

УДК 579.222

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ В СИСТЕМЕ ФЕРРЕДОКСИНОВ И ФЕРРЕДОКСИНРЕДУКТАЗ *MYCOLICIBACTERIUM SMEGMATIS*

© 2024 г. Д. О. Эпиктетов^а, *, М. В. Карпов^а, М. В. Донов^а^аИнститут биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, ФИЦ Пушинский научный центр биологических исследований РАН, Пушкино, 142290, Россия

*e-mail: epiktetoff@gmail.com

Поступила в редакцию 13.10.2023 г.

После доработки 26.10.2023 г.

Принята к публикации 26.10.2023 г.

Стероид-26-монооксигеназы принадлежат суперсемейству цитохромов P450 и функционируют в составе трехкомпонентных систем совместно с ферредоксинами и ферредоксинредуктазами, обеспечивающими электронный транспорт. Работа посвящена изучению P450-зависимых редокс-партнеров актинобактериального штамма *Mycolicibacterium smegmatis* mc²155. В клетках *E. coli* осуществлена сверхэкспрессия генов, кодирующих миколицибактериальные ферредоксины (FdxD и FdxE) и ферредоксинредуктазы (FdrA и FprA). Разработана схема выделения и очистки синтезируемых рекомбинантных белков методом аффинной хроматографии с получением электрофоретически гомогенных препаратов. Спектральный анализ ферредоксинредуктаз показал характерные для ФАД-содержащих белков пики поглощения. Осуществлена реакция восстановления цитохрома *c* с использованием рекомбинантных белков, показавшая, что FdxD, FdxE, FdrA и FprA могут выступать компонентами транспорта электронов от восстановительных эквивалентов НАД(Ф)Н.

Ключевые слова: Ферредоксин, ферредоксинредуктаза, редокс-партнеры, стероиды, транспорт электронов, *Mycobacterium smegmatis* mc²155

DOI: 10.31857/S0026365624020062

Бактериальное окисление стероидных соединений имеет фундаментальный интерес и несет практическую значимость. С одной стороны, способность к поглощению холестерина патогенными микобактериями определяет их вирулентные свойства (Wilburn et al., 2018). С другой стороны, сапротрофные актинобактерии могут быть использованы в качестве биокатализаторов для получения фармацевтически важных стероидных субстанций и их интермедиатов (Fernandez-Cabezón et al., 2016; Tekucheva et al., 2022; Donova, 2023).

Ключевыми ферментами стероидного катаболизма являются стероид-26-монооксигеназы CYP125 и CYP142, принадлежащие к суперсемейству цитохромов P450. Они катализируют гидроксирование терминального атома углерода (C26 или C27) боковой цепи стерина, инициируя его дальнейшую деструкцию (García-Fernández et al., 2013; Ortega Ugalde et al., 2018). Цитохромы P450 бактериального типа функционируют в составе трехкомпонентных ферментных систем совместно с окислительно-восстановительными партнерами: железо-серным белком ферредоксином и ФАД-содержащей ферредоксинредуктазой, которые осуществляют перенос необходимых

для реакции гидроксирования электронов от соответствующих восстановительных эквивалентов НАД(Ф)Н (Hannemann et al., 2007; Ortega Ugalde et al., 2018). Данные об активности актинобактериальных P450-зависимых стероид-С26-монооксигеназ показывают, что при организации электронного транспорта с помощью “суррогатных” редокс-партнеров в реакциях *in vitro* наряду с гидроксированием холестерина наблюдается дальнейшее окисление спиртовой группы с образованием С26-карбоновой кислоты (García-Fernández et al., 2013). Напротив, в случае цитохромов P450 *M. tuberculosis* H37Rv использование нативных ферредоксинов (FdxD, FdxE) и ферредоксинредуктаз (FdrA, FprA) позволило оценить специфику оксифункционализации боковой цепи стерина и определить оптимальный для осуществления реакции набор компонентов ферментной системы (Ortega Ugalde et al., 2018).

