



### Павленко Александра Павловна

Аспирант лаборатории молекулярной фармакологии и био-медицины Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН. В 2020 г. с отличием окончила Дальневосточный федеральный университет (Школа естественных наук) по направлению «Химия». После успешной защиты магистерской диссертации поступила в очную аспирантуру ТИБОХ ДВО РАН (руководитель к.х.н., доцент Е.В. Лейченко).

Объектом исследования молодого ученого являются пороформирующие токсины морских анемонов – актинопорины, получение их рекомбинантных аналогов и изучение биологической активности. Результаты работы были представлены на

Региональной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых по естественным наукам (Владивосток, 2019 г.) и XXXII Зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2020 г.).

УДК 577.112

DOI: 10.37102/0869-7698\_2021\_215\_01\_18

А.П. ПАВЛЕНКО

## Оптимизация условий экспрессии и выделения рекомбинантного аналога актинопорина Hct-A2 морской анемоны *Heteractis crispa*

*Подобраны условия проведения экспрессии и выделения рекомбинантного аналога актинопорина Hct-A2 морской анемоны Heteractis crispa. Показано, что гомогенизация клеток под давлением позволяет существенно увеличить выход растворимой формы рекомбинантного актинопорина по сравнению с ультразвуковой обработкой.*

*Ключевые слова:* актинопорины, пороформирующие токсины, морские анемоны, *Heteractis crispa*.

**Expression and isolation optimization of recombinant analog of actinoporin Hct-A2 from sea anemone *Heteractis crispa*.** A.P. PAVLENKO (G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok).

*The conditions of the expression and isolation of the recombinant analog of actinoporin Hct-A2 from sea anemone Heteractis crispa were selected. The high pressure homogenization of cells was found to increase the yield of recombinant actinoporin in a soluble form, in contrast to the ultrasonic cell destruction.*

*Key words:* actinoporins, pore-forming toxins, sea anemones, *Heteractis crispa*.

Актинопорины являются наиболее представительной группой  $\alpha$ -пороформирующих токсинов морских анемонов. В ядовитом секрете они присутствуют в виде

ПАВЛЕНКО Александра Павловна – аспирант (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток). E-mail: apavlenko141@gmail.com

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 18-74-10028.

комбинаторной библиотеки, включающей множество изоформ, кодируемых мультигенным семейством [3, 7, 13]. Актинопорины представляют собой небольшие основные полипептиды (17–20 кДа, 165–180 а.о.), образующие поры в мембранах клеток, содержащих сфингомиелин. Образование пор приводит к нарушению целостности, избирательной проницаемости клетки и в конечном итоге к ее гибели [2, 15]. Молекулы актинопоринов имеют пространственную структуру  $\beta$ -сэндвича (10–12  $\beta$ -тяжей), к которому с двух сторон примыкают короткие  $\alpha$ -спирали, при этом N-концевая  $\alpha$ -спираль является важным функциональным элементом молекул актинопоринов, обуславливающим формирование катион-селективной поры.

Несмотря на важность актинопоринов для фундаментальной и прикладной химии, выделение отдельных их изоформ из природных источников с использованием хроматографических методов затруднено вследствие высокой идентичности аминокислотных последовательностей, а следовательно, и физико-химических свойств. Кроме того, выделение природных токсинов требует достаточно большого количества биологического сырья, что неблагоприятно сказывается на популяции морских анемонов. Один из путей решения данной проблемы – получение рекомбинантных аналогов этих токсинов путем гетерологической экспрессии кодирующих их генов в бактериальной системе. Данный биотехнологический подход позволяет получить высоко очищенный белок при минимальных затратах [12]. Однако существуют определенные сложности с получением растворимой формы актинопоринов в достаточных количествах. Для большинства актинопоринов, экспрессированных в *Escherichia coli*, наблюдается очень низкий выход белка. Это связано с тем, что, с одной стороны, актинопорины проявляют высокую токсичность в отношении бактериальных клеток и их наработка не должна занимать много времени (оптимально 3–5 ч), с другой – короткая индуцируемая экспрессия дает высокую концентрацию актинопоринов, что приводит к их агрегации с образованием телец включения [1, 4, 5, 9, 11, 14], из которых с помощью процедур солиubilизации и рефолдинга могут быть извлечены рекомбинантные белки [10, 12]. Следует также отметить, что выделение актинопоринов из телец включения, а именно процедуры денатурации–ренатурации, может привести к возникновению нескольких различных конформаций полипептида, отличающихся от природной. Кроме того, существует риск «загрязнения» частично свернутыми формами и их агрегатами, как это наблюдалось, например, при получении рекомбинантного аналога стихолизина II (StII) морской анемоны *Stichodactyla helianthus* [8]. Еще одним важным фактором, влияющим на выход растворимой формы, является температура. Варьируя этим параметром, например снижая его, можно добиться увеличения времени инкубации после индукции с минимальным образованием телец включения и/или минимальным проявлением токсичности. Таким образом, стратегия оптимизации условий должна учитывать как минимум три фактора: время инкубации, температуру и концентрацию индуктора.

