

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель магистерской
программы
Т. Г. Волова
инициалы, фамилия
«_____» _____ 2019 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Получение нативной MLuc164 изоформы люциферазы *Metridia longa* из
телец включения *E. coli* и исследование ее физико-химических свойств

06.04.01 Биология

06.04.01.01 Микробиология и биотехнология

Научный руководитель _____
подпись, дата

к.б.н., с.н.с. С.В. Маркова

Выпускник _____
подпись, дата

Д.А. Горбунова

Рецензент _____
подпись, дата

к.б.н., с.н.с. М.Ю. Трусова

Красноярск 2019

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Получение нативной MLuc164 изоформы люциферазы *Metridia longa* из телец включения *E. coli* и исследование ее физико-химических свойств» состоит из 74 страниц текстового документа, 20 рисунков, 2 формул, 2 таблиц, 112 использованных источников литературы.

Целью данного исследования являлось получение нативной MLuc164 изоформы люциферазы *Metridia longa* из телец включения *E. coli* и исследование ее физико-химических свойств.

В результате работы оптимизирована процедура окислительного рефолдинга люциферазы Metridia (на примере MLuc7 изоформы) из телец включения *E. coli* с выходом белка высокой чистоты 6 мг/л, включающая в себя стадии промывки телец включения, ренатурации белка и его очистки. Эффективность разработанной методики оценена путем сравнения свойств полученного препарата люциферазы MLuc7 и препарата, полученного путем экспрессии в клетках насекомых SF9. Путем оптимизированной методики получен очищенный гомогенный препарат активной MLuc164 изоформы люциферазы *Metridia longa* в мономерной форме и проведена характеристизация его физико-химических свойств.

Научная новизна

Несмотря на то, что копеподные люциферазы в настоящее время широко применяются в качестве аналитических инструментов в биомедицинских исследованиях, их свойства изучены недостаточно. В настоящей работе впервые получен высокоочищенный гомогенный препарат люциферазы MLuc164 в природной форме и описаны его физико-химические свойства.

Практическая значимость

Определение физико-химических свойств люцифераз позволит оптимизировать условия их использования в качестве репортеров для определенных задач. Получение достаточных количеств очищенного препарата

люциферазы открывает возможности применения репортера для медицинской *in vitro* диагностики.

Материалы работы представлены в виде научных докладов и постерных сообщений на VIII съезде Российского фотобиологического общества (Шепси, Россия, 2017), Международном научном форуме «ЛОМОНОСОВ-2018» (Москва, Россия, 2018), Международной студенческой конференции «Проспект Свободный – 2018» (Красноярск, Россия, 2018), III Международной научной конференции «Биотехнология новых материалов – окружающая среда – качество жизни» (Красноярск, Россия, 2018).

По материалам работы опубликовано 5 печатных работ, из них: 1 статья в зарубежном рецензируемом журнале и 4 публикации в сборниках докладов научных конференций.

БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ, ЛЮЦИФЕРАЗА, ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ РЕФОЛДИНГ, *METRIDIA LONGA*, БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ РЕПОРТЕР.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
1 Обзор литературы.....	9
1.1 Природа биолюминесценции	9
1.2 Разнообразие целентеразин-зависимых люцифераз	10
1.3 Копеподные люциферазы	11
1.3.1 Первичная структура копеподных люцифераз	13
1.3.2 Изоформы копеподных люцифераз	15
1.3.3 Оптимизация репортерных свойств люцифераз	16
1.4 Применение копеподных люцифераз для <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i> визуализации.	17
1.4.1 Комплémentационные анализы для оценки белок-белковых взаимодействий	17
1.4.2 Применение в <i>in vitro</i> анализе	20
1.4.3 Проведение высокопоточных скринингов	22
1.4.4 Биолюминесцентный имиджинг	25
1.5 Получение копеподных люцифераз	28
1.5.1 Получение рекомбинантных белков путем рефолдинга из бактериальных телец включения.....	30
2 Материалы и методы.....	33
2.1 Объект исследования.....	33
2.2 Материалы	33
2.3 Методы.....	35
2.3.1 Трансформация в клетки <i>E.coli</i>	35
2.3.2 Экспрессия MLuc7 и MLuc164 в клетках <i>E.coli</i>	35
2.3.3 Получение телец включения <i>E. coli</i>	36
2.3.4 Отмывка и растворение телец включения <i>E. coli</i>	36
2.3.5 Рефолдинг люцифераз MLuc7 и MLuc164	36
2.3.6 Очистка нативной рекомбинантной люциферазы	37

2.3.7 Измерение биолюминесцентной активности люциферазы.....	37
2.3.8 Измерение спектров биолюминесценции и флуоресценции.....	38
2.3.9 Определение точки теплового перехода белков	38
2.3.10 Качественная и количественная оценка белковых препаратов.....	39
3 Результаты исследований и их обсуждения	41
3.1 Подбор условий для отмывки телец включения <i>E. coli</i>	42
3.2 Подбор условий для растворения телец включения <i>E. coli</i>	43
3.3 Подбор условий рефолдинга люциферазы.....	44
3.3.1 Влияние аргинина на рефолдинг	45
3.3.2 Влияние ионов металлов на рефолдинг	45
3.4 Очистка нативной рекомбинантной люциферазы	47
3.5 Свойства нативной рекомбинантной люциферазы MLuc7	48
3.6 Получение и очистка нативной рекомбинантной изоформы люциферазы MLuc164.....	50
3.7 Свойства нативной рекомбинантной люциферазы MLuc164	52
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	59
ВЫВОДЫ.....	61
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	62
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	63

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время большое внимание уделяется вопросам здравоохранения, в частности, диагностике различных заболеваний, проведению фундаментальных и прикладных исследований в области медицины, фармакологии и биотехнологии. Поскольку правильная и своевременная диагностика, а также разработка новых препаратов, являются ключом к эффективному и успешному лечению. Все это привело к появлению различных тест-систем для медицинской *in vitro* диагностики, а также к стремительному развитию технологий неинвазивной визуализации молекулярных процессов *in vivo*, называемых биоимиджингом.

На сегодняшний день достаточно широкое применение находят технологии визуализации молекулярных процессов с использованием биолюминесцентных систем. Биолюминесцентный имиджинг предлагает мощные и универсальные инструменты при мониторинге различных биологических процессов, оценке опухолевой активности и метастазирования на модельных животных [1], а также тестировании лекарственных препаратов для изучения их биораспределения, фармакокинетики и активности [2], оценке экспрессии генов, молекулярной визуализации генной терапии в доклинических исследованиях [2, 3] и др. Подходы с использованием биолюминесцентных систем стали незаменимыми во многих лабораториях молекулярной биологии, охватывающие различные области биомедицины и области доклинических исследований. В зависимости от поставленных задач, необходимы различные биолюминесцентные белки их субстраты с определенными биофизическим свойствами, поэтому многими исследовательскими группами ведется поиск новых биолюминесцентных природных белков, а также улучшение свойств уже используемых репортеров методами белковой инженерии.

Сегодня, наряду с другими известными биолюминесцентными белками (люциферазы светляков, бактерий, кораллов, фотопротеины) широко

используют в качестве репортерных молекул копеподные люциферазы (люциферазы ракообразных). В природных условиях данные секретируемые люциферазы обуславливают биолюминесценцию морских планктонных раков копепод и используют в качестве субстрата целентеразин, аналогично многим другим биолюминесцентным белкам [4]. Преимуществом использования данных люцифераз в качестве аналитического инструмента для неинвазивной визуализации молекулярных процессов является их нетоксичность для клеток и организмов [2] и естественная секретируемость, что позволяет изучать физиологические процессы в динамике на одном и том же биологическом образце. Кроме того, биолюминесцентные белки, являются перспективными кандидатами для их использования в *in vitro* анализе. Методы диагностики с использованием биолюминесцентных репортеров обладают чувствительностью, сравнимой с использованием радиоизотопных меток и при этом являются безопасными [5].

Несмотря на высокий интерес к копеподным люциферазам как к репортерам, их физико-химические и биолюминесцентные свойства до сих пор оставались неисследованными, что влечет за собой их использование в неоптимальных условиях, а их применение в *in vitro* диагностике было невозможным, вследствие трудностей получения белков в нативной конформации. Данные ограничения накладываются из-за наличия большого количества дисульфидных связей в молекуле белка [6], что препятствует эффективному фолдингу рекомбинантных белков в бактериальных клетках. Например, изоформа MLuc164, являющаяся самой длинной из люцифераз *Metridia*, была первой клонирована и описана, в связи с чем достаточно широко используется в качестве биолюминесцентного репортера в биомедицинских исследованиях. Несмотря на это, до настоящего времени свойства данной изоформы не были в достаточной мере охарактеризованы. Понимание люминесцентных свойств фермента влечет за собой осознанный выбор репортера для определенных задач и более корректное его использование в качестве биолюминесцентного репортера и интерпретацию результатов

экспериментов, так как на проявление биолюминесцентной активности может влиять множество факторов.

Таким образом, целью работы являлось **получение нативной MLuc164 изоформы люциферазы *Metridia longa* из телец включения *E. coli* и исследование ее физико-химических свойств.**

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Оптимизировать условия рефолдинга люциферазы *Metridia* из телец включения *E. coli* (на примере изоформы MLuc7).
2. Сравнить свойства препаратов MLuc7, полученных из телец включения *E. coli* и среды клеток насекомых Sf9.
3. Получить очищенный препарат активной MLuc164 изоформы люциферазы *Metridia longa* путем оптимизированной методики рефолдинга из телец включения *E. coli*.
4. Исследовать физико-химические свойства чистого препарата функционально активной копеподной люциферазы MLuc164.

Работа выполнена на базе лаборатории фотобиологии Института Биофизики ФИЦ «КНЦ СО РАН».

1 Обзор литературы

1.1 Природа биолюминесценции

Явление биолюминесценции широко распространено в природе и встречается у отдельных представителей бактерий, грибов, рыб, а также морских и сухопутных беспозвоночных. Тем не менее, наибольшее распространение биологическое свечение получило среди морских организмов. Предполагается, что биолюминесценция в природе необходима для коммуникации организмов и привлечения пищи, в то время как внезапные вспышки свечения считаются отталкивающими и необходимы для отпугивания хищников и маскировки [4]. Однако роль свечения для жизнедеятельности многих организмов до сих пор остается до конца не ясной [7,8].

Основой явления биолюминесценции являются химические реакции живого организма, сопровождающиеся выделением энергии в виде излучения квантов света в видимом диапазоне спектра. В результате многолетнего изучения процессов биолюминесценции у различных организмов многими учеными стали понятны общие принципы молекулярного механизма биолюминесцентных реакций. Свечение организмов осуществляется путем взаимодействия белкового компонента, обладающего ферментативной активностью, с молекулой субстрата. В результате окисления молекула субстрата переходит в кратковременное возбужденное состояние, а процесс релаксации сопровождается испусканием света [4].

Несмотря на одинаковый конечный результат биолюминесценции, механизмы, лежащие в его основе, значительно различаются у представителей различных таксонов [4]. Поэтому биолюминесцентные системы у разных организмов представлены независимыми ферментами и субстратами. Однако ввиду того, что белки схожи функционально, их принято обобщенно называть люциферазами, а соединения, выступающие в роли субстратов – люциферинами [7].

1.2 Разнообразие целентеразин-зависимых люцифераз

Большая группа светящихся морских организмов, часто значительно отдаленных друг от друга таксономически, использует в качестве субстратов для биолюминесцентной реакции производные имидазолпиразиона, называемые целентеразином (англ. «coelenterazine» от Coelenterata – кишечнополостные) и Cypridina-люциферином (от названия рода ракушковых раков Cypridina).

К организмам, использующим целентеразин- зависимую биолюминесцентную систему, относятся мягкий коралл *Renilla* [9,10], среди ракообразных – копеподы надсемейства Augaptiloidea [11], глубоководная креветка *Oplophorus* [12], а также некоторые представители моллюсков и ракушковых раков остракод [13].

Целентеразин- зависимые биолюминесцентные белки делятся на 2 типа в зависимости от особенностей протекания биолюминесцентной реакции – люциферазы и фотопротеины. Люциферазы катализируют типичные ферментативные реакции, в ходе которых при окислении субстрата кислородом образуется продукт (оксилюциферин) в возбужденном состоянии, а процесс релаксации приводит к излучению света. К данному типу относятся люциферазы морских копепод, остракод, сцифоидных медуз, креветок *Oplophorus*, а также коралла *Renilla* [7]. В ходе фотопротеинового типа реакции фермент образует устойчивый фермент-субстратный комплекс с субстратом и кислородом, внутримолекулярная реакция в котором инициируется внешним фактором, например, ионами Ca^{2+} , которые вызывают конформационные преобразования в субстрат- связывающей полости белка. Белки гидромедуз и ктенофор являются наиболее изученными на сегодняшний день Ca^{2+} регулируемыми фотопротеинами [7,14–16].

1.3 Копеподные люциферазы

Одним из основных представителей зоопланктона являются веслоногие раки копеподы. Некоторые из представителей этих маленьких ракообразных (обычно длиной 0,5-2 мм) обладают способностью к биолюминесценции. До сих пор состав их светящегося секрета остается неизвестным, но его основными компонентами [17,18] являются целентеразин и целентеразин-зависимая люцифераза. Данные организмы способны накапливать поочередно в своей биолюминесцентной железе (Рисунок 1) люциферазу и целентеразин, и, будучи встревоженными, секretировать их через специальные поры в морскую воду. Где и происходит реакция окисления субстрата растворенным в воде кислородом под действием люциферазы с излучением света (с максимумом эмиссии около 485 нм). Предполагается, что внезапное свечение, ослепляет адаптированных к темноте потенциальных хищников, благодаря чему у рачка появляется время скрыться.



Рисунок 1 – Изображение веслоногой копеподы *Metridia pacifica*. Указано расположение желез, секретирующих люциферазу в окружающую среду [19]

Люциферазы копепод как обычные ферменты делают несколько оборотов, полностью перерабатывая субстрат [4,18]. Схема биолюминесцентной реакции изображена на рисунке 2. Биолюминесцентный сигнал характеризуется высокой скоростью подъема и быстрым затуханием потока фотонов со временем, это так называемая кинетика типа «вспышка».

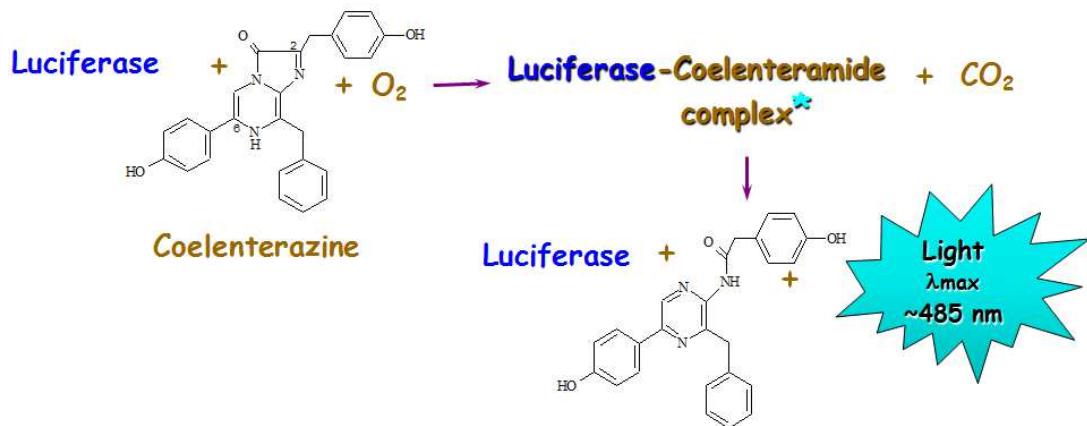


Рисунок 2 – Схема механизма биолюминесцентной реакции, катализируемой копеподными люциферазами

Как уже было сказано выше субстратом для биолюминесцентной реакции копепод служит целентеразин. С помощью меченых изотопами L - аминокислот для кормления раков *Metridia pacifica* было установлено, что копеподы синтезируют целентеразин из двух молекул тирозина и одной молекулы фенилаланина. По всей видимости это происходит в результате нерибосомального синтеза с последующей циклизацией трипептида ($H_2N - Phe - Tyr - Tyr - COOH$) поэтапно (Рисунок 3) [4].

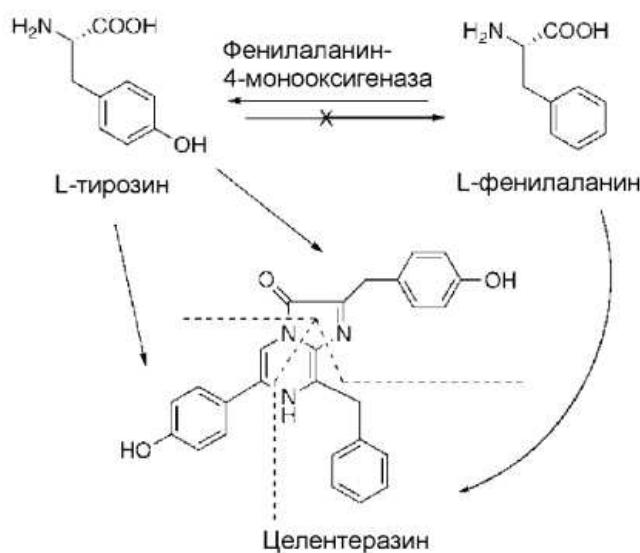


Рисунок 3 – Возможная схема биосинтеза целентеразина копеподами из природных аминокислот: двух молекул тирозина и одной фенилаланина, путем циклизации трипептида.

Пунктиром помечено разделение целентеразина на исходные части [4]

Несмотря на то, что биолюминесцентные виды обнаружены среди многих морских веслоногих раков [20], гены, кодирующие люциферазы, были идентифицированы только для трех семейств Metridinidae, Heterorhabdidae и Lucicutiidae относящихся к надсемейству Augaptiloidea (Arietelloidea). Аминокислотные последовательности люцифераз копепод не выявили гомологию с любыми другими последовательностями в общедоступных базах данных, включая клонированные морские люциферазы семейств Renilla, Oplophorus и Cypridina, несмотря на то, что они используют один и тот же биолюминесцентный субстрат целетеразин или структурно схожий с ним Cypridina-люциферин [4]. Это говорит о возможности возникновения этого класса биолюминесцентных белков от единой предковой формы [11].