Благодаря данным о геномике и протеомике, штамм *Mycolicibacterium smegmatis* mc²155 (syn. *Mycobacterium smegmatis* mc²155) (Snapper et al., 1990; Gupta et al., 2018) представляется удобным объектом при изучении стероидного катаболизма (García et al., 2012) и имеет биотехнологический

потенциал в качестве платформы при биоинженерии продуцентов гидроксистероидов (Fernandez-Cabezón et al., 2016; Karpov et al., 2022). *M. smegmatis* характеризуются наличием как минимум трех стероид-26-гидроксилаз: CYP142A2, CYP125A3 и CYP125A4 (García-Fernández et al., 2013). В аннотированных геномах *M. smegmatis* mc²155 (GenBank: CP000480.1; CP001663.1) предсказано наличие ряда генов, кодирующих как ферредоксинредуктазы, так и P450-зависимые ферредоксины, один из которых (*fdxD*, MSMEG_5904, MSMEI_5744) расположен в генном кластере, ответственном за метаболизм боковой цепи стероидов. Показано, что электрон-транспортные системы *M. smegmatis* способны поддерживать не только собственные, но и гетерологичные бактериальные цитохромы P450 CYP106A1 и CYP106A2 для реализации их гидроксильной активности (Karpov et al., 2022). Актуальными задачами остаются поиск и изучение подобных систем.

Целью настоящей работы явилось выявление потенциальных редокс-партнеров цитохромов P450 и верификация электронного транспорта, организованного с использованием ферредоксинов и ферредоксинредуктаз актинобактериального штамма *M. smegmatis* mc²155.

В работе использовали следующие материалы и реактивы: канамицин, изопропил-β-D-тио-галактопиранозид (ИПТГ) и имидазол (“Thermo Fisher Scientific”, США); цитохром *c* и дитиотреитол (ДТТ) (“Sigma-Aldrich”, США); Трис(гидроксиметил)аминометан (Трис), глицин, бактоагар, триптон и дрожжевой экстракт (“Panreac”, Испания). Остальные использованные в работе реактивы были отечественного производства (Россия), квалификации х.ч. или ч.д.а.

Штамм *M. smegmatis* mc²155 был любезно предоставлен доктором Elke Noens (EMBL, Hamburg Outstation, Hamburg, Германия) и поддерживался на среде M3 (Karpov et al., 2022). Бактерии *E. coli* DH5α и *E. coli* BL21 Star (DE3) (“Thermo Fisher Scientific”, США) выращивали на среде LB (Bertani, 1951). Для селекции трансформантов *E. coli* использовали канамицин (50 мкг/мл).

ДНК-последовательности генов *fdxD* (MSMEI_5744), *fdxE* (MSMEI_2499), *fdrA* (MSMEI_1381) и *fprA* (MSMEI_2039) были амплифицированы с хромосомной матрицы *M. smegmatis* mc²155 с помощью ДНК-полимеразы Q5-HF (“NEB”, Великобритания) и соответствующих пар фланкирующих олигонуклеотидных праймеров, кодирующих рестрикционные сайты *Nde*I и *Hind*III. Каждый ген был клонирован с использованием *E. coli* DH5α в векторе pET28a по сайтам рестрикции *Nde*I и *Hind*III (“Thermo Fisher Scientific”, США) под контролем промотора фага T7. Наличие вставки контролировали рестрикционным анализом, последовательности валидировали секвенированием.

Плазмидные конструкции были использованы для трансформации клеток *E. coli* BL21 Star (DE3) методом теплового шока.

Трансформированные *E. coli* BL21 Star (DE3) культивировали в колбах Эрленмейера в 100 мл богатой питательной среды ТВ (Tartoff, Hobbs, 1987) (37°C, 200 об./мин) до достижения оптической плотности OD₆₀₀ 0.6–0.8. Индукцию экспрессии осуществляли внесением ИПТГ (0.5 ммоль/л), после чего продолжали культивировать при 22°C в течение 20 ч. Для корректного фолдинга и формирования железо-серных центров синтезируемых ферредоксинов FdxD и FdxE в соответствующие культуры дополнительно вносили FeCl₃ (50 мкмоль/л) и FeSO₄ (50 мкмоль/л).

