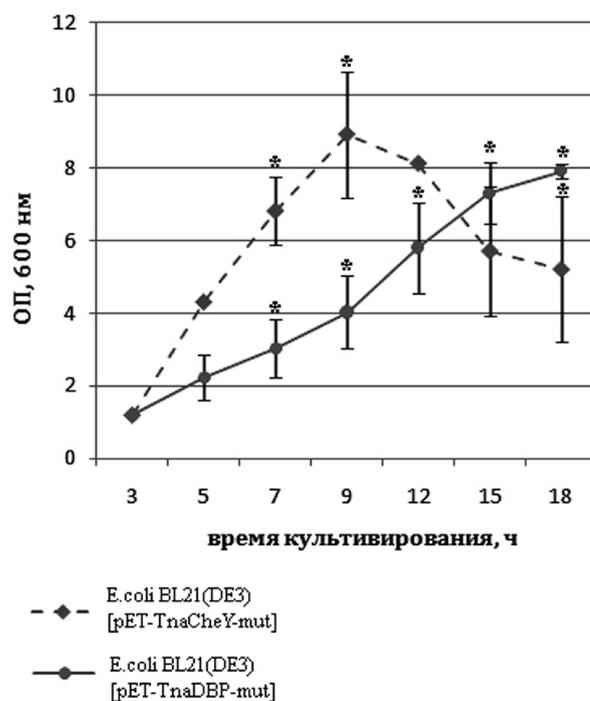


Рисунок 9. Кинетика роста исследуемой культуры *E. coli* BL21(DE3)[pET-TnaCheY-mut] и контрольной культуры *E. coli* BL21(DE3)[pET-TnaDBP-mut]; звёздочками отмечены статистически значимые отличия,  $p \leq 0,05$ .

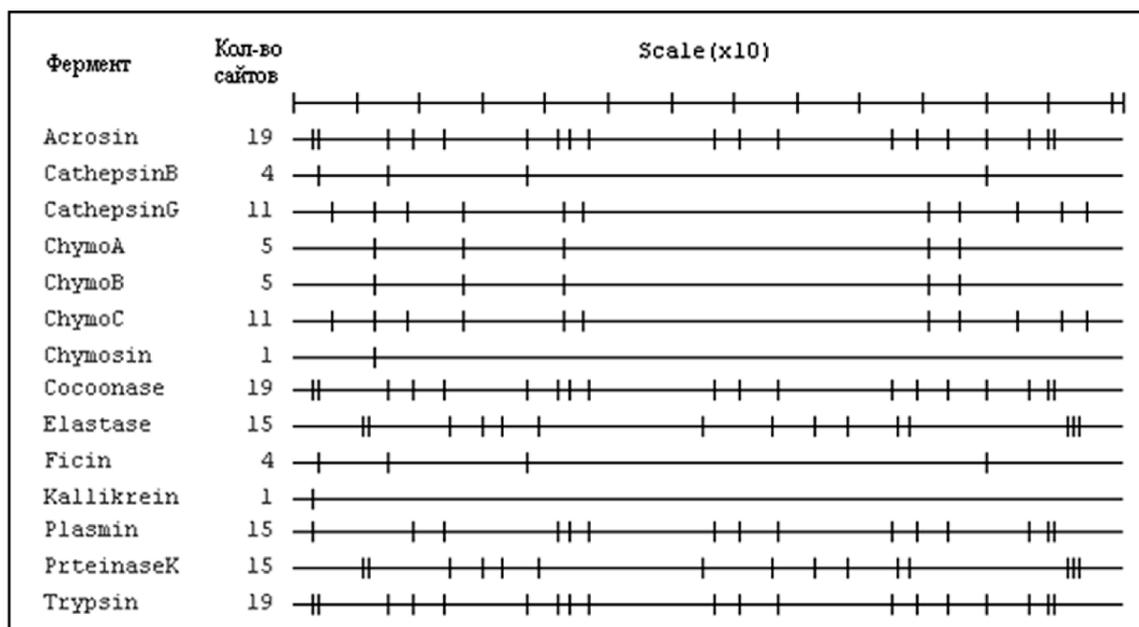


Рисунок 8. Карта сайтов узнавания для различных протеолитических ферментов в белке TnaCheY-mut. Карта получена на основе расчётов в программе DNASIS v 2.5.

