

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

« ____ » _____ 2024г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

**Исследование люциферазы *Metridia* как комплементационного
репортера для мониторинга белок-белковых взаимодействий в клетках**

06.03.01 – Биология

06.04.01.01 –Микробиология и биотехнология

Научный руководитель	_____	к.б.н.	<u>С.В. Маркова</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	
Выпускник	_____		<u>А.Г. Селиверстова</u>
	подпись, дата		
Рецензент	_____	к.б.н.	<u>М.Ю. Трусова</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	

Красноярск 2024

РЕФЕРАТ

Магистерская работа по теме: «Исследование потенциала люциферазы *Metridia* как комплементационного репортера для мониторинга белок-белковых взаимодействий в клетках» состоит из 48 страниц текстового документа, 27 рисунков, 2 таблиц и 35 источников использованной литературы.

БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ РЕПОРТЕР, КОПЕПОДНАЯ ЛЮЦИФЕРАЗА, КОМПЛЕМЕНТАЦИЯ БЕЛКОВЫХ ФРАГМЕНТОВ, *METRIDIA LONGA*, ЦЕЛЕНТЕРАЗИН.

Цель данной работы: в рамках исследования возможностей создания комплементационного репортера на основе люциферазы *Metridia* для анализа белок-белковых взаимодействий проверить уровень восстановления активности различных фрагментов люциферазы при их реассоциации.

Для обеспечения стерического сближения фрагментов люциферазы была выбрана последовательность дрожжевого лейцинового «зиппера» размером 31 а/к остаток – фрагмента ДНК-связывающего транскрипционного фактора GCN4/YEL009C. Для люциферазы *Metridia* были сконструированы и исследованы пары N- и C- концевых фрагментов люциферазы для поиска комбинаций, наиболее эффективно восстанавливающих биолюминесцентную активность репортера при стерическом сближении. На основе люциферазы *Metridia* (ML7) удалось разработать репортерную систему для оценки белок-белковых взаимодействий. Значимая комплементация была обнаружена в случае варианта ML72n-Zip + ML73n-Zip. Максимальная внутриклеточная биолюминесцентная активность, наблюдаемая при комплементации конструкторов sML2n-Zip и sML3n-Zip в лизатах HEK293 составила приблизительно 10 % по сравнению с активностью полноразмерной люциферазы.

СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТ	2
СОДЕРЖАНИЕ	3
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	8
1.1. Люцифераза <i>Metridia longa</i> как биолюминесцентный репортерный белок 8	
1.2 Технологии биолюминесцентного имиджинга.....	9
1.3 Комплементация белковых фрагментов репортера для оценки белок- белковых взаимодействий (РСА)	10
1.4 Дрожжевой лейциновый zipper белка GCN4/YEL009C как модельный объект для стерических сближений	12
1.5 FKBP-рапамицин-FRB как система для димеризации белковых фрагментов	13
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	15
2.1 Материалы	15
2.2 Методы.....	17
2.2.1 Трансформация компетентных клеток <i>E. coli</i>	17
2.2.2 Выделение плазмидной ДНК QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) ...	18
2.2.3. Олигонуклеотид-направленный мутагенез	18
2.2.4. Очистка рестрикционных фрагментов ДНК.....	19
2.2.5. Агарозный ДНК электрофорез	19
2.2.6. Обработка ДНК специфическими эндонуклеазами	19
2.2.7. Слияние двух фрагментов ДНК	19
2.2.8. Реакция амплификации	20

2.2.9 Лигирование	20
2.2.10 Очистка ПЦР продукта.....	20
2.2.11 Трансфекция в НЕК293.....	21
2.2.12. Приготовление компетентных клеток XL1-Blue.....	22
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	23
3.1 Подбор вариантов разрыва молекулы и создание генно-инженерных конструкций исходя из данных о модели фермента люциферазы и экзон-интронной структуры.	24
3.2 Экспрессия фрагментов люциферазы в клетки человека НЕК293 (Human embryonic kidney).....	37
3.3 FKBP-рапамицин-FRB как система для димеризации белковых фрагментов	40
ВЫВОДЫ.....	45
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	46

ВВЕДЕНИЕ

Изучение взаимодействий белков внутри клетки представляет собой ключевой аспект современной протеомики. Белок-белковые взаимодействия играют ключевую роль в важных клеточных процессах таких как транскрипция, репликация, мембранный транспорт и многое другое. Понять, как осуществляется поддержание жизни клетки, невозможно без идентификации всех взаимодействующих друг с другом белков, кодируемых геномом. Одним из способов изучения белок-белковых взаимодействий является метод комплементации белковых фрагментов (PCA). Суть метода заключается в способности белка-репортера восстанавливать свою активность при объединении двух белковых фрагментов во время их стерического сближения. По активности репортера можно судить о взаимодействии двух целевых белков, каждый из которых слит с отдельным таким фрагментом.