Биомассу индуцированных ИПТГ рекомбинантных *E. coli* осаждали центрифугированием (3000 г, 4°C, 30 мин) и на ультразвуковом дезинтеграторе Q500 (“Qsonica”, США). В полученный гомогенат вносили 100 Ед. ДНКазы I (“Sigma-Aldrich”, США), клеточные остатки отделяли центрифугированием (25000 г, 4°C, 75 мин), надосадочную жидкость фильтровали (диаметр пор 0.2 мкм). Очистку рекомбинантных белков проводили методом металл-хелатной жидкостной колонной хроматографии на Ni-NTA агарозе с использованием колонки BioScale Mini Nuvia IMAC (“BioRad”, США). Бесклеточный экстракт вносили в буферный раствор А: калий-фосфатный буфер (50 ммоль/л), pH 7.4; ДТТ (0.25 ммоль/л); имидазол (20 ммоль/л); глицерин (10%, об.). Ступенчатый градиент проводили с использованием буферного раствора Б: калий-фосфатный буфер (50 ммоль/л), pH 7.4; ДТТ (0.25 ммоль/л), имидазол (300 ммоль/л); глицерин (10%, об.).

Белки детектировали электрофоретически в 16- и 12% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях с использованием Трис-Трицинового (в случае ферредоксинов) и Трис-Глицинового (в случае ферредоксинредуктаз) разделяющих буферных растворов, соответственно.

Детекцию простетической группы в составе препаратов очищенных ферредоксинредуктаз осуществляли спектрофотометрически по данным спектров оптического поглощения. Трехмерное моделирование *in silico* осуществляли с использованием сервисов IntFold 7, 3D-Mol Viewer 10.3.0 и Geneious 4.8.5.

Функциональную активность рекомбинантных белков определяли *in vitro* по их способности осуществлять восстановление цитохрома *c* в четырех системах транспорта электронов: FdrA-FdxE, FdrA-FdxD, FprA-FdxE и FprA-FdxD. В качестве источников электронов использовали соответствующие кофакторы: НАДН для FdrA и НАД(Ф)Н для FprA. Состав реакционной смеси (1 мл): цитохром *c* (20 мкмоль/л), FdrA или FprA (5 мкмоль/л), FdxE или FdxD (2.5 мкмоль/л), калий-фосфатный буфер (50 ммоль/л), pH 7.4. Реакцию

