

Министерство науки и высшего образования РФ
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«**СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

_____ Т. Г. Волова

« ____ » _____ 2022 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

Влияние аминокислотных замен на фолдинг и свойства
рекомбинантного фотопротейна беровина гребневика *Beroe*
abyssicola 06.03.01 - Биология

Научный руководитель

подпись, дата

к.б.н. Л.П. Буракова
инициалы, фамилия

Выпускник

подпись, дата

Н.В. Рукосуева
инициалы, фамилия

Красноярск 2022

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Влияние аминокислотных замен на фолдинг и свойства рекомбинантного фотопротейна беровина гребневика *Beroe abyssicola*» содержит 51 страницу текстового документа, 2 таблицы, 34 использованных источников, и 15 рисунков.

Ключевые слова: БЕРОВИН, ФОТОПРОТЕИН, БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ, МУТАГЕНЕЗ, КЛОН.

Цель работы: поиск мутаций рекомбинантного фотопротейна беровина, обеспечивающих фолдинг *in vitro* при нейтральных значениях pH.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

1. Получить экспрессионную конструкцию pQE60-BAwt и провести на её основе ненаправленный мутагенез.
2. Провести скрининг полученной библиотеки клонов на колониях для поиска мутантов заряжающихся в условиях *in vivo*.
3. Проанализировать последовательности ДНК в колониях, выбранных в результате скрининга, провести сайт-направленный мутагенез на основе pET22-BAwt для введения мутаций, обнаруженных в результате анализа клонов, и получить штаммы-продуценты для экспрессии генов мутантных вариантов беровина.
4. Получить высокоочищенные препараты мутантов беровина и проанализировать их условия активации, физико-химические и биолюминесцентные свойства.

Актуальность данной работы заключается в нижеследующем.

Исследование биолюминесцентных белков, является не только фундаментальной задачей, но и важной составляющей направления, развивающего применение этих белков в качестве маркерных молекул в клеточной биологии и биотехнологии.

Содержание

РЕФЕРАТ	2
ВВЕДЕНИЕ.....	4
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
1.1 Ca ²⁺ -регулируемые фотопротеины	7
1.2 Сходства и различия фотопротеинов ктенофор с фотопротеинами гидромедуз	8
1.3 Рекомбинантный фотопроtein беровин, особенности его строения и свойств.....	11
1.4 Формирование фотопротеинового комплекса на примере обелина и беровина	12
1.5 Особенности беровина.....	13
1.6 Свойства мутантов беровина	15
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	18
2.1. Получение экспрессионной конструкции pQE60-BAwt	18
2.2. Ненаправленный мутагенез на основе pQE60-BAwt.....	19
2.3 Скрининг на колониях с использованием экспрессионных штаммов <i>E.coli</i>	20
2.4 Сайт-направленный мутагенез и получение штаммов-продуцентов	20
2.5 Очистка апо-беровина	22
2.6 Очистка заряженного беровина	23
2.7 Измерение биолюминесцентной активности и константы спада биолюминесцентной реакции	23
2.8 Измерение спектров биолюминесценции и флуоресценции.....	24
2.9 Фото- и термо- инаktivация	24
2.10 Приборы и реактивы	25
3 РЕЗУЛЬТАТЫ	26
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	44
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	46
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	47

ВВЕДЕНИЕ

Биолюминесценция – это испускание видимого света живыми организмами самостоятельно или за счёт симбионтов. Свечение вызвано окислением молекулы субстрата (люциферина) ферментом (люциферазой), в результате перехода оксилуциферина из возбужденного состояния в исходное [1]. Все океанические места обитания, мелкие и глубокие, пелагические и донные, включают биолюминесцентные виды [2].

Биолюминесцентные белки можно разделить на две группы: люциферазы, функционирующие как классический фермент, и фотопротеины, образующие в бескальциевых условиях устойчивый комплекс с предокисленным субстратом. Ко второй группе относятся Ca^{2+} -регулируемые фотопротеины медуз, такие как акворин и обелин, и фотопротеины гребневиков, например, беровин. Предполагается, что беровин, наряду с другими Ca^{2+} -регулируемыми фотопротеинами гребневиков, относится к отдельному типу биолюминесцентных белков [3]. Отличительной особенностью биолюминесцентной реакции является то, что большая часть генерируемой энергии излучается в виде света, а не тепла. Поскольку свет с помощью современных регистрирующих приборов может быть измерен с высокой чувствительностью, методы с использованием биолюминесцентных белков в качестве репортерных молекул позволяют измерять вещества в аттомолярных концентрациях [4]. В настоящее время реакции биолюминесценции широко используются в качестве аналитического инструмента. Например, Ca^{2+} -регулируемый фотопротеин, акворин медузы *Aequorea victoria*, применяется для мониторинга внутриклеточного кальция, который регулирует многие биологические процессы [5]. При этом одной из аналитических задач является получение молекул с измененным спектром биолюминесценции. Таким образом, всестороннее исследование биолюминесцентных белков и, в частности, фотопротеинов гребневиков,

является не только фундаментальной задачей, но и важной составляющей направления, развивающего применение этих белков в клеточной биологии, экспериментальной медицине и биотехнологии.

Беровин ктенофор *Beroe abyssicola* является наиболее изученным фотопротеином гребневиков, поэтому он и был выбран в качестве объекта для эксперимента. Рекомбинантный апо-беровин получают путем экспрессии гена апо-белка в штаммах *E.coli* с последующей его очисткой и активацией *in vitro* в процессе инкубации с целентеразином при рН 9,0 и в присутствии 0,5 М NaCl без доступа света [5]. Активация же при стандартных физиологических внутриклеточных условиях является менее эффективной. Одним из методов, применяющихся для получения белков с измененными свойствами, является мутагенез, позволяющий создавать мутантные варианты белка с заданными параметрами. До конца не сформировано полное представление о строении субстрат-связывающей полости беровина. Поэтому важным аспектом в изучении этого белка является создание мутантов беровина с заменой аминокислот во внутренней полости белка и выявления их свойств. Также это позволяет определить роль аминокислот, принимающих участие в биолюминесценции. Кроме того, поскольку для возможности использования рекомбинантного беровина в качестве внутриклеточного репортера необходимо, чтобы формирование активного фотопротеинового комплекса происходило в физиологических условиях, важной задачей остается получение мутантов с подходящими для этого свойствами.

Целью работы являлся поиск мутаций рекомбинантного фотопротеина беровина, обеспечивающих фолдинг *in vitro* при нейтральных значениях рН, в том числе для возможности его дальнейшего использования в качестве внутриклеточного репортера в биомедицинских исследованиях.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Получить экспрессионную конструкцию pQE60-BAwt.

