

516/11

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии
институт
Базовая Кафедра Биотехнологии
кафедра

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
Волова Т. Г.
«29» июня 2016 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01.11 «Биоинженерия и биотехнология»

код – наименование направления

Исследование роли С-концевых аминокислотных остатков в
биолюминесценции Ca^{2+} -регулируемого фотопротейна беровина
тема работы

Руководитель

Франк 27.06.16
подпись, дата

профессор д.б.н.
Должность, ученая
степень

Франк Л.А.
инициалы, фамилия

Выпускник

Реушев 27.06.16
подпись, дата

Реушев В.А.
инициалы, фамилия

Красноярск 2016

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	5
1.1 Биолюминесценция.....	5
1.2 Ca ²⁺ -регулируемые фотопротеины.....	6
1.3 Ca ²⁺ -регулируемый фотопроtein беровин.....	8
1.4 Роль С-концевых аминокислотных остатков в биолюминесценции Ca ²⁺ -регулируемых фотопротеинов.....	10
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	14
2.1 Получение укороченных вариантов гена беровина.....	14
2.2 Очистка и активация фотопротеина беровина и его мутантов.....	14
2.3 Измерение биолюминесцентной активности	16
2.4 Измерение спектров биолюминесценции.....	16
2.5 Фото- и термо- инактивация.....	16
2.6 Реактивы.....	17
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	18
3.1 Создание экспрессионных конструкций укороченных вариантов беровина.....	18
3.2 Экспрессия и очистка белка.....	19
3.3. Биолюминесцентная активность укороченных мутантов беровина	21
3.4 Спектры биолюминесценции и флуоресценции.....	24
3.5 Фото- и термоинактивация.....	26
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	29
ВЫВОДЫ.....	30
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	31

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Биолюминесценцией называют явление свечения живых организмов, которое наблюдается у представителей различных таксонов: бактерий, грибов, одноклеточных водорослей, кишечнорастворимых, ракообразных, червей, моллюсков, насекомых и рыб [1]. Наибольшее распространение биолюминесценция получила у глубоководных морских организмов.

Наиболее распространенным субстратом для биолюминесцентных белков морских беспозвоночных является целентеразин [2]. Наиболее изученными белками, использующими целентеразин в качестве субстрата, являются Ca^{2+} -регулируемые фотопротеины, ответственные за свечение ряда морских кишечнорастворимых, таких, как медузы и гребневика. Ca^{2+} -регулируемые фотопротеины гидромедуз обладают высокой степенью гомологии аминокислотных последовательностей, в пределах 65-75%, а также пространственных структур [3]. Однако, фотопротеины гребневиков демонстрируют низкую степень гомологии с фотопротеинами гидромедуз. Так максимальная гомология аминокислотных последовательностей беровина из гребневика *Beroe abyssicola* и обелина из гидроида *Obelia longissima* составляет всего 29.4% [4].

Фотопротеины являются односубъединичными белками (~22 кДа), содержащими три Ca^{2+} -связывающих центра «EF-hand» типа и представляют собой стабильный фермент-субстратный комплекс, состоящий из апофотопротеина и молекулы органического субстрата – преактивированного кислородом целентеразина (2-гидропероксицелентеразина), который прочно, но нековалентно связан с белком. Связывание ионов кальция с фотопротеином, приводящее к изменению конформации белка, запускает реакцию декарбоксилирования 2-гидропероксицелентеразина, в результате которой

образуется целентерамид в возбужденном состоянии и CO_2 . Переход целентерамида из возбужденного состояния в основное сопровождается излучением кванта света [5].

Молекула фотопротеина имеет 2х-чашечную структуру, во внутренней, гидрофобной полости которой располагается молекула субстрата. У изученных на сегодняшний день фотопротеинов важное значение для изоляции полости и обеспечения правильной конформации белка имеет взаимодействие С-конца с N-концевой α -спиралью [6].

У большинства из известных к настоящему времени фотопротеинов С-концевой аминокислотой является пролин, тогда как у беровина на С-конце располагается тирозин. Возникает вопрос, оказывает ли влияние С-концевой тирозин на формирование активного фотопротеинового комплекса, и имеет ли значение длина С-концевого участка данного фотопротеина.

Цель

Исследовать роль С-концевых аминокислотных остатков в биолюминесценции Ca^{2+} -регулируемого фотопротеина беровина.

Для достижения заданной цели были поставлены следующие задачи:

- 1.** Синтезировать нуклеотидные последовательности, содержащие кодирующую часть укороченных вариантов гена фотопротеина беровина с делецией 2-х,3-х,4-х и 5 С-концевых аминокислотных остатков
- 2.** Получить экспрессионные конструкции для синтеза укороченных вариантов беровина в *E. coli*.
- 3.** Получить укороченные варианты беровина в высокоочищенном состоянии
- 4.** Исследовать физико-химические и спектральные свойства укороченных вариантов беровина
- 5.** Провести фотоинактивацию и термоинактивацию укороченных вариантов беровина

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Билюминесценция

Билюминесценция - это излучение света в видимом диапазоне, происходящее в процессе жизнедеятельности живых организмов. Билюминесценция характерна для организмов, находящихся на разном уровне эволюционного развития. Данный феномен характерен для бактерий, насекомых, рыб и других организмов [1].

Билюминесценция встречается у организмов с разнообразной морфологией, с различными механизмами излучения света. Некоторые организмы имеют весьма сложные световые органы, напоминающие глаза, в которых излучение света находится под контролем нервной системы, и люминесценция излучается при необходимости или после стимуляции (например люминесцентные рыбы и головоногие моллюски). У других организмов, отдельные клетки содержат все необходимое для излучения света, и свет излучается непрерывно (люминесцентные бактерии и грибы). Билюминесцентные системы организма могут включать в себя серии взаимосвязанных химических реакций, хотя свет испускается в результате реакции, которая производит возбужденное синглетное состояние эмиттера. Такая реакция получила название - «светоизлучающая реакция» . Существует широкое разнообразие светоизлучающих реакций, но во все из них вовлечено окисление субстрата (обычно люцеферина) что обеспечивает энергию для генерации возбужденного состояния. Все билюминесцентные реакции в своей основе являются хемилюминесцентными реакциями. [7]

На сегодняшний день, билюминесцентные реакции используются как аналитические инструменты в различных областях науки и технологии. Например, билюминесцентная система светлячков - повсеместно используется как метод измерения АТФ (аденозинтрифосфат), необходимого соединения для всех живых организмов. Ca^{2+} - регулируемые фотопротеины, такие, как акворин из медузы *Aequorea victoria*, широко используются для обнаружения

внутриклеточного кальция, который важен в различных биологических процессах. Люциферин ракообразного *Cypridina hilgendorfi* используется как датчик для измерения супероксид аниона, важной, но неуловимой субстанции в биологических системах. Зеленый флуоресцентный белок (GFP), который был открыт вместе с акворином, является наиболее используемым маркерным белком в области биомедицинских исследований. [7]

1.2 Ca^{2+} -регулируемые фотопротеины

Значимое место среди охарактеризованных биолюминесцентных систем, широко представленных среди морских организмов, занимают системы, использующие целентеразин в качестве субстрата [Thompson et al., 1997].

Наиболее изученными представителями данных систем являются Ca^{2+} -регулируемые фотопротеины. Фотопротеины представляют собой стабильный комплекс, состоящий из молекулы белка и молекулы органического субстрата - преактивированного кислородом целентеразина (2-гидроперокси - целентеразина), прочно, но нековалентно связанного с белком. Связывание фотопротеина с ионами кальция, приводит к изменению конформации белка и запускает реакцию декарбоксилирования 2-гидропероксицелентеразина. В результате реакции образуются молекула целентерамида в возбужденном состоянии и CO_2 . Переход целентерамида из возбужденного состояния в основное сопровождается излучением кванта света. [5]

Главным образом, фотопротеины ответственны за свечение морских кишечнополостных. В настоящее время известно более 25 их видов, биолюминесценция которых обусловлена Ca^{2+} -регулируемыми фотопротеинами. Выделены из природных источников и охарактеризованы только семь фотопротеинов[8]: акворин[9], митрокомин [10], клитин [11] из медуз *Aequorea victoria*, *Mitrocoma cellularia* и *Clytia gregaria*, обелин из гидроидов *Obelia geniculata*[12] и *Obelia longissima*[13-15], мнемииопсин и беровин из гребневиков *Mnemiopsis leidyi* и *Beroe ovata* [16]. К настоящему времени известно несколько представителей фотопротеинов гребневиков:

беровин из *Beroe abyssicola* [4], болинопсин из *Bolinopsis infundibulum* [17, 18], мнemiопсин из *Mnemiopsis leidyi* [19, 20], и фотопротеин из *Bathocyroe fosteri* [21].