в состоянии такого хаотического движения, могут обладать повышенным метаболизмом, интенсивно производят собственные и рекомбинантные белки, что в итоге проявляется в критическом сокращении логарифмической и стационарной фаз роста, появлении большого количества клеток с рыхлой клеточной стенкой и возрастании доли автолизированных клеток.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В работе представлены данные по получению и характеристике рекомбинантного хемотаксисного белка CheY *T. naphthophila* (TnaCheY) и его мутантного гомолога (TnaCheY-mut). Показано, что внесённые изменения не оказали существенного эффекта на растворимость и термостабильность мутантного белка. Как и в случае белка дикого типа, для TnaCheY-mut получены высокие показатели растворимости, фактический уровень которой приближался к 95%, что было значительно выше расчётного значения. Термостабильность TnaCheY-mut по сравнению с исходным белком незначительно снизилась: белок без потерь выдерживал 20-30 мин прогревание в температурном диапазоне от 68°C до 72°C. Электрофоретические исследования показали, что процедура термолиза позволяет в диапазоне температур от 68°C до 72°C избавиться более чем от 90% белков клетки-хозяина и добиться получения хорошо очищенного препарата целевого термостабильного белка (TnaCheY-mut). Была разработана малостадийная высокорентабельная методика выделения подобных белков с использованием стадии высокотемпературной обработки (термолизис). Данная методика приведена в виде блок-схемы на рисунке 10 в сравнении со стандартным регламентом получения рекомбинантных белков биомедицинского и промышленного назначения (рис. 11).

Таким образом, высокий, даже на фоне внесения значительных изменений по С-концу молекулы, уровень экспрессии рекомбинантного мутантного гомолога белка CheY из *T. naphthophila* ( $\geq 20\%$  от общего белка клетки *E. coli*), высокие показатели растворимости ( $\approx 95\%$ ), термостабильности (68–72°C) и простота очистки посредством термообработки свидетельствуют о возможности его применения в качестве самостоятельного белка, обладающего биотехнологической ценностью или “белка-носителя” для получения важных для биомедицины полипептидов, ассоциированных с этим белком на генно-инженерном уровне.

Проведённый анализ аминокислотной последовательности TnaCheY-mut позволил также выявить важные для нутрицевтики параметры полученного рекомбинантного белка. К заявляемым ценным параметрам относятся: наличие комплекса незаменимых L-аминокислот для человека и теплокровных животных и присутствие сайтов узнавания для большинства протеаз желудочно-кишечного тракта (рис. 8), что определяет его хорошую переваримость и усвояемость.

Кроме того, в настоящей работе на примере клеток лабораторного штамма *E. coli* BL21(DE3), экспериментально обоснована возможность использования эписомальной экспрессии хемотаксисных белков CheY бактерий рода *Thermotoga* для управления кинетикой роста данных клеток за счёт воздействия на отдельные этапы хемотаксиса. Это открывает возможности использования данных белков в режиме ко-экспрессии в качестве модуляторов биосинтеза трудноэкспрессируемых белков, обладающих высокой промышленной или биомедицинской ценностью.