1.3.1 Первичная структура копеподных люцифераз

Первые гены кДНК копепод, кодирующие белки с люциферазной активностью GpLuc и MLuc, были выделены из копепод *G. princeps* и *M. longa*, соответственно [4,21]. Люцифераза GpLuc на сегодняшний день является коммерческим предложением компании Prolume (США) и достаточно давно стала использоваться в качестве метки в различных исследованиях: оценка белок-белковых взаимодействий, изучение механизмов транспорта белков *in vivo*, проведение высокопоточных скринингов на живых клетках ([22,23] и др.). Благодаря постепенному накоплению знаний о свойствах изоформ люцифераз MLuc они также обретают всё большую популярность для использования в прикладных и исследовательских целях в качестве биолюминесцентных меток.

На сегодняшний день идентифицировано более 40 последовательностей кДНК для секретируемых люцифераз из 12 видов веслоногих раков и показано, что все гены кодируют люциферазы, имеющие на N-конце сигнальный пептид из 17-22 аминокислотных остатков. Этот пептид отвечает за внеклеточную секрецию, отщепляется специальным ферментом сигнальной

пептидазой [18]. Было показано, что клетки насекомых [24,25] и млекопитающих [11,19,26] эффективно секретируют исследованные копеподные люциферазы с природным сигнальным пептидом.

Люциферазы копепод можно условно разделить на 2 части: вариабельный N-конец и C-концевую консервативную часть. Консервативная C-концевая часть люциферазы формируется двумя неидентичными tandemными повторами длиной около 70 аминокислотных остатков, каждый из которых содержит высоко консервативный участок (мотив) из 32 аминокислот. Каждый мотив включает 5 остатков Cys, что влечет за собой наличие до пяти дисульфидных связей на каждую молекулу люциферазы [4,27]. Вероятно, наличие большого числа S-S-связей, что характерно для секретируемых белков, определяет значительную термостабильность копеподных люцифераз [5].

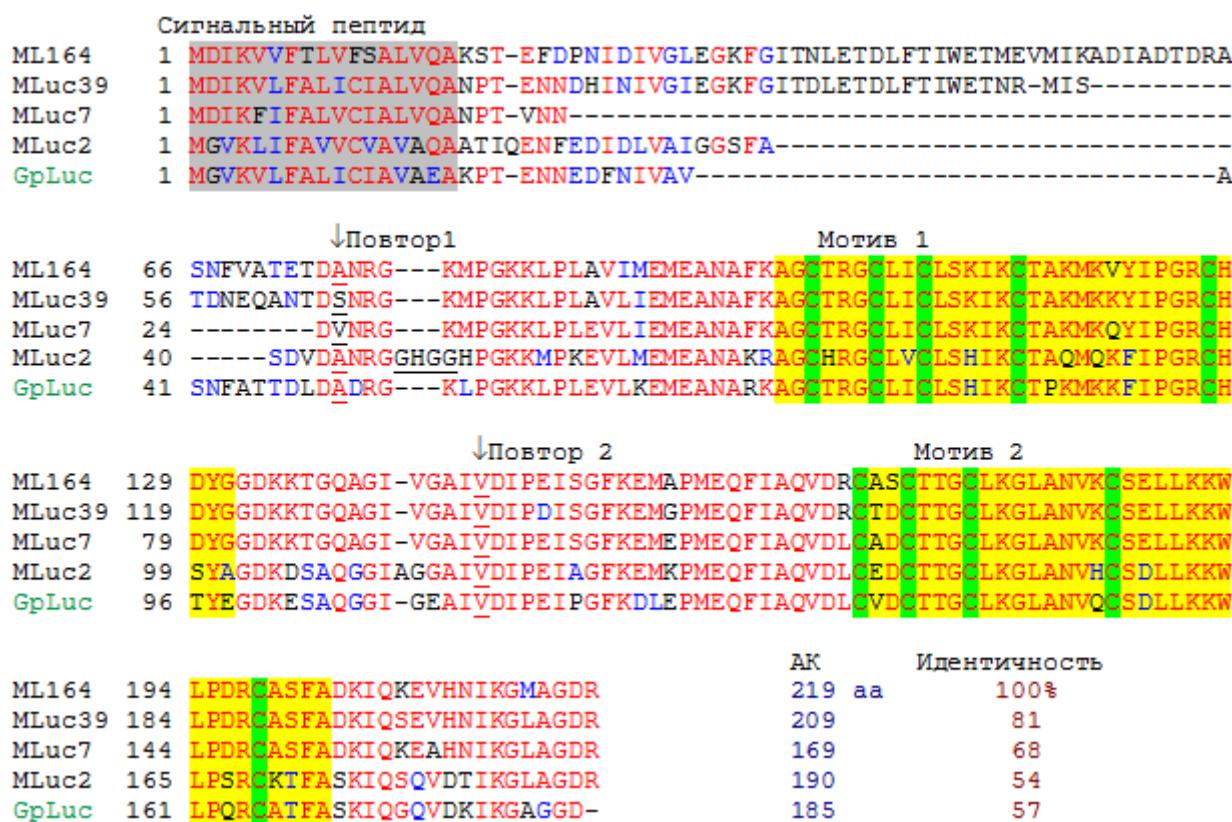


Рисунок 4 – Сравнение аминокислотных последовательностей изоформ MLuc с GpLuc. Серым цветом обозначен сигнальный пептид, зеленым выделены цистеиновые остатки, консервативно расположенные во всех представленных последовательностях.

Красные – идентичные, синие – схожие по свойствам, черные – различные остатки

Наличие внутримолекулярных дисульфидных связей необходимо для функционирования фермента, что было подтверждено путем добавления восстановительных агентов, таких как дитиотреитол, приводящих к полной инактивации фермента [28]. Аминокислотные последовательности различных изоформ люциферазы *M. longa* и люциферазы *G. princeps* представлены на рисунке 4.

1.3.2 Изоформы копеподных люцифераз

В пределах одного вида у некоторых представителей копепод (*M. longa*, *M. pacifica*, *M. oktotensis*) имеется несколько изоформ люцифераз, различия в гомологичности аминокислотных последовательностей которых могут быть сопоставимы с межвидовыми. Эти данные могут свидетельствовать о том, что изоформы кодируются несколькими неаллельными генами. Так, у копеподы *Metridia longa* имеется 4 изоформы люциферазы MLuc, и идентичность последовательностей изоформ MLuc164 и MLuc7 *M. longa* составляет 68%, MLuc164 и MLuc2 всего 54% (Рисунок 4). Такие показатели достаточно близки к 57%-ой идентичности последовательностей MLuc164 и люциферазы GpLuc из *Gaussia princeps* – вида копепод из другого рода того же семейства Metridinidae [4,21].

Основным объектом данного исследования послужила MLuc164 изоформа люциферазы *Metridia*, поскольку она является первой клонированной люциферазой *M. longa* и широко используется в биомедицинских исследованиях, но до сих пор недостаточно изучена. В отличие от других изоформ люциферазы *Metridia* MLuc164 является наиболее длинной (~22 кДа) и обладает более медленным спадом биолюминесцентного сигнала, что более удобно для некоторых видов аналитических применений, особенно для высокопоточных методов скрининга и для применения в качестве *in vivo* репортера в животных тканях.

1.3.3 Оптимизация репортерных свойств люцифераз

Потребности в биолюминесцентных белках и их субстратах с различными свойствами все больше возрастают в связи с быстрым развитием фундаментальных, а также прикладных биомедицинских исследований. На сегодняшний день все биолюминесцентные системы имеют те или иные недостатки для целей биоимиджинга. Например, большинство имеющихся в природе биолюминесцентных белков излучают в голубой области спектра. Такое излучение интенсивно поглощается основным тканевым хромофором гемоглобином, и, как следствие биолюминесцентный сигнал, проходящий через ткани, сильно ослабевает. Кроме того, многие люциферазы имеют довольно низкий температурный оптимум активности, следовательно, при физиологических температурах организма их функционирование значительно снижается. Копеподные люциферазы обладают кинетикой типа «вспышка», что усложняет детекцию биолюминесценции на лабораторных животных *in vivo* и требует биолюминометры, оборудованные системой впрыска с немедленной регистрацией сигнала для каждого образца *in vitro*.

По этим причинам ведутся работы по поиску новых биолюминесцентных систем, а также по совершенствованию уже известных белков методами молекулярной эволюции. Как результат проведения исследований в данной области был получен ряд мутантов GpLuc и MLuc, обладающих как высокой удельной активностью, так и медленным спадом биолюминесцентного сигнала [29–31]. Двойной мутант GpLuc (M60L–M127L) [32] имел приблизительно в 14 раз более медленный спад биолюминесценции, а удельную активность, как у GpLuc дикого типа. Кроме того получен зеленый вариант люциферазы *Gaussia*, получивший название «Monsta», имевший 4 мутации (F89W/I90L/H95E/Y97W), с эмиссией $\lambda=503$ нм и 5-кратным повышением активности [33].

1.4 Применение копеподных люцифераз для *in vivo* и *in vitro* визуализации

В настоящее время секретируемые люциферазы из копепод *Metridia longa* и *Gaussia princeps* широко используются в качестве чувствительных репортеров, в различных *in vivo* и *in vitro* анализах. Технологии биолюминесцентного имиджинга с использованием копеподных люцифераз позволяют всесторонне изучить различные сложные процессы – рост клеток и их миграцию, транспорт интересующих белков, экспрессию генов, межбелковые и лиганд-белковые взаимодействия, иммунодетекцию анализов в пробе, жизнеспособность культуры клеток или их инфицированность и т.д. Активное использование копеподных люцифераз в качестве аналитических инструментов обусловлено их привлекательными свойствами, такими как простая реакция, не требующая дополнительных кофакторов, высокая биолюминесцентная активность, низкий предел обнаружения и широкий линейный диапазон детекции. Линейная корреляция светового сигнала люциферазы с её концентрацией [24,28,29,34] или количеством клеток, экспрессирующих люциферазу [26,35,36], была продемонстрирована во многих работах. Данные свойства копеподных люцифераз делают их пригодными для использования в качестве меток в различных областях.

1.4.1 Комплементационные анализы для оценки белок-белковых взаимодействий

Изучение белок-белковых взаимодействий важно для понимания работы и установления функциональных характеристик ферментов, рецепторов, определения воздействия лигандов на ассоциацию комплексов и т.д. Такие сети межмолекулярных взаимодействий в литературе называют интерактомом [37].

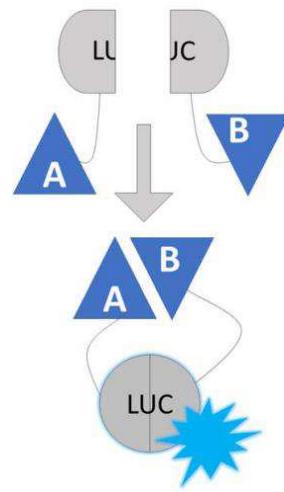


Рисунок 5 – Схема комплементационного анализа с использованием фрагментов люцифераз. Белки-мишени обозначены треугольниками (A, B)

Сегодня большое количество исследований, посвященных белок-белковым взаимодействиям, проводится с помощью комплементационных (или «split» от англ. – «расщепление») анализов [38,39].

Данный подход основан на использовании двух неактивных [40] фрагментов репортерной молекулы, каждый из которых по отдельности сшит с интересующими белками. Во время взаимодействия белков-мишеней два расщеплённых фрагмента стерически сближаются и образуют функционально активный репортер (Рисунок 5). Комплементационный анализ предполагает использование белков, обладающих какими-либо характерными функциональными свойствами.

Различные варианты комплементационного анализа позволяют идентифицировать взаимодействие белков с лигандами и друг с другом при их близком взаиморасположении, регистрировать конформационные изменения в белках и пептидах, комплементацию, регулируемую действием протеаз и т.д. [41].

На сегодняшний день для такого рода анализов используют убиквитин [42], дигидрофолат редуктазу [43], β -лактамазу [44], TEV-протеазу [45] и др. Одной из популярных систем, также позволяющих оценить образование

комплексов белок-белок или белок-ДНК является двухгибридная система («Yeast two-hybrid system», Y2H) [46].

Особенно привлекательными для комплементационных анализов являются флуоресцентные белки (GFP и его модификации [47–49]), а также биолюминесцентные белки, в том числе многие известные люциферазы.

Несмотря на то, что третичная структура ни одной из известных копеподных люцифераз на данный момент не идентифицирована, была продемонстрирована возможность их использования в комплементационном анализе. Так, способность люциферазы *Gaussia* образовывать комплементарные фрагменты была выявлена путем отбора пар фрагментов GpLuc с различными точками расщепления, способными восстанавливать биолюминесцентную активность. В результате была идентифицирована оптимальная пара фрагментов (GpLuc1-93 и GpLuc94-169), соответствующих отдельным tandemным повторам люциферазы [30]. Получившиеся фрагменты представляли собой предельно малые домены (9-10 кДа) для присоединения к целевым белкам, что может обеспечить простоту и достоверность комплементационного анализа. Несмотря на то, что комплементация N- и C-концевых фрагментов GpLuc привела к восстановлению только 10% начальной активности, это значение было сопоставимо или превышало специфичность люцифераз RLuc и FLuc, используемых в комплементационных анализах [26,50].

Разрабатываемые в последнее время вариации «сплит»-анализов на основе фрагментов люциферазы *Gaussia* позволили оценить ассоциации хемокинов со специфическими рецепторами на уровне клеток и лабораторных мышей [23], исследовать интерактом в патогенном микроорганизме *Salmonella enterica* [51]. Кроме того, на основе фрагментов GpLuc проведены комплементационные анализы при исследовании димеризации белка APP (предшественника амилоидных пептидов) [52,53], количественная оценка и визуализация транспорта внутриклеточного кальция при слиянии частей люциферазы с кальмодулином [54] и во многих других работах.

Хотя все комплементационные анализы, описанные ранее, были разработаны с фрагментами люциферазы *Gaussia*, предполагается, что другие люциферазы проявляющие высокую степень гомологии с GpLuc, а также мутанты CopLuc могут применяться как эффективные репортеры для такого рода анализов.

1.4.2 Применение в *in vitro* анализе

В современных методах медицинской диагностики большую долю занимают качественные и количественные анализы, основанные на выявлении аффинного взаимодействия антиген-антитело в твердофазном формате (иммунологические анализы).

Сегодня широко используются ферментные метки, конъюгированные с антителами, в ходе анализа взаимодействие антиген-антитело оценивается колориметрически. Такой способ детекции, так называемый твердофазный иммуноферментный анализ или ELISA («Enzyme linked immunosorbent assay»), используется в диагностических лабораториях для определения множества жизненно важных анализаторов, а также в исследовательских целях.

В иммуноферментном анализе в качестве репортерных молекул традиционно используются пероксидаза хрена, β -D-галактозидаза, щелочная фосфатаза. Определение целевого анализа происходит за счет введения в один из компонентов реакции ферментативной метки с последующей ее детекцией с помощью соответствующего субстрата, изменяющего свою окраску. При этом интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации искомого антигена [55]. Несмотря на то, что данные метки зарекомендовали себя как простые и эффективные инструменты обнаружения агентов, все же они имеют некоторые недостатки. Развитие окраски продукта реакции зависит от окружающей температуры, и как следствие, окрашивание может происходить неравномерно, а также в ходе работы необходимо вносить «стоп»-реагент для остановки ферментативной реакции, что увеличивает время анализа.

Сегодня метки, основанные на применении биолюминесцентных и флуоресцентных белков, активно разрабатываются для иммуноанализов, и в качестве биоспецифических доменов используются антитела или аптамеры [56–59]. Схематическое изображение биолюминесцентного иммуноанализа представлено на рисунке 6.

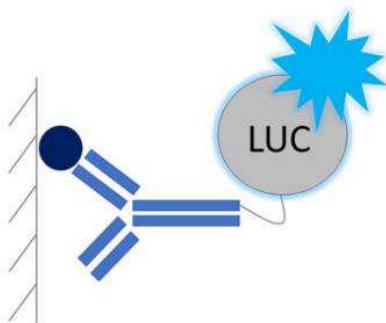


Рисунок 6 – Схема биолюминесцентного иммуноанализа

На сегодняшний день уже были разработаны различные системы биолюминесцентного иммуноанализа на основе копеподных люцифераз *Gaussia* и *Metridia*. Было показано, что использование копеподных люцифераз в качестве меток для *in vitro* исследований крови лабораторных животных является эффективным способом обнаружения анализов, поскольку они позволяют проводить множественные тесты, уменьшить время анализа и, кроме того являются более чувствительными, чем распространённая секрецируемая щелочная фосфатаза (SEAP) [60,61].

В иммуноанализах часто используются биотинилированные метки, служащие универсальными инструментами в обнаружении агентов с помощью avidin-содержащих антител. Так люцифераза *Gaussia* использовалась в качестве метки в анализе гибридизации ДНК [34] и обеспечивала детекцию с пределом обнаружения 1 аттомоль, несмотря на низкий выход активной биотинилированной люциферазы. Тот же предел обнаружения был продемонстрирован в анализе связывания с химически-биотинилированной люциферазой *M. longa* (MLuc39) *in vitro*, производимой в *E.coli* [28].

Авторы исследования [62] разработали химерные белки с использованием GpLuc для детекции аутоантител ZnT8 (специфические маркеры при диабете 1 типа). Гибридный белок продуцировался в секретируемом виде в клетках насекомых и затем применялся без какой-либо очистки для обнаружения аутоантител ZnT8 в сыворотках пациентов с диабетом 1 типа. Авторы показали, что использование гибридного белка позволяет определять аутоантитела с более высокой чувствительностью по сравнению с коммерчески доступным набором ELISA. Другим действенным примером является разработка биоспецифической метки на основе медленного мутанта люциферазы *Gaussia* и одноцепочечных миниантител (scFv), специфичных к кортизолу [63]. Было показано, что биолюминесцентный анализ с GpLuc-scFv был более чувствительным, чем любой из доступных иммуноанализов для обнаружения кортизола в настоящее время, кроме того не требовал наличия планшетного люминометра с системой быстрого впрыска субстрата. Приведенные выше исследования имеют большое клиническое значение.

Таким образом, использование биолюминесцентных белков в качестве меток обеспечивает высокую чувствительность обнаружения аналита в широком линейном диапазоне [64,65], характеризуются стабильностью в растворах и простотой запускаемой биолюминесцентной реакции. Эти свойства дают свои преимущества по сравнению с колориметрическими метками, благодаря чему копеподные люциферазы обладают большим потенциалом для использования в *in vitro* диагностике.