В данной работе с целью повышения выхода растворимой формы актинопорина проведена оптимизация условий экспрессии и выделения рекомбинантного аналога токсина Hct-A2 – представителя комбинаторной библиотеки актинопоринов морской анемоны *Heteractis crispa* [7]. Клетки *E. coli* штамма Rosetta (DE3) путем электропорации были трансформированы экспрессионной конструкцией pET-41a/Hct-A2, полученной ранее [6], и высеяны на чашки Петри со средой Лурия–Бертани (LB-агар). Целевой полипептид в такой системе синтезируется в виде гибридного белка, содержащего полигистидиновую последовательность, белок-партнер глутатион-S-трансферазу (GST) и сайт расщепления энтеропептидазой (Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) для отделения целевого полипептида от белка-партнера. Подбор условий экспрессии производился по трем параметрам: концентрации индуктора экспрессии изопропил- $\beta$ -D-1-тиогаллактопиранозид (ИПТГ), температуре и времени инкубации.

Анализ уровня экспрессии целевого гена выполнялся в присутствии 0,1, 0,2, 0,5 и 1,0 мМ ИПТГ при температуре 18, 30 и 37 °С. Через 3, 10, 15 и 20 ч после добавления

индуктора осуществлялся отбор проб для электрофоретического анализа. В результате оптимальными оказались условия инкубации клеток в присутствии 0,1 мМ ИПТГ при температуре 18 °С в течение 20 ч (см. таблицу).

**Подбор условий экспрессии рекомбинантного аналога актинопорина Нсг-А2 морской анемоны *H. crispata***

Время инкубации, ч	Концентрация ИПТГ, мМ											
	0,1			0,2			0,5			1,0		
	Температура инкубации, °С											
	18	30	37	18	30	37	18	30	37	18	30	37
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	++	+	+	++	+	+	++	+	+	++	+	+
15	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
20	+++	++	++	+++	++	++	+++	++	++	+++	++	++

Примечание. Экспрессия белка: «+» – в малых, «++» – небольших, «+++» – максимальных количествах.

Далее клетки Rosetta (DE3), трансформированные рекомбинантной плазмидой, растили в 1 л среды LB в подобранных условиях, затем клеточную суспензию разделяли на две части и осаждали. Разрушение клеток осуществляли двумя методами: обработкой ультразвуком и гомогенизацией под давлением.

Согласно литературным данным для выделения рекомбинантных актинопоринов, как правило, используется ультразвуковая обработка бактериальных клеток [12]. На электрофореграммах видно, что гибридный белок (50 кДа)

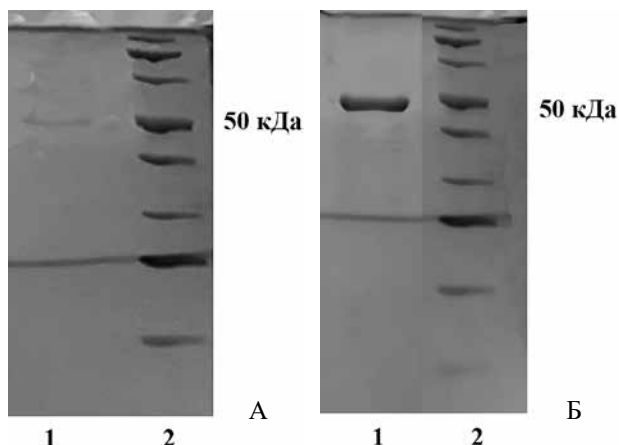


Рис. 1. Электрофореграммы гибридного белка GST-His6-gHct-A2, полученные после разрушения клеток ультразвуком (А) и гомогенизации клеток под давлением (Б). 1 – гибридный белок, 2 – маркер молекулярных масс



Рис. 2. Схема получения рекомбинантного актинопорина Нсг-А2

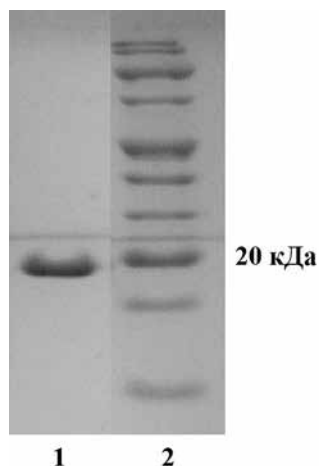


Рис. 3. Электрофореграмма актинопорина gHct-A2 после STI-аффинной хроматографии. 1 – gHct-A2, 2 – маркер молекулярных масс

после обработки ультразвуком присутствует в следовых количествах (рис. 1, А), тогда как после гомогенизации под давлением наблюдается выраженная полоса на уровне 50 кДа (рис. 1, Б). Эти результаты указывают на то, что гомогенизация под давлением является более подходящим методом разрушения клеток для получения растворимой формы актинопорина. Основным недостатком ультразвуковой обработки – выделение тепла, что может приводить к нагреву белка и его денатурации, тогда как при гомогенизации под давлением такого не происходит.