2. Провести ненаправленный мутагенез на основе pQE60-BAwt.

3. Проанализировать последовательности ДНК в колониях, выбранных в результате скрининга, провести сайт-направленный мутагенез на основе pET22-BAwt для введения мутаций, обнаруженных в результате анализа клонов, и получить штаммы-продуценты для экспрессии генов мутантных вариантов беровина.

4. Получить высокоочищенные препараты мутантов беровина и проанализировать их условия активации, физико-химические и биолюминесцентные свойства.

Работа выполнена на базовой кафедре биотехнологии в Институте Фундаментальной Биологии и Биотехнологии СФУ и в лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Ca²⁺-регулируемые фотопротеины

Большинство фотопротеинов содержится в морских организмах. Существуют разные типы фотопротеинов, природа свечения которых зависит от различных факторов. Так фотопротеины кишечнополостных, гребневиков и радиолярий нуждаются в ионах Ca²⁺, инициирующих их свечение; фотопротеины двустворчатого моллюска, по-видимому, вовлекают супероксидные радикалы и O₂ в свои светоизлучающие реакции; фотобелок эуфазидных креветок излучает свет только в присутствии специального флуоресцентного соединения; фотопротеин многоножки *Luminodesmus* – единственный известный пример такого белка наземного происхождения, требует АТФ и Mg²⁺ для излучения света [1]. Фотопротеины отличаются от люцифераз тем, что они представляют собой устойчивые предокисленные промежуточные комплексы люциферазы и люциферина.

Главным образом, фотопротеины ответственны за свечение морских кишечнополостных. В настоящее время известно более 25 их видов, биолюминесценция которых обусловлена Ca²⁺-регулируемыми фотопротеинами. Из природных источников выделены и охарактеризованы только семь фотопротеинов: акворин [6], митрокомин [7], клитин [8] из медуз *Aequorea victoria*, *Mitrocoma cellularia* и *Clytia gregaria*, соответственно, обелин из гидроидов *Obelia geniculata* [9] и *Obelia longissima* [10], мнemiопсин и беровин из гребневиков *Mnemiopsis leidyi* и *Beroe ovata*, соответственно [1]. К настоящему времени клонировано несколько представителей фотопротеинов гребневиков: беровин из *Beroe abyssicola* [5], болинопсин из *Bolinopsis infundibulum* [11], мнemiопсин из *Mnemiopsis leidyi* [12], и фотопротеин из *Bathocyroe fosteri* [2].

Все Ca²⁺-регулируемые фотопротеины являются односубъединичными белками с молекулярной массой ~ 21-25 кДа [13], и имеют высокую степень

сходства пространственных структур, а также содержат 3 Ca^{2+} -связывающих центра «EF-hand», характерных для семейства Ca^{2+} -связывающих белков.

1.2 Сходства и различия фотопротеинов ктенофор с фотопротеинами гидромедуз

Биолюминесценция ктенофор также обусловлена Ca^{2+} -регулируемыми фотопротеинами [1]. Несмотря на то, что фотопротеины ктенофор и гидромедуз функционально схожи и в качестве субстрата биолюминесцентной реакции используют целентеразин, они значительно отличаются рядом свойств. Максимум спектра поглощения фотопротеинов ктенофор находится при 437 нм [14], тогда как для фотопротеинов гидромедуз – при 460 нм [15]. Это указывает на то, что аминокислотное окружение связанного 2-гидропероксицелентеразина в активном центре фотопротеинов ктенофор и гидромедуз отличается. Следовательно, могут различаться и аминокислотные остатки, вовлеченные в стабилизацию пероксипроизводного целентеразина, его каталитическое окисление и формирование эмиттера.

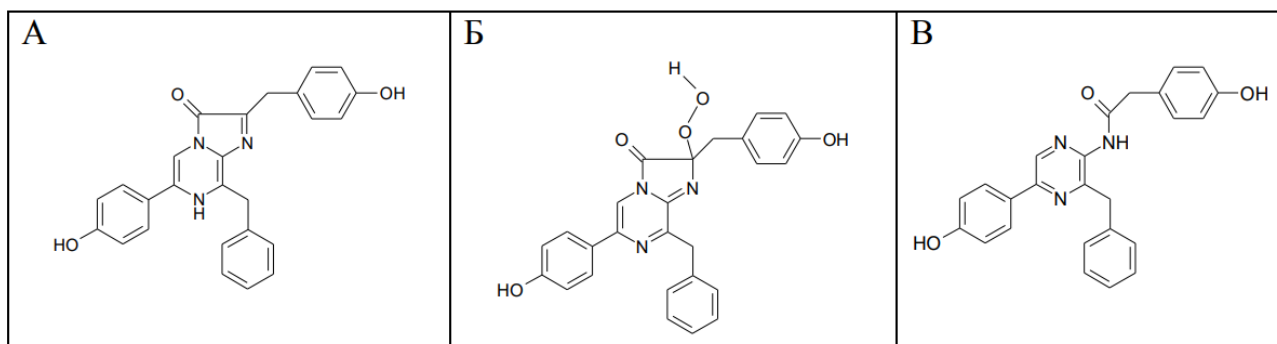


Рисунок 1 – Химическая структура целентеразина (А), 2-гидропероксицелентеразина (Б) и целентерамида (В).

Ca^{2+} -регулируемые фотопротеины гидромедуз обладают высокой степенью гомологии аминокислотных последовательностей, в пределах 65-75%, а также пространственных структур [16]. Однако, фотопротеины гребневиков демонстрируют низкую степень гомологии аминокислотных последовательностей с фотопротеинами гидромедуз – максимальная для

беровина из гребневика *Beroe abyssicola* и обелина из гидроида *Obelia longissima* составляет всего 29.4% [5].