Несмотря на это их применение в *in vitro* диагностике все еще довольно ограничено, вследствие трудностей получения активных копеподных люцифераз высокой чистоты.

1.4.3 Проведение высокопоточных скринингов

Высокопоточный скрининг (High-Throughput Screening, HTS) является основным средством на пути отбора и анализа химических соединений,

обладающих клинической значимостью, а также исследований сетей взаимодействия внутриклеточных транспортных белков, ферментов, рецепторов и т.д.

Небольшие размеры копеподных люцифераз катализирующих реакцию окисления субстрата без наличия дополнительных кофакторов, а также высокая эффективность секреции, не требующая стадии лизиса клеток для количественной оценки агентов и простота проведения крупномасштабных исследований, сделали CopLucs востребованными репортерами для проведения высокопоточных скринингов.

Так, на основе HTS-анализа с использованием люциферазы Metridia было проанализировано более девяти тысяч низкомолекулярных соединений в исследовании по поиску критических агентов, участвующих в развитии бокового амиотрофического склероза [66]. Была разработана репортерная система HTS-анализа транскрипционных факторов, индуцируемых клеточной гипоксией (HIF) [67]. В результате анализа были протестированы потенциальные агенты, вызывающие гипоксию.

При применении секретируемой люциферазы GpLuc был создан псевдоинфекционный вирус-репортер Западного Нила, который был использован для высокопроизводительного скрининга антивирусных препаратов [68].

Системы скрининга на основе люцифераз MLuc и GpLuc были разработаны для исследований микроРНК (miRNAs) в формате HTS, которые, подавляют глобальную экспрессию генов и играют важную роль в различных клеточных процессах. Например, мониторинг активности miR-15/16 miRNAs, которые могут подавлять экспрессию антиапоптотического белка BCL-2, проводился с течением времени в одной и той же популяции раковых клеток путем отбора аликвот культуральной среды с использованием репортерного гена MLuc с целевой miR-15/6 в ее 3'-нетранслируемой области (3' UTR) [69]. Такой подход показывает активность конкретной miRNA, которая коррелирует с активностью репортера, содержащего последовательность-мишень для этой

miRNA в его гене. Репортерный ген GpLuc, контролируемый сайтами связывания miRNA в их 3' UTR, использовали для описания функциональной miRNA в культивируемых клетках [70] и мониторинга уровней экспрессии miR-22 при гипертрофии сердца [71] в формате HTS. Клетки рака предстательной железы, меченные MLuc, применялись для идентификации миметиков miRNA, которые ингибируют репарацию ДНК и повышают чувствительность опухолевых клеток к ионизирующей радиации во время терапии [72]. Таким образом, системы скрининга на основе люцифераз MLuc и GpLuc позволяют изучать динамические изменения микроРНК-активности в одной популяции клеток в течение времени [69,70,73].

Широкомасштабные HTS выполнены с использованием сенсора, сконструированного на основе комплементарных фрагментов GpLuc. Так, для выявления белков, участвующих в клеточном апоптозе, было проанализировано более 3000 комбинаций белковых пар и обнаружено около 50 новых взаимодействий, прежде никогда не описанных [74]. Масштабированный комплементационный анализ на основе GpLuc также позволил выявить бинарные белок-белковые взаимодействия полимеразы вируса гриппа с клеточными белками хозяина при инфекциях в нативных условиях [75] и выявить новые небольшие молекулы, ингибирующие образование полимеразного комплекса вируса гриппа [76].

Большую клиническую и фундаментальную значимость имеют исследования, направленные на изучение интерактома вирусных белков. Так, были изучены взаимодействия белковых компонентов вируса папилломы человека (GpLuc в комбинации с Y2H-системой) [77], а также филовирусов, благодаря чему был осуществлен широкий поиск ингибиторов репликации вирусов Эбола и Марбурга (MLuc-репортер) [78].

1.4.4 Биолюминесцентный имиджинг

Визуализация *in vivo* с использованием биолюминесцентных белков является неинвазивным и нетоксичным методом для мониторинга процессов в интактных клетках и на небольших модельных животных [21]. Высокоактивные копеподные люциферазы, обладающие чрезвычайно малым размером, стабильностью и естественной секретируемостью, являются удобным инструментом для биоимиджинга. Секреторная природа CopLucs позволяет оценивать их активность без разрушения клеток в культуральной среде, крови или других биологических жидкостях модельных животных [36,60,79,80]. Таким образом появляется возможность осуществлять множественные *ex vivo* анализы наблюдаемой клеточной культуры, образцов крови или производить прижизненный мониторинг, проводя инъекции субстрата в кровеносные сосуды лабораторных животных.

В настоящее время из всех люцифераз копепод широко используются для биоимиджинга *in vivo* люциферазы MLuc из *M. longa* и, в большей степени, GpLuc из *G. princeps*. Показано, что в сравнении с другими распространенными люциферазами FLuc и RLuc, люцифераза *Gaussia* проявила себя как более чувствительный репортер (до 100 раз) в клетках млекопитающих *in vivo* [26,81].

Значительной областью применения копеподных люцифераз являются онкологические исследования на мелких модельных животных, включающие изучение миграции раковых клеток в режиме реального времени, оценку метастазирования и ответа привитых опухолей на терапию [72,82–84] и др. Такие исследования основаны на введении лабораторному животному с низким иммунным статусом культуры опухолевых клеток, ранее трансфенированных генетическими конструкциями с репортерными элементами (Рисунок 7). Далее регистрируют свечение в высокочувствительных имиджинговых камерах (например, «IVIS Spectrum», PerkinElmer, США), после внутривенного введения субстрата. В результате, с помощью программного обеспечения прибора возможно получить данные о разной интенсивности излучения. Одним

из примеров такого анализа является мониторинг тучноклеточного лейкоза человека на лабораторных мышах с помощью платформы «IVIS Spectrum», США [84]. Была проведена внутривенная инъекция опухолевыми клетками ROSAKIT D816V-Gluc и через 4 недели наблюдалось приживление у всех инъецированных первичных реципиентных мышей. При помощи имиджинговой системы по активности люциферазы *Gaussia* приживленные клетки были обнаружены на высоком уровне в костном мозге и в меньшей степени в селезенке, печени и периферической крови. Кроме того, прогрессирование заболевания дополнительно отслеживалось путем повторного количественного определения активности фермента в периферической крови.

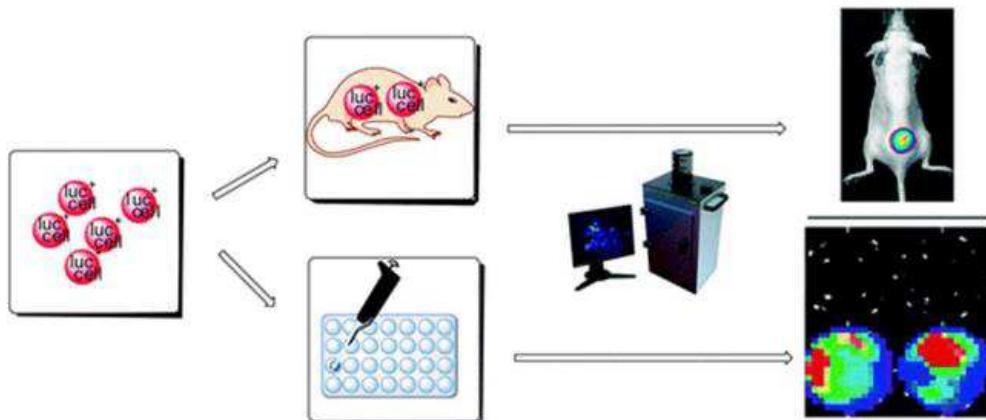


Рисунок 7 – Схема визуализации опухолей с использованием мелких лабораторных животных и имиджинговой камеры [85]

Не менее важными примерами различных приложений с использованием копеподных люцифераз являются мониторинг секретируемых белков-мишеней, слитых с GpLuc, например человеческого инсулина [86,87] и секретируемых внутриклеточных и циркулирующих белков у мышей для мониторинга генной терапии [88]; отслеживание опухолевых клеток в реальном времени, например, обнаружение жизнеспособных циркулирующих клеток рака предстательной железы в крови с помощью селективного для опухоли предстательной железы репортерного аденоовириуса, меченного MLuc [83], мониторинг

прогрессирования злокачественной глиомы [89] у мышей для доклинических исследований по активности GpLuc в крови; и другие. На базе репортера GpLuc, связанного с клеточной мембраной были исследованы пути первичного распределения Т-клеток мышей и человека на интактных мышах [81] и произведен долгосрочный мониторинг живых нейронов без признаков фототоксичности с высоким разрешением [90].

В ряде исследований GpLuc и MLuc люциферазы были использованы для обнаружения *in vivo* различных Luc-меченных инфекционных агентов, таких как *Candida Albicans* [91], *E.coli* [92], *Mycoplasma sp.* [93], вирус геморрагической септицемии [94], репортерный энтеровирус 71 [95] и вирус гриппа А [96].

Поскольку CopLucs показывают высокую термостабильность, MLuc была использована в качестве репортера в исследованиях клеточной гипертермии при опосредованном наночастицами нагревании [97].

Многие работы демонстрируют применение копеподных люцифераз в разработке новых простых методов оценки метаболической активности исследуемых клеточных культур. На базе CopLucs были созданы биосенсоры для выявления стресса эндоплазматического ретикулума и активации внутриклеточных каспаз [98], для оценки метаболической активности и жизнеспособности клеток в режиме реального времени [35,36] и для оценки цитотоксичности [99]. Данные разработки позволяют быстро оценить метаболическую активность без разрушения клеток, без использования микроскопирования и стандартного MTT-теста.

Кроме того, существует ортогональный подход, который основан на применении нескольких биолюминесцентных репортеров и позволяет отследить на одной культуре клеток или модельном животном сразу несколько событий. В данном случае один из репортеров обычно служит внутренним контролем для нормализации сигналов других репортеров. Например, системы тройного репортера были созданы на основе GpLuc в сочетании с FLuc и *Vargula* люцифераз (из остракод *Vargula hilgendorfii*) для мониторинга

клеточных процессов *in vivo* [100]. Также люциферазы *Gaussia*, *Renilla* и *firefly* одновременно использовались для неинвазивного количественного определения активности Src-киназы в живых клетках и *in vivo* у мышей [101], была получена многоцветная клеточная линия с GpLuc для *in vivo* визуализации активности NF- κ B и апоптоза при раке молочной железы человека [102] и другие.

1.5 Получение копеподных люцифераз

Копеподные люциферазы экспрессируются практически во всех типах клеток, включая клетки бактерий, микобактерий, дрожжей, водорослей, насекомых и млекопитающих [4,6] с образованием активного белка, что делает их очень привлекательными для использования в качестве репортерных белков. Тем не менее, качество и количество продуцируемой рекомбинантной люциферазы зависят от конкретной системы экспрессии и клеточного компартмента, выбранных для экспрессии.

Люциферазы копепод эффективно секретируются в культуральную среду в виде нативно свернутых белков при экспрессии в клетках млекопитающих и насекомых с их природными сигнальными пептидами. Однако наличие до пяти дисульфидных связей на молекуле CopLucs [29] затрудняет получение правильно свернутых люцифераз при экспрессии в цитоплазме прокариотических и эукариотических клеток, где восстановительная среда препятствует образованию дисульфидных связей. Биолюминесцентная активность в клетках млекопитающих, экспрессирующих люциферазу *Gaussia* без сигнального пептида в цитоплазме, была очень низкой по сравнению с активностью в культуральной среде клеток того же типа, секрецирующих GpLuc, экспрессирующуюся совместно с сигнальным пептидом и созревающую в окислительных условиях эндоплазматического ретикулума во время секреции [21]. Тем не менее, биолюминесценция живых клеток млекопитающих, экспрессирующих цитоплазматическую люциферазу GpLuc, значительно

превышала интенсивность сигнала (более чем в 200 раз) обычно используемых люцифераз светлячка и *Renilla*, экспрессируемых в сходных условиях [26].

Несмотря на то, что бактериальные клетки имеют восстановительный характер цитоплазмы, предпринимались неоднократные попытки продуцировать копеподные люциферазы в клетках *E. coli* в активной форме. Например, была сделана попытка экспрессировать копеподную люциферазу *Gaussia*, со множественными дисульфидными связями, в периплазме *E. coli* за счет использования прокариотической сигнальной пептидной последовательности *pelB*, обеспечивающей секрецию в бактериальных клетках [103]. Поскольку периплазма клеток *E. coli* лучше подходит для экспрессии рекомбинантных белков с внутримолекулярными S-S-связями за счет присутствия в ней дисульфид-оксидоредуктазы и дисульфид-изомеразы, которые катализируют образование дисульфидных связей [104]. Однако данный компартмент не всегда эффективен для правильного фолдинга белков с несколькими дисульфидными связями [104]. В результате работы было показано, что выход и специфическая активность секретируемой GpLuc были относительно низкими, а расщепление *pelB* было неполным во время созревания белка [22,103]. Другим предпринятым подходом было понижение температуры экспрессии (pCold expression system), что способствовало правильному фолдингу люциферазы *Gaussia*, но замедляло скорость синтеза белка [6]. Кроме того, были предприняты попытки экспрессии люциферазы в виде фьюжина с соответствующим пептидом, повышающим растворимость белка в бактериальном хозяине. В частности, экспрессия люциферазы *G. princeps* в виде слияния с синтетическим IgG-связывающим доменом белка A [105], улучшающим растворимость пептидом [106] или С-концевым аминокислотным Туг-линкером [31], увеличивающими количество растворимой люциферазы в цитоплазматической фракции клеток *E.coli*. Хотя эти подходы позволили получить чистые высокоактивные образцы GpLuc, ни один из них не гарантировал соответствия свойств рекомбинантной люциферазы, продуцируемой в *E.coli*, свойствам нативного белка.

Высокоактивные рекомбинантные люциферазы копепод с корректным образованием дисульфидных связей были получены в виде секретируемых белков с использованием бакуловирусной системы экспрессии в клетках насекомых [21,85]. Изоформы люциферазы *Metridia* MLuc7 [24] и MLuc2 [107], а также люцифераза *Gaussia* [29] были эффективно экспрессированы в клетках насекомых Sf9 с их нативными сигнальными пептидами. Данные люциферазы были очищены от бессывороточной культуральной среды с выходом 3–6 мг/л чистого препарата белка. В случае люциферазы MLuc7, продуцируемой в клетках насекомых, было продемонстрировано, что ее свойства полностью коррелируют со свойствами MLuc7, секretируемой клетками млекопитающих [24]. Несмотря на то, что такой подход показал себя как наиболее эффективный способ получения высокоактивных очищенных препаратов копеподных люцифераз, он является довольно дорогостоящим [108].

1.5.1 Получение рекомбинантных белков путем рефолдинга из бактериальных телец включения

E. coli является наиболее выгодным хозяином для производства рекомбинантных белков, но окислительно-восстановительный потенциал бактериальной цитоплазмы препятствует образованию дисульфидных связей рекомбинантного белка, и как следствие, правильному фолдингу люциферазы *M. longa*, содержащей множественные дисульфидные связи. Видимо поэтому, при экспрессии в цитоплазме *E.coli* изоформы люциферазы *M. longa* [18,28] и *GpLuc* [34] в основном накапливаются в виде нерастворимых цитоплазматических агрегатов – телец включения (Inclusion bodies, IB).

Преимуществами такого синтеза являются высокие уровни накопления целевого белка, а также его чистоты [109]. Выделение телец включения из гомогената клеток является эффективным способом очистки белка, за счет различий в плотностях и размерах IB, относительно клеточных загрязнителей

[110]. Таким образом, тельца включения обеспечивают прямое очищение целевого белка. Существенной проблемой является то, что белки телец включения лишены нативной конфигурации, и как следствие не обладают биологической активностью. Для дальнейшего восстановления белка в биологически активную форму (ренатурация) необходимы специфические условия, обеспечивающие возможность корректной сборки молекулы на уровне третичной/четвертичной структуры и образование функциональных дисульфидных связей. Наиболее общая стратегия, используемая для ренатурации нерастворимых белков, включает три этапа: изоляцию и очистку телец включения; солюбилизацию агрегированного белка; рефолдинг солюбилизированного белка. [109]

Белки, имеющие множественные дисульфидные связи, нуждаются в более сложном процессе рефолдинга. При растворении телец включения требуется наличие восстановителей тиоловых групп, такие как дитиотреитол, меркаптоэтанол, а также присутствие оптимальных концентраций как окислителей, так и восстановителей для образования дисульфидных связей, в буфере для рефолдинга. Окисление воздухом в присутствии металлического катализатора является самым простым способом окисления белка, но оптимальные условия очень вариативны для конкретного белка [110]. Образование смешанного дисульфида между окисленным глутатионом и восстановленным белком повышает растворимость денатурированного белка за счет усиления гидрофильности полипептидной цепи и, таким образом, помогает снизить степень образования неправильных дисульфидных связей. Замыкание дисульфидной связи индуцируется разведением денатурирующего агента (гуанидингидрохlorida, мочевины) и добавлением каталитических количеств восстановленной формы тиола на последующих этапах ренатурации [109]. Так, рефолдинг рекомбинантных белков — правильное сворачивание белка в природную конфигурацию, является эмпирическим процессом и требует разработки уникальных протоколов для индивидуальных белков. При

подборе оптимальной методики рефолдинга определенного белка из телец включения появляется возможность получить достаточные количества биологически активного белка высокой чистоты.

Несомненным преимуществом такого подхода получения активных нативно свернутых CopLucs является его рентабельность, по сравнению с использованием бакуловирусной экспрессионной системы в клетках насекомых [108].

Таким образом, несмотря на всё возрастающий интерес к использованию копеподных люцифераз в качестве репортеров *in vivo*, их физико-химические свойства до настоящего времени остаются в недостаточной мере изученными, вследствие трудностей получения корректно свернутых белков для их характеризации. Кроме того, третичные структуры копеподных люцифераз также остаются неизвестными. По этой же причине использование CopLucs в качестве меток в *in vitro* анализах до сих пор сильно затруднено. Продукция копеподных люцифераз со множественными дисульфидными связями является важной задачей для исследователей. Решение данной проблемы может привести к значительной оптимизации условий использования CopLucs в качестве репортеров, к получению достаточных количеств белка для *in vitro* использования люцифераз в качестве меток, а также существенно повлиять на нахождение оптимальных условий кристаллизации белков и дальнейшего понимания их структуры. В будущем это позволит вводить направленные изменения в молекулы белков для улучшения репортерных свойств люцифераз и, как следствие, производить более качественный анализ, подходящий под конкретные требования. Поэтому целью данной работы являлось получение люциферазы *Metridia longa* в нативном виде из телец включения *E. coli* и исследование ее физико-химических свойств.

