

УДК [602.6+58.088] 547.963.4:582.736

ЭКСПРЕССИЯ ЛЕГОГЛОБИНА – ГЕМОГЛОБИНА БОБОВЫХ РАСТЕНИЙ КАК КОМПОНЕНТА ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА «РАСТИТЕЛЬНОГО МЯСА»

А.Ф. Топунов, О.В. Космачевская, Э.И. Насыбуллина

*Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук, Москва, Россия*

Введение

Легоглобин (леггемоглобин, Lb) – симбиотический гемоглобин, образующийся в клубеньках на корнях бобовых растений при инфицировании их азотфиксирующими почвенными бактериями рода *Rhizobium*. Этот белок необходим для фиксации азота бобовыми. Основная функция Lb заключается в обеспечении кислородом быстро дышащих *Rhizobium* при очень низкой концентрации O_2 , нетоксичной для бактериальной нитрогеназы [1–3]. Lb содержится в цитоплазме инфицированных клеток, где его содержание составляет до 30–40 % всех растворимых белков (внутриклеточная концентрация = $1 \div 5 \times 10^{-4}$ М) [4]. Благодаря чрезвычайно высокому сродству к кислороду ($p50 = 48$ нМ) Lb поддерживает нормальный поток кислорода к азотфиксирующим бактериям при его низкой концентрации в клубеньке.

Долгое время Lb изучали только как компонент азотфиксирующей симбиотической системы, необходимый для функционирования бобово-ризобиального симбиоза. В последнее время интерес к этому белку усилился. Возник спрос на создание продуктов из растительного сырья, имитирующих мясные продукты животного происхождения – «растительное мясо» (Plant-Based Meat). Lb оказался единственным растительным гемопротеидом, который может выступать в качестве ингредиента для придания органолептических свойств растительной основе [5, 6].

Первая экспрессия Lb была выполнена в 1995 г. в нашей совместной работе с Институтом биоорганической химии Польской АН (Познань), и Европейской лабораторией молекулярной биологии (Гамбург, Германия) [7]. LbI люпина был экспрессирован в клетках *E. coli*, штамм BL21. Впоследствии различными авторами были проведены работы по экспрессии и других растительных гемоглобинов. Позже были опубликованы работы по экспрессии в *E. coli* Lba сои [8, 9], LbII вигны [10] и несимбиотического гемоглобина риса Hb1 [11].

Во всех работах очищенный рекомбинантный Lb по характеристикам не отличался от Lb дикого типа, и в клетках *E. coli* находился в физиологически активной восстановленной форме. При этом Lb для клеток *E. coli* – чужеродный белок, на синтез которого тратится часть биохимического ресурса бактериальной клетки. Поэтому такие клетки могут иметь пониженный адаптационный потенциал, что может помешать эффективному биотехнологическому синтезу Lb.

Целью работы было изучить, как экспрессия Lb влияет на способность клеток *E. coli* переносить окислительный и нитрозативный стресс.

Материалы и методы

В работе использовали клетки *Escherichia coli* (штамм ТВ-1, модифицированный плазмидой pEMBL18+:SyLba со встроенным геном Lba сои, любезно предоставленный Проф. Р. Арредондо-Петером из Автономного университета штата Морелос, Куэрнавака, Мексика). В качестве контроля использовали аналогичный штамм без плазмиды. Исследования проводили на трех типах культур клеток: не синтезирующие Lb (C_{Lb-}) – 0,08 мкг гема/мг белка, слабо синтезирующие Lb (C_{Lb+}) – 0,15 мкг гема/мг белка, и активно синтезирующие Lb (C_{Lb++}) – 0,45 мкг гема/мг белка. Концентрацию клеток в культуре измеряли по величине оптической плотности при 600 нм (OD_{600}) в 0,1 см кювете.

Для создания в клетках условий окислительного и нитрозативного стрессов использовали S-нитрозоглутатион (GSNO), гидропероксид трет-бутила (t-BOOH) и бензилвиологен (Bv). Стерилизованные фильтрованием растворы t-BOOH, Bv и GSNO в различных концентрациях вносили в среду на ранней стадии логарифмической фазы роста, через 3 ч с момента засева ($OD_{600} = 0,12 \div 0,15$).

