

Гетерологичная экспрессия тетрагемового цитохрома *c* анаэробной бактерии *Geobacter sulfurreducens* AM-1

Архинова О. В., Захарова М. В.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пушкино;
aroksan@gmail.com

Периплазматическая метакрилатредуктазная активность была обнаружена у трёх анаэробных грамотрицательных бактерий *Geobacter sulfurreducens* AM-1 (класс *Deltaproteobacteria*), *Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-1 (класс *Deltaproteobacteria*) и *Denitrovibrio acetiphilus* DSM 12809 (класс *Deferribacteres*) [1,2]. Метакрилатная редокс система *G. sulfurreducens* AM-1 является терминальным звеном в процессе метакрилатного дыхания. Она состоит из флавиносодержащей метакрилатредуктазы Mrd (50 кДа) и четырёхгемового цитохрома *c* Mcc (30 кДа) [1]. Гены *mrd* и *mcc*, кодирующие гомологичные хромопротеиды метакрилатных редокс систем *G. sulfurreducens*, *A. dehalogenans* и *D. acetiphilus*, организованы в один оперон в геномах этих анаэробов [3]. Для последующих биохимических исследований уникальной метакрилатной редокс системы гены *mrd* и *mcc* *G. sulfurreducens* были клонированы и экспрессированы в клетках *E. coli* [4]. Однако уровень экспрессии растворимого Mcc оказался низким. Гетерологичная экспрессия периплазматических цитохромов *c* анаэробных бактерий, даже не мультигемовых, а содержащих 1-2 гема, – задача нетривиальная. Незрелый белок этих цитохромов синтезируется с сигнальной последовательностью типа Sec, которая отщепляется при переносе белка через мембрану в периплазму [5,6]. Окончательное созревание цитохромов *c* осуществляется в периплазме после ковалентного связывания с белком гемов *c* [5,7]. Случаи успешной продукции растворимых мультигемовых цитохромов *c* анаэробов в настоящее время единичны [8,9].

Целью работы был поиск приемлемого способа гетерологичной экспрессии Mcc *G. sulfurreducens*. Для достижения поставленной цели мы проверили разные факторы, которые могут способствовать правильному биогенезу анаэробных цитохромов *c* в процессе гетерологичной экспрессии, т.е. образованию в результате растворимого периплазматического цитохрома *c*.

Были опробованы 2 типа отщепляемых сигнальных последовательностей, способствующих преодолению плазматической мембраны. Сначала клонировали полный ген *mcc*, включая лидерную последовательность типа Sec длиной 23 аминокислоты, в плазмиду pQE30 под промотором бактериофага T5. Однако, экспрессия рекомбинантного Mcc в клетках *E. coli* M15[pREP4] привела к локализации этого белка в телах включения. Этот факт послужил основанием для замены природной последовательности Sec на лидерную *relB*. Кодирующий фрагмент гена *mcc* после слияния с отщепляемым пептидом *relB* был клонирован в плазмиду pET22 и экспрессирован в клетках *E. coli* BL21(DE3). Результатом оказалась продукция Mcc в телах включения.

Была выполнена смена экспрессионного штамма для продукции целевого белка [8]. Для проверки этой гипотезы и сравнения с вариантами экспрессии в клетках *E. coli* BL21(DE3) мы использовали экспрессионный штамм *E. coli* C41(DE3). Небольшое количество рекомбинантного Mcc обнаружили в растворимой фракции клеток C41(DE3).

Для корректного биогенеза периплазматических цитохромов *c* была осуществлена коэкспрессия со вспомогательной плазмидой pEC86, содержащей кластер генов *ccm* *E. coli* [8-14], в клетках *E. coli* BL21(DE3) и C41(DE3). Применение pEC86 увеличило количество целевого белка, хоть он присутствовал в основном в телах включения.

Для повышения выхода растворимого белка была снижена концентрация индуктора IPTG (200 мкМ, 20 мкМ, 10 мкМ, 5 мкМ) [8,9,11], однако существенного влияния на

экспрессию количества IPTG не было обнаружено. Понижение температуры индукции с 25°C до 15°C привело к существенному уменьшению уровня продукции целевого белка.

Для улучшения растворимости целевого белка были использованы соли и/или детергенты [9]: неионные детергенты (додецилмальтозид, или Твин 20, или Тритон X-100 в концентрации 2%), NaCl (1M), а также сочетания указанных детергентов и NaCl. Инкубация клеток в буфере, содержащем NaCl, не приводила к повышению растворимости рекомбинантного Мсс, в отличие от ранее описанных экспериментов [9]. Однако, обработка клеток буфером с додецилмальтозидом приводила к повышению уровня растворимости рекомбинантного Мсс более, чем в 2 раза.

Таким образом, в настоящее время мы располагаем рядом приемлемых условий для экспрессии анаэробного рекомбинантного тетрагеомового цитохрома *c* Мсс в клетках *E. coli* и способом повышения его растворимости. Данные по гетерологичной экспрессии гена цитохрома *c* Мсс *G. sulfurreducens* в клетках *E. coli* внесут вклад в исследование мультигеомовых цитохромов *c* анаэробов, а также в разработку новых подходов к генно-инженерным работам с ними.

Литература

1. Mikoulińskaia (Arkhipova) et al. Eur J Biochem. 1999. V. 263. P. 346-352.
2. Архипова и др. Микробиология. 2019. Т. 88. № 2. С. 144–153.
3. Arkhipova et al. PLoS ONE. 2015. 10(5):e0125888. doi:10.1371/journal.pone.0125888
4. Захарова и др. IV Пущинская школа-конференция "Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов". 4-8 декабря 2017. Пушино. С. 54-56.
5. Thöny-Meyer et al. Molecular Microbiology. 1994. 12: 1 –9.
6. Bagos et al. Bioinformatics. 2010. 26: 2811 –2817.
7. Li et al. BMC Structural Biology. 2011. 11
8. Londer et al. Protein Expression and Purification. 2005. 39. 254–260.
9. Londer et al. Protein Expression and Purification. 2006. 47: 241–248.
10. Arslan et al. Biochem Biophys Res Commun. 1998. 251(3): 744-747.
11. Londer et al. Biochim Biophys Acta. 2002. 1554: 202-211.
12. Heitmann D. and Einsle O. Biochemistry. 2005. 44: 12411 -12419.
13. Pokkuluri et al. Biochimica et Biophysica Acta. 2010. 1797: 222–232.
14. Dantas et al. FEBS Letters. 2013. 587: 2662–2668.