2 Материалы и методы

2.1 Объект исследования

Объектами исследования являлись изоформы MLuc7 и MLuc164 секретируемой люциферазы из копепод *Metridia longa*

2.2 Материалы

В работе использовались следующие материалы:

В качестве клеток-хозяев использовался бактериальный штамм *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus(RIPL) (Stratagene, США)

L-аргинин («Sigma-Aldrich»);
N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД);
N,N'-метилен-бисакриламид («Sigma»);
акриламид («Bio-Rad»);
аммония персульфат («Bio-Rad»);
антибиотик: Ампициллин 200 нг/мл;
глицерин («Serva»);
глицин («Serva»);
глутатион восстановленный («MP Biomedicals, LLC.»);
глутатион окисленный («Sigma»);
гуанидингидрохлорид («Sigma»);
дитиотреитол (ДТТ, «Sigma»);
додецилсульфат натрия («Bio-Rad»);
набор стандартных маркерных белков («Bio-Rad»);
Тритон X-100 («Bio-Rad»);
целентеразин («NanoLight Technology»)
буферные растворы и среды представлены в таблице 1

Таблица 1 - буферные растворы и среды:

LB-среда	(20 г/л бактотриптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 7,5 г/л NaCl)
SOB-среда	20 г/л бактотриптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 0,6 г/л NaCl, 2,5 mM KCl, 10mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄
SOC-среда	SOB, 20 mM глюкозы
LB-агар	1,5% агара в LB-среде
TFB	0,1 M KCl, 10 mM CaCl ₂ , 45 mM MnCl ₂ , 10 mM K MES, pH 6,2, 3 mM Co(NH ₂) ₆ Cl ₃
TGB	3 г/л триплекс, 1 г/л ДСН, 14 г/л глицин
ML	50 mM Трис-HCl pH 7.5, 10 mM MgSO ₄ , 0.5 M NaCl, 0.01% желатин
раствор для денатурации MLuc и восстановления S-S- связей	4M гуанидин-HCl, 1 mM ЭДТА, 20 mM Трис-HCl pH 8,0, 100 mM ДТТ
раствор для рефолдинга	300 mM Арг, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 0.02% NP-40, 5 mM GSH, 0.5 mM GSSG, 20 mM Трис-HCl pH 8.0, 0.2 mM CuCl ₂
буферы для очистки нативной MLuc7	буфер для обессолевания: 20 mM BTP pH 9,3, 0,02% Np-40, 5% глицерол, 20 mM NaCl
	буфер А: 20 mM BTP pH 9,3, 0,02% Np-40, 5% глицерол, 50 mM NaCl
	буфер Б: 20 mM BTP pH 9,3, 0,02% Np-40, 5% глицерол, 1 M NaCl
буферы для очистки нативной MLuc164	буфер для обессолевания: 20 mM Трис-HCl pH 9,0, 0,02% Np-40, 5% глицерол, 20 mM NaCl
	буфер А: 20 mM Трис-HCl pH 9,0, 0,02% Np-40, 5% глицерол, 50 mM NaCl
	буфер Б: 20 mM Трис-HCl pH 9,0, 0,02% Np-40, 5% глицерол, 1 M NaCl
буфер для гель-фильтрации MLuc	20 mM Трис-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,02% Np-40, 5% глицерол, 1 mM ЭДТА
буферы для белкового электрофореза	буфер С: 0,5 M Трис-HCl pH 6,8; буфер В: 1,5 M Трис-HCl pH 8,8; раствор акриламида; 30% акриламид, 0,8% бисакриламид; лизирующий буфер х 2: 2% ДСН, 10% глицерин, 45 mM Трис-HCl pH 6,8, 50 mM ДТТ, 5% β-меркаптоэтанол

2.3 Методы

В работе использовались следующие методы:

2.3.1 Трансформация в клетки *E.coli*

Плазмидную ДНК, содержащую гены люцифераз MLuc7 и MLuc164 (pET22b+-*mluc7*; pET22b+-*mluc164*) для синтеза люциферазы в цитоплазме без сигнального пептида трансформировали в экспрессионный штамм *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus-RIPL. Для этого 0.5 мкл ДНК в концентрации ~100 нг/мкл добавляли к 30 мкл химически компетентных клеток RIPL, обработанных буфером TFB, обеспечивающим эффективную трансформацию, и инкубировали в течение 30 мин при 0°C. Затем подвергали тепловому шоку в течение 25 с при 42°C и далее переносили в лед на 2 мин. В стерильном боксе в пробирку добавляли 5 объемов среды SOC, инкубировали 1 час при 37°C. Далее рассевали на чашки с LB-агаром, содержащим антибиотик в концентрации 150 мкг/мл.

2.3.2 Экспрессия MLuc7 и MLuc164 в клетках *E.coli*

Полученные бактериальные колонии *E.coli*, содержащие экспрессионную конструкцию pET22b+-*mluc7*; pET22b+-*mluc164*, культивировали при постоянном перемешивании в 200 мл среды LB, содержащей ампициллин (200 мкг/мл), при 37°C до стационарной фазы роста ($OD_{600} = 1.2$). Индукцию синтеза проводили добавлением ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ, а затем культивировали с интенсивным перемешиванием в течение 1 часа при 37°C. Клетки осаждали центрифугированием при 8000 об/мин в течение 10 мин при 4°C.

2.3.3 Получение тельца включения *E. coli*

Клеточный осадок из 200 мл культуры ресуспенсировали в 10 мл буфера (20 мМ Трис-HCl pH 8,0, 1 мМ ЭДТА) и разрушали при 0°C с использованием ультразвукового дезинтегратора «Q700 Sonicator» (QSonica) (10 сек х 6 раз с перерывами по 1,5 мин во льду). Тельца включения собирали центрифугированием (14000 g, 20 мин).

2.3.4 Отмывка и растворение тельца включения *E. coli*

Осадок, содержащий тельца включения, последовательно промывали в растворах, содержащих 20 мл 0,9% NaCl, 20 мМ Tris-HCl pH 8,0; 20 мл 0,1% Triton X-100 (20 мкл) 20 мМ Трис-HCl pH 8,0, 1 мМ ЭДТА. При этом суспенсировали осадок ультразвуком до однородной суспензии при 0°C (10 сек х 6 раз с перерывами по 1 мин во льду). Все процедуры очистки тельц включения проводились при центрифугировании (14000 g, 20 мин). Содержание белка в тельцах включения и в супернатантах оценивали белковым ДСН-ПААГ электрофорезом.

Очищенные тельца включения растворялись в 1 мл 4М гуанидин гидрохлорида, 1 мМ ЭДТА, 20 мМ Трис-HCl pH 8,0 с добавлением 100 мМ ДТТ при постоянном помешивании в течении 3 часов при 23°C.

2.3.5 Рефолдинг люцифераз MLuc7 и MLuc164

Процедуру восстановления белка проводили путем разведения денатурированных препаратов MLuc7/MLuc164 в растворах для рефолдинга в соотношении 1:30, при 4°C, в условиях постоянного перемешивания в течение ночи.

2.3.6 Очистка нативной рекомбинантной люциферазы

Для дальнейшей очистки образец рефолдированной люциферазы пропускали через фильтр 0,22 мкм (Millipore), концентрировали с помощью Amicon Ultra Centrifugal Filter, проводили обессоливание концентрированного образца на колонке HiTrap (GE Healthcare), уравновешенной буфером А. Далее проводили анионообменную хроматографию на колонке Q-Sepharose в том же буфере. В данных условиях MLuc7 (20 мМ ВТР pH 9,3, 0,02% NP-40, 5% глицерол, 50 мМ NaCl) и MLuc164 (20 мМ Трис-HCl pH 9,0, 0,02% NP-40, 5% глицерол, 50 мМ NaCl) проходят через колонку, а загрязняющие белки связываются с анионообменной смолой. Загрязняющую фракцию белков элюировали буфером В, содержащим 1 М NaCl. Фракцию, содержащую пик активной люциферазы, концентрировали с помощью центрифужного фильтра Amicon Ultra Centrifugal Filter и пропускали через гель-фильтрационную колонку Superdex 75 (GE Healthcare), уравновешенную 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 5% глицерин, 0,02% NP-40, 20 мМ Трис-HCl pH 7,5. Фракции элюата анализировали гель-электрофорезом в нередуцирующих условиях.

2.3.7 Измерение биолюминесцентной активности люцифераз

Измерение биолюминесцентной активности белков проводили с использованием люминометра (модель «БЛМ 003», СКБ Наука, Россия), оснащенного термостатом и программным обеспечением для обработки цифрового сигнала (BLM-8812, Оберон-К, Россия). В кювету для измерения в стандартных условиях вносили 500 мкл ML-буфера (0,5 М NaCl, 50 мМ Трис-HCl, pH 7,5, 0,01% желатин) и 5 мкл образца белка. Для запуска биолюминесцентной реакции в кювету с помощью автоматического дозатора (Hamilton, США) впрыскивали 5 мкл целентеразина (1 мкМ). За биолюминесцентную активность образцов принимали среднее значение как минимум трех параллельных измерений. При разведении препаратов

люцифераз для измерения использовали стабилизирующий ML-буфер с добавлением 0,02% неионного детергента NP-40 (Sigma, США). Для оценки термостабильности люцифераз белковые препараты, разведенные в стабилизирующем ML-буфере, инкубировали в течение 1 часа в термостате при различных температурах (до 100°C), далее охлаждали в течение 5 минут при 4°C и измеряли биолюминесцентную активность, как описано выше.

2.3.8 Измерение спектров биолюминесценции и флуоресценции

Спектры биолюминесценции и флуоресценции белков были зарегистрированы на флуоресцентном спектрофотометре «Varian CaryEclipse» (Agilent, США), оснащенном термоконтроллером «Cary Single cell Peltier Accessory» (Agilent, США). Все спектры были корректированы на чувствительность ФЭУ к различным длинам волн с помощью программного обеспечения прибора. Спектры флуоресценции люцифераз в концентрации 0,05 – 0,1 мг/мл измеряли в буфере, содержащем 20 mM Трис-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl. Измерения проводились при возбуждении 275 и 295 нм для тирозиновой и триптофановой флуоресценции, соответственно, при установленной ширине щели 5 мм. Спектры биолюминесценции измеряли в белковых растворах в ML-буфере, для запуска биолюминесцентной реакции в кювету впрыскивали 1 мкМ целентеразина.

2.3.9 Определение точки теплового перехода белков

Для определения значения температурного перехода при тепловой денатурации белков был использован метод исследования собственной триптофановой флуоресценции при последовательном нагревании.

Флуоресценцию белков измеряли при помощи флуоресцентного спектрофотометра «Varian Cary Eclipse», оснащенного термоконтроллером

«Cary Single cell Peltier Accessory» (Agilent technologies, США). Нагревание кюветы с образцом производилось со скоростью 1°C°/мин в диапазоне 20–95°C.

Для исследования использовали образцы белков в концентрации 0,1–0,15 мг/мл в буфере, содержащем 150 mM NaCl и 20 mM HEPES, pH 7,5. Возбуждение триптофановой флуоресценции осуществляли $\lambda=295$ нм, регистрация интенсивности проводилась на 310, 330, 360 нм.

Завершенность теплового перехода α рассчитывали, используя уравнение (1) [111]:

$$\alpha = \frac{I - I_f}{I_u - I_f}, \quad (1),$$

где I – исходная интенсивность флуоресценции, а параметры I_f и I_u – интенсивность флуоресценции до и после теплового перехода.

Финальные кривые были нормализованы и описаны сигмоидной функцией Больцмана (2), определяющей завершенность перехода α от значения температуры T :

$$\alpha(T) = 1 - \frac{1}{1 + e^{\frac{T - T_{0.5}}{d}}}, \quad (2),$$

где $T_{0.5}$ – температура полуперхода (Tm), d – угол наклона нормализованной кривой. Расчеты были произведены с помощью программного обеспечения «OriginPro 9.0» (OriginLab Corp., США).

2.3.10 Качественная и количественная оценка белковых препаратов

Концентрацию белков определяли спектрофотометрически по методу Лоури при помощи наборов «Bio-Rad Lowry protein assay» (Bio-Rad, США), а также «Pierce BCA protein assay kit» (Thermo Scientific, США), в качестве стандарта для калибровки использовался BSA (Bio-Rad, США).

ДСН-ПААГ электрофорез проводили по методу Лэмли в 12.5% полиакриламидном геле в камере (PerkinElmer, США) в буфере TGB с постоянной подачей тока 10 mA. Денатурированные образцы готовили с

использованием лизирующего буфера (2% ДСН, 10% глицерин, 45 мМ Трис-HCl, pH 6,8, 50 мМ ДТТ, 5% β -меркаптоэтанол, бромфеноловый синий) и кипятили в течение 3 мин. При проведении электрофореза в полунативных условиях образцы не денатурировали и для приготовления использовали буфер без ДТТ и β -меркаптоэтанола, камеру во время процедуры охлаждали подведенной в нее проточной водой. Для оценки молекулярных масс исследуемых препаратов использовали набор стандартных маркерных белков («Serva»). Для окрашивания гелей использовали раствор (20% уксусной кислоты, 50% этанола, Coomassie R-250 (Bio-Rad, США)) с последующей промывкой. Съемку гелей при естественном освещении осуществляли в камере AlphaImager (AlphaInnotech, США).

3 Результаты исследований и их обсуждения

Ранее в лаборатории Института биофизики СО РАН была получена библиотека генов светящихся копепод *Metridia longa* и путем функционального скрининга выделен ряд клонов из кДНК-библиотеки, несущих кДНК-гены для изоформ люциферазы [18,28]. Изоформы MLuc164 и MLuc39 практически сразу были успешно использованы в качестве репортерных молекул в аналитических целях [18,25,28,66,99,112]. Несмотря на это, свойства этих люциферазных изоформ изучены недостаточно.

Основной проблемой, препятствующей эффективной характеризации изоформ люциферазы *Metridia* являлось получение очищенного препарата белка ввиду присутствия большого числа дисульфидных связей в молекуле люциферазы, что препятствует эффективному фолдингу в традиционных системах экспрессии. Ранее была продемонстрирована возможность получения люциферазы *Metridia* из среды клеток насекомых Sf9 с использованием эукариотической бакуловирусной экспрессионной системы на самой маленькой изоформе MLuc7 [24,85]. Однако такой способ получения очищенных препаратов белка является весьма дорогостоящим [108].

В настоящей работе оптимизирована процедура окислительного рефолдинга люциферазы *Metridia* из телец включения *E.coli* на MLuc7 изоформе и продемонстрирована возможность ренатурации люциферазы в нативную форму из нерастворимых белковых агрегатов, что подтверждено сравнением основных люминесцентных свойств полученного препарата белка, со свойствами нативного препарата, очищенного из среды клеток насекомых [24]. Использование бактериальных клеток, для получения рекомбинантных белков гораздо выгоднее, чем использование клеток насекомых. Путем оптимизированной методики рефолдинга получен гомогенный препарат активной MLuc164 люциферазы и впервые описаны ее основные физико-химические свойства. Продукция высокочистых препаратов белков MLuc164 и MLuc7 составила до 5-6 мг/л.

3.1 Подбор условий для отмывки телец включения *E. coli*

E. coli является наиболее выгодным хозяином для производства рекомбинантных белков, однако в существенных количествах экспрессировать в *E. coli* рекомбинантную люциферазу *M. longa*, содержащую множественные дисульфидные связи, удалось только в нерастворимой фракции в виде телец включения (IV). Это может объясняться тем, что восстановительный характер бактериальной цитоплазмы препятствует образованию дисульфидных связей белка и, как следствие, его правильному фолдингу. Преимуществом получения люциферазы из телец включения является относительная чистота экспрессируемого белка и достаточно легкое выделение IV. Однако требуется процедура последующего рефолдинга белка (повторного сворачивания в нативную конформацию) в специфических условиях.

Таким образом, стояла задача подобрать наиболее оптимальные условия для отмывки телец включения, содержащих пул неактивной рекомбинантной люциферазы, их растворения, ренатурации фермента, а также его очистки. Для подбора оптимальных условий была выбрана самая короткая изоформа люциферазы Metridia - MLuc7 (~16,5 кДа), так как ранее она была получена в очищенной мономерной форме в функционально-активном состоянии путем секреции в среде клеток насекомых Sf9 [24]. Использование данной изоформы обеспечило возможность оценки эффективности рефолдинга из бактериальных телец включения путем сравнения физико-химических свойств препаратов, полученных путем рефолдинга из телец включения и секрецией в клетках насекомых.

В качестве продуцента целевого белка использовали клетки штамма *E.coli* BL21(DE3) CodonPlus-RIPL, содержащие экспрессионную конструкцию pET22b+-mluc7 для синтеза люциферазы в цитоплазме без сигнального пептида; продукцию люциферазы индуцировали 1 мМ ИПТГ.

В ходе работы были подобраны условия для очистки телец включения (IV) путем последовательной промывки в растворах, содержащих 0.9% NaCl и

0,1% Тритон X-100. Данный этап необходим для удаления небелковых примесей, а также белков, которые, адсорбируясь на тельцах включения благодаря гидрофобным взаимодействиям, могут в дальнейшем влиять на прохождение рефолдинга и конечный выход целевого белка. На снимке ДСН-ПААГ видно, что основная часть контаминаントов уходит в раствор (Рисунок 8-1,2), а целевой белок остается в тельцах включения в виде осадка (Рисунок 8-5). При оптимизации для очистки IB также проверяли влияние мочевины на степень очистки IB от контаминаントов, однако это приводило к значительным потерям белка (около 10%), что видно на рисунке 8-3. Этапы промывки растворами 0,9% NaCl и 0,1% Тритон X-100 показаны на рисунке 8-1 и 8-2 соответственно.