Использование биолюминесцентных белков в качестве репортеров считается многообещающим направлением. В качестве популярных белковых молекул выделяют люциферазы из кораллов, светляков и ракообразных, а также фотопротеины кишечнорастворимых. Наиболее важными характеристиками при выборе оптимального репортера являются спектральные параметры белков, их размеры и наличие кофакторов, необходимых для осуществления биолюминесцентной реакции. Особенными преимуществами среди биолюминесцентных репортерных молекул обладают люциферазы, выделенные из морских копепод семейства *Metridinae* – люциферазы, клонированные из организмов *Gaussia princeps* и *Metridia longa*.

Люциферазы копепод – это небольшие секреторные белки, имеющие сигнальный пептид, который отвечает за яркую секретируемую биолюминесценцию некоторых морских копепод. Преимуществами таких люцифераз являются – небольшой размер, высокая люминесцентная активность и стабильность, включая термостабильность. Эти характеристики делают секретируемые люциферазы копепод очень привлекательными кандидатами в

качестве репортерных белков, которые особенно полезны для неразрушающих репортерных анализов и для высокопроизводительного формата.

Данные люциферазы, характеризующиеся высокой степенью гомологии аминокислотных последовательностей, являются перспективными репортерными молекулами для технологий биолюминесцентного имиджинга. Эти белки обладают небольшой молекулярной массой (до 23 кДа) и требуют только наличия субстрата и кислорода для протекания биолюминесцентной реакции. Биолюминесцентная активность этих люцифераз в эукариотических клетках при использовании их в качестве репортеров в 200 раз выше, чем у люциферазы кораллов *Renilla*. В структуре аминокислотных последовательностей данных люцифераз обнаружены N-концевые сигнальные пептиды, которые отщепляются от белков в процессе секреции в окружающую среду.

Наиболее исследованными представителями семейства люцифераз копепод являются первые клонированные гомологичные люциферазы GrLuc и MLuc из копепод *Gaussia princeps* и *Metridia longa* соответственно. Обе люциферазы сразу после клонирования стали успешно применять в качестве биолюминесцентных репортёров *in vivo* и *in vitro*. На данный момент сфера их применения успешно расширяется. Высокая активность и стабильность клонированной в лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН люциферазы *Metridia longa* предполагает большой потенциал ее использования в качестве биолюминесцентного репортера для различных аналитических приложений. Для использования MLuc люциферазы как репортера белок-белковых взаимодействий методом комплементации белковых фрагментов необходимо определить возможные комплементирующие фрагменты люциферазы и их репортерный потенциал.

- **Цель данной работы:** Исследовать потенциал фрагментов люциферазы *Metridia* как комплементационного репортера для мониторинга белок-белковых взаимодействий в клетках.

В задачи работы входило:

- 1) Подбор вариантов разрыва молекулы на потенциально комплементирующие фрагменты исходя из 1) смоделированной пространственной структуры и 2) использования данных по экзон-интронной структуре геномного гена люциферазы.
- 2) Создание экспрессионных генно-инженерных конструкций на основе люциферазы *Metridia*.
- 3) Экспрессия фрагментов люциферазы *Metridia*, потенциально способных к комплементации, в клетках человека HEK293
- 4) Оценка способности отдельных фрагментов люциферазы *Metridia* к восстановлению полной функциональной активности люциферазы.

Работа проводилась на базе лаборатории фотобиологии Института биофизики СО РАН, г. Красноярск.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Люцифераза *Metridia longa* как биолюминесцентный репортерный белок

В настоящий момент целентеразин-зависимые люциферазы из копепод *Gaussia* и *Metridia*, содержащие природный сигнальный пептид представляют собой один из наиболее удобных аналитических инструментов для задач современной молекулярной биологии, поскольку позволяют с высокой чувствительностью отслеживать события внутри клетки. Это свойство хорошо подходит для применения в биомедицинских исследованиях и разработке клеточных анализов. Люцифераза *Metridia longa* широко используется в качестве биолюминесцентных сенсоров *in vivo* и *in vitro*. Преимуществами данной люциферазы могут являться: маленький молекулярный вес, по сравнению с другими люциферазами, высокая биолюминесцентная активность, термостабильность, естественная секреция [1] [2]. Также, для люцифераз ракообразных необходим только субстрат для свечения в виде целентеразина, что является преимуществом в сравнении с другими люциферазами, например, люциферазами насекомых, свечение которых зависит от дополнительных кофакторов, таких как АТФ и ионы магния. [3].