Для получения Lb-содержащей фракции культуру клеток (15 ч роста), отмывую от компонентов среды, разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе «MSE» (Англия) при мощности 23 кГц. Раствор для разрушения включал 50 мМ трис-НСl буфер (pH 7,4), лизоцим (10 мг/мл) и PMSF (20 мкМ). Белки клеточного экстракта высаливали сульфатом аммония (50–90 % насыщения), после чего проводили хроматографию на Ultrogel AcA-54 (колонка 1*60 см), уравновешенном 0,02 М К-фосфатным буфером pH 7,2 (КРВ) и на ДЭАЭ-целлюлозе (колонка 1*7 см), уравновешенной 0,01 М КРВ с линейным градиентом NaCl от 0 до 1 М. Фракция Lb выходила с колонки при 0,3 М NaCl. Для подавления активности протеаз в буфер добавляли 10 мкМ PMSF. Lb-содержащую фракцию концентрировали ультрафильтрацией, окисляли раствором феррицианида калия и диализовали в 0,02 М КРВ.

Спектры поглощения целых клеток записывали на спектрофотометре “Beckman Coulter DU 650” (США) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см относительно среды LB. Концентрацию Lb определяли с помощью модифицированного пиридингемохромного метода. Для этого измеряли оптическое поглощение восстановленного пиридингемохромогена против окисленного при 556 и 539 нм, определяли разницу: $\Delta D = (D_{556red} - D_{556oxi}) - (D_{539red} - D_{539oxi})$ и рассчитывали концентрацию Lb, используя коэффициент миллимолярной экстинкции $\Delta E = 4,3 \text{ ммоль}^{-1}\text{см}^{-1}$, определенный нами для данного ΔD [12]. В качестве стандарта использовали миоглобин кашалота.

Результаты и обсуждение

Штамм *E. coli*, использованный в данной работе, обладает высоким уровнем экспрессии Lba, о чем свидетельствует выраженный розовый цвет клеток. Большие количества Lba в бактериальных клетках позволяют спектрофотометрически регистрировать состояние Lb в целых клетках. Спектры поглощения целых клеток обнаруживали максимумы, характерные для оксигенированного Lb, то есть леогоглобин находился в бактериальных клетках в физиологически активном восстановленном состоянии и был идентичен Lb сои дикого типа. В поддержании Lb в восстановленном состоянии в клетках *E. coli* могут участвовать бактериальные редуктазы [7, 13]. Экспрессионная система, использованная в нашей работе, позволяла получать белок в растворимом состоянии, что очень важно для биотехнологического использования.

Рост всех культур в середине логарифмической фазы роста (7 часов) подавлялся гидропероксидом трет-бутила. Клетки, экспрессирующие Lb на низком уровне (C_{Lb+}), обнаруживали большую чувствительность к t-BOOH: уровень их роста к 7 часам по сравнению с контролем составлял 43 %, в то время как C_{Lb-} и C_{Lb++} – 66 %. Рост всех типов клеток в условиях индуцированного t-BOOH окислительного стресса стимулировался нитрозоглутатионом (GSNO), даже при концентрациях t-BOOH, вызывавших полное подавление роста штаммов [14].

В бактериальной клетке на фоне таких эффективных антиоксидантных ферментов, как супероксиддисмутаза и каталазы-пероксидазы, антиоксидантное действие леогоглобина малозаметно. Lb является чужеродным белком для клеток *E. coli*, и на его синтез она расходует энергетические и пластические ресурсы, необходимые ей для синтеза антиоксидантных ферментов de novo в условиях окислительного и нитрозативного стресса. Ситуацию могут усугублять феррильная и оксоферрильная формы Lb, образующиеся в реакции с пероксидами, и сами являющиеся сильными окислителями. Например, эти формы Lb могут вызывать перекисное окисление липидов мембран. При этом в бобовых растениях пероксидазная, NO-диоксигеназная и пероксинитрит-изомеразная активности леогоглобина могут вносить существенный вклад в общую антиоксидантную защиту инфицированной клетки азотфиксирующего клубенька, в которой концентрация Lb очень высока.

В настоящее время экспрессию Lb рассматривают в одном ряду с синтезом других гемоглобинов, как потенциально важный биотехнологический процесс [15]. Уже имеются попытки закрепления возможности использования Lb, как и некоторых других гемоглобинов, для получения растительного мяса, в патентах. В качестве примера можно привести патент РФ [16], оформленный американскими авторами. Поэтому сохранение жизнеспособности микроорганизмов, синтезирующих Lb, на высоком уровне становится важной биотехнологической задачей. В связи с этим необходимы дополнительные исследования, которые позволят уменьшить негативные последствия синтеза Lb на клетки-продуценты. Такие работы могут быть важны для биотехнологического синтеза и других гемоглобинов, как животных, так и бактериальных.

Заключение

Клетки *E. coli* со встроенным геном левоглобина сои (Lba) производят этот белок в восстановленном и оксигенированном, то есть физиологически активном состоянии. Клетки, синтезирующие Lb, были более чувствительны к действию индукторов окислительного и нитрозативного стресса, по сравнению с клетками без Lb, что, вероятно, связано с его включением в процессы, связанные с обменом активных форм кислорода и с синтезом его суперокисленных форм (феррильной и оксоферрильной), что усиливает окислительный стресс в клетках.