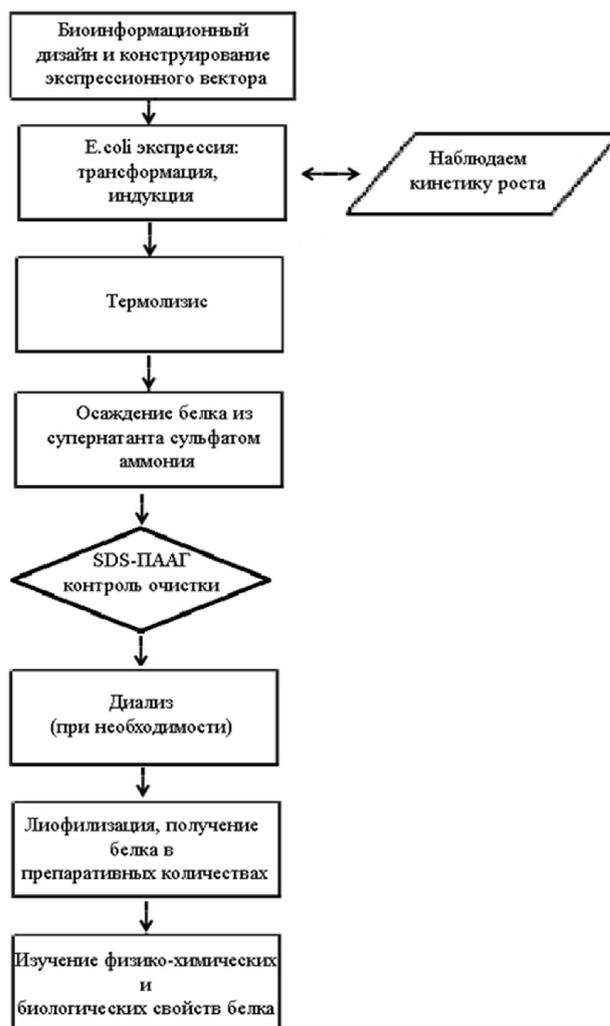


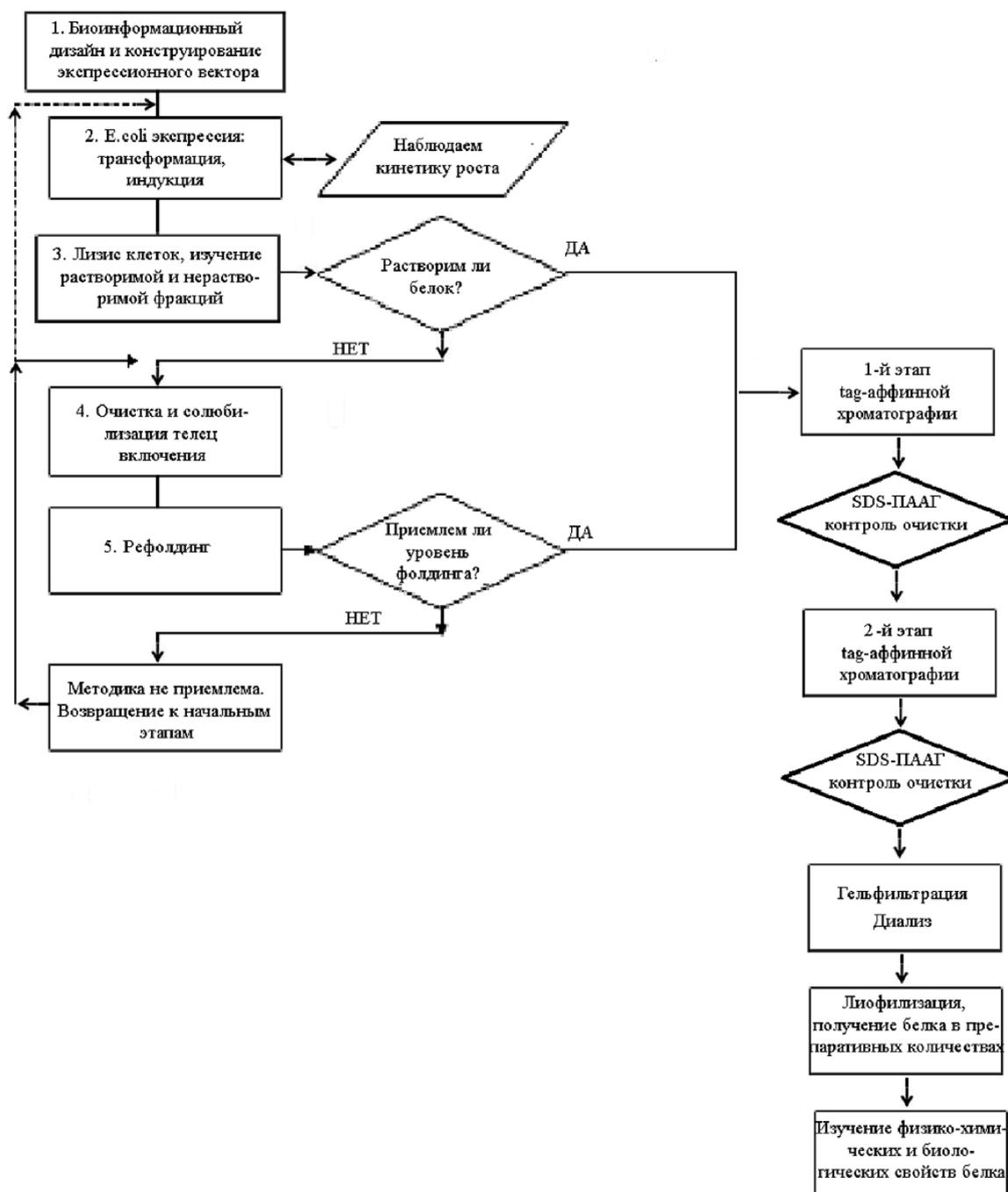
Рисунок 10. Оптимизированная технологическая схема получения белка TnaCheY-mut с использованием этапа термолизиса.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №16-16-04086).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.