Девять фотопротеинов - акворин, клитин, митрокомин, два обелина - из *Obelia geniculata* и *Obelia longissima*, беровин, болинопсин, мнemiопсин и фотопротеин из *Bathocyroe fosteri*, были клонированы. Для акворина, обелина, клитина, митрокомина и беровина были получены пространственные структуры. Все Ca^{2+} -регулируемые фотопротеины являются односубъединичными белками, и имеют высокую степень сходства пространственных структур, а также содержат 3 Ca^{2+} -связывающих центра, характерных для семейства Ca^{2+} -связывающих белков. Их молекулярная масса ~ 21 -25 кДа. [5, 6]

Фотопротеины гребневиков также относятся к группе Ca^{2+} -регулируемых фотопротеинов. Они функционально идентичны по многим характеристикам фотопротеинам представителей класса Hydrozoa, но, в отличие от фотопротеинов медуз, экстремально чувствительны к облучению широким диапазоном длин волн [22, 23].

Несмотря на то, что фотопротеины гребневиков функционально идентичны по многим свойствам фотопротеинам гидромедуз, степень идентичности их аминокислотной последовательности очень низка. Наивысшая степень идентичности между беровином и обелином, например, составляет около 29.4%. [4]

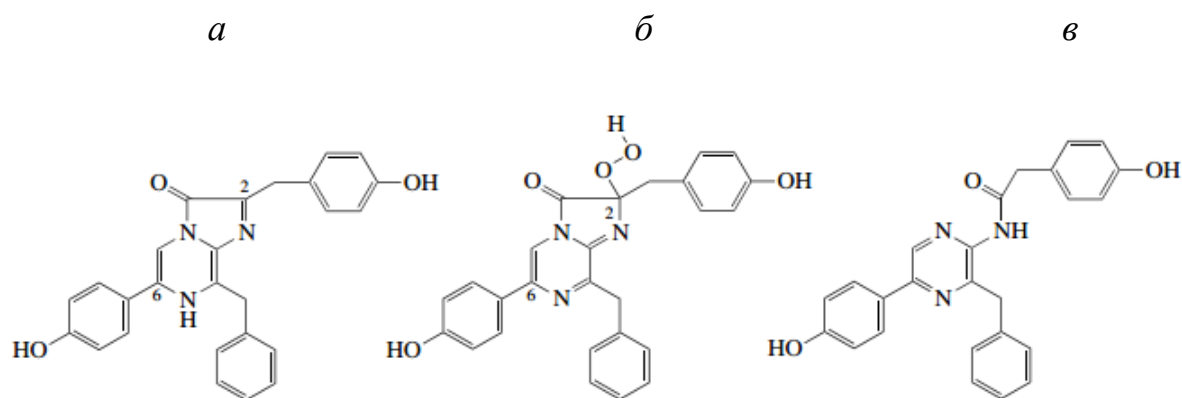


Рис 1. Химическая структура целентеразина(а), 2-гидропероксицелентеразина(б) и целентерамида(в)

1.3 Ca^{2+} -регулируемый фотопротеин беровин

Апоберовин представляет собой слегка асимметричный компактный шаровидный белок с N-концевой α -спиралью (1-35 аминокислотных остатка), расположенной в боковой щели белка. Подобно Ca^{2+} -регулируемым фотопротеинам гидромедуз глобула апоберовина образована двумя чашеобразными доменами с полостью в центре. Каждая чаша состоит из четырех α -спиралей А-Д и Е-Н в N- и С-концевых доменах соответственно, расположенных в виде спираль-петля-спираль (НТН) мотивов, характерных для кальций-связывающих белков семейства EF-hand. Двухдоменная структура апоберовина стабилизируется и несколькими межпетлевыми водородными связями и водородными связями между N- и С-концевыми доменами. С-концевые остатки (194-208) и остатки N-концевой петли (27-35) апоберовина не структурированы и, таким образом, данные электронной плотности для этих регионов отсутствуют. [6]

Кристаллические структуры Ca^{2+} -регулируемых фотопротеинов акворина [24], обелина [25, 26] и клитина [27] были определены, они все они имеют одинаковую компактную глобулярную структуру. 2-гидропироксицелентеразин-связывающий карман в основном образован боковыми цепями гидрофобных остатков; несколько боковых цепей гидрофильных остатков (His22, Tyr138, His175 и Tyr190) также направлены внутрь. Почти все остатки, формирующие субстрат связывающую полость, сохраняются в аминокислотной последовательности фотопротеина. В последовательности беровина, однако, эти позиции в основном заняты более гидрофильными остатками Tyr133, Tyr134, Tyr204, Trp192, Met153, Met154, Ser130, и два Phe. [28]. Только 10 из 21 аминокислотного остатка беровина

идентичны или аналогичны тем, что образуют целентеразин-связывающую полость у обелина и акворина. Еще одна важная особенность: на С-конце фотопротеинов гидромедуз находится остаток пролина. Его удаление или замена приводят к уменьшению стабильности белковой глобулы и снижению биолюминесцентной активности [29]. Было высказано предположение, что С-концевой Pro взаимодействует через водородную связь с N-концевым доменом в формировании закрытой конформации фотопротеина. Его закрытая конформация изолирует 2-гидропероксицелентеразин, расположенный в пределах фотопротеиновой глобулы, от растворителя и способствует высокому квантовому выходу биолюминесценции [8]. Из всех фотопротеинов гидромедуз только митрокомин содержит на С-конце остаток тирозина, однако, его удаление даже повышает квантовый выход биолюминесценции [30]. В беровине С-концевая последовательность богата остатками тирозина [4]. При этом Tyr204 предположительно участвует в стабилизации молекулы целентеразина в активном центре [28].

Рекомбинантный апоберовин обладает типичным УФ-поглощением характерным для белков без каких либо органических лигандов, с максимумом поглощения 280 нм и плечом 295 нм. Кроме того, активный фотопротеин со связанным 2-гидропероксицелентеразином, отображает максимум при 437 нм, что соответствует пику поглощения ($\lambda_{\max}=435\text{нм}$) целентеразина в метаноле. [7]

Ca²⁺-разряженный беровин не поглощает в видимой области спектра, но приобретает новый максимум поглощения при 335 нм.

Спектр излучения рекомбинантного беровина имеет максимум на 491 нм. Ca²⁺-разряженный беровин имеет яркую флуоресценцию, подобно акворину и обелину, которая однако зависит от рН. При нейтральном рН, максимум спектра флуоресценции равен 420 нм и сдвинут на 70 нм к более короткой длиной волны, чем спектр биолюминесценции. При щелочном рН, флуоресценция отображает бимодальный спектр с максимумами 410 и 485 нм, последний почти что соответствует биолюминесценции. Поскольку спектр

флуоресценции рН-чувствителен, это указывает на то, что внутренняя целентеразин-связывающая полость Ca^{2+} -разряженного фотопротеина гребневику может подвергаться воздействию растворителей, в отличие от фотопротеинов медуз [4].

1.4 Роль С-концевых аминокислотных остатков в биолюминесценции Ca^{2+} -регулируемых фотопротеинов

Nomura с коллегами [31] исследовали роль С-концевого пролина для биолюминесценции акворина из медузы *Aequorea victoria*. Исследователи создали мутантные белки с делецией С-концевого пролина - cdP, а также с делецией 3х С-концевых аминокислот (аланина, валина, пролина) -cdAVP. Их относительная активность по сравнению с диким типом составила 0.3 и 0.02 % соответственно. Затем были созданы смешанные линкеры, имеющие последовательность NNN за сайтом С-концевого пролина. Линкеры имеют в составе 20 различных аминокислот. В результате удалось получить 54 мутанта. 4 из 54 мутантных белков показали относительно высокую люминесцентную активность: 33, 45, 52 и 80% относительно биолюминесценции дикого типа. Активность остальных варьировала от 0.2 до 2.8%. В результате секвенирования выяснилось, что все мутанты с высокой активностью содержали С-концевой пролин. В следующем эксперименте химически синтезировали апоакворин с делецией предпоследней аминокислоты - валина, так, что С-концевой пролин сместился на 1 положение. Относительная активность данного мутанта составила менее 0,1%. Также химически синтезировали апоакворин содержащий на 1 аминокислоту больше (глицин), расположенную за С-концевым пролином. Активность также оказалась низкой и составила 1,4%. Таким образом, С-концевой пролин, представленный как неполярная гидрофобная группа на конце длинного хвоста, может иметь функциональную роль в формировании каталитического сайта или в сборке акворина из апобелка, целентеразина и молекулярного кислорода. Какой бы ни была эта роль, очевидно что делеция С-концевого пролина, вызывающая

небольшое изменение во вторичной структуре, приводит почти к полной потере биолюминесцентной активности.