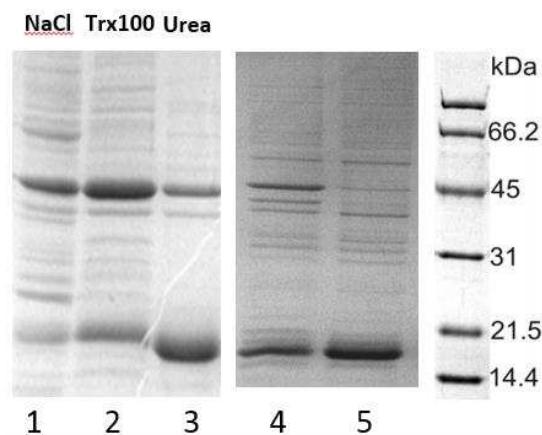


Рисунок 8 – ДСН-ПААГ промывки телец включения *E. coli*: 1, 2, 3 – этапы промывки (супернатант), 4 – осадок IB до промывки, 5 – осадок очищенных IB; целевой белок находится в районе 16,5 кДа

3.2 Подбор условий для растворения телец включения *E. coli*

Очищенные от гидрофобных контаминаントов IB были денатурированы в растворе, содержащем гуанидина гидрохлорид с добавлением 100 мМ ДТТ для полного восстановления внутри- и межмолекулярных S-S связей. При оптимизации условий растворения телец включения тестировались разные концентрации ДТТ. Так, при добавлении 50 мМ концентрации ДТТ к денатурирующему раствору, выход активного белка после его ренатурации был

около 70% от возможного при добавлении ДТТ в концентрациях 100 и 200 мМ, что показано на рисунке 9. Без добавления ДТТ в денатурирующий раствор, выход активного белка после рефолдинга составлял не более 1%, в сравнении с 100 мМ ДТТ. Это может свидетельствовать о том, что в отсутствии восстановливающих агентов белок имеет большую долю некорректных S-S связей, и в результате последующего рефолдинга имеет склонность к агрегации. Для удаления ионов металлов, приводящих к нежелаемому на данном этапе окислению тиольных групп белка, в солюбилизирующий буфер добавлялся хелатирующий реагент (1 мМ ЭДТА).

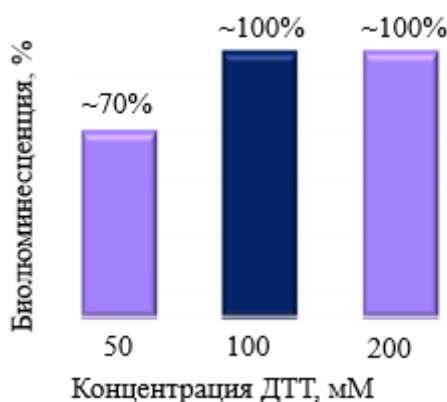


Рисунок 9 – Выход активной люциферазы в результате в зависимости от концентраций ДТТ, использованного при растворении IV

3.3 Подбор условий рефолдинга люциферазы

Оптимизация условий рефолдинга (правильного сворачивания белка в природную форму) белка проводилась в двух направлениях: повышения выхода активной рекомбинантной люциферазы и ускорения процесса ренатурации белка.

В результате подбора условий рефолдинга, был найден оптимальный раствор, содержащий 300 мМ Арг, 150 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂, 0,02% NP-40, 5 мМ GSH, 0,5 мМ GSSG, 20 мМ Трис-HCl, pH 8,0, 0,2 мМ CuCl₂. Процедуру восстановления белка проводили путем разведения денатурированного

препарата MLuc7 в растворе для рефолдинга в соотношении 1:30, при 4°C, в условиях постоянного перемешивания.

Основным компонентом, способствующим формированию дисульфидных связей в белке, а также их изомеризации при образовании некорректных дисульфидов, является глутатион в окисленной и восстановленной формах [110]. Тем не менее, присутствие других компонентов в определенных концентрациях, может существенно повлиять на выход активного белка в процессе окислительного рефолдинга, что продемонстрировано далее.

3.3.1 Влияние аргинина на рефолдинг

Было показано, что добавление аргинина в рефолдинговый раствор в концентрациях от 0,1 до 0,5 М снижает агрегацию белка, при этом его выход увеличивается более чем в 10 раз, в сравнении с раствором без Арг, но оптимальными концентрациями других компонентов. Белок был наименее подвержен агрегации при 300 мМ концентрации аргинина. Это может объясняться тем, что аргинин повышает растворимость и стабильность белка в процессе его сворачивания [110].

3.3.2 Влияние ионов металлов на рефолдинг

При добавлении Mg^{2+} в рефолдинговый раствор, было отмечено увеличение скорости сворачивания MLuc7 в нативную форму в течение первых суток инкубации в рефолдинговом растворе, что показано на рисунке 10. Так, спустя 3 часа от начала инкубации, выход активного белка с добавлением в раствор 10 мМ $MgCl_2$ был больше в 6 раз, через 4 часа разница в выходе активного белка составила 4 раза, в сравнении с раствором без добавления $MgCl_2$. Вероятно, это связано с тем, что MLuc7 или другие промежуточные продукты рефолдинга могут связываться с ионами магния. Тем не менее, через

6 часов ренатурации белка в растворе для рефолдинга, его выход был практически одинаков, как с добавлением $MgCl_2$, так и без добавления.

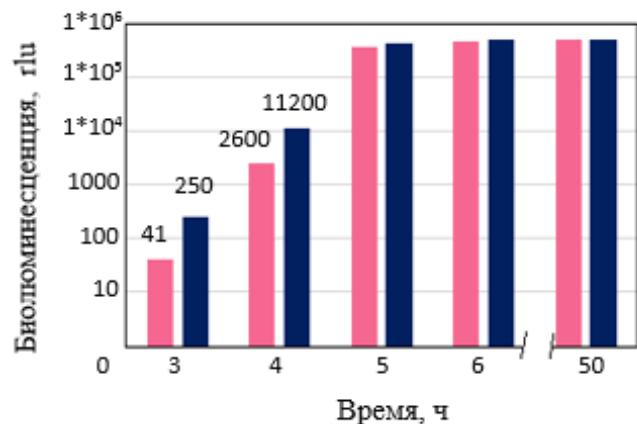


Рисунок 10 – Влияние $MgCl_2$ на эффективность рефолдинга MLuc7, розовым – без добавления $MgCl_2$, синим – с добавлением 10 mM $MgCl_2$

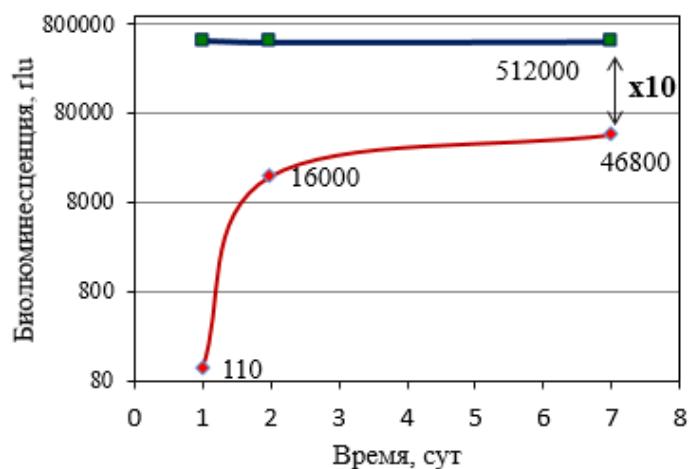


Рисунок 11 – Активности MLuc7 во время рефолдинга. Красным – без добавления $CuCl_2$, синим – с добавлением 0,2 mM $CuCl_2$

На рисунке 11 представлено влияние ионов меди на рефолдинг. Добавление ионов меди в катализических количествах (0,2 mM $CuCl_2$) значительно ускорило процесс рефолдинга белка. Так, уже после суток инкубации MLuc7 в рефолдинговом растворе выход активного белка был максимальным и его активность сохранялась на протяжении недели, однако без добавления $CuCl_2$, небольшая биолюминесцентная активность наблюдалась только на 7 сутки. Помимо увеличения скорости рефолдинга белка добавление

ионов меди в рефолдинговый раствор привело к 10-кратному увеличению выхода активной люциферазы. Это может объясняться тем, что ионы меди играют роль катализатора окисления тиоловых групп белка.

3.4 Очистка нативной рекомбинантной люциферазы

Для дальнейшей очистки образец рефолдированной люциферазы пропускали через фильтр 0,22 мкм (Millipore), концентрировали с помощью Amicon Ultra Centrifugal Filter, проводили обессоливание концентрированного образца на колонке HiTrap (GE Healthcare), уравновешенной буфером для обессоливания. Далее проводили анионообменную хроматографию на колонке Q-Sepharose в буфере А (рН 9.3). В данных условиях MLuc7 проходит через колонку, а загрязняющие белки связываются с анионообменной смолой. Загрязняющую фракцию белков элюировали буфером В, содержащим 1 М NaCl. Собранный фракции с люциферазой после концентрирования подвергали финальной очистке путем гель-проникающей хроматографии на колонке Superdex 75 (GE Healthcare). В результате чего была собрана мономерная фракция (Рисунок 12А) согласно профилю разделения калибровочных белков.

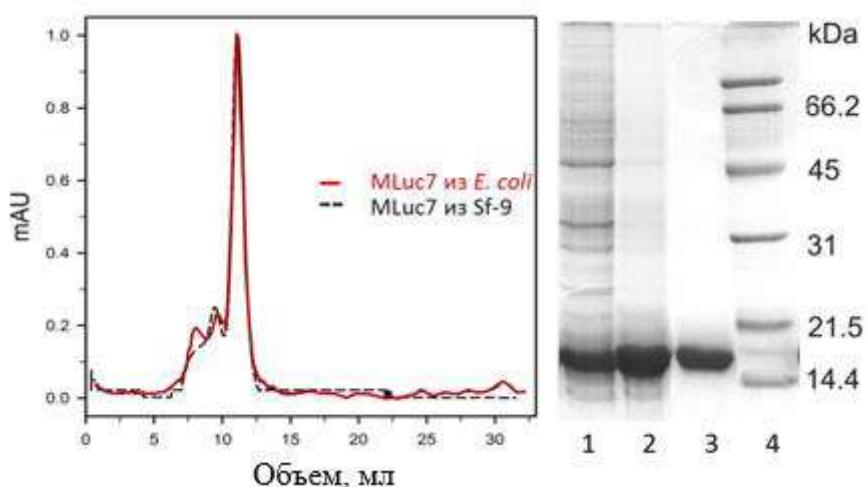


Рисунок 12 – Очистка MLuc7: А - Профиль гель-фильтрации MLuc7 на колонке Superdex 75; Б - ДСН-ПААГ очистки MLuc7: 1 – IB, растворенные в рефолдинговом буфере, 2 – препарат после анионообменной хроматографии на Q-сепарозе, 3 – препарат после гель-фильтрации на колонке Superdex-75; 4 – протеиновый стандарт

В результате проведенных процедур был получен гомогенный белковый препарат (Рисунок 12Б), обладающий высокой люциферазной активностью. Выход белка составил 6 мг/л.

3.5 Свойства нативной рекомбинантной люциферазы MLuc7

Ранее в лаборатории фотобиологии Института биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН была получена люцифераза MLuc7 в нативной форме из среды клеток насекомых (*Spodoptera frugiperda*, линия клеток тканей яичников гусеницы Sf9) [108]. Однако получение рекомбинантных белков путем экспрессии в клетках насекомых более трудоемко и дорого, в сравнении с клетками *E. coli*.

Свойства MLuc7, полученной из телец включения *E. coli*, оценивали для высокоактивной мономерной фракции белка, собранной при гель-фильтрационной очистке и сравнивали со свойствами нативной рекомбинантной люциферазы, полученной из среды клеток насекомых Sf9.

Оба образца имели одинаковые спектры биолюминесценции с пиком испускания $\lambda_{\text{max}} = 487$ нм, что показано на рисунке 13А. Оптимум биолюминесценции находился при pH 7,00-7,75.

Оба образца демонстрируют одинаковую температурную зависимость, с оптимумом биолюминесцентной реакции около 15°C (Рисунок 13Б). Кроме того, оба препараты люциферазы показали экстремально высокую термостабильность (Рисунок 13В), с сохранением до 70% от начальной активности после 1 часа инкубации при 100°C. Это свидетельствует о том, что люцифераза MLuc7, полученная из телец включения, также имеет корректно сформированные внутримолекулярные дисульфидные связи, которые ответственны за высокую термостабильность.

Поскольку специфическая активность является важной характеристикой, определяющей возможности применения биолюминесцентного белка в качестве метки в различных анализах *in vitro*, было показано, что при оптимальных условиях удельные активности обоих препаратов являются

практически одинаковыми, несмотря на небольшие различия в биолюминесцентной кинетике, что показано на рисунке 13Г.

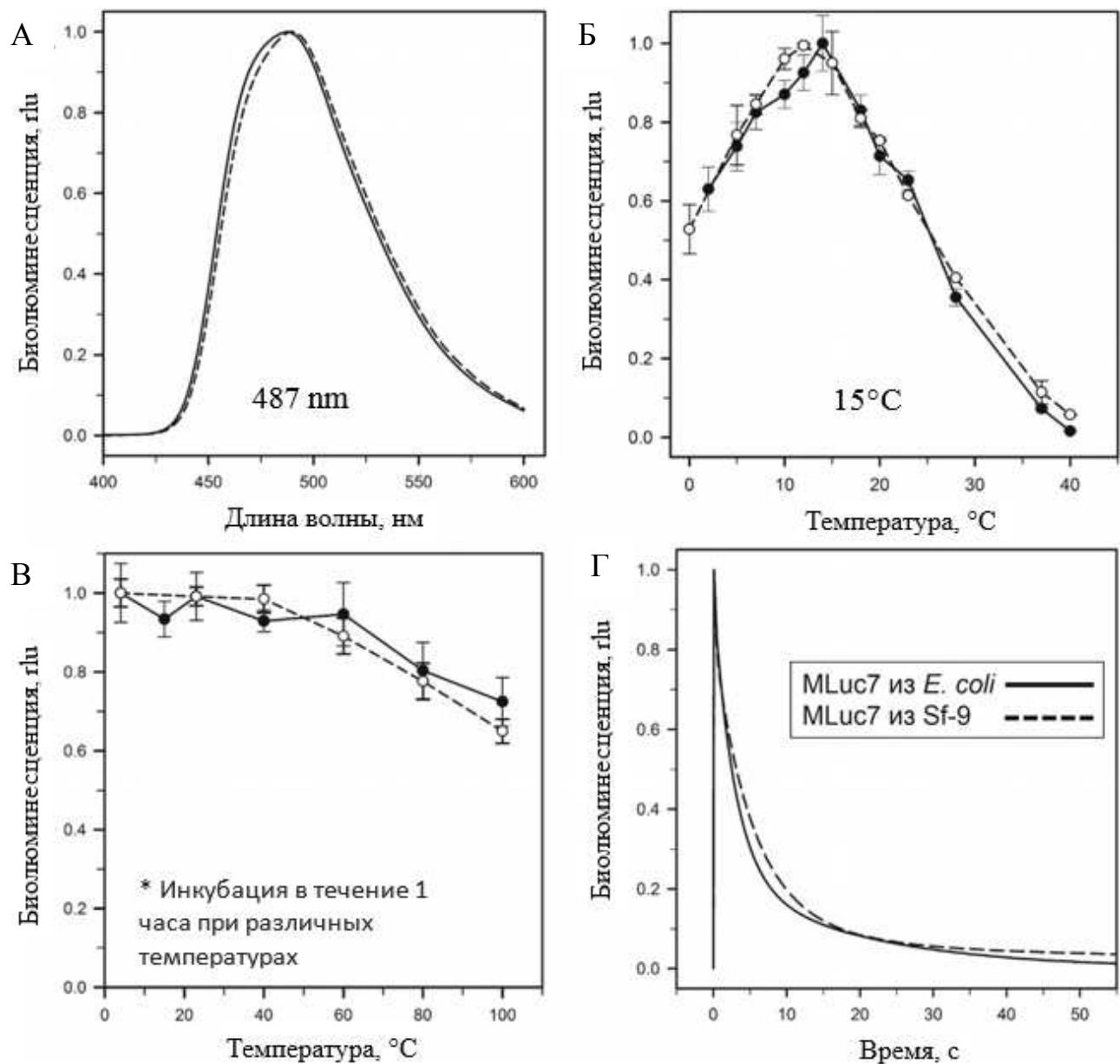


Рисунок 13 – Свойства MLuc7, полученной из клеток насекомых Sf9 и телец включения *E.coli*: А - спектры биолюминесценции MLuc7 при 23°C; Б – температурный оптимум ферментов; В – термостабильность MLuc7; Г – кинетика биолюминесцентной реакции MLuc7 при 23°C

Для изучения структурных особенностей белков, были измерены спектры собственной флуоресценции, определяемые остатками тирозина и триптофана [111]. Оба образца люциферазы показали максимумы флуоресценции Трг и Туг при 330 и 303 нм соответственно (Рисунок 14). Это означает, что окружение

ароматических боковых цепей остатков этих аминокислот является идентичным.

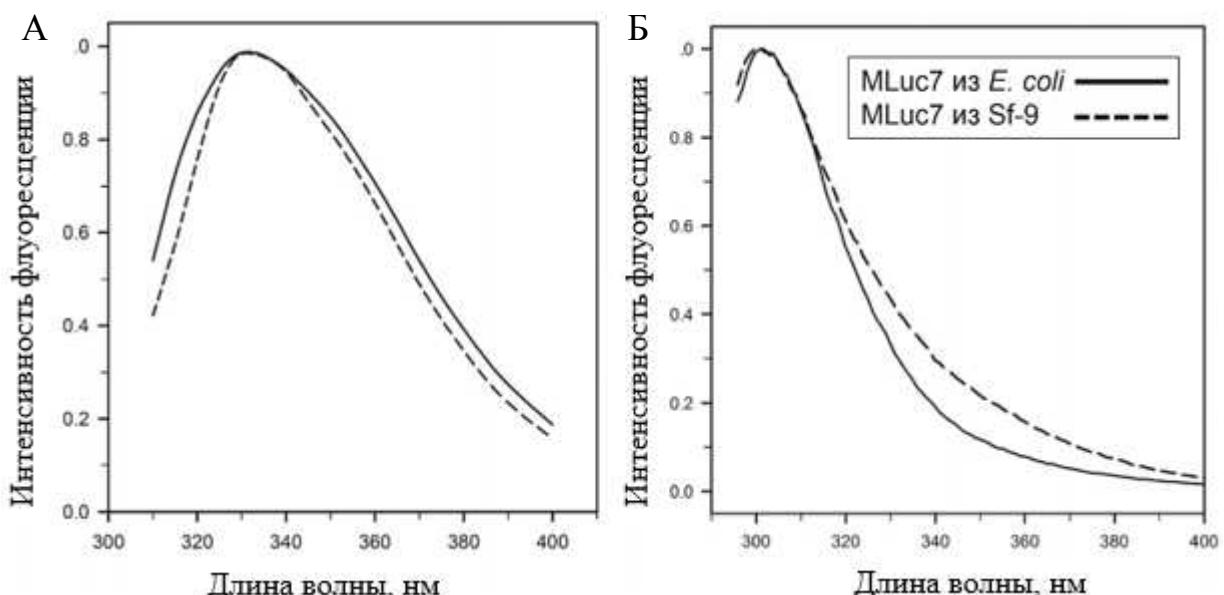


Рисунок 14 – Спектры флуоресценции Трп (А) и Тир (Б), возбуждаемые при 295 и 275 нм соответственно

Таким образом, разработанная процедура рефолдинга позволяет получать высокоактивную мономерную люциферазу MLuc7 из бактериальных телец включения, со свойствами идентичными свойствам люциферазы MLuc7 в нативной форме, полученной из среды клеток насекомых.