Обычно ферменты состоят из различных функциональных доменов. В последовательностях люциферазы *Metridia longa* принято выделять три части: N-концевой сигнальный пептид из 17 аминокислот, отвечающий за секрецию, N-концевой вариабельный домен, и С-концевой каталитический консервативный домен, образованный двумя повторами. Эти повторы содержат десять высококонсервативных цистеиновых остатков, что предполагает наличие дисульфидных связей. Стоит отметить, что ранее было показано, что N-концевой вариабельный домен не участвует в катализе, и, соответственно, не влияет на активность люциферазы, поскольку его делеция не нарушает функцию биолюминесценции. [4].

В настоящий момент, секретируемые изоформы люциферазы копепод *Metridia longa* применяются в качестве биоллюминесцентных репортеров в различных исследованиях и успешно используются для анализа *in vitro* [5] и *in vivo* в клетках млекопитающих. Например, иммунологические анализы, анализ комплементации белковых фрагментов, неинвазивная биоллюминесцентная визуализация *in vivo* [6].

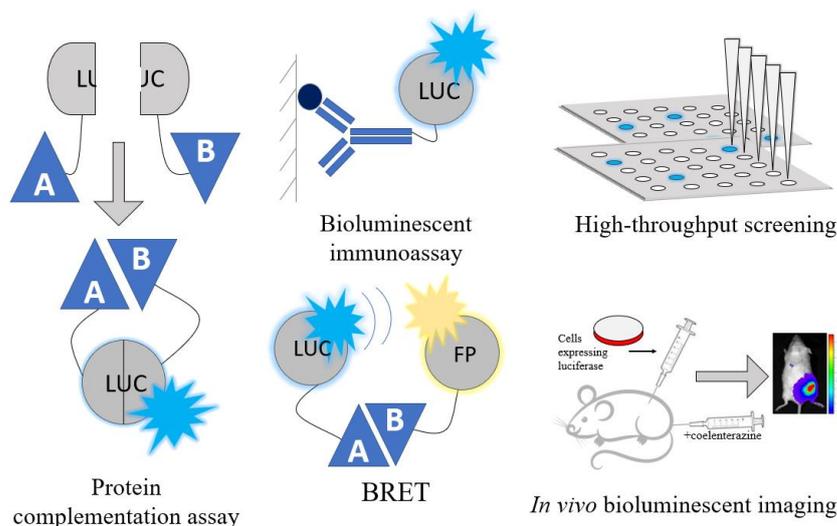


Рисунок 1– Схематическое представление основных областей аналитического применения люциферазы копепод (адаптировано из [6])

В данной работе использовалась высокоактивная изоформа люциферазы *Metridia longa* – ML7. Данная люцифераза примерно в 3 и 6 раз превышает биоллюминесцентную активность других изоформ – ML164 и ML39, а также обладает наиболее маленьким весом среди других изученных люцифераз – всего 16.5 кДа. [7].

1.2 Технологии биоллюминесцентного имиджинга

Технология визуализации живых клеток в режиме реального времени имеет решающее значение для понимания биологических явлений. Для этой цели были разработаны биоллюминесцентные репортеры, которые являются чувствительными и удобными инструментами.

Биоллюминесцентные технологии являются чрезвычайно перспективными для визуализации процессов в живом организме *in vivo*. Прежде всего,

использование билюминесценции для визуализации не требует внешних источников света, так как световой сигнал возникает в результате ферментативного окисления специфического субстрата с помощью специфического белка – люциферазы.

Клетки, меченные геном билюминесцентного репортера, либо исследуют в клеточной культуре, либо вводят в лабораторное животное, например, мышь. Поскольку в клетках млекопитающих не содержатся билюминесцентные субстраты, свечение исследуемых клеток будет наблюдаться только при добавлении субстрата извне. Оба используемых субстрата для билюминесцентного имиджинга *in vivo* – целентеразин и D-люциферин – быстро и эффективно проникают сквозь клеточные мембраны, поэтому раствор субстрата добавляют к клеточной культуре. [8].

1.3 Комплементация белковых фрагментов репортера для оценки белок-белковых взаимодействий (РСА)

Одним из методов обнаружения белок-белковых взаимодействий является комплементация белковых фрагментов. Комплементация белковых фрагментов – способ исследования белок-белковых взаимодействий, где белок-репортер разделен на два нефункциональных фрагмента, которые в виде фьюжинов слиты с двумя целевыми белками. При взаимодействии целевых белков друг с другом фрагменты репортерного белка также сближаются и формируют активный фермент, регистрация активности которого позволяет оценить взаимодействие целевых белков. Целевые белки по отдельности сливаются в единый полипептид с комплементарными фрагментами репортерного белка. Если белки взаимодействуют, то фрагменты репортера собираются вместе, складываются в нативную структуру с восстановлением функциональной активности [9].