Watkins и Campbell [32] установили роль С-концевого пролина в молекуле акворина из медузы *Aequorea victoria*. Эксперименты показали что С-концевой пролин необходим для стабилизации целентеразинов активном центре акворина и высокого квантового выхода биолюминесценции. Было получено 3 мутантных белка: в АЕQ-Р концевой пролин отсутствовал, в АЕQH он был замещен на гистидин, имеющий циклическую структуру, в АЕQE он был замещен на глутаминовую кислоту, имеющую карбоксильную группу. При комнатной температуре время полураспада для акворина без пролина на С-конце, при отсутствии Ca^{2+} (в буфере с 2.5 mM ЭДТА), оказалось 3,7 часа, а в течении 24 часов осталось менее 1% первоначальной люминесцентной активности. В противоположность этому нативный акворин в аналогичных условиях при отсутствии Ca^{2+} затухал на половину только через 30 дней. Замена остатка пролина на С-конце на гистидин или глутаминовую кислоту приводит к более высокой люминесценции на начальном этапе, по сравнению с мутантом лишенным последней аминокислоты вообще. Тем не менее, эти варианты оказались также неустойчивыми.

Предыдущая группа исследователей [31] предположили, что С-концевой пролин может иметь функциональную роль в каталитическом сайте, такую, как формирование полного комплекса целентеразин-кислород-белок. Однако исследования Watkins и Campbell показали что их интерпретация не верна. Несмотря на то что абсолютный максимум выхода фотонов всех вариантов акворина был значительно меньше, чем в диком акворине, начальная скорость образования фотопротеина во всех трех мутантах (АЕQ-Р, АЕQH и АЕQE) была выше чем для дикого типа. Это показывает что С-концевой остаток пролина не представляется необходимым для целентеразиноксигеназы. Кроме того схожее сродство АЕQ-Р и дикого типа к целентеразину подтвердило, что у пролина нет необходимости связываться с целентеразином. Пролин - единственная аминокислота в природе содержащая иминогруппу. Пептиды, содержащие

иминогруппу, имеют лимитированную конформацию из-за пиррольного кольца через N-C связь, и пептидную связь, по существу это один большой, относительно жесткий блок, который диктует конформацию. Таким образом пролин может обеспечивать жесткую область на конце белка, защищающую целентеразин в апопротеине. Это также объясняет неэффективность гистидина и глутаминовой кислоты в улучшении стабильности.

Группе ученых (Sapna K. Deo, Jennifer C. Lewis, Sylvia Daunert) [33] удалось получить гибридный акворин с аффинной меткой на C-конце, без потери биолюминесцентной активности белка. Предыдущие исследования показали, что C-концевой пролин необходим для активности акворина, что делает невозможным его модификацию. Несмотря на это, ученые поставили себе целью открыть возможный способ произвести гибридизацию C-конца акворина без делеции или изменения пролина 189 и определить имеет ли данная модификация какое-либо влияние на люминесцентную активность белка. Перед проведением гибридизации был выбран и сконструирован мутант акворина, не содержащий цистеин, так как он оказался более стабильным чем акворин дикого типа. К C-концу апоакворина генетически конъюгировали N-конец октапептида Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys который часто используется в качестве аффинной метки для выделения белков. Данный пептид является высоко полярной молекулой. В другом опыте в роли метки использовали лей-энкефалин - опиоидный пептид млекопитающих, имеющий следующую аминокислотную последовательность Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu. Данный пептид относительно слабо поляризован. Лей-энкефалин - агонист опиатных рецепторов, что может быть использовано при очистке белка. Аналогично предыдущему способу к N-концу был прикреплен октапептид. Результаты эксперимента показали, что добавление лей-энкефалина к C-концу белка не вызвало потери биолюминесцентной активности. А это значит что использование подобной конструкции обладает потенциальными преимуществами в уменьшении стоимости очистки белка. Данные результаты являются первым случаем когда модификация C-конца не привела к потере

активности. Акворин может быть модифицирован как на N так и на C-конце, а более того на обоих концах сразу. Таким образом, это может расширить область применения белка.

Предыдущие исследования показали, что акворин теряет биолюминесцентную активность при модификации C-конца. Поэтому генетический фьюзинг с акворином ограничен только N-концом. Для того чтобы изучить данный вопрос для другого белка - обелина из *Obelia longissima*, Ereemeeva с коллегами [34] удлиннили C-конец обелина на 1 аминокислоту - тирозин, а затем провели слияние с зеленым флуоресцентным белком медузы *Clytia gregaria* (cgreGFP). Через гибкий 31 линкер. Оба белка были изолированы и изучены. OL-Y находился в форме стабильного фотопротеинового комплекса, обладая 75% биолюминесцентной активности от обелина дикого типа. OL-cgreGFP сохранил 46% активности и продемонстрировал эффективную передачу энергии резонанса, где OL-партнер и cgreGFP-партнер являются донором и акцептором соответственно.

Дальнейшие исследования показали важность C-концевого пролина и водородных связей, для образования активной формации фотопротеинового комплекса, стабильности и функциональной активности. В соответствии с полученными данными о кристаллической структуре обелина и акворина, карбоксильная группа C-концевого пролина формирует 2 водородные связи с Arg21(Arg15 в случае акворина) первой α -спирали. Поэтому удаление или замена C-концевого пролина может заметно изменить биолюминесцентную активность, стабильность или квантовый выход активного фотопротеинового комплекса. Следовательно модификация Arg в первой α -спирали имеет деструктивное влияние на основные свойства фотопротеина. C-концевая сеть водородных связей имеет важное значение для придания стабильности молекуле фотопротеина от внешних возмущений, когда он принимает участие в формировании запертых конформации белка и изоляции целентеразин-связывающей полости. [29]

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Получение укороченных вариантов гена беровина

Нуклеотидные последовательности, содержащие укороченные варианты гена беровина с сайтами для рестрикции NdeI и XhoI были получены с помощью ПЦР-реакции. В качестве матрицы использовали плазмиду pET22b-BA, содержащую кодирующую часть гена беровина. В качестве ведущего праймера был 5'-AGTTACATATGACTGAACGTCTGAACG-3' с сайтом для рестрикции NdeI, в качестве обратных праймеров:

1. 5'-CGAGACTCGAGTТААТАAGCGTAGACTC-3'
2. 5'-GTTACTCGAGTТААТАAGCGTAGACTCCGTC-3'
3. 5'-GТАCTCGAGTТАGТАGACTCCGTCCCAC-3'
4. 5'-СТTCTCGAGTТАGACTCCGTCCCACCTG-3'

с сайтом для рестрикции XhoI.

Аmplифицированные мутантные вставки были обработаны рестриктазами FauNDI (аналог NdeI) (СибЭнзим) и XhoI (NEB). Лигирование вставок осуществлялось T4 ДНК-лигазой (СибЭнзим) в вектор pET22b по указанным сайтам рестрикции. Клетки *E. coli* (штамм XL1Blue) были трансформированы полученными плазмидами, содержащими укороченные варианты гена беровина. Выделение плазмидной ДНК проводили с помощью GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, USA), согласно протоколу. Правильность нуклеотидных последовательностей была подтверждена секвенированием.

2.2 Очистка и активация фотопротеина беровина и его мутантов

Трансформированные экспрессионными плазмидами клетки *E. coli* штамм BL21(DE3) Codon Plus RIPL (Stratagene) выращивали в LB-среде, содержащей ампициллин (200 мг/мл) при 37°C. Синтез белка индуцировали добавлением в среду ИПТГ в конечной концентрации 1 мМ после достижения оптической плотности культуры $OD_{600}=0,6 - 0,8$. После индукции клетки

растили еще в течение 3 часов при интенсивном перемешивании. Клеточный осадок ресуспендировали в пятикратном объеме 20 мМ Трис-НСl, рН 7,0 и разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора UD-20 ("Techpan", Польша) пятикратной обработкой в течение 20 секунд с интервалами по 20 секунд на льду. Затем образец центрифугировали (5000 об/мин, 10 мин), осадок промывали, последовательно ресуспендируя в 20 мМ Трис-НСl рН 7,0 с 0,9% NaCl, а затем с 1% Тритон X-100. Отмытые тельца включения растворяли в буфере (6 М мочевины в 20 мМ Трис-НСl рН 7,0), 1:10 w/v, при 4°C. Затем образец центрифугировали 5 минут при 10000 g.