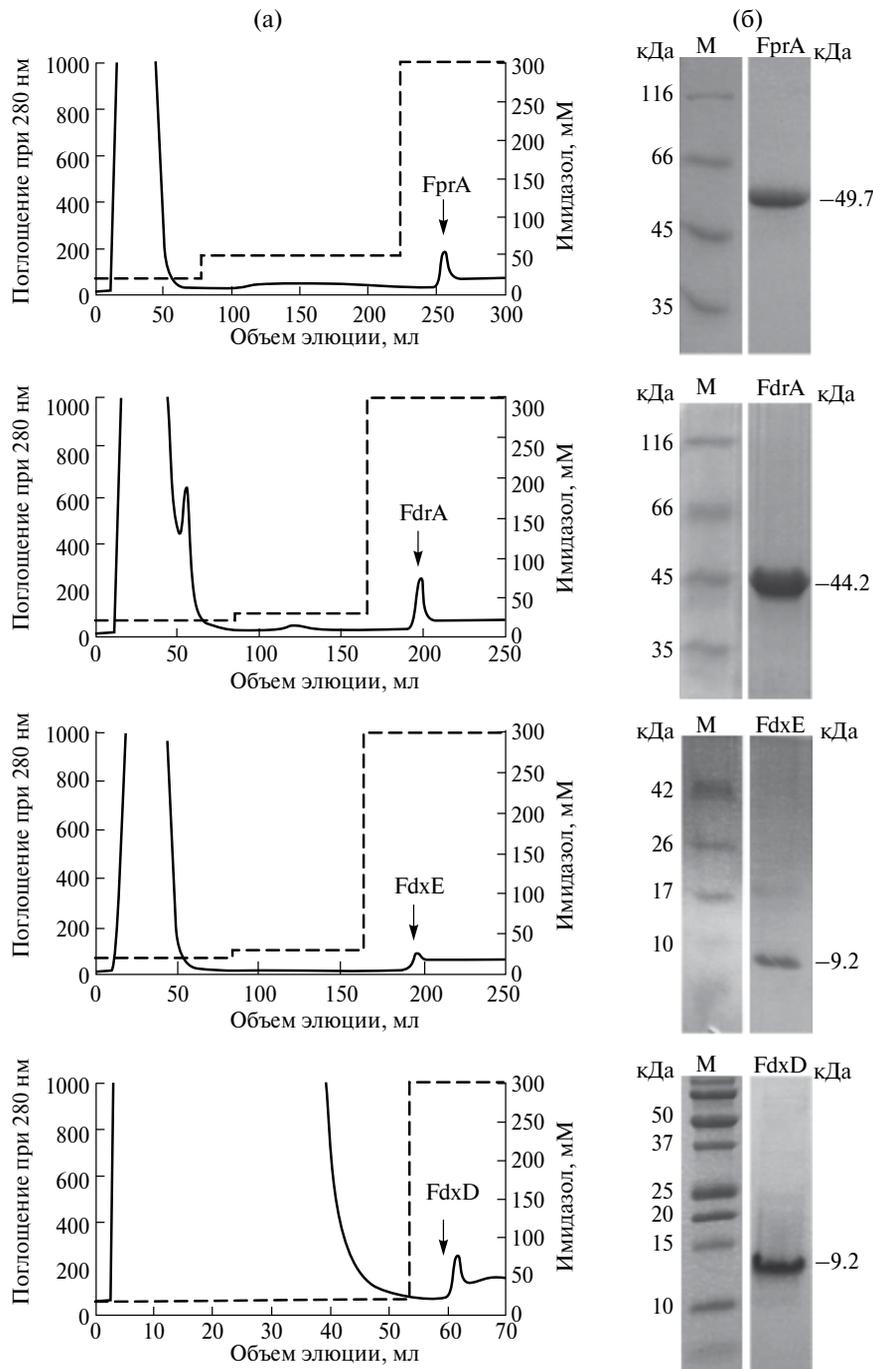


Рис. 1. Очистка белков с использованием Ni-NTA агарозы: (а) – хроматограммы очистки FdxE, FdxD, FprA и FdrA. Стрелками обозначены пики элюции. Сплошная линия — поглощение при 280 нм, пунктирная линия — концентрация имидазола. (б) – Электрофореграммы белковых препаратов FprA, FdrA, FdxE и FdxD. М — маркер молекулярных масс.

инициировали добавлением соответствующего кофактора НАД(Ф)Н (1 ммоль/л) и инкубировали при температуре 30°C в течение 10 мин. Восстановление цитохрома *c* детектировали по изменению оптического поглощения при длине волны 550 нм.

Согласно приведенным данным (Ortega Ugalde et al., 2018) в клетках *M. tuberculosis* H37Rv функцию передачи электронов от восстановительных эквивалентов к микобактериальным стероидным

P450-монооксигеназам выполняют ферредоксины FdxD (ген *Rv3503c*) и FdxE (ген *Rv1786*). Они же, в свою очередь, в равной степени принимают электроны от ФАД-содержащих ферредоксинредуктаз: НАДН-зависимой FdrA (ген *Rv0688*) и НАД(Ф)Н-зависимой FprA (ген *Rv3106*). Основываясь на биоинформатическом анализе, у бактерий *M. smegmatis* mc²155 были выявлены ортологичные ферредоксины и ферредоксинредуктазы,