В настоящее время билюминесцентные репортеры можно разделить на два типа: фотопротеины и люциферазы [10]

В качестве репортеров для детекции белок-белковых взаимодействий методом комплементации белковых фрагментов, в том числе для мониторинга

белок-белковых взаимодействий в клетках млекопитающих предложено использовать несколько белков, включая: дигидрофолатредуктазу [11], бета-галактозидазу [12], бета-лактамазу [13], люциферазу из коралла *Renilla* [14], люциферазу из копепод *Gaussia* [15].

Создано несколько различных вариантов систем расщепленного репортера на основе фрагментов зеленого флуоресцентного белка, синего, голубого, желтого и других флуоресцентных белков. [16] [17] [18] Цвет различных комбинаций фрагментов флуоресцентных белков в основном зависит от N-концевого фрагмента и в меньшей степени от С-концевого фрагмента. Эта особенность позволяет регистрировать несколько белок-белковых взаимодействий внутри клетки, определять их порядок, а также выявлять дифференциальные различия [17]. Использование флуоресцентных белков-репортеров также открывает возможность определения внутриклеточной локализации объекта исследования путем микроскопирования. Основными недостатками флуоресцентных репортеров являются довольно высокий фон, обусловленный клеточной аутофлуоресценцией, токсичность интенсивного возбуждающего флуоресценцию света для живых объектов и маленький динамический диапазон измерений.

Успех эксперимента по исследованию комплементационных фрагментов во многом зависит от поиска оптимального места разрыва белковой молекулы на два фрагмента. Это необходимо для наиболее максимального восстановления активности репортера при стерическом сближении. Первоначально точка разрыва определялась эмпирически, например, при изучении люциферазы из копепод *Gaussia* было испробовано 41 место разрыва (Рис.) пока был найден оптимальный для данного белка вариант [19]. В настоящий момент гуманизированная форма люциферазы *Gaussia* стала широко использоваться как репортер для высокопроизводительных анализов [20], [21], [22].

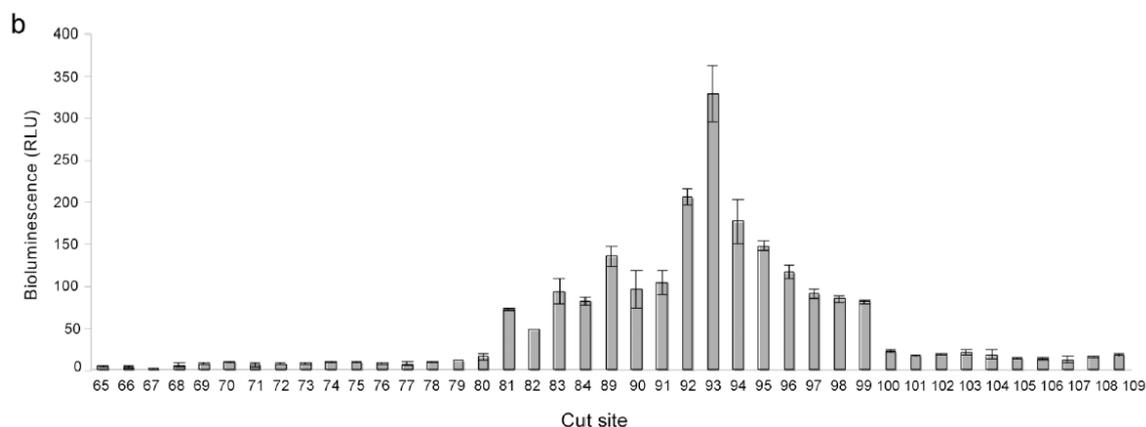


Рисунок 2 – Восстановление активности люциферазы *Gaussia* при изменении точки разрыва молекулы при формировании комплементирующих фрагментов [19]

1.4 Дрожжевой лейциновый zipper белка GCN4/YEL009C как модельный объект для стерических сближений

Для создания комплементационной системы в качестве модельной системы белок-белковых взаимодействий в данной работе был использован параллельный дрожжевой лейциновый zipper белка GCN4/YEL009C. [23], [24]. С помощью лейцинового zipпера белки формируют гомодимеры или гетеродимеры белков. В основном взаимодействие происходит за счет гидрофобного слипания лейциновых остатков, находящихся в каждом седьмом положении каждой из α -спиралей. Благодаря этому свойству, лейциновые zipперы иногда используют в белковой инженерии как димеризирующий фрагмент [25]. Структурный домен лейциновый zipper зарекомендовали себя как удобный инструмент для разработки комплементационных анализов, предназначенных для оценки белок-белковых взаимодействий.