Апобелок, экстрагированный из телец включения буфером (6 М мочевины в 20 мМ Трис-НСl рН 7,0), очищали с помощью ионообменной хроматографии на колонке с DEAE-Sepharose Fast Flow (Amersham-Biosciences, Швеция) с помощью системы BioLogic LP (Bio-Rad, США). Элюцию белков с колонки проводили градиентом концентрации хлорида натрия (0 – 0,6 М) в буфере 20 мМ Трис-НСl рН 7,0, содержащем 6 М мочевины. Полученные образцы были скоцентрированы с помощью центрифужных концентраторов (Millipore, США) в течении 15 мин. при 10000g. Для определения концентрации белок обессоливали гель-фильтрацией. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически, используя коэффициент экстинкции при $\lambda=280\text{nm}$ и значение молекулярной массы беровина.

Активацию беровина и его укороченных мутантов проводили путем инкубации апобелка с целентеразином в молярном соотношении 1:1,1, в буфере содержащем 50 мМ Трис-НСl рН 9,0, 0,5 М NaCl, 5 мМ ЭДТА, с последующей инкубацией в течение ночи при 4°C. Далее фотопротеин отделяли от апобелка и несвязавшегося целентеразина с помощью ионообменной хроматографии на колонке Mono Q (GE Healthcare, Швеция) в градиенте NaCl (0-50%) с использованием хроматографической системы Akta Purifier (GE Healthcare, Швеция).

Степень чистоты беровина и его мутантов проверяли с помощью электрофореза в 12,5% ПААГ в присутствии ДСН.

Все манипуляции с активированными фотопротеинами проводили без доступа света для предотвращения их инактивации.

2.3 Измерение биолюминесцентной активности

Измерения биолюминесцентной активности проводили при комнатной температуре с помощью люминометра БЛМ-8812 (СКТБ "Наука"), впрыскивая 10 мкл раствора белка в 20 мМ Трис-НСl рН 7.0, 5 мМ ЭДТА в кювету люминометра, содержащую 490 мкл 50 мМ Трис-НСl рН 8.5, 2 мМ CaCl₂. Световой сигнал записывали до его полного прекращения.

2.4 Измерение спектров биолюминесценции

Спектры биолюминесценции и флуоресценции были записаны с помощью флуоресцентного спектрофотометра Cary Eclipse (Varian, США) и скорректированы на чувствительность ФЭУ к различным длинам волн с помощью программного обеспечения прибора. Спектры биолюминесценции фотопротеинов измеряли в буфере, содержащем, 50 мМ бис-Трис пропан рН 8,5. Биолюминесценцию инициировали добавлением 100 мМ раствора CaCl₂ в том же буфере. Спектры флуоресценции и абсорбции были записаны сразу после затухания биолюминесцентного сигнала.

Все спектральные измерения выполнены при комнатной температуре.

2.5 Фото- и термо- инактивация

Образцы заряженных и очищенных от апобелка фотопротеинов дикого типа и мутантов разводили до концентрации 0.1 мг/мл в буфере содержащем 20мМ Трис-НСl, рН 7.0, 5мМ ЭДТА. 200 мкл раствора фотопротеинов в полипропиленовых микропробирках помещали под лампу накаливания при 0 °С (на льду) на расстоянии ~ 20 см. Измерения биолюминесцентной активности проводили с помощью люминометра БЛМ-8812 (СКТБ "Наука") до фотоинактивации и через 10, 25, 40 и 60 мин после ее начала.

Термоинактивацию проводили при температуре 50°C, которую поддерживали с помощью водяной бани. Биolumинесцентную активность измеряли до термоинактивации, через 30 мин и через 1 час.

2.6 Реактивы

Целентеразин был получен из NanoLight Technology Prolume Ltd (Пайнтоп, Аризона, США). Экспрессионная конструкция pET22b-BA была получена в лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН. Pfu ДНК полимеразы, Taq ДНК полимеразы, dNTP (смесь dATP, dCTP, dGTP, dTTP), маркеры молекулярного веса ДНК «1 KB DNA Ladder» были от компании «СибЭнзим» (Россия). Маркер молекулярного веса для ПААГ был от Bio-Rad, США. Остальные реактивы, если не указано иное, были высокой степени чистоты от Sigma Aldrich, США.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1 Создание экспрессионных конструкций укороченных вариантов беровина

Для изучения роли С-концевых аминокислотных остатков в биолюминесценции Ca^{2+} -регулируемого фотопротейна беровина нами было получено 4 укороченных варианта этого белка с делецией 2-х, 3-х, 4-х и 5-и аминокислотных остатков. Аминокислотные последовательности С-концевых фрагментов мутантных белков приведены на рис. 2.

BAwt	GVYAYKY
BAdKY	GVYAY--
BAdYKY	GVYA---
BAdAYKY	GVY----
BAdYAYKY	GV-----

Рис 2. Аминокислотные последовательности С-концевых фрагментов укороченных форм беровина. Красным показаны совпадающие аминокислотные остатки, черным - различающиеся аминокислотные остатки, делеции показаны штрихами.

Вставки для клонирования были получены с помощью ПЦР-реакции (Рис. 3).

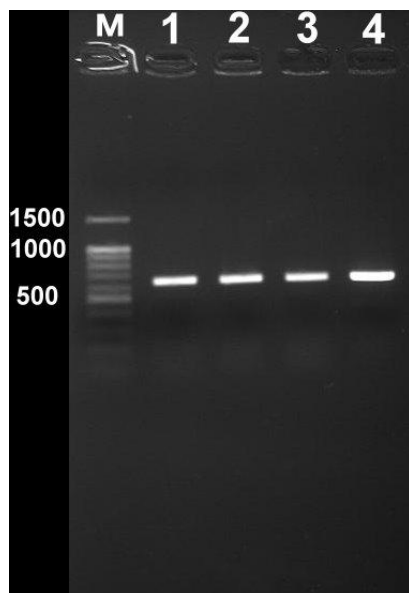


Рис 3. Электрофореграмма ПЦР-фрагментов, содержащих укороченные варианты гена беровина. На треках: М - маркер молекулярного веса 100 bp DNA Ladder, 1-BAdKY, 2-BAdYKY, 3-BAdAYKY, 4-BAdYAYKY.

После лигирования в вектор было получено 4 экспрессионных конструкции, содержащих укороченные варианты гена беровина (Рис 4.).
Результирующие плазмиды были названы: pET22-BAdKY, pET22-BAdYKY, pET22-BAdAYKY, pET22-BAdYAYKY.

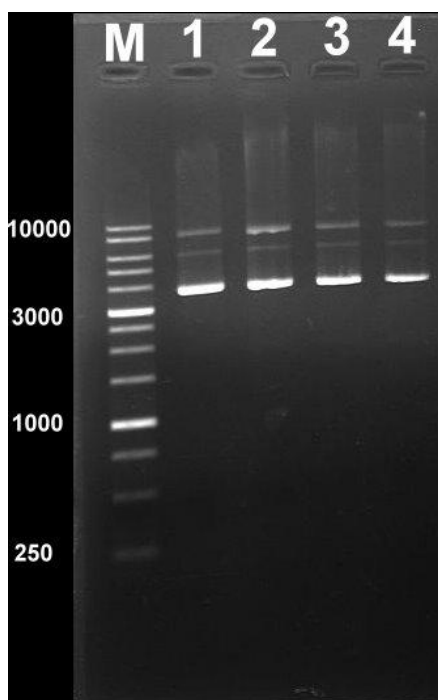


Рис 4. Экспрессионные конструкции укороченных вариантов беровина. На треках: М - маркер молекулярного веса 1KB DNA Ladder, 1-pET22-BAdKY, 2-pET22-BAdYKY, 3-pET22-BAdAYKY, 4-pET22-BAdYAYKY.