В дальнейшем актинопорин выделяли по схеме, представленной на рис. 2. Разделение белков клеточного лизата было проведено с помощью металл-аффинной хроматографии. Гибридный белок, связанный остатками гистидина с ионами никеля, подвергся расщеплению энтеропептидазой в присутствии 2 мМ CaCl<sub>2</sub> для высвобождения целевого актинопорина (молекулярная масса около 20 кДа). Последующая очистка от фермента проводилась на STI-агарозе (рис. 3). В результате выход rHct-A2 после гомогенизации под давлением составил около 1 мг/л клеточной культуры, тогда как выход после ультразвука – около 0,2 мг/л. Молекулярная масса rHct-A2 была определена с помощью МАЛДИ-ВП масс-спектрометрии и составила 19 142 Да, что соответствует расчетной.

Таким образом, подбор условий экспрессии рекомбинантного аналога Hct-A2 морской анемоны *H. crispa* и применение гомогенизации под давлением для разрушения бактериальных клеток позволили более чем в 5 раз увеличить выход рекомбинантного актинопорина в растворимой форме.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Anderluh G., Pungerčar J., Štrukelj B., Maček P., Gubenšek F. Cloning, sequencing, and expression of equinatoxin II // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1996. N 2 (220). P. 437–442.
2. Anderluh G., Maček P. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria) // *Toxicon*. 2002. Vol. 40, N 2. P. 111–124.
3. Anderluh G., Krizaj I., Štrukelj B., Gubenšek F., Maček P., Pungerčar J. Equinatoxins, pore-forming proteins from the sea anemone *Actinia equina*, belong to a multigene family // *Toxicon*. 1999. N 10 (37). P. 1391–1401.
4. Anderluh G., Gökçe I., Lakey J.H. Expression of proteins using the third domain of the *Escherichia coli* periplasmic-protein TolA as a fusion partner // *Protein Expression and Purification*. 2003. N 1 (28). P. 173–181.
5. Jiang X., Chen H., Yang W., Liu Y., Liu W., Wei J., Tu H., Xie X., Wang L., Xu A. Functional expression and characterization of an acidic actinoporin from sea anemone *Sagartia rosea* // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2003. N 3 (312). P. 562–570.
6. Leichenko E.V., Monastirnaya M.M., Zelepuga E.A., Tkacheva E.S., Isaeva M.P., Likhatskaya G.N., Anastyuk S.D., Kozlovskaya E.P. Hct-A is a new actinoporin family from the *Heteractis crispa* sea anemone // *Acta Nat.* 2014. N 23 (6). P. 89–98.
7. Leychenko E., Isaeva M., Tkacheva E., Zelepuga E., Kvetkina A., Guzev K., Monastirnaya M., Kozlovskaya E. Multigene family of pore-forming toxins from sea anemone *Heteractis crispa* // *Mar. Drugs*. 2018. N 6 (16). P. 1–19.
8. Manchêo J.M., De Los Ríos V., Martínez Del Pozo Á., Lanio M.E., Ónaderra M., Gavilanes J.G. Partially folded states of the cytolytic protein sticholysin II // *Biochim. Biophys. Acta – Protein Structure and Molecular Enzymology*. 2001. N 1/2 (1545). P. 122–131.
9. Pazos F., Valle A., Martínez D., Ramírez A., Calderón L., Pupo A., Tejuca M., Morera V., Campos J., Fando R., Dyszy F., Schreier S., Horjales E., Alvarez C., Lanio M.E., Lissi E. Structural and functional characterization of a recombinant sticholysin I (rSt I) from the sea anemone *Stichodactyla helianthus* // *Toxicon*. 2006. N 8 (48). P. 1083–1094.
10. Terpe K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006. Vol. 72, N 2. P. 211–222.
11. Uechi G.I., Toma H., Arakawa T., Sato Y. Molecular cloning and functional expression of hemolysin from the sea anemone *Actinaria villosa* // *Protein Expression and Purification*. 2005. N 2 (40). P. 379–384.
12. Valle A., Hervis Y.P., Socas L.B.P., Canet L., Faheem M., Barbosa J.A.R.G., Lanio M.E., Pazos I.F. The multigene families of actinoporins (part II): Strategies for heterologous production in *Escherichia coli* // *Toxicon*. 2016. N 118. P. 64–81.
13. Wang Y., Yap L.L., Chua K.L., Khoo H.E. A multigene family of *Heteractis magnifica* lysins (HMgs) // *Toxicon*. 2008. N 8 (51). P. 1374–1382.
14. Wang Y., Chua K.L., Khoo H.E. A new cytolytic protein from the sea anemone, *Heteractis magnifica*: Isolation, cDNA cloning and functional expression // *Biochim. Biophys. Acta – Protein Structure and Molecular Enzymology*. 2000. N 1 (1478). P. 9–18.
15. Yap W.Y., Hwang J.S. Response of cellular innate immunity to cnidarian pore-forming toxins // *Molecules*. 2018. Vol. 23, N 10. P. 1–19.