Сохранение жизнеспособности микроорганизмов, синтезирующих Lb и другие гемоглобины, на высоком уровне становится важной биотехнологической задачей. Необходимы дополнительные исследования, которые позволят уменьшить негативные последствия синтеза этих белков на клетки-продуценты.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075–15–2022–318 от 20 апреля 2022 г. о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

ЛИТЕРАТУРА

1. Appleby C.A. Leghemoglobin and Rhizobium respiration. // *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1984. 35. 443–478.
2. Топунов А.Ф. Левоглобин и его роль в регуляции кислородного режима в азотфиксирующих клубеньках бобовых. // *Биохимия.* 1995. 60(1). 66–74.
3. Layzell, D.B.; Atkins, C.A. The physiology and biochemistry of legume N₂ fixation. In *Plant Metabolism*, 2nd ed. Harlow, UK: Longman, 1997, pp. 495–505.
4. Verma, D.P.S.; Bal, A.K. Intracellular site of synthesis and localization of leghemoglobin in root nodules. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1976. 73. 3843–3847.
5. Fraser R.Z., Shitut M., Agrawal P., Mendes O., Klapholz S. Safety evaluation of soy leghemoglobin protein preparation derived from *Pichia pastoris*, intended for use as a flavor catalyst in plant-based meat. // *Int. J. Toxicol.* 2018. 37. 241–262.
6. Reyes T.F., Chen Y., Fraser R.Z., Chan T., Li X. Assessment of the potential allergenicity and toxicity of *Pichia* proteins in a novel leghemoglobin preparation. // *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2021. 119. e104817.
7. Sikorski M.M., Topunov A.F., Strozycki P., Vorgias C.E., Wilson K.S., Legocki A.B. Cloning and expression of plant leghemoglobin cDNA of *Lupinus luteus* in *Escherichia coli* and purification of the recombinant protein. // *Plant Sci.* 1995. 108. 109–117.
8. Hargrove M.S., Barry J.K., Brucker E.A., Berry M.B., Phillips G.N. Jr., Olson J.S., Arredondo-Peter R., Dean J.M., Klucas R.V., Sarath G. Characterization of recombinant soybean leghemoglobin a and apolar distal histidine mutants. // *J. Mol. Biol.* 1997. 266. 5. 1032–1042.
9. Jones D.K., Badii R., Rosell F.I., Lloyd E. Bacterial expression and spectroscopic characterization of soybean leghaemoglobin a. // *Biochem. J.* 1998. 330 (Pt 2). 983–988.
10. Arredondo-Peter, R.; Moran, J.F.; Sarath, G.; Luan, P.; Klucas, R.V. Molecular cloning of the cowpea leghemoglobin II gene and expression of its cDNA in *Escherichia coli*. Purification and characterization of the recombinant protein. // *Plant Physiol.* 1997. 114. 493–500.
11. Arredondo-Peter R., Hargrove M.S., Sarath G., Moran J.F., Lohrman J., Olson J.S., Klucas R.V. Rice hemoglobins (Gene cloning, analysis, and O₂-binding kinetics of a recombinant protein synthesized in *Escherichia coli*). // *Plant Physiol.* 1997. 115. 1259–1266.
12. Космачевская О.В., Топунов А.Ф. Метод определения содержания гемоглобинподобных белков в гетерогенных смесях. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2007. 43(3). 347–353.
13. Талызин В.В., Топунов А.Ф., Баширова Н.Ф., Кретович В.Л. Бактериальные редуктазы, восстанавливающие кислородпереносящие гемопротеиды. // *Докл. АН СССР.* 1988. 303(4). 1011–1012.
14. Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Shumaev K.B., Topunov A.F. Expressed soybean leghemoglobin: Effect on *Escherichia coli* at oxidative and nitrosative stress. // *Molecules.* 2021. 26. e7207.
15. Zhao Xinrui, Zhou Jingwen, Du Guocheng, Chen Jian. Recent advances in the microbial synthesis of hemoglobin. // *Trends in Biotechnology.* 2021. 39. 286–297.
16. Патент RU 2653751 C2 Российская Федерация. Способы и композиции для предметов потребления / Браун П.О., Врльиц М., Варадан Р., Айзен М., Соломатин С.; заявитель и патентообладатель «Импоссибл Фудз Инк» (US). – № 2014104812; заявл. 12.07.2012; опубл. 14.05.2018; Бюл. № 14.