3.2 Экспрессия и очистка белка

Индукцируемую экспрессию апоберовина и его укороченных вариантов осуществляли в клетках *E. coli*, где белок накапливается в виде телец включения. В течение 3 часов после индукции каждый час контролировали оптическую плотность и отбирали алиquotы для анализа эффективности

экспрессии. Результаты показали, что во всех случаях максимальное количество белка наблюдается через 3 часа после добавления ИПТГ (рис. 5).

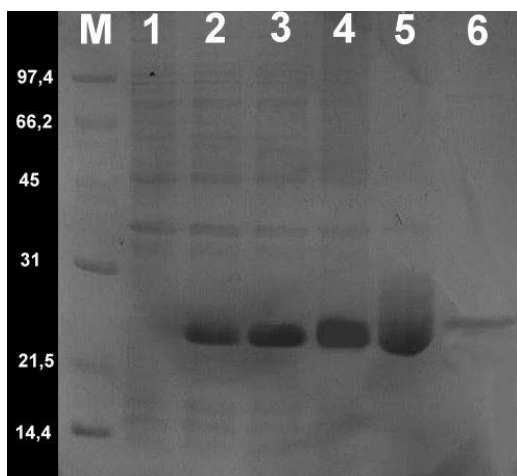


Рис 5. Электрофорез в ПААГ. На треках: М - маркер молекулярного веса, 1- клеточный лизат до индукции; 2,3,4- клеточный лизат через 1, 2 и 3 часа после индукции соответственно; 5- мочевиновый экстракт апоберовина; 6-беровин дикого типа после хроматографической очистки на колонке Mono Q.

Профиль элюции, характерный для беровина дикого типа, при очистке на MonoQ имеет 2 пика. Первый пик соответствует выходу активного фотопротейна, второй - апопротеина (рис. ба). Профиль элюции характерный для всех укороченных вариантов беровина имеет один основной пик, соответствующий выходу апобелка, и небольшое плечо, соответствующее выходу активного фотопротейна (рис. бб).

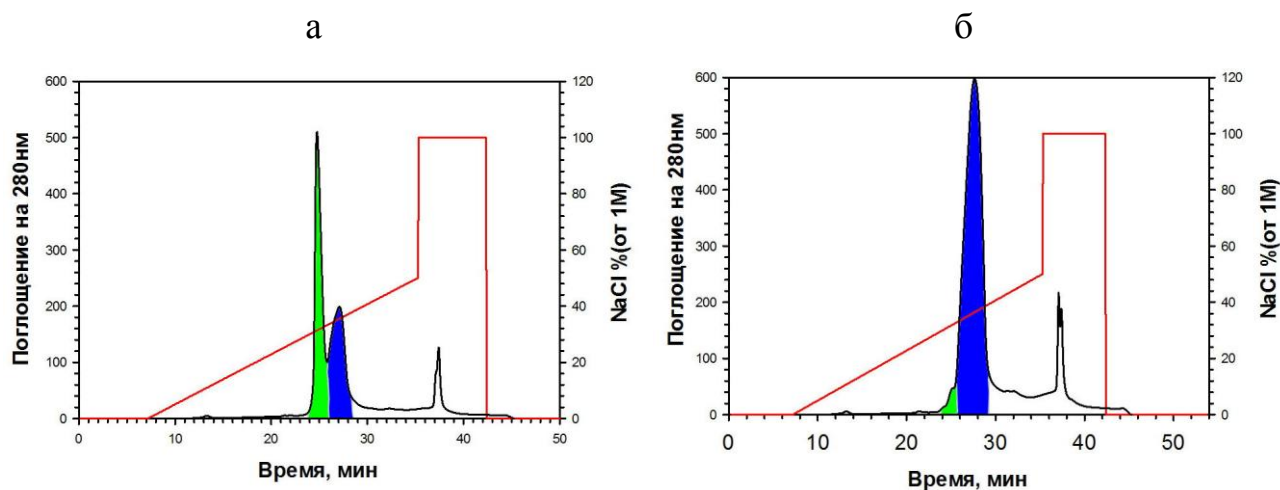


Рис 6. Профили элюции беровина дикого типа и его мутантов. А. Профиль элюции беровина дикого типа на колонке MonoQ. Пик, соответствующий выходу активного фотопротеина, обозначен зеленым, выходу апопротеина - синим. Красной линией показана концентрация NaCl. Б. Профиль элюции укороченного беровина на колонке MonoQ. Пик, соответствующий выходу активного фотопротеина, обозначен зеленым, выходу апопротеина - синим. Красной линией показана концентрация NaCl.

Таким образом, электрофоретический анализ показал, что в результате индуцированной экспрессии наибольшее количество апобелка синтезируется в течение 3 часов после добавления ИПТГ, как в случае беровина дикого типа, так и в случае всех его укороченных вариантов. После хроматографической очистки как беровин дикого типа, так и его укороченные мутанты, были высокой степени чистоты (количество примесей в белковых препаратах не превышало 5%).

3.3. Биolumинесцентная активность укороченных мутантов беровина

Выход активного беровина дикого типа при стандартных условиях активации составляет около 50% [4]. Делеция С-концевых аминокислотных остатков существенно снижает выход активного белка. Для всех укороченных вариантов беровина выход активного белка был менее 4% (Таблица 1), что показывает важность делетированных аминокислотных остатков для формирования фотопротеинового комплекса. Делеция двух и трех аминокислотных остатков снижает выход активного белка почти в 13 раз, а делеция четырех и пяти - более чем в 20 раз.

Таблица 1 – Выход активного белка после хроматографии на Mono Q

Фотопротеин	Выход активного белка
BAwt	~50%
BAdKY	~3,9%

VAdYKY	~3,8%
VAdAYKY	~2,5%
VAdYAYKY	~2,4%

То есть выход активного беровина напрямую зависит от длины его С-концевого участка. Возможно, данный участок является "запирающим" фрагментом, обеспечивающим изоляцию гидрофобной полости белка от внешней среды. Ранее было высказано предположение, что Tyr204 является одним из остатков, образующих водородную связь с NH₂-группой Arg41 и участвующих в стабилизации 2-пероксианиона целентеразина [28]. Его делеция, скорее всего, приводит к тому, что 2-гидропероксицелентеразин неправильно координируется в активном центре и легко диссоциирует от активного центра.

Биолюминесцентная активность фотопротеинов является одной из основных характеристик белков этого типа. Измерение биолюминесцентной активности укороченных мутантов беровина показало, что делеция аминокислотных остатков драматически снижает удельную активность беровина. Независимо от длины цепи активность снижается практически одинаково для всех укороченных вариантов беровина - более чем на 4 порядка от активности беровина дикого типа (Рис. 7).

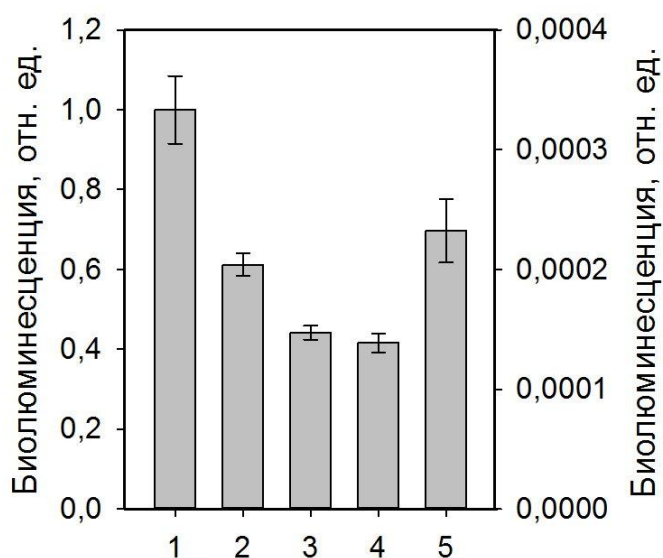


Рис 7. Относительная удельная биолюминесцентная активность (полулогарифмическая шкала): 1-беровина дикого типа, 2-VAdKY, 3-VAdYKY, 4-VAdAYKY, 5-VAdYAYKY

Таблица 2 – Константы спада биолюминесцентной реакции беровина дикого типа и его укороченных вариантов

VAwt	$2,46 \text{ c}^{-1}$
VAdKY	$2,21 \text{ c}^{-1}$
VAdYKY	$2,46 \text{ c}^{-1}$
VAdAYKY	$1,95 \text{ c}^{-1}$
VAdYAYKY	$2,26 \text{ c}^{-1}$

Константа спада показывает скорость падения биолюминесцентной реакции во времени и косвенно характеризует сродство фотопротейна к ионам Ca^{2+} . Делеция С-концевых аминокислотных остатков практически не повлияла на кинетику спада биолюминесцентной активности беровина. То есть С-концевой фрагмент с большой вероятностью не оказывает влияния на взаимодействие белка с кальцием.