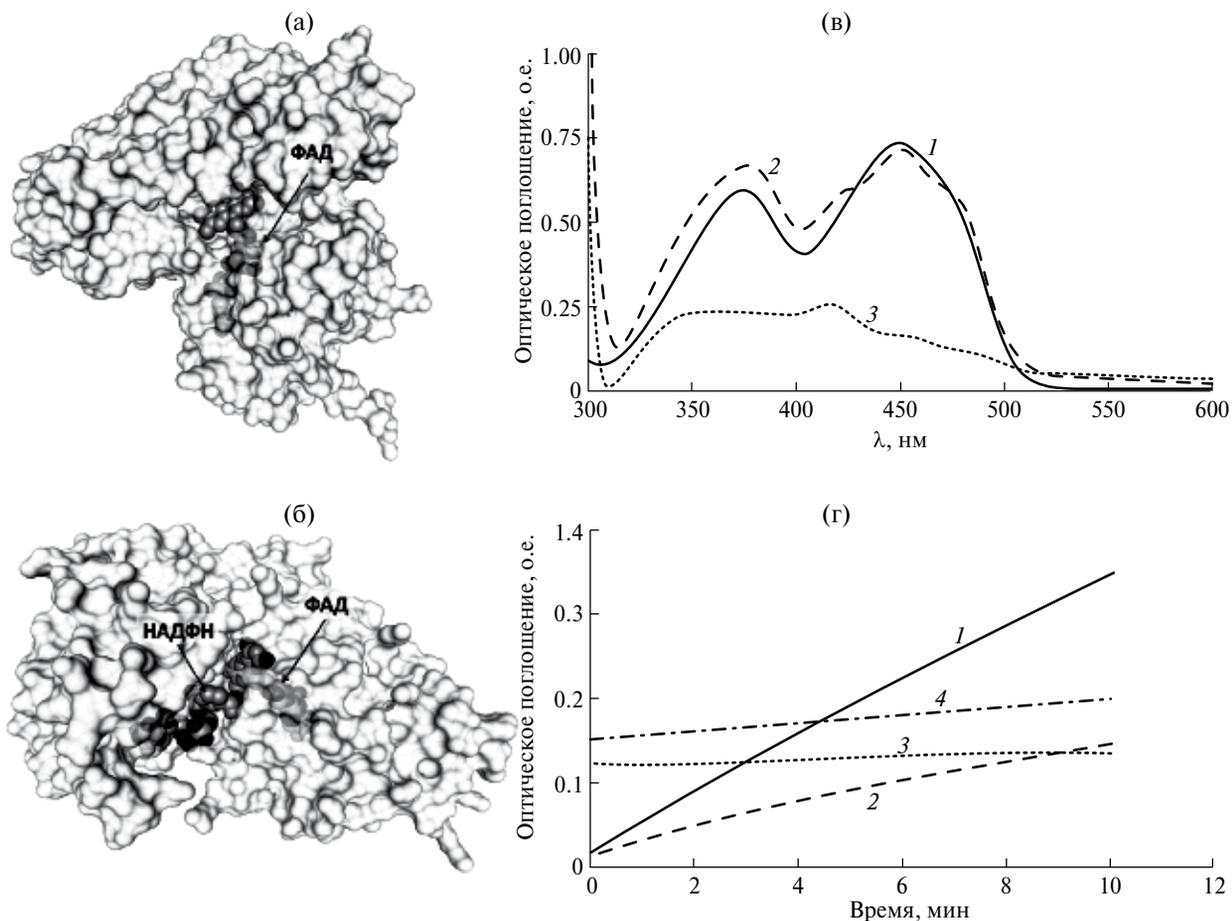


Рис. 2. Анализ структуры и активности рекомбинантных белков: 3D-модели белков FdrA (а) и FprA (б). Спектры поглощения FdrA и FprA (в): 1 – ФАД, 2 – FprA, 3 – FdrA. Скорость восстановления цитохрома с редокс-парами при 550 нм (г): 1 – FdrA-FdxD, 2 – FprA-FdxD, 3 – FprA-FdxE, 4 – FdrA-FdxE.

имеющие высокую степень гомологии с белками *M. tuberculosis*:

- FdxD (ген *MSMEI_5744*, 192 пар нуклеотидов (п.н.) — 63 аминокислотных остатка (а.о.), 6.976 кДа, ~81% идентичности последовательности аминокислот (ИПА) с FdxD *M. tuberculosis* H37Rv;

- FdxE (ген *MSMEI_2499*, 192 п.н.) — 63 а.о., 7.087 кДа, ~30% ИПА с FdxE *M. tuberculosis* H37Rv, ~41% ИПА с FdxD *M. smegmatis* mc²155;

- НАДН-зависимая FdrA (ген *MSMEI_1381*, 1188 п.н.) — 395 а.о., 41.922 кДа, ~74% ИПА с FdrA *M. tuberculosis* H37Rv;

- НАД(Ф)Н-зависимая FprA (ген *MSMEI_2039*, 1368 п.н.) — 455 а.о., 49.471 кДа, ~74% ИПА с FprA *M. tuberculosis* H37Rv.