Ранее данный структурный мотив использовался при исследовании комплементационных свойств люциферазы *Gaussia*, которая имеет сродство с люциферазой ML7. [19]А также для исследования комплементации зеленого флуоресцентного белка (GFP) [26].

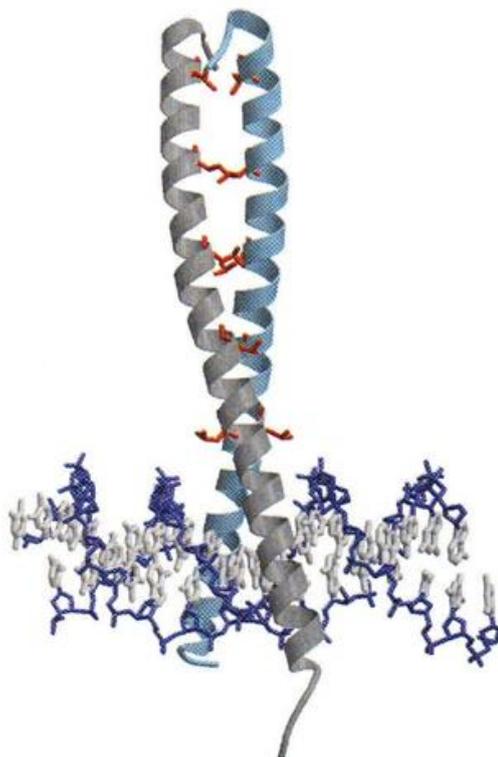


Рисунок 3 – Схема образования димера ДНК-связывающего белка из параллельных α -спиралей лейцинового zipper

1.5 FKBP-рапамицин-FRB как система для димеризации белковых фрагментов

Рапамицин представляет собой 31-членный макролидный противогрибковый антибиотик, который был впервые выделен из *Streptomyces hygroscopicus*. Рапамицин является важным иммунодепрессантом, возможным противоопухолевым средством и широко используемым исследовательским инструментом. Важной особенностью рапамицина является способность связываться одновременно с двумя различными белками, FKBP12 и mTOR [28], из-за чего его иногда называют «молекулярным клеем». Рапамицин связывается с FK506-связывающим белком (FKBP12, далее именуемому просто FKBP), а также с 100-аминокислотным доменом FRB мишени рапамицина млекопитающих протеинкиназы mTOR (mechanistic target of rapamycin kinase), известный как FKBP-рапамицин-связывающий домен [29].

Широкое применение рапамицин получил в технологии, разработанной для использования преимуществ способности малой молекулы гетеродимеризировать белки. Представляющие интерес белки могут быть экспрессированы в виде гибридов с FKBP или FRB, а затем условно димеризованы при добавлении рапамицина. Стоит также отметить, что FKBP и FRB не взаимодействуют в отсутствие рапамицина. [30]

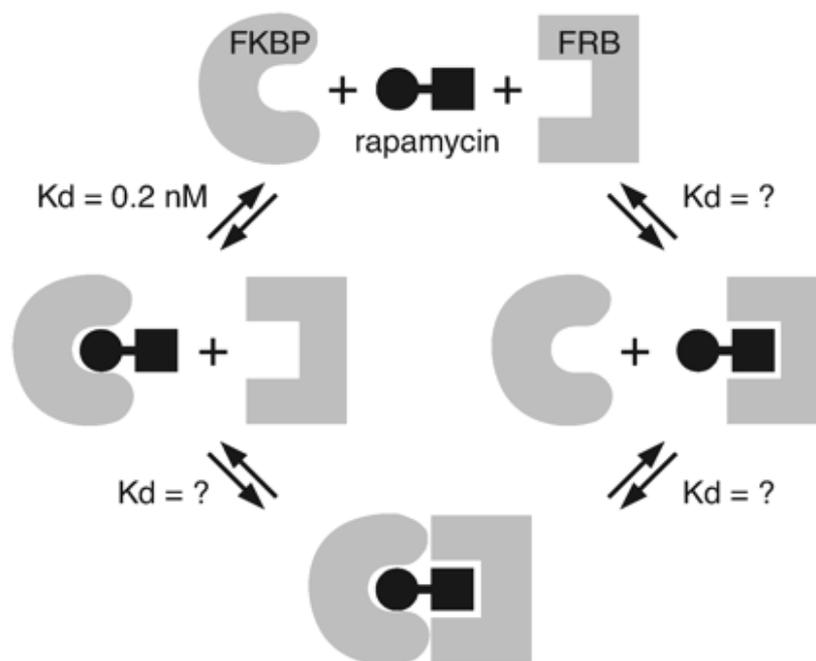


Рисунок 5 – Схема, представляющая четыре возможных события формирования тройного комплекса: FKBP-рапамицин-FRB [28]