3.4 Спектры биолюминесценции и флуоресценции

Максимумы спектров биолюминесценции и флуоресценции фотопротеинов отражают состояние молекулы субстрата внутри белковой глобулы. Флуоресцентные исследования целентерамида и его аналогов в различных растворителях показывают, что целентерамид может образовывать пять форм: нейтральную ($\lambda_{\max} = 386-423$ нм), фенолят анион ($\lambda_{\max} = 480-490$ нм), ион-парное состояние ($\lambda_{\max} = 465-479$ нм), амид анион ($\lambda_{\max} = 435-458$ нм) и пиразин-анион ($\lambda_{\max} = 530-565$ нм) [35]

Биолюминесценция беровина дикого типа наблюдается в сине-зеленой области спектра с максимумом 490 нм (Рис. 8а) [4]. Нам не удалось получить данные о спектрах биолюминесценции укороченных вариантов беровина из-за их крайне низкой активности. Флуоресценция Ca^{2+} -разряженного беровина зависит от pH: при нейтральных и кислых значениях ее максимум находится около 420 нм, при щелочных - появляется дополнительный пик в длинноволновой области спектра [4]. В случае укороченных мутантов беровина спектры флуоресценции, полученные после затухания биолюминесцентной реакции отличаются от такового беровина дикого типа (Рис. 8б).

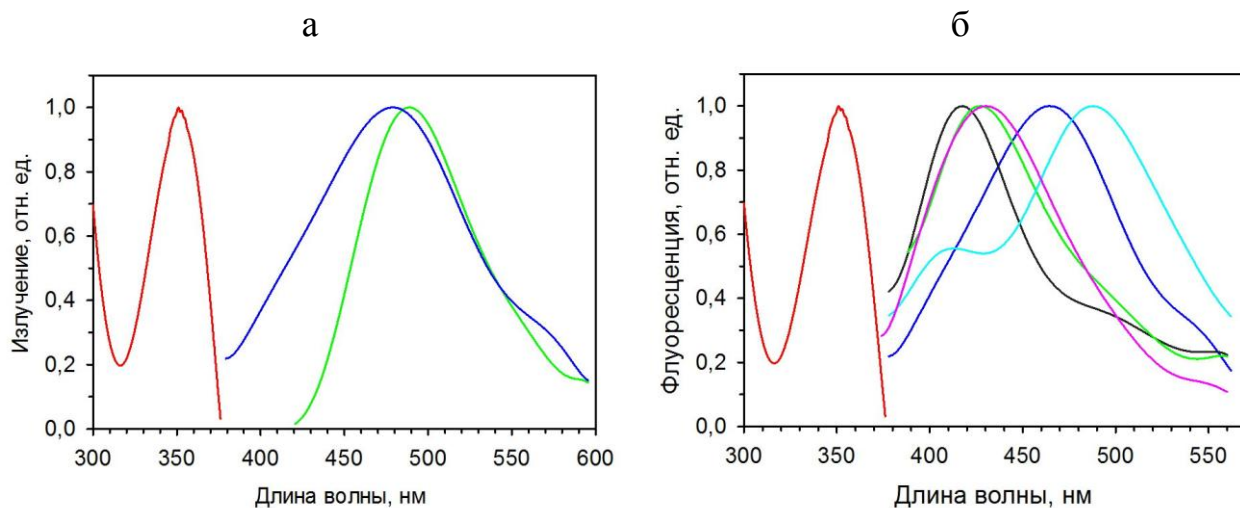


Рис 8. Спектры биолюминесценции и флуоресценции беровина и его мутантов. А. Спектры флуоресценции (синяя линия) и биолюминесценции (зеленая линия) беровина дикого типа. Спектр возбуждения флуоресценции показан красной линией. Б. Спектры флуоресценции беровина дикого типа (синяя линия) и его мутантов VAdKY (черная линия), VAdYKY (зеленая линия), VAdAYKY (голубая линия), VAdYAYKY (розовая линия). Спектр возбуждения флуоресценции показан красной линией.

У мутантов, где С-концевым остатком является тирозин (VAdKY и VAdAYKY), наблюдается флуоресценция в коротковолновой области спектра, что свидетельствует о присутствии целентерамида в нейтральном состоянии. Только один мутант с делецией 4-х аминокислотных остатков и с сохраненным Tyr204 имеет основной пик флуоресценции при 490 нм и дополнительный - при 410 нм, что показывает присутствие двух ионных форм целентерамида - нейтральной (в меньшей степени) и фенолят-аниона (преобладающей). При этом флуоресценция мутанта с делецией 5-и аминокислотных остатков не имеет даже плеча в длинноволновой области, которое наблюдается у остальных укороченных вариантов. По-видимому, отсутствие Tyr204, стабилизирующего 2-пероксианион целентеразина, препятствует образованию фенолят-анионной формы целентерамида. Максимум флуоресценции мутантов с делецией 3-х и 5-и аминокислотных остатков слегка сдвинут в длинноволновую область спектра относительно спектра мутанта с делецией 4-х аминокислотных остатков и близок к амид-анионной форме $\lambda_{\max} = 435-458$ нм. У обоих этих мутантов С-концевыми аминокислотными остатками являются гидрофобные аланин или валин. Возможно, что присутствие этих остатков в качестве С-концевых может затруднять доступ полярного растворителя в гидрофобную полость по сравнению с двумя другими мутантами и беровином дикого типа, у которых С-концевым аминокислотным остатком является тирозин. В целом в результате делеции С-концевых аминокислот беровина, предположительно, повышается доступность целентеразин-связывающей полости для растворителя, который в свою очередь способствует ионизации целентерамида. Таким образом, вероятно, на возможность ионизации целентерамида может влиять не только

длина С-концевого фрагмента беровина, но и находящийся на С-конце аминокислотный остаток. С-концевой остаток тирозина может облегчать доступ растворителя к целентерамиду, а гидрофобные аминокислотные остатки - затруднять.

3.5 Фото- и термоинаktivация

Беровин, как представитель фотопротеинов гребневиков, отличается высокой чувствительностью к облучению широким спектром длин волн. Предполагается, что в результате действия света нарушается связь субстрата с окружающими его аминокислотными остатками, и происходит его диссоциация от активного центра [4]. Однако механизм такой фотоинаktivации и роль отдельных аминокислотных остатков в этом процессе остается неизвестной. Для того, чтобы исследовать влияние С-концевых аминокислотных остатков беровина на его фотостабильность, мы подвергли все его укороченные варианты действию света. Результаты показаны на (рис. 9а). Все укороченные варианты беровина оказались более фотостабильными и их остаточная биолюминесцентная активность относительно первоначальной была выше, чем для беровина дикого типа. Самым фотостабильным оказался мутант с делецией 2-х аминокислотных остатков, наименее фотостабильным - с делецией 4-х аминокислотных остатков. Мутанты с делецией 3-х и 4-х аминокислотных остатков показали практически одинаковое падение активности при облучении. В этом случае мы не увидели связи между присутствующим С-концевым аминокислотным остатком и фотостабильностью. Делеция С-концевых аминокислотных остатков, вероятно, приводит к нарушению стабилизации субстрата в активном центре и, возможно, к его неправильному положению в активном центре беровина. Те немногие молекулы субстрата, которые смогли закрепиться в активном центре в неправильной ориентации и способны подвергаться окислению при присоединении ионов кальция, по видимому, менее подвержены воздействию света и хуже диссоциируют из гидрофобной полости.