Гены были клонированы в векторе pET28a для последующей экспрессии в клетках *E. coli*. Анализ показал высокий уровень синтеза рекомбинантных белков. Выход чистых препаратов рекомбинантных белков на 1 л культуральной среды составил 6.6 и 15.5 мг/л для ферредоксинов (FdxE и FdxD), 16 и 26 мг/л для НАД(Ф)Н-зависимых

ферредоксинредуктаз (FprA и FdrA), соответственно. Наличие полигистидиновой метки (6xHis) позволило осуществить очистку синтезируемых ферредоксинов и ферредоксинредуктаз методом аффинной хроматографии с использованием Ni-NTA агарозы. Была разработана общая схема очистки, предполагающая одноступенчатую элюцию белков (рис. 1а).

При концентрации имидазола 30–50 ммоль/л удалось избавиться от балластных и не связавшихся с носителем белков. Пики поглощения элюируемых белков наблюдались при увеличении концентрации имидазола до 300 ммоль/л. Данный подход позволил получить электрофоретически гомогенные препараты FdxE, FdxD, FprA и FdrA (рис 1б). Маркированные полигистидиновой меткой ферредоксины детектируются на электрофореграмме в области чуть более крупных белков (более 10 кДа), тогда как расчетная масса составляла порядка 9.2 кДа (рис. 1б). Это явление согласуется с литературными данными о том, что низкомолекулярные ферредоксины актинобактерий могут проявлять подобные свойства (Ortega Ugalde et al., 2018; Lu et al., 2017). Белковые продукты, обнаруженные на

электрофореграмме, соответствовали рассчитанным молекулярным массам 6xHis-FdrA (44.2 кДа) и 6xHis-FprA (51.6 кДа).

Микобактериальные ферредоксинредуктазы являются ФАД-содержащими белками (Fischer et al., 2002). Присутствие данной простетической группы было предсказано ранее в рамках автоматической аннотации используемых белковых последовательностей FdrA и FprA и наглядно демонстрируется с использованием 3D-моделирования (рис. 2а, 2б).

Спектральный анализ показал наличие пика оптического поглощения в области излучения при 450 нм, характерного для нековалентно связанного ФАД, для каждого из препаратов FdrA и FprA (рис. 2в). Этот факт свидетельствует о сохранении структурной целостности получаемых ферредоксинредуктаз.

В реакции *in vitro* выявлено стабильное изменение окраски цитохрома *c* при тестировании всех используемых пар FdrA-FdxE, FprA-FdxE, FdrA-FdxD и FprA-FdxD, позволяющее утверждать, что рекомбинантные белки сохраняют свою активность и могут выступать в качестве редокс-партнеров при восстановлении цитохромов (рис. 2г). При этом организация электронного транспорта посредством совместного использования FdrA и FdxD представляется наиболее предпочтительной.