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы

Агароза, легкоплавкая агароза ("Bio-Rad"), 80% изопропанол, 96 % этанол.

Наборы для очистки ДНК: QIAquick PCR Purification Kit, QIAprep Spin Miniprep Kit и QIAquick Gel Extraction Kit фирмы QIAGEN.

Маркеры молекулярного веса "1 kb DNA Ladder" и "100 bp DNA Ladder" (NEB).

Таблица 1 – Олигонуклеотиды, использованные в работе

№	Краткое наименование конструкции	Последовательность (5' → 3')
751	PCA-ML7	AAAATGATAACCATCTCGC
788	PCA-ML7	CAGCTGCACCTCGGCACCACCGGATCCACGATCTCCAGCAAGAC
908	PCA-ML71n	ATAGGATCCCACCTATTCCAGCCTGTCCA
909	PCA-ML71n	TACGGATCCTATTCCAGCCTGTCCAGTT
910	PCA-ML72n	GCATTGGTCCAGGCTAACCCAGGTGCTATTGTTGACATT
911	PCA-ML72n	AATGTCAACAATAGCACCTGGGTTAGCCTGGACCAATGC
916	PCA-ML71c	GGACAGGCTGGAATAGTGTAATGACTCGAGTGATCTAGA
917	PCA-ML71c	TCTAGATCACTCGAGTCATTACACTATTCCAGCCTGTCC
918	PCA-ML72c	GGACTGGTGGTGGATCCGGTGCTATTGTTGACATTCC
919	PCA-ML72c	GGAATGTCAACAATAGCACCGGATCCACCACCAGTCC
948	PCA-ML75n	GGTCTTGCCAATGTCAAGGGATCCACTGGTGCTGG
949	PCA-ML75n	CCAGCACCAGTGGATCCCTTGACATTGGCAAGACC
950	PCA-ML77n	AAGGTCTTGCCAATGTTCGGATCCACTGGTGCTG
951	PCA-ML77n	CAGCACCAGTGGATCCGACATTGGCAAGACCTT
952	PCA-ML76c	GACTGGTGGTGGATCCTGTTCTGAACTCCTCAAGA
953	PCA-ML76c	TCTTGAGGAGTTCAGAACAGGATCCACCACCAGTC
954	PCA-ML78c	GACTGGTGGTGGATCCAAGTGTCTGAACTCCTCA
955	PCA-ML78c	TGAGGAGTTCAGAACACTTGGATCCACCACCAGTC
956	PCA-ML79n	CCAATGCTTTTAAAGCTGGATCCACTGGTGCTGG
957	PCA-ML79n	CCAGCACCAGTGGATCCAGCTTTAAAAGCATTGG

958	PCA-ML80c	GGACTGGAGGTGGATCCGGCTGCACTAGGGGAT
959	PCA-ML80c	ATCCCCTAGTGCAGCCGGATCCACCTCCAGTCC
960	PCA-ML81n	GCACCAGGGGATGTCTCGGATCCACTGGTGCTGG
961	PCA-ML81n	CCAGCACCAGTGGATCCGAGACATCCCCTGGTGC
962	PCA-ML82c	GGACTGGTGGAGGATCCATCTGTCTTTCAAAAATCAAG
963	PCA-ML82c	CTTGATTTTTGAAAGACAGATGGATCCTCCACCAGTCC
980	PCA-ML76n	ATTGGTCCAGGCCAACTCATGTTCTGAACTCCTCAAGA-
981	PCA-ML76n	TCTTGAGGAGTTCAGAACATGAGTTGGCCTGGACCAAT
982	PCA-ML78n	TGCATTGGTCCAGGCCTCTAAGTGTCTGAACTCCTCA
983	PCA-ML78n	TGAGGAGTTCAGAACAACCTTAGAGGCCTGGACCAATGCA
984	PCA-ML80n	GTCCAGGCCAACCCCTGGCTGCACCAGGGGA
985	PCA-ML80n	TCCCCTGGTGCAGCCAGGGTTGGCCTGGAC
986	PCA-ML82n	GACAAATGGCCTGGACCAAGCCTGCAATGCAAACAAGAG
987	PCA-ML82n	GGTCCAGGCCATTTGTCTTTCAAAAATCAAG
T7	PCA-ML76n	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
375	PCA-ML76n	TAGAAGGCACAGTCGAGG
1005	FKBP-ML7	ATAGGTACCATGGGAGTGCAGGTGGAAAC
1006	FKBP-ML7	AGTCCCAGGACCAGTGCCACCTTCCAGTTTTAGAAAGCTCC
1007	FRB-ML7	GGCACTGGTCCTGGGACTGGTGGATCCAACCCTACT
1008	FKBP-ML73c	TAGGTACCATGGGCAGCATCCTCTGGCATGAGATGTGGCATGAA GG
1009	FKBP-ML73c	AGTCCCAGGACCAGTGCCACCCTTTGAGATTCGTCGGAAC
1010	FRB-ML72c	GGCACTGGTCCTGGGACTGGTGGATCCGGTGCTATT