3.6 Получение и очистка нативной рекомбинантной изоформы люциферазы MLuc164

Несмотря на то, что изоформа MLuc164 была первой клонирована и описана, до настоящего времени свойства данной изоформы не были в достаточной мере охарактеризованы. Для понимания оптимальных условий работы фермента, а также для возможности использования люциферазы Metridia в иммunoологических *in vitro* исследованиях требуется получить очищенный препарат активной люциферазы и определить ее основные физико-химические свойства.

Для получения люциферазы MLuc164 в активной нативной форме использовали разработанную ранее методику рефолдинга из бактериальных телец включения для изоформы MLuc7.

В качестве продуцента целевого белка использовали клетки штамма *E.coli* BL21(DE3) CodonPlus-RIPL, содержащие экспрессионную конструкцию pET22b+-*mluc164* для синтеза люциферазы в цитоплазме без сигнального пептида; продукцию люциферазы индуцировали 1 мМ ИПТГ. В результате такого синтеза были получены тельца включения, в которых наблюдаются высокие уровни накопления целевого белка, а также его чистоты, что видно из белкового электрофореза, представленного на рисунке 15-1. Белковый электрофорез очищенных телец включения представлен на рисунке 15-2.

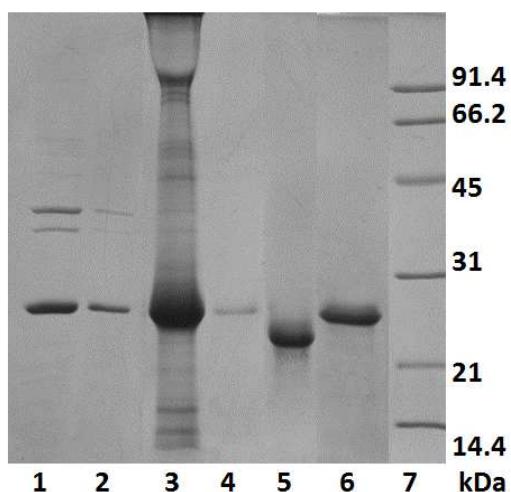


Рисунок 15 – ДСН ПААГ очистки MLuc164: 1 – IB, 2 – очищенные IB, 3 – IB в рефолдинговом растворе, 4 – препарат после ионообменной хроматографии на Q-сепарозе, 5 – полунативный препарат после гель-фильтрации на колонке Superdex-75, 6 – препарат после гель-фильтрации на колонке Superdex-75, 7 – протеиновый стандарт

Очистку MLuc164 после рефолдинга из бактериальных телец включения проводили аналогично очистке MLuc7 изоформы, но вместо 20 мМ ВTP pH 9.3 использовали 20 мМ Tris-HCl pH 9.0 в растворе для обессоливания, в буферах А и В в соответствие с более низкой изоэлектрической точкой MLuc164.

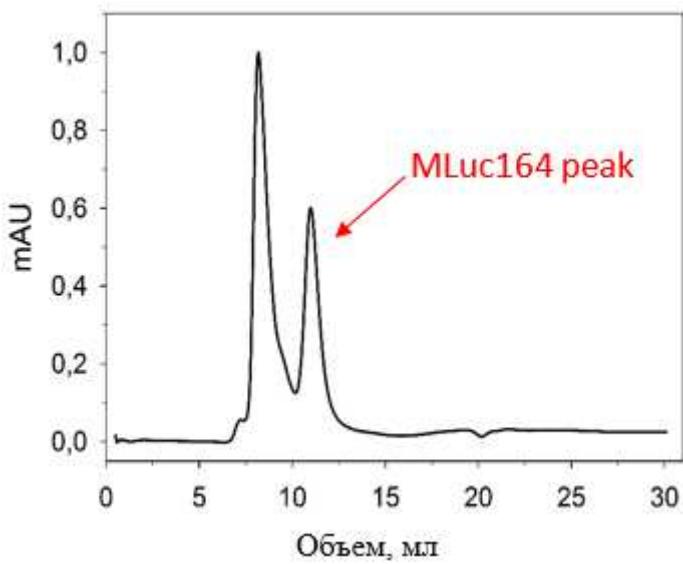


Рисунок 16 - Профиль гель-фильтрационной очистки MLuc164 на сорбенте Superdex75

Первый высокий пик на хроматограмме (Рисунок 16) почти не имеет биолюминесцентной активности и содержит, видимо, оптически активные небелковые примеси из телец включения, не отделившиеся на ионообменной хроматографии. Таким образом, полученный препарат белка представляет по результатам хроматограммы и гель-электрофореза (Рисунок 15-5) чистый мономерный белок соответствующего размера (~22 кДа).

3.7 Свойства нативной рекомбинантной люциферазы MLuc164

Полученный мономерный препарат люциферазы MLuc164 был использован для исследования физико-химических свойств.

Максимум спектра биолюминесценции составил $\lambda_{\max}=488$ нм, что представлено на рисунке 17Е. Показано, что люцифераза проявляет максимальную функциональную активность при 0,5 М концентрации соли (Рисунок 17Б), диапазоне pH 7,25 – 7,75 (Рисунок 17В) и температур 10-18°C, с довольно существенным падением активности при дальнейшем возрастании температуры (Рисунок 17А). Так, следует учитывать важность оптимальных концентраций соли в измерительном буфере, поскольку в отсутствии NaCl в

буфере, либо при ее наличии в концентрациях от 1,5 М и выше, активность люциферазы падает более чем в 2 раза, в сравнении с оптимальной.

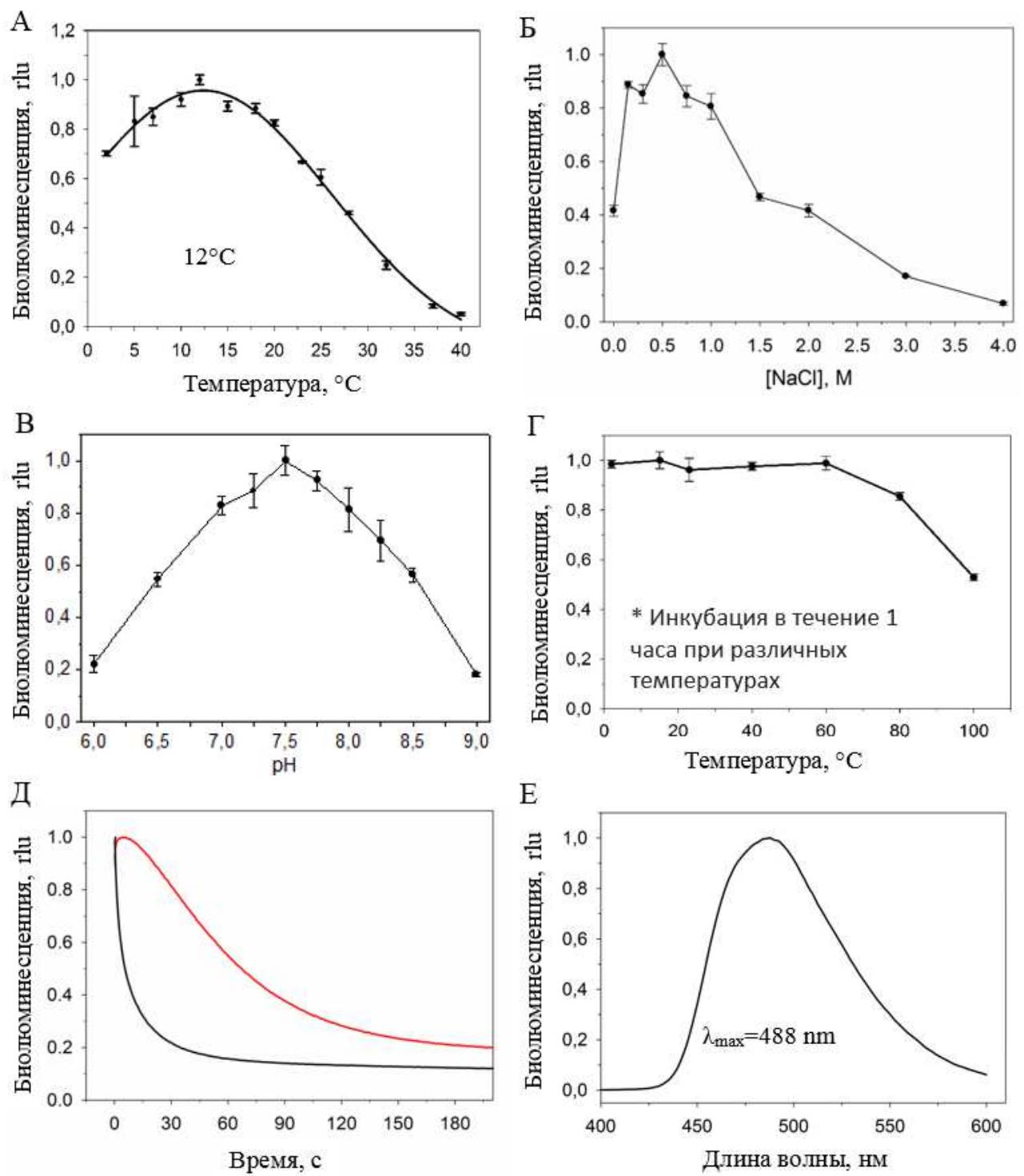


Рисунок 17 – Исследование свойств люциферазы MLuc164. Зависимость максимума биолюминесценции от температуры (А), концентрации NaCl (Б), pH (В); Г- исследование термостабильности при инкубации при соответствующих температурах; Д - кинетика биолюминесцентной реакции MLuc164 при 23°C: черным – без детергента, красным – с добавлением 0,02% Np-40; Е - спектр биолюминесценции MLuc164

Несмотря на довольно низкий температурный оптимум биолюминесцентной активности, MLuc164 люцифераза выявляет высокую термостабильность (Рисунок 17Г) с сохранением до 55% от начальной активности после 1 ч инкубации при 100°C. Предположительно, это связано с наличием множественных дисульфидных связей, стабилизирующих структуру молекулы. Вероятно, благодаря этому происходит эффективная ренатурация белка после его тепловой денатурации при его кратковременной инкубации при 4°C перед измерением.

При наличии кинетики биолюминесцентной реакции типа «вспышка» показано, что добавление детергента (0.02% Np-40) в измерительный буфер существенно замедляет кинетику биолюминесцентной реакции MLuc164, что показано на рисунке 17Д красной линией. Таким образом показано, что добавляя в измерительный буфер детергент, можно существенно замедлить кинетику биолюминесцентной реакции, получая более стабильный сигнал, что очень полезно для многих практических задач.

Для понимания структурных особенностей белка были определены спектры собственной флуоресценции по остаткам триптофана и тирозина и сопоставлены с таковыми у изоформы люциферазы *Metridia* MLuc7 [44], полученной из телец включения *E.coli*. У обоих белков максимумы Три флуоресценции, возбуждаемой 295 нм, составили 330 нм (Рисунок 18А), что свидетельствует о гидрофобном окружении хромофоров у люцифераз. При этом у изоформы MLuc7 имеется единственный остаток триптофана в консервативной части, а у MLuc164 2 остатка (один в консервативной, а другой в вариабельной части белка).

Максимумы спектров тирозиновой флуоресценции, возбуждаемой 275 нм, у обоих препаратов составили 303 нм. Однако у MLuc164 профиль флуоресценции отличается от профиля MLuc7 (Рисунок 18Б), что может говорить о переизлучении от остатков Трп ($\lambda_{\text{max}}=330$ нм) из-за близкого взаиморасположения флуорофоров и переноса энергии по Ферстеровскому механизму. Такой эффект может свидетельствовать о различиях в ближайшем

окружении Тир флуорофоров белков, в силу различий в их аминокислотных последовательностях.

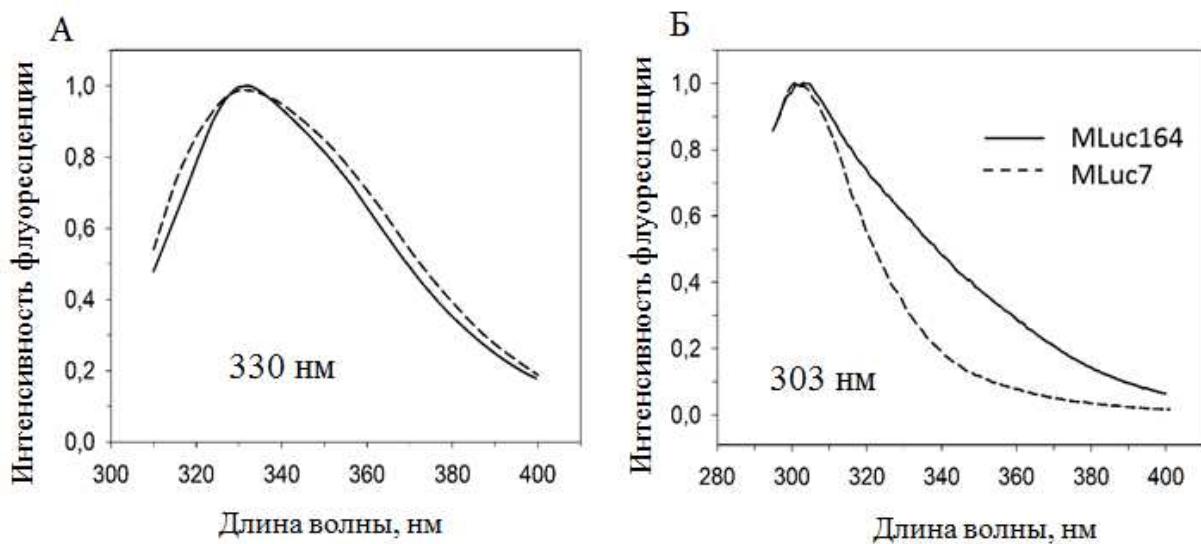


Рисунок 18 – Спектры флуоресценции Трп (А) и Тир (Б), возбуждаемые при 295 и 275 нм соответственно

Исследование процессов разворачивания белка и его стабильности было проведено посредством изучения интенсивности триптофановой флуоресценции при последовательной тепловой денатурации ($1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$). Для MLuc164 показано, что при нагревании максимум спектра флуоресценции (330 нм) не сдвигается в более длинноволновую область и ранее такой же результат был получен для MLuc7 изоформы [85]. Это может свидетельствовать о том, что окружение триптофановых остатков в обоих белках является схожим как при стандартных условиях, так и во время тепловой денатурации. Исследование термоустойчивости MLuc7 продемонстрировало точку полуперхода белка в области $70,3 \pm 0,6^{\circ}\text{C}$ [85]. При изучении термоустойчивости MLuc164 по триптофановой флуоресценции следует учитывать, что в молекуле данной изоформы присутствуют 2 триптофановых остатка. Один из них содержится во втором консервативном повторе (Трп 193), как и единственный триптофановый остаток у MLuc7 (Трп 143), а другой в вариабельной N-концевой части белка (Трп 48). Ввиду этого у MLuc164 изоформы было получено 2 точки температурного перехода белка $37,99 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$ и $66,8 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ (Рисунки 19, 20). По

всей видимости, это может объясняться тем, что первый триптофановый остаток находится в менее упорядоченной части белка, в которой отсутствуют остатки цистеина, формирующие дисульфидные связи, за счет чего данная область подвержена разворачиванию при более низких температурах. В более ранних исследованиях [112] было показано, что делеция вариабельного N-концевого участка MLuc164, содержащего остаток аминокислоты Трп48 не оказывает существенного влияния на биолюминесцентную функцию белка, и, как следствие, не вовлечен в активный центр фермента. Исходя из этого, можно предположить, что первый триптофановый остаток существенно не влияет на термостабильность и структурную жесткость люциферазы, в частности на окружение активного центра. Поэтому первую точку температурного перехода белка ($37,99 \pm 0,4^\circ\text{C}$), скорее всего, можно не учитывать в интерпретации результата. Однако окончательные выводы требуют проведения дополнительного исследования, включающего создание мутанта MLuc164, содержащего замену Трп48 на нейтральную аминокислоту. Таким образом, по предварительным данным обе изоформы люциферазы обладают достаточно жесткой структурой и высокой термоустойчивостью.