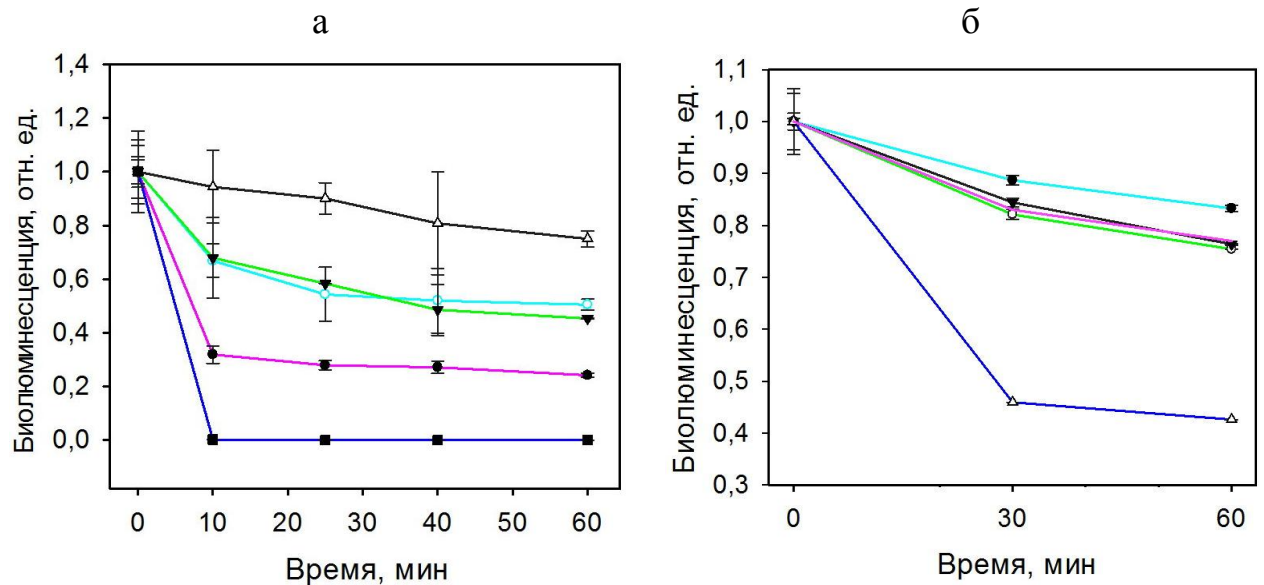


Рис 9. Фото- и термоинактивация беровина дикого типа и его укороченных вариантов А. Изменение билюминесцентной активности беровина дикого типа (синяя линия) и его укороченных вариантов: VAdKY (черная линия), VAdYKY (зеленая линия), VAdAYKY (розовая линия) и VAdYAYKY (голубая линия) при облучении светом в течение 1 часа. Б. Изменение билюминесцентной активности беровина дикого типа (синяя линия) и его укороченных вариантов: VAdKY (черная линия), VAdYKY (зеленая линия), VAdAYKY (розовая линия) и VAdYAYKY (голубая линия) в течение 1 часа инкубации при 50 °С.

Нагревание белка практически всегда ведет к его денатурации из-за разрыва связей, стабилизирующих белковую глобулу. Термостабильность белка является характеристикой прочности связей, формирующих его третичную структуру. Для оценки термостабильности укороченных вариантов беровина белки выдерживали в течение часа при 50 °С. Относительная остаточная билюминесцентная активность всех мутантов была практически одинаковой и выше, чем таковая беровина дикого типа (Рис. 9б). То есть мутантные белки оказались более термостабильными, чем дикий беровин. Вероятно, что причиной этого является та же, что и в случае фотоинактивации: связи, координирующие молекулы субстрата, которые все же оказались в активном центре, возможно в неправильном положении, по-видимому прочнее, чем в беровине дикого типа. Поэтому 2-гидропероксицелентеразин в укороченных

мутантах, с одной стороны, хуже окисляется, что приводит к катастрофическому снижению удельной активности, а, с другой стороны, дольше остается в активном центре при воздействии света или высоких температур.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленная работа посвящена исследованию роли С-концевых аминокислотных остатков в биолюминесценции Ca^{2+} -регулируемого фотопротеина беровина.

В формировании активного фотопротеинового комплекса с субстратом - целентеразином у Ca^{2+} -регулируемых фотопротеинов кишечнорастворимых играет важную роль С-концевой участок. У большинства из известных фотопротеинов С-концевой аминокислотой является пролин. Удаление пролина приводит к нарушению формирования фотопротеинового комплекса. Как показали наши исследования, не смотря на отсутствие на С-конце беровина пролина, делеция С-концевых аминокислотных остатков также приводит к сильному снижению биолюминесцентной активности.

В нашем исследовании мы выяснили, что делеция любого количества С-концевых аминокислотных остатков в беровине приводит к нарушению формирования фотопротеинового комплекса, уменьшению выхода активного белка и значительному снижению биолюминесцентной активности, что свидетельствует об их непосредственном участии в этих процессах. Мы не увидели никакой зависимости биолюминесценции беровина от того, какой аминокислотный остаток является С-концевым после делеции. Однако относительно спектров флуоресценции Ca^{2+} -разряженных белков такая зависимость прослеживается: флуоресценция укороченных вариантов с остатком Туг на С-конце, в отличие от вариантов с С-концевым Ala или Val, имеет вклад в длинноволновой области спектра, что свидетельствует о более полярном окружении целентерамида в данном случае.

Таким образом, результаты, описанные в данной работе, вносят вклад в понимание роли С-концевых аминокислотных остатков в биолюминесценции Ca^{2+} -регулируемого фотопротеина беровина. Перспективы дальнейших

исследований будут связаны, прежде всего, с детальным установлением механизма образования активного фотопротеинового комплекса, с участием С-концевых аминокислотных остатков беровина. Полученные результаты имеют в первую очередь фундаментальное значение, но в дальнейшем могут иметь и практическую важность, поскольку использование белка в аналитических целях предполагает возможность его модификации, в том числе и в области С-концевого участка.

ВЫВОДЫ

1. Получены укороченные варианты Ca^{2+} -регулируемого фотопротеина беровина из гребневика *Beroe abyssicola* с делецией 2, 3, 4 и 5 С-концевых аминокислотных остатков на основе экспрессионной конструкции рЕТ22b-ВА.
2. Проведены экспрессия, активация и очистка укороченных вариантов беровина, в результате чего получены фотопротеины в высокоочищенном состоянии. Показано, что делеция С-концевых аминокислотных остатков существенно снижает выход активного белка.
3. Делеция С-концевых аминокислотных остатков снижает биолюминесцентную активность более чем на 4 порядка и практически не оказывает влияния на скорость спада биолюминесцентной реакции.
4. Делеция С-концевых аминокислотных остатков приводит к смещению максимумов спектров флуоресценции Ca^{2+} -разряженных фотопротеинов в зависимости от присутствующего С-концевого аминокислотного остатка: в случае С-концевого Туг наблюдается бимодальный спектр с максимумами при 410 и 490 нм, а в случае Ala или Val - мономодальный спектр с максимумом около 440 нм.
5. Делеция С-концевых аминокислотных остатков приводит к повышению фото- и термостабильности беровина.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

λ	Длина волны
АТР	Аденозинтрифосфат
БСА	Бычий сывороточный альбумин
DEAE	Диэтиламиноэтил
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
ДСН	Додецилсульфат натрия
ЭДТА	Этилендиаминтетрауксусная кислота
GFP	Зеленый флуоресцентный белок
ИПТГ	Изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид
ПААГ	Полиакриламидный гель
Среда-LB	Среда <i>Luria-Bertani</i>

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Haddock, Steven H.D. Bioluminescence in the Sea/ Steven H.D. Haddock, Mark A. Moline, and James F. Case// *Annu. Rev. Mar. Sci.* –2010. –V. 2. –P. 443-93
2. Markova, S.V. Coelenterazine-dependent luciferases / S.V. Markova, E.S. Vysotski// *Biochemistry (Mosc).*–2015. –V. 6. –P. 14-32
3. Tsuji, Frederick I. Molecular evolution of the Ca²⁺-binding photoproteins of the hydrozoa/ Frederick I. Tsuji, Yoshihiro Ohmiya, Thomas F. Fagan, Hiroyuki Toh, Satoshi Inouye// *Photochemistry and Photobiology.* –Vol. 62 No. 4. –P. 657-661
4. Markova, S.V. The light-sensitive photoprotein berovin from the bioluminescent ctenophore *Beroe abyssicola*: a novel type of Ca²⁺-regulated photoprotein/ S.V. Markova, L.P. Burakova, S. Golz, N.P. Malikova, L.A. Frank, E.S. Vysotski, // *FEBS J.* –2012. –V. 279.–P. 856-870.
5. Высоцкий, Е.С. Кальций-регулируемые фотопротейны морских кишечнополостных / Е.С. Высоцкий, С.В. Маркова, Л.А. Франк // *Молекулярная биология.* – 2006. – Т. 40, № 3. – С. 404–417
6. Stepanyuk, G. A. Spatial structure of the novel light-sensitive photoprotein berovin from the ctenophore *Beroe abyssicola* in the Ca²⁺-loaded apoprotein conformation state/ Galina A. Stepanyuk, Zhi-Jie Liu, Ludmila P. Burakova, John Lee, John Rose, Eugene S. Vysotski, Bi-Cheng Wang//*Biochimica et Biophysica Acta.* –2013. –V. 1834. –P. 213-214.
7. Shimomura, O. Bioluminescence: Chemical Principles and Methods/ O. Shimomura//World Scientific, Singapore. –2006.
8. Morin J.G. In: *Coelenterate Biology: Reviews and New Perspectives*/ J.G. Morin. Eds L. Muscatine, H.M. Lenhoff //New York: Acad. Press. –1974. – P. 397–438.