Культуральные среды:

LB-среда – на 1 л: 10 г бакто-триптона (Difco); 5 г дрожжевого экстракта (Sigma); 7,5 г NaCl; pH 7,0.

LB-агар – на 1 л LB -среды 15 г агара (Difco).

SOC-среда – на 1 л: 20 г бакто-триптона (Difco), 5 г дрожжевого экстракта (Sigma), 0,5 г NaCl, 20 мМ глюкоза; pH 7,5.

Штамм *E. coli* XL1-Blue, клеточная линия НЕК 293 (Human Embryonic Kidney 293).

Маркеры молекулярного веса «1 kВ DNA Ladder» и «100 bp ladder»

Ферменты: Эндонуклеазы рестрикции XhoI, BamHI, KpnI, DpnI; высокоэффективная T4 ДНК лигаза («BioLabs»), полимеразы Pfu-turbo («Stratagene»), Taq-полимераза («Sibenzyme»).

Условия работы с ферментами описаны в руководствах, предоставленных фирмами изготовителями (Sibenzyme и BioLabs).

Буферы:

Pfu-Turbo буфер (200 мМ Трис-НСl, 100 мМ КСl, 100 мМ (NH₄)₂SO₄, 20 мМ MgSO₄, 1 mg nuclease-free BSA, 1% Triton X-100);

Лигазный буфер (50 мМ Трис-НСl рН 7,8, 10 мМ MgCl₂, 25 мкг/мл BSA, 1 мМ АТР, 10 мМ DTT);

ТАЕ-буфер – 0,04 М Трис-ацетат; 0,02 М – ЭДТА, рН 8.0

ML буфер (0.5 М NaCl, 0.015% желатин, 50 мМ Tris-НСl рН 7.5)

2.2 Методы

В работе использовались следующие методы:

2.2.1 Трансформация компетентных клеток *E. coli*

К 20 мкл компетентных клеток *E. coli* XL1-Blue добавляли 0.5 мкл плазмиды в концентрации 100 нг/мкл. Проводили инкубацию во льду 30 минут, далее проводили тепловой шок для клеток при температуре 42°C в течение 45 секунд. Добавляли среду SOC в пятикратном объеме (100 мкл), после чего инкубировали в термостате в течение 1 часа при температуре 37°C. Инкубированную суспензию переносили на чашки Петри с LB агаром и ампициллином. Суспензию растирали шпателем, чашки оставляли на ночь в термостате при температуре 37°C.

2.2.2 Выделение плазмидной ДНК QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)

Клетки выращивали в 6 мл жидкой LB-среды с добавлением ампициллина (100 мкг/мл) при 37°C в течение ночи. Затем биомассу центрифугировали 2 мин при 6000 об/мин, супернатан сливали.

Для выделения использовали набор QIAprep Spin Miniprep Kit фирмы QIAGEN. Осадок ресуспендировали в 500 мкл раствора P1 (с РНКазой), добавляли 500 мкл раствора P2 (Lysis solution) и 700 мкл раствора N3 (Нейтрализующий раствор), затем центрифугировали 10 мин при 14000 об/мин. Супернатант переносили на колонку, центрифугировали в течении 1 минуты на 14000 об/мин, проходящий сквозь колонку раствор сливали. Далее колонку последовательно промывали буферами PB (500 мкл) и PE (500 и 250 мкл), каждый раз сливая жидкость после центрифугирования, после чего колонку сушили 10 мин. Элюцию ДНК проводили добавлением 80 мкл буфера EB + 1mM EDTA с последующим центрифугированием (2 мин, 14000 об/мин).