Таким образом, в данной работе получены суперпродукты микобактериальных редокс-партнеров: НАД(Ф)Н-зависимых ферредоксинредуктаз (FdrA и FprA) и железосодержащих ферредоксинов (FdxD и FdxE). Все исследуемые белки были получены в растворимой форме в виде электрофоретически гомогенных препаратов путем их очистки из бесклеточных экстрактов методом аффинной хроматографии с использованием Ni-NTA агарозы. Для ферредоксинредуктаз были определены спектры поглощения, соответствующие ФАД-содержащим белкам. Расположение простетических групп наглядно продемонстрировано с использованием 3D-моделирования белковых структур. В реакции *in vitro* восстановления цитохрома *c* с использованием рекомбинантных препаратов показан транспорт электронов от восстановительных эквивалентов НАД(Ф)Н. Результаты позволяют предположить участие миколицибактериальных FdxD, FdxE, FdrA и FprA в качестве редокс-партнеров цитохромов P450.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-64-00024).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bertani G.* Studies on Lysogenesis I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* 1951. V. 62. P. 293–300.
- Donova M.V.* Current Trends and Perspectives in Microbial Bioconversions of Steroids // *Microbial Steroids. Methods in Molecular Biology* / Eds. Barreiro C., Barredo J.L. N.Y.: Humana, 2023. V. 2704. P. 3–21.
- Fernandez-Cabezón L., Galan B., Garcia J.L.* Engineering *Mycobacterium smegmatis* for testosterone production // *Microb. Biotechnol.* 2017. V. 10. P. 151–161.
- Fischer F., Raimondi D., Aliverti A., Zanetti G.* *Mycobacterium tuberculosis* FprA, a novel bacterial NADPH-ferredoxin reductase // *Eur. J. Biochem.* 2002. V. 269. P. 3005–3013.
- Garcia J.L., Uhia I., Galan B.* Catabolism and biotechnological applications of cholesterol degrading bacteria // *Microb. Biotechnol.* 2012. V. 5. P. 679–699.
- Garcia-Fernandez E., Frank D.J., Galan B., Kells P.M., Podust L.M., Garcia J.L., Ortiz de Montellano P.R.* A highly conserved mycobacterial cholesterol catabolic pathway // *Environ. Microbiol.* 2013. V. 15. P. 2342–2359.
- Hannemann F., Bichet A., Ewen K.M., Bernhardt R.* Cytochrome P450 systems – biological variations of electron transport chains // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. V. 1770. P. 330–344.
- Lu Y., Qiao F., Li Y., Sang X.-H., Li C.-R., Jiang J.-D., Yang X.-Y., You X.-F.* Recombinant expression and biochemical characterization of *Mycobacterium tuberculosis* 3Fe-4S ferredoxin Rv1786 // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017. V. 101. P. 7201–7212.
- Ortega Ugalde S., de Koning C.P., Wallraven K., Bruyneel B., Vermeulen N.P., Grossmann T.N., Bitter W., Commandeur J.-N.M., Vos J.C.* Linking cytochrome P450 enzymes from *Mycobacterium tuberculosis* to their cognate ferredoxin partners // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018. V. 102. P. 9231–9242.
- Snapper S.B., Melton R.E., Mustafa S., Kieser T., Jacobs W.R., Jr.* Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis* // *Mol. Microbiol.* 1990. V. 11. P. 1911–1919.
- Tartoff K.D., Hobbs C.A.* Improved media for growing plasmid and cosmid clones // *Bethesda Res. Lab. Focus.* 1987. V. 9. P. 12.
- Tekucheva D.N., Nikolayeva V.M., Karpov M.V., Timakova T.A., Shutov A.A., Donova M.V.* Bioproduction of testosterone from phytosterol by *Mycobacterium neoaurum* strains: “one-pot”, two modes // *Bioresour. Bioprocess.* 2022. V. 9. P. 116.
- Wilburn K.M., Fieweger R.A., VanderVen B.C.* Cholesterol and fatty acids grease the wheels of *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis // *Pathog. Dis.* 2018. V. 76. Art. fty021. P. 21.

Identification of Electron Transfer in the System of Ferredoxins and Ferredoxin Reductases from *Mycobacterium smegmatis*

D. O. Epiktetov^{1, *}, M. V. Karpov¹, and M. V. Donova¹

¹*Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, Federal Research Center, Pushchino, 142290 Russia*

**e-mail: epiktetoff@gmail.com*

Received October 13, 2023; revised October 26, 2023; accepted October 26, 2023

Abstract—Steroid-26-monooxygenases belong to the cytochrome P450 superfamily and function as part of three-component systems together with ferredoxins and ferredoxin reductases providing electron transport. The P450-dependent redox partners of the actinobacterial strain *Mycobacterium smegmatis* mc²155 were investigated. The genes encoding mycolibacterial ferredoxins (FdxD and FdxE) and ferredoxin reductases (FdrA and FprA) were overexpressed in *E. coli* cells. A scheme for isolation and purification of synthesized recombinant proteins using affinity chromatography was developed, resulting in electrophoretically homogeneous preparations. Spectral analysis of ferredoxin reductase showed absorption peaks characteristic of FAD-containing proteins. The reaction of cytochrome *c* reduction using recombinant proteins was carried out, demonstrating that FdxD, FdxE, FdrA, and FprA can act as components of electron transport from the reducing equivalents of NAD(P)H.

Keywords: ferredoxin, ferredoxin reductase, redox partners, steroids, electron transport, *Mycobacterium smegmatis* mc²155