Кристаллические структуры Ca^{2+} -регулируемых фотопротеинов акворина [17], обелина [18] и клитина [19] были определены, все они имеют одинаковую компактную глобулярную структуру. 2-гидропероксицелентеразин-связывающий карман в основном образован боковыми цепями гидрофобных остатков; несколько боковых цепей гидрофильных остатков (His22, Tyr138, His175 и Tyr190) также направлены внутрь. Субстрат-связывающую полость беровина предположительно формируют более гидрофильные остатки: Tyr133, Tyr134, Tyr204, Trp192, Met153, Met154, Ser130, и два Phe [20]. Только 10 из 21 аминокислотного остатка беровина идентичны или аналогичны тем, что образуют целентеразин-связывающую полость у обелина и акворина. В мнемнопсине полость могут формировать Leu18, Arg21, Phe25, Ile38, Pro42, Met46, Phe68, Trp84, Asn88, Ile107, Leu110, Ser111, Tyr114, Tyr115, Leu131, Met134, Val168, Phe171, Trp175, Val140 и Tyr186 [21]. Исходя из сравнительного анализа аминокислотных последовательностей фотопротеина из *Bathocyroe fosteri* и обелина, теоретически был предсказан аминокислотный состав его субстрат-связывающей полости, куда вошли Leu38, Arg41, Phe45, Ile58, Phe63, Met66, Phe88, Trp104, Asn108, Ile127, Leu130, Tyr134, Tyr135, Leu151, Met154, Val160, Phe191, Trp195 и Tyr207 [22]

Аминокислотные последовательности фотопротеинов гидромедуз отличаются большим содержанием триптофана, цистеина и гистидина (обелин из *O. geniculata* содержит 6 остатков триптофана, 5 – цистеина и гистидина) [23], которые обычно не встречаются в кальций-связывающих белках [24]. Беровин, несмотря на низкую степень идентичности с обелином, содержит 5 остатков триптофана и 3 остатка гистидина, то есть примерно такое же количество как у обелина. Стоит отметить, что у беровина

полностью отсутствуют остатки цистеина, что характерно также и для 9 из 12 известных изоформ мнемипсина.

Комплекс Ca^{2+} -регулируемых фотопрототеинов с продуктом биолюминесцентной реакции целентерамидом обладает флуоресцентными свойствами. Тогда как максимум спектра флуоресценции комплекса фотопротеинов гидромедуз не зависит от каких-либо внешних факторов, для фотопротеинов гребневиков наблюдается значительная зависимость этого параметра от pH, что свидетельствует о доступности внутренней целентеразин-связывающей полости белка для растворителя [5].

В отличие от Ca^{2+} -регулируемых фотопротеинов гидромедуз, фотопротеины ктенофор подвержены фотоинактивации – при облучении светом видимого диапазона активный фотопротеиновый комплекс теряет способность к биолюминесценции [25]. Таким образом, светочувствительные биолюминесцентные белки ктенофор представляют собой отдельный тип фотопротеинов, структурная организация и механизмы биолюминесценции и фотоинактивации которых пока еще остаются малоизученными.

Сравнение пространственных структур связанных с ионами металлов апобелков ктенофор и гребневиков показало достаточно высокую степень сходства, несмотря на низкую идентичность аминокислотных последовательностей [3, 26, 27]. Все фотопротеины гребневиков содержат три канонические EF-hand последовательности, включающие кальций-связывающие участки.

Особенности биолюминесценции акворина несколько отличаются от таковых у обелина. В связи с тем, что особенности биолюминесценции фотопротеинов тесно связаны с конформацией и стабильностью их субстрата целентеразина в центре связывания, можно сделать вывод, что такие свойства, как длина волны и период полураспада, в значительной степени определяются его микроокружением. Поэтому незначительное изменение аминокислот в активном центре, приводящее к изменению белок-

субстратного взаимодействия, может существенно влиять на биоломинесцентные свойства [12].

1.3 Рекомбинантный фотопротейн беровин, особенности его строения и свойств

Беровин – один из представителей фотопротейнов гребневиков, отвечающий за свечение гребневика *Beroe abyssicola* и относящийся к Ca^{2+} -регулируемым целентеразин-зависимым фотопротейнам [28]. Это односубъединичный глобулярный белок с $M_v \sim 25$ кДа, внутренняя полость которого состоит из боковых цепей остатков, расположенных на внутренних сторонах α -спиралей [5]. Апо-беровин представляет собой слегка асимметричный компактный глобулярный белок с его N-концевой α -спиралью (остатки 1–35), расположенной в боковой бороздке белка [3]. Рекомбинантный апо-беровин обладает максимумом поглощения при 280 нм. Активный фотопротейн со связанным 2-гидропероксицелентеразином имеет дополнительный максимум поглощения при 437 нм. Ca^{2+} -разряженный беровин не поглощает в видимой области спектра, но приобретает новый максимум поглощения при 335 нм [3]. Особенностью фотопротейнов гребневиков является, прежде всего, чувствительность к свету, называемая фотоинактивацией, которая характеризуется потерей люминесцентной активности фотопротейнового комплекса при облучении светом широкого диапазона длин волн.

Спектр излучения рекомбинантного беровина имеет максимум при 491 нм. Ca^{2+} -разряженный беровин обладает яркой флуоресценцией, которая зависит от pH. При нейтральном pH максимум спектра флуоресценции равен 420 нм, то есть сдвинут на 70 нм в коротковолновую область спектра по сравнению со спектром биоломинесценции, а при щелочном – 485 нм, что практически совпадает с максимумом спектра биоломинесценции [5].

1.4 Формирование фотопротеинового комплекса на примере обелина и беровина

Фотопротеиновая реакция представляет собой окислительное декарбоксилирование перекисно-замещенного целентеразина с выделением углекислого газа и образованием связанного с белком продукта целентерамида в возбужденном состоянии [29].

Молекула обелина по данным рентгеноструктурного анализа представляет собой компактную глобулу с радиусом около 25 Å, состоящую из двух доменов. Каждый домен содержит два EF-hand мотива и может быть представлен в форме «чашек» с внутренней полостью, сформированной боковыми цепями гидрофобных аминокислот. Эти «чашки», соединяясь краями, формируют внутри защищенную от растворителя гидрофобную полость, в которой находится 2-гидропероксицелентеразин. Вероятно, защищенность субстрата от растворителя обеспечивает необходимое окружение для эффективного образования продукта в возбужденном состоянии с последующим его переходом в основное состояние, сопровождающимся высвобождением энергии в виде кванта света.

Боковые цепи гидрофобных остатков, формирующие целентеразин-связывающую полость, локализованы во всех восьми α -спиралях [30]. Имеются только четыре гидрофильных остатка (His22, Tyr138, His175 и Tyr190), боковые цепи которых направлены внутрь полости. Практически все аминокислоты, формирующие внутреннюю субстрат-связывающую полость, являются консервативными [31]. Два остатка гистидина и один остаток триптофана находятся вблизи молекулы 2-гидропероксицелентеразина в 17 активных центрах обелина. В обелине His175 формирует водородную связь с ОН-группой Tyr190 и карбонильной группой 2-гидропероксицелентеразина, а His22 и Trp92 образуют водородные связи с гидроксилом 6-(*n*-гидрокси)-фенильной группы. Водородные связи с атомами 2-гидропероксицелентеразина образуют Tyr138 и Tyr190: остаток Tyr138 образует водородную связь с N1-атомом, а Tyr190 – с C2-

гидропероксигруппой. Предполагается, что водородная связь, формируемая Tyr190, стабилизирует 2-гидропероксицелентеразин в активном центре фотопротеинов [32].