9. Shimomura, O. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*/ O. Shimomura, F.H. Johnson, Y. Saiga // *J. Cell. Comp. Physiol.* – 1962. –V. 59. –P. 223-239.
10. Shimomura, O. Extraction and properties of halistaurin, a bioluminescent protein from the hydromedusan, *Halistaura*/ O. Shimomura, F.H. Johnson, Y. Saiga// *J. Cell. Comp. Physiol.* –1963. –V. 62. –P. 9–15.
11. Levine, L.D. Isolation and characterization of a photoprotein, “phialidin”, and a spectrally unique green-fluorescent protein from the bioluminescent jellyfish *Phialidium gregarium*/ L.D. Levine, Ward W.W. // *Comp. Biochem. Physiol.* –1982. – V. 72B. – P.77-85.
12. Campbell A.K. Extraction, partial purification and properties of obelin, the calcium-activated luminescent protein from hydroid *Obelia geniculata*/ A.K. Campbell // *Biochem. J.* –1974. –V. 143. –P. 4111-418.
13. Высоцкий, Е. С. Выделение и очистка Ca^{2+} -зависимого фотопротейна - обелина из гидроидных полипов *Obelia longissima*/ Е. С. Высоцкий, В.С. Бондарь, В.Н. Летунов // *Биохимия.* –1989. –V. 54. –P. 965-973.
14. Высоцкий Е. С., Выделение и свойства различных молекулярных форм Ca^{2+} -активируемого фотопротейна обелина/Е. С. Высоцкий, В.С. Бондарь, И.И. Гительзон // *ДАН СССР.* –1991. – V. 321.–P. 214-217.
15. Бондарь, В.С. Физико-химические свойства фотопротейна из гидроидного полипа *Obelia longissima*/В.С. Бондарь, К.П. Трофимов, Е. С. Высоцкий // *Биохимия* –1992. –V. 57. –P. 1481-1490
16. Ward, W.W. Extraction and purification of calcium-activated photoproteins from the ctenophores *Mnemiopsis* sp. and *Beroe ovata*/ W.W. Ward, H.H Seliger.// *Biochemistry.* – 1974. –V. 13. –P. 1491-1499.

17. Golz, S. Isolated photoprotein bolinopsin, and the use thereof /S. Golz, S. Markova, L. Burakova, L. Frank, E. Vysotski//WO. –2005.–000885 (Patent)
18. Golz, S. Isolated photoprotein gr-bolinopsin and use thereof/ S. Golz, E. Vysotski, S. Markova, L. Burakova, L. Frank//WO. –2006. –108518 (Patent)
19. Aghamaali, M. Cloning, sequencing, expression and structural investigation of mnemiopsin from *Mnemiopsis leidyi*: an attempt toward understanding Ca^{2+} -regulated photoproteins/ M. Aghamaali, V. Jafarian, R. Sariri, M. Molakarimi, B. Rasti, M. Taghdir, R. Sajedi, S. Hosseinkhani, //Protein J. –2011. – V. 30. –P. 566-574.
20. Schnitzler, C.E. Genomic organization, evolution, and expression of photoprotein and opsin genes in *Mnemiopsis leidyi*: a new view of ctenophore photocytes/ C.E. Schnitzler, K. Pang, M.L. Powers, A.M. Reitzel, J.F. Ryan, D. Simmons, T. Tada, M.Park, J. Gupta, S.Y. Brooks, R.W. Blakesley, S. Yokoyama, S.H. Haddock, M.Q. Martindale, A.D. Baxevanis, // BMC Biol. –2012. –V. 10. –P. 107.
21. Powers, M.L. Expression and characterization of the calcium-activated photoprotein from the ctenophore *Bathocyroe fosteri*: insights into light-sensitive photoproteins/ M.L. Powers, A.G. McDermott, N.C. Shaner, S.H. Haddock // Biochem. Biophys. Res. Commun. –2013. –V. 431.–P. 360–366.
22. Haddock, S.H.D. Bioluminescence spectra of shallow and deep-sea gelatinous zooplankton: ctenophores, medusae and siphonophores/ S.H.D. Haddock, J.F. Case//Mar Biol.-1999.-V. 133–P. 571-582.
23. Anctil, M. Mechanism of photoinactivation and reactivation in the bioluminescence system of the ctenophore *Mnemiopsis*/ M. Anctil, & O. Shimomura //Biochem J. –1984. –V. 221. –P. 269-272.

24. Head, J.F. The crystal structure of the photoprotein aequorin at 2.3 Å resolution/ S. Inouye, K. Teranishi & O. Shimomura // *Nature*. –2000. –V. 405–P. 372-376.
25. Liu, Z.J. Structure of the Ca²⁺-regulated photoprotein obelin at 1.7 Å resolution determined directly from its sulfur substructure/ E.S. Vysotski, C.J. Chen, J.P. Rose, J. Lee & B.C. Wang // *Protein Sci.* –2000. –V. 9. –P. 2085-2093.
26. Liu, Z.J. Atomic resolution structure of obelin: soaking with calcium enhances electron density of the second oxygen atom substituted at the C2-position of coelenterazine/ E.S. Vysotski, L. Deng, J. Lee, J. Rose & B.C. Wang // *Biochem Biophys Res Commun.* –2003. –V. 311. –P. 433-439.
27. Titushin, M.S. NMR-derived topology of a GFP-photoprotein energy transfer complex/ M.S. Titushin, Y. Feng, G.A. Stepanyuk, Y. Li, S.V. Markova, S. Golz, B.C. Wang, J. Lee, J. Wang, E.S. Vysotski // *J. Biol Chem.* –2010. –V. 285. –P. 40891-40900.
28. Burakova, L.P. Role of certain amino acid residues of the coelenterazine-binding cavity in bioluminescence of light-sensitive Ca²⁺-regulated photoprotein berovin/ L.P. Burakova, G.A. Stepanyuk, E.V. Ereemeeva, E.S. Vysotski // *Photochem Photobiol. Sci.* – 2016. – V.15. – P. 691-704.
29. Ereemeeva, E.V. Hydrogen-bond networks between the C-terminus and Arg from the first α-helix stabilize photoprotein molecules/ E.V. Ereemeeva, L.P. Burakova, V.V. Krasitskaya, A.N. Kudryavtsev, O. Shimomura, L.A. Frank // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2014. –V. 13. – P. 541-7.
30. Burakova, L. The C-terminal tyrosine deletion in mitrocomin increases its bioluminescent activity/L. Burakova, P. Natashin, S. Markova, E. Ereemeeva, E. Vysotski // *Luminescence.* – 2014. – V. 29. –P. 84.

31. Nomura, M. A C-terminal proline is required for bioluminescence of the Ca²⁺ binding photoprotein aequorin/ M. Nomura, S. Inouye, Y. Ohmiya, F. Tsuji, I. // FEBS Lett. –1991. – V. 295. –P. 63.
32. Watkins, N. J. Requirement of the C-terminal proline residue for stability of the Ca²⁺-activated photoprotein aequorin/ N. J. Watkins, A.K. Campbell // Biochem. J.-1993. – V. 293. –P. 181-185.
33. Deo, S.K. C-terminal and N-terminal fusions of aequorin with small peptides in immunoassay development/ S.K. Deo, J.C. Lewis, S. Daunert // Bioconjugate Chem. –2001. – V.12. –P. 378-384.
34. Eremeeva, E. V. Ca²⁺-regulated photoprotein obelin as N-terminal partner in the fusion proteins/ E. V. Eremeeva, , L. A. Frank, S. V. Markova and E. S. Vysotski, // J. Sib. Fed. Univ., Biol. –2010. –V. 4. – P. 372–383.
35. Shimomura, O. Light-emitters involved in the luminescence of coelenterazine/ O. Shimomura, K. Teranishi // *Luminescenc.* –2000. – V. 15. –P. 51-58