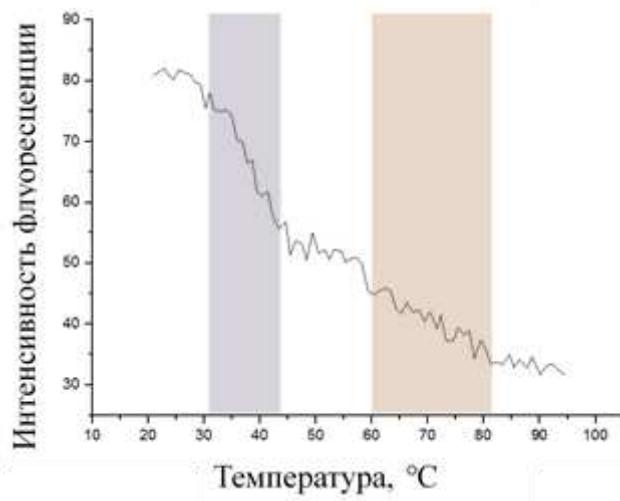


Рисунок 19 – Зависимость максимума собственной Трп флуоресценции MLuc164 от температуры (цветом отмечены области падения максимума триптофановой флуоресценции)

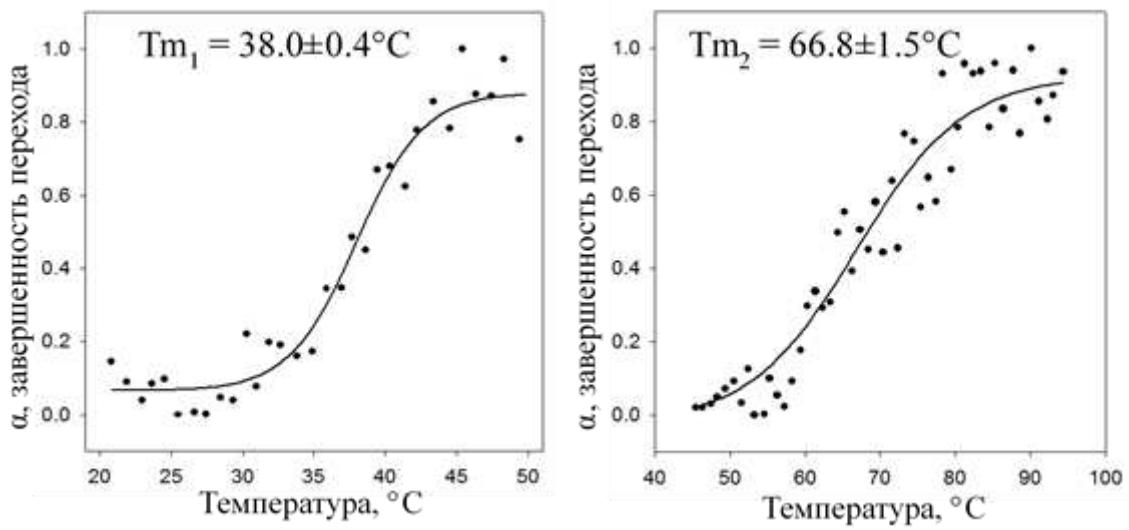


Рисунок 20 – Определение точки перехода MLuc164 посредством расчета степени завершенности теплового перехода α из нативного в денатурированное состояние

Таким образом оптимизированная методика рефолдинга позволила получить люциферазу MLuc7 в клетках *E. coli* со свойствами (удельная активность, температурный оптимум биолюминесценции, термостабильность, кинетика светового сигнала), идентичными свойствам нативной люциферазы, полученной из клеток насекомых. При этом выход белка высокой чистоты составил не менее 6 мг/л. Оптимизированная методика была применена к очистке другой изоформы MLuc164, получение нативной формы которой из клеток насекомых было затруднено, скорее всего, благодаря частичному протеолизу секретируемого белка в культуральной среде. Благодаря разработанной методике было получено достаточное количество активной люциферазы MLuc164 для ее характеризации. В ходе исследования было показано, что копеподные люциферазы MLuc164 и MLuc7, полученные путем рефолдинга из телец включения *E. coli*, проявляли биолюминесцентную активность при близких температурных условиях и значениях pH, имели одинаковую зависимость биолюминесцентной активности от концентрации NaCl и практически идентичный спектр биолюминесценции, что говорит о строгом формировании активного центра ферментов. Несмотря на это, MLuc164 имела в 4,5 раза меньший максимум биолюминесцентной активности,

чем MLuc7 (Таблица 2), но обладала более медленным спадом биолюминесцентного сигнала [21].

Таблица 2 – Сравнительная характеристика исследуемых копеподных люцифераз (измерения проводились при оптимальных температурах)

Характеристика		MLuc7	MLuc164
Относительная активность по Lmax, %		100	22,5
Оптимум	T, °C	15	12
	NaCl, M	0,5	0,5
	pH	7,00-7,75	7,25-7,75
λ_{max}		487	488
Tm, °C		70,3±0,6	66,8±1,5°C
Активность после 1 ч инкубации при 100°C, %		70	55

При этом оба белка проявляли высокую термостабильность, благодаря чему обе люциферазы можно использовать как эффективные репортеры в анализах, особенно где требуются стадии температурной инкубации. Наличие изоформ люциферазы с различными свойствами позволяет выбрать более оптимальный вариант репортера для конкретных условий эксперимента, что существенно расширяет методические возможности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данное исследование было посвящено характеризации изоформы MLuc164 люциферазы *Metridia longa*, которая обладает наиболее медленной кинетикой биолюминесцентного сигнала среди изоформ люциферазы *Metridia*. Исследуемая изоформа была клонирована первой среди других и в связи с чем уже достаточно широко используется в биомедицинских исследованиях *in vivo*. Несмотря на это, ее свойства не были в достаточной мере охарактеризованы в силу трудностей получения очищенного препарата люциферазы в активной форме. Кроме того, показана перспективность применения люциферазы *Metridia* в *in vitro* анализах, но для этого также требуется наличие достаточного количества очищенного препарата белка.

Поэтому целью работы являлось получение нативной MLuc164 изоформы люциферазы *Metridia longa* из телец включения *E. coli* и исследование ее физико-химических свойств.

Для достижения цели первостепенной задачей являлся подбор условий рефолдинга люциферазы из бактериальных телец включения. Для этого была выбрана другая изоформа люциферазы *Metridia* (MLuc7), так как ранее она была получена в очищенной мономерной форме в функционально-активном виде путем секретируемой экспрессии в среде клеток насекомых Sf9. Использование данной изоформы обеспечило возможность оценки эффективности рефолдинга из бактериальных телец включения путем сравнения физико-химических свойств препаратов MLuc7 полученных обоими способами. В результате было показано, что люцифераза *Metridia* способна к ренатурации. Выход белка высокой чистоты был сопоставим у обоих препаратов, полученных в разных системах экспрессии, и составил 6 мг/л. Путем оптимизированной методики рефолдинга был получен препарат активной люциферазы MLuc164. Таким образом, разработанная методика рефолдинга позволила получить люциферазы MLuc7 и MLuc164 с корректно сформированными внутримолекулярными дисульфидными связями в клетках

E. coli. В результате проведенного исследования впервые были описаны основные физико-химические свойства люциферазы MLuc164.

Понимание свойств люцифераз копепод позволит оптимизировать условия их использования в качестве репортеров для определенных задач. Так, например, при анализе следует учитывать низкий температурный оптимум активности люцифераз и использовать температурную стабилизацию при измерениях. Кроме того, была продемонстрирована высокая термостабильность исследуемых люцифераз, благодаря чему данные репортеры могут быть полезными в схемах *in vitro* тестирований, предполагающих стадии нагревания.

Применение клеток *E. coli* для производства рекомбинантной люциферазы *M. longa* обеспечивает более быстрое и экономичное получение целевого белка по сравнению с его производством в клетках эукариот. Ожидается, что данная технология позволит получать достаточные количества люциферазы для использования в различных *in vitro* исследованиях. Вероятно, разработанная методика будет полезной для подбора условий получения других белков, содержащих множественные дисульфидные связи, путем традиционной экспрессии в бактериальных клетках.

Таким образом, результаты, полученные при выполнении настоящего исследования, имеют как фундаментальное, так и прикладное значение.

ВЫВОДЫ

1. Оптимизированы условия окислительного рефолдинга люциферазы *Metridia* из телец включения *E. coli* на примере изоформы MLuc7, включающие в себя отмывку телец включения и их денатурацию, процесс ренатурации белка и его очистку. Оптимальный буфер для проведения процедуры рефолдинга содержал 300 мМ Арг, 150 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂, 0.02% NP-40, 5 мМ GSH, 0.5 мМ GSSG, 20 мМ Трис-HCl pH 8.0, 0.2 мМ CuCl₂. Выход активной люциферазы составил 6 мг/л.

2. Продемонстрировано, что основные физико-химические свойства препаратов MLuc7, полученных из телец включения *E. coli* и среды клеток насекомых Sf9 были идентичными, что позволило оценить разработанную методику как эффективный и предпочтительный способ получения люциферазы *Metridia*.

3. Получен очищенный препарат активной MLuc164 изоформы люциферазы *Metridia longa* в мономерной форме путем использования оптимизированной методики окислительного рефолдинга из телец включения *E. coli*.

4. Впервые исследованы физико-химические свойства чистого препарата функционально активной копеподной люциферазы MLuc164. Продемонстрированы спектр биолюминесценции ($\lambda_{\text{max}}=487$ нм); спектры тирозиновой ($\lambda_{\text{max}}=302$ нм) и триптофановой ($\lambda_{\text{max}}=330$ нм) флуоресценции; оптимальные условия для проявления функциональной активности фермента: pH 7,5, температура 12°C, концентрация NaCl 0,5M; термостабильность с сохранением 55% активности после 1 часа кипячения; точка теплового полуперхода белка $66,8 \pm 1,5^\circ\text{C}$. Показано, что добавление неионного детергента в измерительный буфер замедляет падение светового сигнала в ходе реакции.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТР, АТФ – аденоzinтрифосфат
CopLucs – копеподные люциферазы
GFP – зеленый флуоресцентный белок
IB – тельца включения (inclusion bodies)
L_{max} – пик биолюминесцентного сигнала
rlu – условные световые единицы
SEAP – секретируемая щелочная фосфатаза
ДСН – додецилсульфат натрия
ДТТ – дитиотриетол
ИПТГ – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид
кДНК – ДНК, комплементарная матричной РНК
н.п. – нуклеотидная пара
ПААГ – поликариламидный гель
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Iyer M. Applications of molecular imaging in cancer gene therapy /M. Iyer [et al.] // Curr. Gene Ther. – 2005. – Vol. 5. – № 6. – P. 607–618.
- 2 Badr, C.E. Bioluminescent imaging: methods and protocols / C.E. Badr // Ch. 1. Bioluminescence imaging: basics and practical limitations. – Springer Science, New York – 2014. – V. 1098. – P. 1–18.
- 3 Rome C. Gene expression and gene therapy imaging / C. Rome, F. Couillaud, W. Moonen // Eur. Radiol. – 2007. – Vol. 17. – № 2. – P. 305–319
- 4 Маркова, С. В. Целентеразин-зависимые люциферазы / С. В. Маркова, Е. С. Высоцкий // Биохимия. – 2015. – Т.80, вып. 6. – С. 845-866.
- 5 Бондарь, В.С. Физика и химия биолюминесценции: учеб. пособие / В.С. Бондарь, Е.С. Высоцкий, Е.Н. Есимбекова [и др.], под ред. О. Шимомуры, И.И. Гительзона. – Красноярск: СФУ. – 2012.
- 6 Wu, N. Bacterial expressionand re-engineering of *Gaussia princeps* luciferase and its use as a reporter protein / N. Wu, T. Rathnayaka, Y. Kuroda // Biochim Biophys Acta. – 2015. – V. 1854. – P. 1392–1399.
- 7 Shimomura, O. Bioluminescence: chemical principles / O. Shimomura // World Scientific Publishing, Singapore. – 2006.
- 8 Widder, E.A. Bioluminescence in the ocean: origins of biological, chemical, and ecological diversity / E.A. Widder // Science. – 2010. – V. 328. – P. 704–708.
- 9 Matthews, J.C. Purification and properties of *Renilla reniformis* luciferase / J.C. Matthews, K. Hori, M.J. Cormier // Biochemistry. – 1977. – V. 16. – P. 85–91.
- 10 Titushin, M.S. Coelenterazine-binding protein of *Renilla muelleri*: cDNA cloning, overexpression, and characterization as a substrate of luciferase / M.S. Titushin [et al.] // Photochem Photobiol Sci. – 2008. – V. 7. – P. 189–196.
- 11 Takenaka, Y. A light in the dark: ecology, evolution and molecular basis of copepod bioluminescence. Horizons / Y. Takenaka, A. Yamaguchi, Y. Shigeri // J Plankton Res. – 2017. – V. 39, N. 3, 369–378.

- 12 Inouye S. Secretional luciferase of the luminous shrimp *Oplophorus gracilirostris*: cDNA cloning of a novel imidazopyrazinone luciferase / S. Inouye [et al.] // FEBS Lett. – 2000. – V. 481. – № 1. – P. 19–25
- 13 Oba, Y. Biosynthesis of coelenterazine in the deep-sea copepod, *Metridia pacifica* / Y. Oba [et al.] // BBRC. – 2009. – V. 390. – P. 684–688.
- 14 Vysotski E.S., Lee J. Ca²⁺ -Regulated Photoproteins: Structural Insight into the Bioluminescence Mechanism / E.S. Vysotski, J. Lee // Acc. Chem. Res. – 2004. – V. 37. – № 6. – P. 405–415.
- 15 Франк Л.А. Кальций-регулируемые фотопротеины морских кишечнополостных / Л.А. Франк, Е.С. Высоцкий, С.В. Маркова // Молекулярная биология. – 2006. – V. 40. – № 3. – C. 404–317.
- 16 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 Journal – 2012. – V. 279, N. 5. – P. 856–870.
- 17 Szent-Gyorgyi C. Cloning and characterization of new bioluminescent proteins / C. Szent-Gyorgyi [et al.] // Biomed. Imaging Reporters – 1999. – P. 4–11.
- 18 Markova, S.V. Cloning and expression of cDNA for a luciferase from the marine copepod *Metridia longa*. A novel secreted bioluminescent reporter enzyme / S.V. Markova, S. Golz, L.A. Frank // J Biol Chem. –2004. – V. 279, N. 5. – P. 3212–3217.
- 19 Takenaka, Y. Evolution of bioluminescence in marine planktonic copepods / Y. Takenaka, A. Yamaguchi, N. Tsuruoka, M. Torimura, T. Gojobori, Y. Shigeri // Mol Biol Evol. – 2012. – V. 29, N. 6. – P. 1669–1681.
- 20 Евстигнеев П.В., Битюков Э.П. Биолюминесценция морских копепод / П.В. Евстигнеев, Э.П. Битюков // Киев: Наук. думка. –1 990. – 144 с.
- 21 Markova S. V. Shining Light on the Secreted Luciferases of Marine Copepods: Current Knowledge and Applications / S.V. Markova, M.D. Larionova, E.S. Vysotski // Photochem. Photobiol. – 2019. – V. 95 – № 3. – P. 705–721.

- 22 Maguire, C.A. *Gaussia luciferase variant for high-throughput functional screening applications* / C.A. Maguire, N.C. Deliolanis, L. Pike, J.M. Niers, L.A. Tjon-Kon-Fat, M. Sena-Esteves, B.A. Tannous // *Anal Chem.* – 2009. – V. 81. – P. 7102–7106.
- 23 Luker, K.E. *Split Gaussia luciferase for imaging ligand-receptor binding.* / K.E., Luker, G.D. Luker // *Methods Mol Biol.* – 2014. – V. 1098. – P. 59–69.
- 24 Markova S.V. *The smallest natural high-active luciferase: Cloning and characterization of novel 16.5-kDa luciferase from copepod *Metridia longa** / S.V/ Markova [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2015. – V. 457. – № 1. – P. 77–82.
- 25 Stepanyuk, G.A. *Expression, purification and characterization of the secreted luciferase of the copepod Metridia longa from Sf9 insect cells* / G.A. Stepanyuk [et al.] // *Prot Expr Purif.* – 2008. – V. 61, N. 2. – P. 142–148.
- 26 Tannous, B.A. *Codon-optimized Gaussia luciferase cDNA for mammalian gene expression in culture and in vivo* / B.A. Tannous [et al.] // *Molecular Therapy.* – 2005. – V. 11. – P. 435–443.
- 27 Takenaka, Y. *Two forms of secreted and thermostable luciferases from the marine copepod crustacean, Metridia pacifica* / Y. Takenaka [et al.] // *Gene.* – 2008. – V. 425. – P. 28–35.
- 28 Borisova, V.V. *Recombinant Metridia luciferase isoforms: expression, refolding and applicability for *in vitro* assay* / V.V. Borisova [et al.] // *Photochem Photobiol Sci.* – 2008. – V. 7, N. 9. – P. 1025–1031.
- 29 Larionova M.D. *Bioluminescent and structural features of native folded Gaussia luciferase* / M.D. Larionova, S. V. Markova, E.S. Vysotski // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* – 2018. – V.183. – P. 309–317.
- 30 Remy I., Michnick S.W. *A highly sensitive protein-protein interaction assay based on Gaussia luciferase* / I. Remy, S.W. Michnick // *Nat. Methods.* – 2006. – V. 3. №12. – P. 977–979.