В беровине, основываясь на модели пространственных структур и на влиянии аминокислотных замен беровина на его биолюминесценцию, предполагается, что субстрат в его внутренней полости связан в виде 2-пероксианионного аддукта целентеразина, отрицательно заряженная пероксианионная группа которого стабилизируется благодаря Кулоновскому взаимодействию с положительно заряженной гуанидиниевой группой Arg41 в паре с Tyr204 [20].

У фотопротеинов квидарий наряду с боковыми цепями гидрофобных аминокислот несколько боковых цепей гистидина и тирозина также обращены к полости. Остатки His и Tyr спарены и тесно связаны с остатками Trp, образующими три триады Tyr-His-Trp. Спарены и тесно связаны с остатками Trp, образующими три триады Tyr-His-Trp. Важность каждой триады для биолюминесценции стрекающих, расположенных вблизи ОН-группы 6-гидроксифенильного заместителя, влияет на цвет излучения и, следовательно, на образование возбужденного состояния продукта реакции, но практически не влияет на биолюминесценцию активность.

Аминокислотная последовательность беровина содержит 7 остатков тирозина, 5 – триптофана и 3 – гистидина, однако формирование триад в структурных моделях со встроенным пероксиаддуктом целентеразина не было обнаружено. Предполагается, что остатки, участвующие в биолюминесценции фотопротеинов гребневиков отличаются от таковых в фотопротеинах квидарий [20].

1.5 Особенности беровина

Апо-беровин представляет собой слегка асимметричный компактный глобулярный белок с *N*-концевой α -спиралью, расположенной в боковой бороздке белка [3]. Фотоинактивация его фотопротеинового комплекса

сопровождается не только потерей способности излучать свет, но и исчезновением поглощения в видимой и ближней ультрафиолетовой областях. Отсутствие абсорбционной способности, а также флуоресценция, свойственная апобелку, свободному от Ca^{2+} , указывают на то, что фотоинактивированный фотопротеин гребневика не содержит ни целентеразина, ни его производных [5]. Таким образом, облучение, скорее всего, приводит к элиминации 2-пероксианиона или продуктов его распада из целентеразин-связывающей полости белка.

Еще одной особенностью фотопротеинов гребневиков является низкое содержание или полное отсутствие остатков цистеина, что, в отличие от фотопротеинов гидромедуз, не требует добавления восстанавливающих агентов для превращения рекомбинантного апобелка в активный фотопротеин. Таким образом, эти фотопротеины могут быть более подходящими партнерами для создания слитых белков, второму компоненту которых необходимы межмолекулярные дисульфидные связи [28].

Рекомбинантный беровин получают путем экспрессии гена апобелка в *E.coli* с последующей активацией в процессе инкубации с целентеразином при pH 9.0 и в присутствии 0.5 M NaCl [5] без доступа света. Активация при стандартных физиологических внутриклеточных условиях является менее эффективной. Но даже при самых оптимальных условиях выход активного белка составляет около 50%. Предполагается, что в клетке эффективность активации должна быть выше, поэтому актуальной задачей является выявление факторов, способствующих повышению выхода фотопротеинового комплекса при активации *in vitro*.

Беровин на данное время является самым изученным из фотопротеинов гребневиков, поэтому он может являться хорошей моделью для исследования различных физико-химических и биолюминесцентных свойств этой группы белков.

1.6 Свойства мутантов беровина

Замена аминокислотных остатков в белках на другие с различными свойствами боковых радикалов позволяет выяснить их роль в реализации их основных функций. Фотопротеины не являются исключением. В N-концевой части внутренней полости беровина, сильно поляризованной, боковая цепь содержит Lys90, Trp103, Asn107 и Arg41. Их влияние на биолюминесценцию беровина было определено заменой на аминокислоты с разной полярностью и донорно-акцепторными свойствами. Введение гидрофобного Trp в положении 107 вместо Asn (N107W) привело к значительному снижению как удельной биолюминесцентной активности, так и выхода активного фотопротеина. Замена Lys90 на Glu (K90E) с отрицательно заряженным боковым радикалом или Met (K90M), боковой радикал которого является гидрофобным, также снижает удельную активность и выход активного фотопротеина. Замена Arg41 на Met приводит к получению мутанта (R41M) с самой низкой удельной активностью (0,0017% от активности беровина дикого типа). Замена Arg41 на Lys (R41K) также снижает удельную активность, и в этом случае снижение активности значительно меньше, чем для мутанта R41M. Это значит, что положительно заряженная основная группа Arg важна для эффективной биолюминесценции беровина. Центральная и C-концевая части внутренней полости беровина более гидрофобны и сформированы в основном Tyr133, Tyr134, Tyr204, Trp192, Met153, Met154, Ser130, и двумя Phe остатками, содержит одну молекулу воды, которая связана с Tyr133 через OH-группу. Большинство мутантов с замененным Tyr показывают низкую биолюминесцентную активность, за исключением мутанта Y204F, чья удельная активность такая же, как и у беровина дикого типа. Несмотря на то, что эта замена не влияет на удельную активность беровина, появление Phe вместо Tyr уменьшает выход активного белка в 2 раза. Замена того же остатка Tyr на остаток Glu с кислыми свойствами (Y204E) или на остаток Lys с основными свойствами (Y204K)

приводит к почти полной потере биолюминесцентной активности и существенно снижает выход активного фотопротеина. Примечательно, что замена Tyr133 на Phe (Y133F) или His (Y133H) снижает удельную активность и выход активного белка, а в случае замены Tyr134 на такие же остатки (Y134F и Y134H) только мутантный Y134F теряет активность и способность формировать активный фотопротеин. В отличие от Y133H, мутант Y134H сохраняет 56,7% от активности беровина дикого типа и тот же выход активного фотопротеина. Замена Met153 и Met154 на остатки с более полярными группами боковых цепей (M153Y, M154Y и M154Q) ведет к значительной потере активности и способности образовывать активный фотопротеиновый комплекс. Предполагается, что эти остатки могут быть ключевыми в формировании связывающей-полости и активации целентеразина [5].