**Рисунок 11.** Стандартная технологическая схема получения рекомбинантных белков фармацевтического и промышленного назначения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Sourjik V., Berg H.C. (2000) Mol. Microbiol., **37**, 740-751.
2. Sourjik V., Berg H.C. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **99**, 12669-12674.
3. Park S.Y., Chao X., Gonzalez-Bonet G., Beel B.D., Bilwes A.M., Crane B.R. (2004) Mol. Cell., **16**, 563-574.
4. Sircar R., Greenswag A.R., Bilwes A.M., Gonzalez-Bonet G., Crane B.R. (2013) J. Biol. Chem., **288**, 13493-13502.
5. Bitbol A.-F., Wingreen N.S. (2015) Biophys. J., **108**, 1293-1305.
6. Lipkow K., Andrews S.S., Bray D. (2005) J. Bacteriol., **187**, 45-53.
7. Dahlquist F.W. (2018) Biophys. J., **114**, 505-506.
8. Cuadros C., Lopez-Hernandez F.J., Dominguez A.L., McClelland M., Lustgarten J. (2004) Infect. Immun., **72**, 2810-2816.
9. Rizzuto R., Brini M., Pizzo P., Murgia M., Pozzan T. (1995) Curr. Biol., **5**, 635-642.
10. Гришин Д.В., Жданов Д.Д., Гладиллина Ю.А., Покровский В.С., Подобед О.В., Покровская М.В., Александрова С.С., Милюшкина А.Л., Виговский М.А., Соколов Н.Н. (2018) Биомед. химия, **64**, 53-60. DOI: 10.18097/PBMC20186401053.
11. Grishin D.V., Gladilina Y.A., Aleksandrova S.S., Pokrovskaya M.V., Podobed O.V., Pokrovskii V.S., Zhdanov D.D., Sokolov N.N. (2017) Appl. Biochem. Microbiol., **53**, 688-698.

## МУТАНТНЫЙ ГОМОЛОГ ХЕМОТАКСИСНОГО БЕЛКА CheY T. *NAPHTHOPHILA*

12. Гришин Д.В., Подобед О.В., Гладиллина Ю.А., Покровская М.В., Александрова С.С., Покровский В.С., Соколов Н.Н. (2017) *Вопр. питания*, **86**, 19-31.
13. Drury L. (1996) *Methods Mol. Biol.*, **58**, 249-256.
14. Gibson D.G. (2011) *Methods Enzymol.*, **498**, 349-361.
15. Yadav P., Yadav A., Garg V., Datta T.K., Goswami S.L., De S. (2011) *Indian J. Exp. Biol.*, **49**, 558-560.
16. Bradford M.M. (1976) *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
17. Laemmli U.K. (1970) *Nature*, **227**(5259), 680-685.
18. Felsenstein J. (1985) *Evolution*, **39**, 783-791.
19. Yang C., Xu Y., Jia R., Li P., Zhang L., Wang M., Zhu D., Chen S., Liu M., Yin Z., Cheng A. (2017) *J. Virol. Methods*, **247**, 1-5.
20. Tanaka M., Tokuoaka M., Gomi K. (2014) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 3859-3867.
21. Gustafsson C., Govindarajan S., Minshull J. (2004) *Trends Biotechnol.*, **22**, 346-353.
22. Murashima K., Kosugi A., Doi R.H. (2003) *Proteins*, **50**, 620-628.
23. Costa S., Almeida A., Castro A., Domingues L. (2014) *Front. Microbiol.*, **19**, 63.
24. Silversmith R.E., Guanga G.P., Betts L., Chu C., Zhao R., Bourret R.B. (2003) *J. Bacteriol.*, **185**, 1495-1502.
25. Sarkar M.K., Paul K., Blair D. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 9370-9375.

Поступила в редакцию: 09. 01. 2019.  
После доработки: 23. 01. 2019.  
Принята к печати: 23. 01. 2019.

### PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF A NEW MUTANT HOMOLOG OF CHEMOTAXIS PROTEIN CheY FROM ANAEROBIC HYPERTHERMOPHILIC MICROORGANISM *THERMOTOGA NAPHTHOPHILA*

*D.V. Grishin<sup>1\*</sup>, Ju.A. Gladilina<sup>1</sup>, D.D. Zhdanov<sup>1,2</sup>, M.V. Pokrovskaya<sup>1</sup>, I.Yu. Toropygin<sup>1</sup>, S.S. Aleksandrova<sup>1</sup>, V.S. Pokrovskiy<sup>1,2</sup>, N.N. Sokolov<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Biomedical Chemistry,  
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; \*e-mail: molbiol\_ibm@inbox.ru  
<sup>2</sup>Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

Using genetic engineering methods the expression vectors structures have been designed to produce recombinant proteins TnaCheY and Tna CheY-mut, the homologues of the chemotaxis protein CheY from the hyperthermophilic organism *Thermotoga naphthophila* in *Escherichia coli* BL21(DE3) cells. The cultivation conditions of transformed strains were optimized. The influence of episomal expression of the heterologous chemotaxis protein CheY on growth kinetics parameters of the culture of mesophilic bacteria *E. coli* was studied. The optimal purification flowchart of the obtained proteins using thermolysis is proposed. Using the *E. coli* BL21(DE3) laboratory strain as an example, the possibility of employment the episomal expression of such proteins to control the cultivation and production time of pharmaceutically and industrially valuable metabolites due to the impact on some stages of the bacterial chemotaxis is experimentally proved.

**Key words:** recombinant protein; thermal stability; chemotaxis protein CheY; strain-producer; expression; biotechnology