- 31 Hunt, E.A. Truncated variants of *Gaussia luciferase* with tyrosine linker for sitespecific bioconjugate applications / E.A. Hunt [et al.] // Sci Rep. – 2016. – V. 6. – P. 26814.
- 32 Welsh J.P. Multiply mutated *Gaussia luciferases* provide prolonged and intense bioluminescence / J.P. Welsh [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2009. Vol. 389, № 4. P. 563–568.
- 33 Degeling M.H. Directed molecular evolution reveals *Gaussia luciferase* variants with enhanced light output stability / M.H. Degeling [et al.] // Anal. Chem. – 2013. – V. 85. – № 5. – P. 3006–3012.
- 34 Verhaegen, M., Christopoulos, T. Recombinant *Gaussia luciferase*. Overexpression, purification, and analytical application of a bioluminescent reporter for DNA hybridization / M. Verhaegen, T. Christopoulos // Analytical Chemistry. – 2002. – V. 74. – P. 4378–4385.
- 35 Markova S.V. Bioluminescent monitoring enables observation of intracellular events in real time without cell and tissue destruction / S.V. Markovq [et al.] // Biophysics (Oxf) – 2017. – V. 62 – № 3. – P. 503–507.
- 36 Lupold, S.E. A real time *Metridia luciferase* based non-invasive reporter assay of mammalian cell viability and cytotoxicity via the β -actin promoter and enhancer / S.E. Lupold, T. Johnson, W.H. Chowdhury, R. Rodriguez // PLoS ONE. – 2012. – V. 7, N. 5. – e36535.
- 37 Valencia, A., Pazos, F. Computational methods for the prediction of protein interactions / A. Valencia, F. Pazos // Curr Opin Struct Biol. – 2002. – V. 12. – P. 368–373.
- 38 Kerppola T.K. Complementary methods for studies of protein interactions in living cells / T.K. Kerppola // Nat. Methods. – 2006. – V. 3. – № 12. – P. 969–971.
- 39 Wehr M.C., Rossner M.J. Split protein biosensor assays in molecular pharmacological studies / M.C. Wehr, M.J. Rossner // Drug Discov. Today. – 2016. –V. 21. – № 3. – P. 415–429.
- 40 Shekhawat, S.S., Ghosh, I. Split-protein systems: beyond binary protein–protein

- interactions / S.S. Shekhawat, I. Ghosh // Curr Opin Chem Biol. – 2011. – V. 15. – P. 789–797.
- 41 Lake, M.C., Aboagye, E.O. Luciferase fragment complementation imaging in preclinical cancer studies / M.C. Lake, E.O. Aboagye // Oncoscience. – 2014. – V. 1, N. 5. – P. 310–325.
- 42 Johnsson, N., Varshavsky, A. Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo / N. Johnsson, A. Varshavsky // PNAS USA. – 1994. – 91, 10340–13044.
- 43 Pelletier, J.N. Oligomerization domain-directed reassembly of active dihydrofolate reductase from rationally designed fragments / J.N. Pelletier, F.X. Campbell-Valois, S. Michnick // PNAS USA. – 1998. – V. 95. – P. 12141–12146.
- 44 Galarneau, A. Beta-lactamase protein fragment complementation assays as *in vivo* and *in vitro* sensors of protein–protein interactions / A. Galarneau [et al.] // Nat Biotechnol. – 2002. – V. 20. – P. 619–622.
- 45 Wehr, M.C. Monitoring regulated protein–protein interactions using split TEV / M.C. Wehr [et al.] // Nat Methods. – 2006. – V. 3. – P. 985–993.
- 46 Joung, J. A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions / J. Joung, E. Ramm, C. Pabo // PNAS USA. – 2000. – V. 97, N. 13. – P. 7382–7387.
- 47 Hu, C.D., Kerppola, T.K. Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. / C.D. Hu, T.K. Kerppola // Nat Biotechnol. – 2003. – V. 21. – P. 539–545.
- 48 Magliery, T.J. Detecting protein–protein interactions with a green fluorescent protein fragment reassembly trap: scope and mechanism / T.J. Magliery [et al.] // J Am Chem Soc. – 2005. – V. 127. – P. 146–157.
- 49 Lindman, S. *In vivo* protein stabilization based on fragment complementation and a split GFP system / S. Lindman [et al.] // PNAS USA. – 2010. – V. 107. – P. 19826–19831.
- 50 Auld D.S. Characterization and Use of TurboLuc Luciferase as a Reporter for High-Throughput Assays / D.S. Auld [et al.] // Biochemistry. – 2018. – V. 57. – № 31. – P. 4700–4706.

- 51 Wille, T. *Gaussia princeps* luciferase as a reporter for transcriptional activity, protein secretion, and protein-protein interactions in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* / T. Wille [et al.] // *Appl Environ Microbiol.* – 2012. – V. 78, N. 1. – P. 250–257.
- 52 Hashimoto, T. Characterization of oligomer formation of amyloid- β peptide using a split-luciferase complementation assay / T. Hashimoto [et al.] // *J Biol Chem.* – 2011. – V. 286, N. 31. – P. 27081–27091.
- 53 Decock, M. Analysis by a highly sensitive split luciferase assay of the regions involved in APP dimerization and its impact on processing / M. Decock [et al.] // *FEBS Open Bio.* – 2015. – V. 5. – P. 763–673.
- 54 Kim, S.B. Split *Gaussia* luciferase-based bioluminescence template for tracing protein dynamics in living cells / S.B. Kim, M. Sato, H. Tao // *Anal. Chem.* – 2009. – V. 81. – P. 67–74.
- 55 Grange, R.D. Radioimmunoassay, enzyme and non-enzyme-based immunoassays / R.D. Grange, J.P. Thompson, D.G. Lambert // *Br J Anaesth.* – 2014. – V. 112, N. 2. – P. 213–216.
- 56 Wang, B.J. Establishment of a bioluminescence-based bioassay for the detection of dioxin-like compounds / B.J. Wang [et al.] // *Toxicol Mech Methods.* – 2013. – V. 23, N. 4. – P. 247–254.
- 57 Burakova, L.P. Bioluminescent detection probe for tick-borne encephalitis virus immunoassay / L.P. Burakova [et al.] // *Anal Bioanal Chem.* – 2015. – V. 407, N. 18. – P. 5417–5423.
- 58 Krasitskaya, V.V. Mutants of Ca^{2+} -regulated photoprotein obelin for site-specific conjugation / V.V. Krasitskaya [et al.] // *Photochem Photobiol.* – 2017. – V. 93, N. 2. – P. 553–557.
- 59 Huang, L. Current advances in highly multiplexed antibody-based single-cell proteomic measurements / L. Huang [et al.] // *Chem Asian J.* – 2017. – V. 12, N. 14. – P. 1680–1691.
- 60 Tannous, B.A., Teng, J. Secreted blood reporters: insights and applications / B.A. Tannous, J. Teng // *Biotechnol Adv.* – 2011. – V. 29, N. 6. – P. 997–1003.

- 61 Bovenberg, M.S. Enhanced *gaussia* luciferase blood assay for monitoring of *in vivo* biological processes / M.S. Bovenberg, M.H. Degeling, B.A. Tannous // Anal Chem. – 2012. – V. 84, N. 2. – P. 1189–1192.
- 62 Ustinova, J. Development of a luciferase-based system for the detection of ZnT8 autoantibodies / J. Ustinova [et al.] // J Immunol Methods. – 2014. – V. 405. – P. 67–73.
- 63 Oyama, H. *Gaussia* luciferase as a genetic fusion partner with antibody fragments for sensitive immunoassay monitoring of clinical biomarkers / H. Oyama [et al.] // Anal Chem. – 2015. – V. 87, N. 24. – P. 12387–12395.
- 64 Smirnova, D.V., Ugarova, N.N. Firefly luciferase-based fusion proteins and their applications in bioanalysis / D.V. Smirnova, N.N. Ugarova // Photochem Photobiol. – 2017. – V. 93, N. 2. – P. 436–447.
- 65 Frank L.A., Krasitskaya V.V. Application of Enzyme Bioluminescence for Medical Diagnostics / L.A. Frank, V.V. Krasitskaya // Advances in biochemical engineering/biotechnology. – 2014. – Vol. 144. – P. 175–197.
- 66 Murakami, G. Chemical library screening identifies a small molecule that downregulates Sod1 transcription for drugs to treat amyotrophic lateral sclerosis / G. Murakami [et al.] // J Biomol Screen. – 2011. – V. 16. – P. 405–414.
- 67 Tsujita, T. Hypoxia-sensitive reporter system for high-throughput screening / T. Tsujita, S. Kawaguchi, T. Dan, L. Baird, T. Miyata, M. Yamamoto // Tohoku J Exp Med. – 2015. – V. 235, N. 2. – P. 151–159.
- 68 Zhang H.L. Generation and characterization of West Nile pseudo-infectious reporter virus for antiviral screening / H.L. Zhang [et al.] // Antiviral Res. – 2017. – V. 141. – P. 38–47.
- 69 Huang, P.C. A multisampling reporter system for monitoring microRNA activity in the same population of cells / P.C. Huang [et al.] // J Biomed Biotechnol. – 2009. – V. 2009. – P. 104716.

- 70 Tian, W. High-throughput functional microRNAs profiling by recombinant AAV-based microRNA sensor arrays / W. Tian [et al.] // PLoS ONE. – 2012. – V. 7. – e29551.
- 71 Tu Y. *In vitro* and *in vivo* direct monitoring of miRNA-22 expression in isoproterenol-induced cardiac hypertrophy by bioluminescence imaging / Y. Tu [et al.] // Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. – 2014. – V. 41. – № 5. – P. 972–984.
- 72 Hatano, K. A functional screen identifies miRNAs that inhibit DNA repair and sensitize prostate cancer cells to ionizing radiation / K. Hatano [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2015. – V. 43, N. 8. – P. 4075–4086.
- 73 Ko, H.Y. Bioluminescence reporter gene-based detection of microRNAs / H.Y. Ko, Y.S. Lee, S. Kim // Methods Mol Biol. – 2014. – V. 1098. – P. 85–95.
- 74 Gilad, Y. Discovering protein-protein interactions within the programmed cell death network using a protein-fragment complementation screen / Y. Gilad [et al.] // Cell Reports. – 2014. – V. 8. – P. 909–921.
- 75 Munier S. Exploration of binary virus-host interactions using an infectious protein complementation assay / S. Munier [et al.] // Mol. Cell. Proteomics. – 2013. –V. 12. – № 10. – P. 2845–2855.
- 76 Li C. Screening for Novel Small-Molecule Inhibitors Targeting the Assembly of Influenza Virus Polymerase Complex by a Bimolecular Luminescence Complementation-Based Reporter System / C. Li [et al.] // J. Virol. – 2017. – V. 91 – № 5. – P. e02282-16
- 77 Neveu, G., Comparative analysis of virus-host interactomes with a mammalian high-throughput protein complementation assay based on *Gaussia princeps* luciferase / G. Neveu [et al.] // Methods. – 2012. – V. 58. – P. 349–359.
- 78 Uebelhoer, L.S. High-throughput, luciferase-based reverse genetics systems for identifying inhibitors of Marburg and Ebola viruses / L.S. Uebelhoer [et al.] // Antivir Res. – 2014. – V. 106. – P. 86–94.
- 79 Wurdinger T. A secreted luciferase for ex vivo monitoring of *in vivo* processes / T. Wurdinger [et al.] // Nat. Methods. – 2008. – Vol. 5. – № 2. – P. 171–173.

- 80 Bovenberg, M.S. Multiplex blood reporters for simultaneous monitoring of cellular processes / M.S. Bovenberg [et al.] // Anal Chem. – 2013. – V. 85, N. 21. – P. 10205–10210.
- 81 Santos, E.B. Sensitive *in vivo* imaging of T cells using a membrane-bound *Gaussia princeps* luciferase / E.B. Santos [et al.] // Nat Med. – 2009. – V. 15. – P. 338–344.
- 82 Yamashita, H. Blood-based assay with secreted *Gaussia* luciferase to monitor tumor metastasis / H. Yamashita, D.T. Nguyen, E. Chung // Methods Mol Biol. – 2014. – V. 1098. – P. 145–151.
- 83 Wu P. A novel approach for detecting viable and tissue-specific circulating tumor cells through an adenovirus-based reporter vector / P. Wu [et al.] // Prostate. – 2014. – V. 74. – № 13. – P. 1286–1296.
- 84 Bibi, S. A new humanized *in vivo* model of KIT D816V+ advanced systemic mastocytosis monitored using a secreted luciferase / S. Bibi [et al.] // Oncotarget. – 2016. – V. 7, N. 50. – P. 82985–83000.
- 85 Ларионова М.Д. Новые изоформы люциферазы из копеподы *Metridia longa*: свойства и применение : дис. ... канд. биол. наук : 03.01.02 / Ларионова Марина Дмитриевна. – Красноярск, 2018. – 129 с.
- 86 Kalwat M.A. Insulin Promoter-Driven *Gaussia Luciferase-Based* Insulin Secretion Biosensor Assay for Discovery of β -Cell Glucose-Sensing Pathways / M.A. Kalwat [et al.] // ACS Sensors. – 2016. – Vol. 1 – № 10. – P. 1208–1212.
- 87 Suzuki T. Quantitative visualization of synchronized insulin secretion from 3D-cultured cells / T. Suzuki, T. Kanamori, S. Inouye. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2017. – V. 486. – № 4. – P. 886–892.
- 88 Paul-Smith M.C. The murine lung as a factory to produce secreted intrapulmonary and circulatory proteins / M.C. Paul-Smith [et al.] // Gene Ther. Nature Publishing Group. – 2018. – V. 25 – № 5. – P. 345–358.
- 89 Alessandrini, F., Noninvasive monitoring of glioma growth in the mouse / F. Alessandrini [et al.] // J Cancer. – 2016 – V. 7, N. 13. – P. 1791–1797.

- 90 Tung J.K. Bioluminescence imaging in live cells and animals / J.K. Tung [et al.] // *Neurophotonics*. – 2016. – V. 3 – № 2. – P. 025001.
- 91 Delarze, E. Adaptation of a *Gaussia princeps* luciferase reporter system in *Candida albicans* for *in vivo* detection in the *Galleria mellonella* infection model / E. Delarze [et al.] // *Virulence*. – 2015. – V. 6, N. 7, 684–693.
- 92 Liu, M. Secreted *Gaussia princeps* luciferase as a reporter of *Escherichia coli* replication in a mouse tissue cage model of infection / M. Liu [et al.] // *PLoS ONE*. – 2014. – V. 9, N. 3. – e90382.
- 93 Degeling, M.H. *Gaussia* luciferase-based mycoplasma detection assay in mammalian cell culture / M.H. Degeling [et al.] // *Methods Mol Biol*. – 2014. – V. 1098. – P. 47–55.
- 94 Kim, M.S., Kim, K.H. Effects of NV gene knock-out recombinant VHSV on Mx gene expression in Epithelioma papulosum cyprini (EPC) cells and olive flounder / M.S. Kim, K.H. Kim // *Fish Shellfish Imm*. – 2012. – V. 32, N. 3. – P. 459–463.
- 95 Xu, L.L. Development of a stable *Gaussia* luciferase enterovirus 71 reporter virus / L.L. Xu [et al.] // *J Virol Methods*. – 2015. – V. 219. – P. 62–66.
- 96 Eckert, N. Influenza A virus encoding secreted *Gaussia* luciferase as useful tool to analyze viral replication and its inhibition by antiviral compounds and cellular proteins / N. Eckert [et al.] // *PLoS ONE*. – 2014. – V. 9, N. 5. – e97695.
- 97 Mukherjee A. Monitoring nanoparticle-mediated cellular hyperthermia with a high-sensitivity biosensor / A. Mukherjee [et al.] // *Nanomedicine (Lond)*. – 2014. – V. 9 – № 18. – P. 2729–2743.
- 98 Gaur, S. Engineering intracellularly retained *Gaussia* luciferase reporters for improved biosensing and molecular imaging applications / S. Gaur [et al.] // *ACS Chem Biol*. – 2017. – V. 12, N. 9. – P. 2345–2353.
- 99 Matta, H. Development and characterization of a novel luciferase-based cytotoxicity assay / H. Matta, [et al.] / *Sci Rep*. – 2018. – V. 8. – P. 199.
- 100 Maguire, C.A. Triple bioluminescence imaging for *in vivo* monitoring of cellular processes / C.A. Maguire [et al.] // *Mol Ther Nucleic Acids*. – 2013. – V. 2. – e99.

- 101 Leng W. Novel Bioluminescent Activatable Reporter for Src Tyrosine Kinase Activity in Living Mice / W. Leng [et al.] // Theranostics – 2016. – V. 6. – № 4. P. 594–609.
- 102 Mezzanotte L. A new multicolor bioluminescence imaging platform to investigate NF-κB activity and apoptosis in human breast cancer cells / L. Mezzanotte [et al.] // PLoS One – 2014. – V. 9. – № 1. – P. e85550.
- 103 Goerke, A.R. Cell-free metabolic engineering promotes high-level production of bioactive *Gaussia princeps* luciferase / A.R. Goerke, A.M. Loening, S.S. Gambhir, J.R. Swartz // Metab Eng. – 2008. – V. 10. – P. 187–200.
- 104 de Marco A. Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli* / A. de Marco // Microb. Cell Fact. – 2009. – V. 8. – № 1. – P. 26.
- 105 Inouye S., Sahara Y. Soluble protein expression in *E. coli* cells using IgG-binding domain of protein A as a solubilizing partner in the cold induced system / S. Inouye, Y. Sahara // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2008. – V. 376. – № 3. – P. 448–453.
- 106 Rathnayaka, T. Solubilization and folding of a fully active recombinant *Gaussia* luciferase with native disulfide bonds by using a SEP-Tag / T. Rathnayaka [et al.] // Biochimica et Biophysica Acta. – 2011. – V. 1814. – P. 1775–1778.
- 107 Larionova M.D. The novel extremely psychrophilic luciferase from *Metridia longa*: Properties of a high-purity protein produced in insect cells / M.D. Larionova, S.V. Markova, E.S. Vysotski // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2017 – V. 483. – № 1. – P. 772–778.
- 108 Markova S. V. The disulfide-rich *Metridia* luciferase refolded from *E. coli* inclusion bodies reveals the properties of a native folded enzyme produced in insect cells / S.V. Markova [et al.] // J. Photochem. Photobiol. B Biol. – 2017. – V. 175. – P. 51–57.
- 109 Gilchuk P.V. Evaluation of renaturation methods for industrial obtaining of recombinant proteins from *Escherichia coli* inclusion bodies in biologically active form / P.V. Gilchuk // Biopolym. Cell. – 2004. – V. 20. – № 3. –P. 182–192.

- 110 Singh S.M., Panda A.K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins / S.M. Singh, A.K. Panda // J. Biosci. Bioeng. – 2005. – V. 99. – № 4. – P. 303–310.
- 111 Пермяков Е.А. Метод собственной люминесценции белка / Е.А. Пермяков. – Наука. – 2003. – 188 с.
- 112 Markova, S.V. High-active truncated luciferase of copepod *Metridia longa* / S.V. Markova, L.P. Burakova, E.S. Vysotski // BBRC. – 2012. – V. 412. – P. 98–103.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение

высшего образования

«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

исследование ее физико-химических свойств состоит из 74 страниц текстового документа, 20 рисунков, 2 формула, 2 таблиц, 12 источников. **УТВЕРЖДАЮ**

Руководитель магистерской

программы

Т. Г. Волова

инициалы, фамилия

М. Носова

« 5 » июня 2019 г.

исследование ее физико-химических свойств.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Получение нативной MLuc164 изоформы люциферазы *Metridia longa* из телец включения *E. coli* и исследование ее физико-химических свойств

06.04.01 Биология

06.04.01.01 Микробиология и биотехнология изученного путем экспрессии в клетках люциферазы MLuc164. Путем оптимизированной методики получены очищенный гомогенизированный активный MLuc164 изоформа люциферазы *Metridia longa* в мономерной форме и описаны характеристики его физико-химических свойств.

Научные наставники

Научный руководитель

Маркова 5.07.19

к.б.н., с.н.с. С.В. Маркова

подпись, дата

Выпускник

Горбунова 5.07.19

Д.А. Горбунова

подпись, дата

Рецензент

Трусова 5.07.19

к.б.н., с.н.с. М.Ю. Трусова

подпись, дата

Практическая значимость

Определение физико-химических свойств люциферазы позволяет оптимизировать условия их Красноярск 2019 в качестве литературы для определения биотехнологии. Полученные достоверные данные оптимизированного препарата