Все фотопротеины гидромедуз, аминокислотные последовательности которых охарактеризованы на данный момент, содержат 6 остатков триптофана. Четыре из них (Trp92, Trp114, Trp135, Trp179) находятся в целентеразин-связывающей полости, а Trp18 и Trp103 располагаются за ее пределами в первой и четвертой α -спиралях, соответственно. Боковые цепи остатков Trp92 и Trp179 находятся по обе стороны от 6-(*p*-гидрокси)-фенильного кольца целентеразина; а боковые цепи Trp114 и Trp135 располагаются вблизи 2-(*p*-гидрокси)-бензильной группы целентеразина. Эти триптофаны важны в биолюминесценции, так как атомы азота индольных колец Trp92 и Trp179 формируют водородные связи с атомами кислорода 6-(*p*-гидрокси)-фенильной группы и C3-карбонилем целентеразина [32]. В беровине были обнаружены Trp61, Trp103 и Trp192. При замене Trp103 на Phe, белок сохраняет 10% биолюминесцентной активности. Выход активного фотопротеина снижается до 6-7% выхода беровина дикого типа. Однако, замена Trp103 на Tyr приводит к почти полной потере биолюминесценции [20].

Спектры биолюминесценции мутантов практически соответствуют спектру биолюминесценции беровина дикого типа ($\lambda_{\max} = 490 \pm 5$ нм). Мутация только двух остатков, Asn107 и Tyr134, приводит к изменению спектра биолюминесценции. При замене Tyr134 на Phe максимум излучения сдвигается в сторону более коротких длин волн ($\lambda_{\max} = 482-483$ нм), в то время как замена Asn107 на Trp приводит к более значительному смещению спектра биолюминесценции ($\lambda_{\max} = 535$ нм) [20].

Таким образом, анализ литературных данных показывает что, наиболее изученным фотопротеином гребневиков является беровин из ктенофор *Beroe abyssicola*. Схожесть фотопротеинов гидромедуз и гребневиков в большей степени является функциональной, поскольку их вторичная структура и условия активации аналогичны (целентеразин в качестве субстрата, инициация биолюминесцентной реакции ионами кальция). К тому же, фотопротеины гребневиков теряют способность к биолюминесценции при облучении светом в видимом диапазоне длин волн, чего не происходит у фотопротеинов гидромедуз, идентичность аминокислотных последовательностей фотопротеинов гребневиков и составляет не более 29% [5]. Это указывает на то, что возможно, аминокислотные остатки, участвующие в окислении субстрата, формировании фотопротеинового комплекса и эмиттера, у фотопротеинов ктенофор и гидромедуз могут различаться.

Исследование свойств фотопротеинов осуществляется различными методами, в том числе и с помощью сайт-направленного мутагенеза [20, 33], позволяющего проводить точечные замены аминокислотных остатков. Создание и исследование мутантных биолюминесцентных белков помогает в определении роли отдельных аминокислотных остатков, а также используется для получения новых свойств у белков, которые могут быть использованы в прикладных исследованиях.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Получение экспрессионной конструкции pQE60-BAwt

Нуклеотидная последовательность, содержащая кодирующую часть гена беровина с сайтами для рестрикции NcoI и BamHI была получена с помощью ПЦР с Tersus-полимеразой (Евроген, Россия). Для синтеза гена беровина использовали pET22b-BAwt в качестве матрицы и следующие праймеры:

Прямой: 5'-САТТАССАТGGАТGACTGAACGTCTGAACGAGC-3' с сайтом для рестрикции NcoI.

Обратный: 5'-САТАТGGATCСТТАGТАСТТАТААGCGТАGACTCCGTC-3' с сайтом для рестрикции BamHI.

Сайты рестрикции выделены жирным шрифтом с подчеркиванием.

Программа амплификации:

95°C-30сек	
95°C-30сек	} 25 циклов
56°C-30сек	
72°C-1 минута	
72°C-7 минут	

где 95°C – температура денатурации матрицы, 56°C – температура отжига праймеров, 72°C – температура полимеризации.

Аmplифицированный фрагмент ДНК был обработан рестриктазами Bsp 19I (аналог NcoI) (СибЭнзим, Россия) и BamHI (СибЭнзим, Россия). Лигирование вставки в вектор pQE60 осуществлялось T4 ДНК-лигазой

(СибЭнзим, Россия) по указанным сайтам рестрикции. Клетки *E. coli* (штамм XL1Blue) были трансформированы полученной плазмидой, содержащей ген беровина. Выделение плазмидной ДНК проводили с помощью набора Plasmid Miniprep (Евроген, Россия), согласно протоколу. Правильность нуклеотидных последовательностей была подтверждена секвенированием.

2.2. Ненаправленный мутагенез на основе pQE60-BAwt

В качестве матрицы для неспецифического мутагенеза использовали ранее созданную экспрессионную плазмиду pQE60-BAwt, содержащую кодирующую часть гена беровина дикого типа. Мутагенез (один раунд) проводили с использованием набора Diversity PCR Random Mutagenesis Kit (Clontech, США), в соответствии с прилагаемым протоколом. Продукты реакции анализировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. Далее проводили очистку ПЦР-продуктов с помощью QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, США), рестрикцию NcoI и BamHI, лигирование с вектором и трансформацию штамма XL1Blue клеток *E. coli*.

Программа амплификации:

94°C-30сек	} 25 циклов
94°C-30сек	
58°C-20сек	
68°C-1 минута	

где 94°C – температура денатурации матрицы, 58°C – температура отжига праймеров, 68°C – температура полимеризации.

2.3 Скрининг на колониях с использованием экспрессионных штаммов *E.coli*

Для скрининга клетки *E. Coli* XLIBLue, трансформированные мутантной плазмидой pQE60-BA, высевали на чашки Петри с LB-агаром, содержащим 200 мг/л ампициллина. Представительность библиотеки клонов составила 1120 колоний. Колонии обильно опрыскивали 40 мМ водным раствором ИПТГ в H₂O и инкубировали в течение 1 ч при 37°C для индукции экспрессии гена. Затем колонии обрабатывали 0,07 мМ раствором целентеразина в DMSO, инкубировали при комнатной температуре сутки без доступа света, после чего проводили скрининг на наличие биолюминесцентного сигнала от клеток на установке для измерения биолюминесценции и флуоресценции (НЛЦ, Нижний Новгород). Запуск биолюминесцентной реакции осуществляли опрыскиванием колоний 100 мМ раствором CaCl₂ в 100 мМ Трис-HCl pH 8,5, после чего визуализировали свечение с помощью CCD-камеры в течение 3 минут.

2.4 Сайт-направленный мутагенез и получение штаммов-продуцентов

Сайт-направленный мутагенез проводили с использованием набора QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, США). В качестве матрицы использовали ранее созданную экспрессионную плазмиду pET22-BAwt [5], содержащую кодирующую часть гена боровина дикого типа, и специфические праймеры (Таблица 1).

В результате было получено 4 мутанта с заменами K90E, E118V, S132P и E118V/S132P. Наличие соответствующих мутаций подтверждали определением нуклеотидных последовательностей ДНК вставки в результирующей плазмиде. Далее плазмиды с мутантными генами боровина были использованы для трансформации штамма BL21(DE3) Codon Plus RIPL *E.coli*.

Таблица 1 – Праймеры сайт-направленного мутагенеза

Мутация	Праймеры
K90E	Прямой: 5'-GAGTTTTCTTTTTGCACGAGGGAGTGGAGC-3' Обратный: 5'-GCTCCACTCCCTCGTGCAAAAAGAAAАСТС-3'
E118V	Прямой: 5'-GAGAGAGAAAGAGTGCGACGAGGAGAAC-3' Обратный: 5'-GTTCTCCTCGTCGCACTCTTTCTCTCTC-3'
S132P	Прямой: 5'-CACTTCTCTCCAACCCTTACTACGATGTAСТG-3' Обратный: 5'-CAGTACATCGTAGTAAGGGTTGGAGAGAAGTG-3'

Программа амплификации:

95°C-30сек

95°C-30сек

56°C-1 минута

68°C-14 минут

17 циклов

где 95°C – температура денатурации матрицы, 56°C – температура отжига праймеров, 68°C – температура полимеризации.

Трансформацию проводили методом теплового шока: 1 мкл раствора плазмиды добавляли к 20 мкл суспензии клеток *E. coli*, инкубировали в ледяной бане в течение 30 минут, нагревали при температуре 42°C в течение 25 секунд, затем добавляли 0,2 мл SOC-среды и инкубировали 1 час при 37°C, после чего 50 мкл суспензии высевали на чашки Петри с LB-агаром, содержащим ампициллин 200 мкг/мл, и инкубировали при 37°C в течение ночи. В дальнейшем бактериальные колонии были использованы для получения апо-белка.

2.5 Очистка апо-беририна

Наращивание бактериальной культуры проводили путем высева клеток в стеклянную колбу, содержащую 100 мл LB-среды с 200 мкг/мл ампициллина, которую помещали в шейкер-инкубатор Excella E25 (New Brunswick, США) и растили при 37°C с перемешиванием (220 об/мин) до достижения оптической плотности культуры $OD_{590}=0,6$. Индукцию синтеза белка осуществляли добавлением раствора ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ, после чего растили еще 3 часа.

Для получения телец включения, содержащих апо-белок, клеточный осадок ресуспендировали в буфере 20 мМ Трис-НСl, pH 7,0, а затем клетки разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора УЗДН-2Т (РосПрибор, Россия) трехкратной обработкой в течение 20 секунд с интервалами по 20 секунд на льду. Далее образец центрифугировали с помощью центрифуги Avanti J-E (Beckman Coulter, США) 10000 g 10 мин, супернатант удаляли. Осадок, содержащий тельца включения, последовательно отмывали 0,9% раствором NaCl в 20 мМ Трис-НСl pH 7,0 и 1% раствором Тритона X-100 в том же буфере. После каждой промывки проводили центрифугирование при тех же условиях.

Тельца включения растворяли в 6 М растворе мочевины в 20 мМ Трис-НСl pH 7,0. Затем образец вновь центрифугировали 10 минут при 10000 g.

Очистку апобелка проводили с помощью ионообменной хроматографии на колонке DEAE FF (GE Healthcare, США) в линейном градиенте NaCl (0 – 1 М) с использованием хроматографической системы BioLogic LP (Bio-Rad, США). Для хроматографии использовали следующие буферы: буфер А – 6М раствор мочевины в 20 мМ Tris-НСl, pH 7,0; буфер В – 1 М NaCl в буфере А.

Концентрацию белка после обессоливания на колонке HiTrap Desalting (GE Healthcare, США) определяли оптическим методом по поглощению при

280 нм с использованием расчетного коэффициента экстинкции для апо-белка.

2.6 Очистка заряженного беровина

Белок активировали инкубацией с целентеразином (молярное соотношение белок:целентеразин 1:1,1) при 4°C в течение ночи. Очистку заряженного белка проводили с помощью ионообменной хроматографии на колонке HiTrap Q HP5 (GE Healthcare, США) в линейном градиенте NaCl (0-0,5 М), скорость элюции 2 мл/мин. Выход активного фотопротеина оценивали с помощью уравнения :

$$Y (\%) = [C_{\text{charged}} / (C_{\text{charged}} + C_{\text{apoprotein}})] \times 100, \quad (1)$$

где C_{charged} и $C_{\text{apoprotein}}$ – концентрации белка в пиках, соответствующих активному фотопротеину и апопротеину при хроматографии на HiTrap Q HP5, соответственно.

Все манипуляции с активными фотопротеинами проводили без доступа света. Концентрацию белка определяли по методу Лоури [34].

2.7 Измерение билюминесцентной активности и константы спада билюминесцентной реакции

Билюминесцентную активность измеряли с помощью билюминометра БЛМ-8812 (Оберон-К СКТБ "Наука", Россия) путем быстрого внесения 10 мкл раствора белка в 20 mM Трис-НСl pH 7,0, 5 mM ЭДТА, ~0,3 М NaCl с помощью шприца CR 700–20 (Hamilton, США) в кювету люминометра, содержащую 490 мкл измерительного буфера (50 mM Трис-НСl, pH 8,8, 2 mM CaCl₂). Каждое измерение проводили не менее 3-х раз. В качестве основного результата брали среднее арифметическое трех измерений с учетом ошибки среднего.

Максимальную кальций-независимую билюминесценцию измеряли, помещая 500 мкл очищенного фотопротеина в 20 mM Трис-НСl pH 7,0, 5 mM

ЭДТА, ~0,3 М NaCl в кювету люминометра при 23 °С, пока световой сигнал не выйдет на стационарный уровень. Удельную активность определяли как количество единиц максимальной активности на 1 мг белка. Относительную кальций-независимую биолюминесценцию рассчитывали как отношение удельной активности в бескальциевых условиях к максимальной удельной активности при добавлении кальция.

Константу спада биолюминесцентной реакции рассчитывали как отношение изменения интенсивности биолюминесценции за 5 секунд к площади под кривой спада биолюминесцентного сигнала. Измерения проводили при 23 °С.

2.8 Измерение спектров биолюминесценции и флуоресценции

Спектры флуоресценции и биолюминесценции измеряли с помощью спектрофлуориметра Cary Eclipse (Varian, США) при следующих условиях: для биолюминесценции – ширина щели 5 нм, диапазон от 370 нм до 600 нм, напряжение на ФЭУ 1000 В; для флуоресценции – ширина щели 5 нм, диапазон от 460 нм до 600 нм, длина волны облучения 350 нм, напряжение на ФЭУ 600 В. Измерения проводили в буфере 50 мМ бис-Трис пропан рН 8,5, биолюминесценцию инициировали добавлением 40мкл 100 мМ раствора CaCl₂ в том же буфере.

2.9 Фото- и термо- инактивация

Фотоинактивацию проводили следующим образом: 200 мкл раствора фотопротеина с концентрацией 0,09 мг/мл в буфере (20 мМ Трис-HCl, рН 7,0, 5 мМ ЭДТА) в микропробирке типа Эппендорф помещали на лед и в течение часа облучали лампой накаливания, расположенной на расстоянии ~10 см от образца, отбирая аликвоты для измерения биолюминесцентной активности каждые 10 минут. Термоинактивацию проводили с аналогичными образцами белка, помещая их в термостат при 37°C в течении 1 часа.

2.10 Приборы и реактивы

Целентеразин высокой степени чистоты был получен от NanoLight Technology Prolume Ltd. (США). В качестве клеток-хозяев использовали бактериальные штаммы *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus (RIPL) (Stratagene, США) и XL1Blue. В работе был использован вектор pET22b (Novagen, США) и pQE60 (QIAGEN, США). При скрининге использовались: LB-среда, ампициллин, изопропил β -D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) (Thermo Scientific, США). Измерения световой эмиссии проводили с помощью биолюминометра БЛМ-8812 (Оберон-К СКТБ «Наука», Красноярск, Россия). Биолюминесцентный сигнал от клеток измеряли на установке для измерения биолюминесценции и флуоресценции (НЛЦ, Нижний Новгород).

Так же при работе использовались шейкер-инкубатор Excella E25 (New Brunswick, США), спектрофотометр (Bio-Rad, США), спектрофлуориметр Cary Eclipse (Varian, США), миксер Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, США), ультразвуковой дезинтегратор УЗДН-2Т (У-РосПрибор, Россия), хроматографические колонки HiTrap DEAE FF и HiTrap Q HP5 (GE Healthcare, США).

Сравнение нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы GeneRunner (<http://www.generunner.net/>).

3 РЕЗУЛЬТАТЫ

Изъяты страницы 26-43 в связи с авторским правом

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рекомбинантные фотопротеины гребневиков наиболее эффективно образуют фотопротеиновый комплекс с целентеразином в щелочных условиях и при высокой концентрации соли, что препятствует их использованию в качестве репортерных молекул *in vivo*. Поэтому поиск мутантных вариантов рекомбинантного фотопротеина беровина, активирующихся при нейтральных значениях pH, важен как для понимания механизмов активации, так и для создания новых репортерных молекул для биоимиджинга.

В результате данной работы была разработана методика скрининга на колониях для анализа экспрессии и фолдинга фотопротеинов гребневиков и их мутантных вариантов в клетках *E. coli* XL1Blue.

С помощью ненаправленного мутагенеза были найден мутантный вариант беровина K90E, с оптимумом активации при условиях, близких к физиологическим, а также получена экспрессионная конструкция для получения апо-белка в неограниченных количествах в лабораторных условиях с помощью экспрессии его гена в бактериальной системе с использованием клеток *E. coli*. Мутант K90E показал наибольший выход активного фотопротеинового комплекса при: pH 7,0 в присутствии 0,3 М NaCl. Фотопротеин гребневиков с такими характеристиками был получен впервые. Несмотря на то, что выход активного белка K90E и его удельная активность ниже, чем у беровина дикого типа, при определенной коррекции с помощью дополнительных мутаций или использования синтетических аналогов субстрата возможно получить белок с характеристиками, подходящими для аналитического применения.

Мутации E118V, S132P и E118V/S132P не показали ожидаемых результатов и имели условия активации как у беровина дикого типа.

Таким образом, замена аминокислотного остатка активного центра с положительным зарядом боковой цепи на другой с отрицательным зарядом может приводить к смене условий формирования фотопротеинового комплекса на близкие к внутриклеточным. Поиск и корректировка мутантных вариантов, способных активироваться в физиологических условиях, будет продолжен.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ИПТГ – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид

ПААГ – полиакриламидный гель

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

DEAE – диэтиламиноэтил

LB – Lysogeny Broth

SOC – Super Optimal Broth for Catabolic repression

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Widder, E.A. Bioluminescence in the ocean: origins of biological, chemical, and ecological diversity // *Science*. - 2010. – V. 328. – P. 704-708.
2. Powers M.L. et.al, Expression and characterization of the calcium-activated photoprotein from the ctenophore *Bathocyroe fosteri*: insights into light-sensitive photoproteins // *Biochemical and biophysical research communications*. — 2013. — Т. 431. – №2. — P. 360-366.
3. Stepanyuk, G. et al. Spatial structure of the novel light-sensitive photoprotein berovin from the ctenophore *Beroe abyssicola* in the Ca^{2+} -loaded apoprotein conformation state // *Biochimica et Biophysica Acta*. - 2013. – V. 1834. - №10. – P 2139-2146.
4. Еремеева Е. В. Формирование активного фотопротеинового комплекса на примере обелина и акворина и их мутантных форм дис. – Красноярск: ЕВ Еремеева, 2010.
5. Markova, S.V. et al. The light-sensitive photoprotein berovin from the bioluminescent ctenophore *Beroe abyssicola*: A novel type of Ca^{2+} -regulated photoprotein // *FEBS Journal*. – 2012. – V.279. - №5. – P. 856-870.
6. Shimomura O., Johnson F. H., Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea* // *Journal of cellular and comparative physiology*. – 1962. – V. 59. – №. 3. – P. 223-239.
7. Shimomura O., Johnson F. H., Saiga Y. Extraction and properties of halistaurin, a bioluminescent protein from the hydromedusan *Halistaura* // *Journal of cellular and comparative physiology*. – 1963. – V. 62. – №. 1. – P. 9-15.
8. Levine L. D., Ward W. Isolation and characterization of a photoprotein, "phialidin", and a spectrally unique green-fluorescent protein from the

- bioluminescent jellyfish *Phialidium gregarium* //Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry. – 1982. – V. 72. – №. 1. – P. 77-85.
9. Campbell A. K. Extraction, partial purification and properties of obelin, the calcium-activated luminescent protein from the hydroid *Obelia geniculata* // Biochemical Journal. – 1974. – V. 143. – №. 2. – P. 411-418.
10. Бондарь В. С. Физико-химические свойства фотопротейна из гидроидного полипа *Obelia longissima* //Биохимия. – 1992. – Т. 57. – С. 1481-1490. Despa F., Orgill D. P., Lee R. C. Molecular crowding effects on protein stability// Annals-New York Academy of Sciences.– 2006. – Т. 1066. – P. 54-66.
11. Golz S. et al. Isolated photoprotein bolinopsin, and the use thereof //Patent No. WO. – 2005. – P. 2005000885-A1.
12. Aghamaali M. R. et al. Cloning, sequencing, expression and structural investigation of mnemiopsin from *Mnemiopsis leidyi*: an attempt toward understanding Ca²⁺-regulated photoproteins //The protein journal. – 2011. – V. 30. – №. 8. – P. 566-574.
13. Высоцкий, Е.С. Кальций-регулируемые фотопротейны морских кишечнорастворимых / Е.С. Высоцкий, С.В. Маркова, Л.А. Франк // Молекулярная биология. – 2006. – Т. 40, № 3. – С. 404–417.
14. Tomilin F.N et al. Unusual shift in the visible absorption spectrum of an active ctenophore photoprotein elucidated by time-dependent density functional theory // Photochem Photobiol Sci. – 2021. – V 20. – №. 4. – P. 559-570.
15. Shimomura, O. Bioluminescence: Chemical Principles and Methods // World Scientific. Singapore. – 2006.
16. Tsuji F. I. et al. Molecular evolution of the Ca²⁺- binding photoproteins of the hydrozoa //Photochemistry and photobiology. – 1995. – V. 62. – №. 4. – P. 657-661.

17. Head, J.F. The crystal structure of the photoprotein aequorin at 2.3 Å resolution. // S. Inouye, K. Teranishi & O. Shimomura // Nature. –2000. –V. 405–P. 372-376.
18. Liu, Z.J. Atomic resolution structure of obelin: soaking with calcium enhances electron density of the second oxygen atom substituted at the C2-position of coelenterazine/ E.S. Vysotski, L. Deng, J. Lee, J. Rose & B.C. Wang // Biochem Biophys Res Commun. – 2003. –V. 311. –P. 433-439.
19. Titushin M. S. et al. NMR-derived topology of a GFP-photoprotein energy transfer complex // Journal of Biological Chemistry. – 2010. – V. 285. – №. 52. – P. 40891-40900.
20. Burakova, L. P. et al. Role of certain amino acid residues of the coelenterazine-binding cavity in bioluminescence of light-sensitive Ca²⁺-regulated photoprotein berovin/ L.P. Burakova, G.A. Stepanyuk, E.V. Eremeeva, E.S. Vysotski // Photochem Photobiol. Sci. – 2016. – V.15. – P. 691-704.
21. Jafarian V. et al. A unique EF-hand motif in mnemiopsin photoprotein from *Mnemiopsis leidyi*: Implication for its low calcium sensitivity // Biochemical and biophysical research communications. – 2011. – V. 413. – №. 2. – P. 164-170.
22. Powers M. L. et al. Expression and characterization of the calcium-activated photoprotein from the ctenophore *Bathocyroe fosteri*: insights into light-sensitive photoproteins // Biochemical and biophysical research communications. – 2013. – V. 431. – №. 2. – P. 360-366.
23. Markova, S.V., Vysotski, E.S., Blinks, J.R., Burakova, L.P., Wang, B.C., Lee, J. Obelin from the bioluminescent marine hydroid *Obelia geniculata*: cloning, expression, and comparison of some properties with those of other Ca²⁺-regulated photoproteins // Biochemistry. – 2002. – 19. – P. 2227-2236.

24. Moncrief, N.D., Kretsinger, R.H., Goodman, M. Evolution of EF-hand calciummodulated proteins. I. Relationships based on amino acid sequences // *J. Mol. Evol.* – 1990. – 30. – P. 522–562.
25. Ward, W.W., Seliger, H.H. Action spectrum and quantum yield for the photoinactivation of mnemiopsin, a bioluminescent photoprotein from the ctenophores *Mnemiopsis sp.* // *Photochemistry and Photobiology.* – 1976. – V. 23. – P. 351–363.
26. Burakova, L.P., Natashin, P.V., Malikova, N.P., Niu, F., Pu, M., Vysotski, E.S., Liu, Z.J. All Ca^{2+} -binding loops of light-sensitive ctenophore photoprotein berovin bind magnesium ions: The spatial structure of Mg^{2+} -loaded apo-berovin // *J. Photochem. Photobiol. B.* – 2016. – 154. – P. 57–66
27. Molakarimi M. et al. Reaction mechanism of the bioluminescent protein mnemiopsin1 revealed by X-ray crystallography and QM/MM simulations // *Journal of Biological Chemistry.* – 2019. – V. 294. – №. 1. – P. 20-27.
28. Burakova L. P. et al. Recombinant Ca^{2+} -regulated photoproteins of ctenophores: current knowledge and application prospects // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2019. — V. 103. – №15. — P.5929-5946.
29. Cormier M. J. et al. Evidence for similar biochemical requirements for bioluminescence among the coelenterates // *Journal of cellular physiology.* – 1973. – V. 81. – №. 2. – P. 291-297.
30. Liu Z. J. et al. Structure of the Ca^{2+} - regulated photoprotein obelin at 1.7 Å resolution determined directly from its sulfur substructure // *Protein Science.* – 2000. – V. 9. – №. 11. – P. 2085-2093.
31. Vysotski E. S., Lee J. Ca^{2+} -regulated photoproteins: structural insight into the bioluminescence mechanism // *Accounts of chemical research.* – 2004. – V. 37. – №. 6. – P. 405-415.
32. Vysotski E. S., Lee J. Bioluminescent mechanism of Ca^{2+} -regulated photoproteins from three-dimensional structures // *Luciferases and*


- fluorescent proteins: principles and advances in biotechnology and bioimaging. – 2007. – P. 19-41.
33. Mahdavi A. et al. Site-directed mutagenesis of photoprotein mnemiopsin: implication of some conserved residues in bioluminescence properties //Photochemical & Photobiological Sciences. – 2013. – V. 12. – №. 3. – P. 467-478
34. Lowry O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent //Journal of biological chemistry. – 1951. – V. 193. – P. 265-275.

Министерство науки и высшего образования РФ
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой


 Т. Г. Волова

«24» июня 2022 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА


Влияние аминокислотных замен на фолдинг и свойства
рекомбинантного фотопротейна беровина гребневика *Beroe abyssicola*
06.03.01 - Биология

Научный руководитель


подпись, дата

к.б.н. Л.П. Буракова
инициалы, фамилия

Выпускник


подпись, дата

Н.В. Рукосуева
инициалы, фамилия

Красноярск 2022