2.2.3. Олигонуклеотид-направленный мутагенез

Дизайн праймеров для олигонуклеотид- направленного мутагенеза и реакцию мутагенеза проводили согласно протоколу для набора «Quick Change site-directed mutagenesis kit». В состав реакции мутагенеза на общий объем 20 мкл входили 0.4 мкл 20 mM dNTP, 0.4 мкл полимеразы PfuUltra, 0.5 µl ДНК матрицы (20 нг/мкл), 2 мкл буфера для QCSDM, по 0.6 мкл 5' и 3' праймеров и 15.5 мкл воды.

Денатурацию матрицы проводили при температуре 94°C – 30 сек, отжиг праймеров – 55°C в течение одной минуты, реакция полимеризации проходила в течение 11 минут при температуре 68°C. Реакция проходила в 18 циклов. Продукты реакции оценивали гель-электрофорезом. При успешном синтезе расщепляли матрицу в течении 2 часов используя рестриктазу DpnI из набора QCSDM. Данную смесь в последующем использовали для трансформации клеток *E. coli* XL1-Blue.

2.2.4. Очистка рестрикционных фрагментов ДНК

Фрагменты ДНК разделяли гель-электрофорезом 1% легкоплавкой агарозы без добавления бромистого этидия в TAE буфере при рабочем напряжении 40 В. Небольшую часть геля окрашивали бромистым этидием и позиционировали с неокрашенной для определения целевого фрагмента. Полосу геля с фрагментом ДНК нужной длины вырезали для последующего выделения ДНК.

2.2.5. Агарозный ДНК электрофорез

Фрагменты ДНК разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле с использованием TAE-буфера при рабочем напряжении 100 мВ. В гель и буфер добавляли краситель – бромистый этидий (EtBr) до конечной концентрации 1 мкг/мл.

На гель наносили также стандартные маркеры молекулярного веса 1 kb DNA Ladder и 100 bp DNA Ladder (BioLabs). Концентрацию ДНК в каждой из фракций оценивали визуально по флуоресценции бромистого этидия. По расстоянию, пройденному фрагментом в геле, определяли его размер (в сравнении с маркерами). Гели фотографировали в ультрафиолетовом свете с использованием системы видеодокументации "AlfaImager".

2.2.6. Обработка ДНК специфическими эндонуклеазами

Использовали ферменты рестрикции XhoI, BamHI, KpnI. Для реакций были подобраны оптимальные условия указанные производителем. Рестрикцию проводили в течении 2 часов в термостате при температуре 37°C.

2.2.7. Слияние двух фрагментов ДНК

Очищенные фрагменты ДНК гибридизовали в 25 µl путем смешивания 5 мкл Tersus-buf и 10 мкл смеси ДНК. После денатурации в течение 2 мин при 95°C в термоциклере с подогреваемой крышкой, смесь медленно охлаждали до 30°C. Пробирку помещали в 200 мл воды со стартовой температурой 95°C выдерживали 20 мин для постепенного остывания приблизительно до 50°C,

затем 30 мин в холодильнике. После остывания добавляли 20 мкл H₂O, 1 мкл 10 mM dNTP, 1 мкл Tersus-pol mix(Evrogen).

Далее проводили ПЦР-слияние без праймеров в термоциклере по следующей программе: достройка цепей ДНК 72°C 3 мин, денатурация 95°C 30 сек, далее 7 циклов 94°C 20 сек, 60°C 20 сек и 72°C 40 сек.

Далее добавляли крайние праймеры для сливаемого фрагмента и проводили дополнительную амплификацию. Для проведения амплификации использовали следующие параметры: денатурация 94°C – 20 сек, температура отжига подбиралась исходя из используемых праймеров и проводилась в течение – 30 сек, элонгация 72°C – 40 сек. Реакция проходила за 6 циклов.

2.2.8. Реакция амплификации

В состав ПЦР-реакции на общий объем 50 мкл добавляли 5 мкл буфера для Pfu-Turbo, 10 мкл 10mM dNTP, по 1,5 мкл 5' и 3' праймеров, 1 мкл полимеразы Pfu-Turbo (1.25 U, 2.5U/μl), 0.5 мкл матричной ДНК (при концентрации 100 нг/мкл) и 30.5 мкл воды.

Параметры реакции амплификации следующие: денатурация – 20 сек при 95°C, отжиг праймеров 30 сек, температура подбиралась исходя из используемых праймеров, реакция элонгации проводилась при температуре 72°C, 40 сек. Реакция проходила в 18 циклов.

2.2.9 Лигирование

Для лигирования вектора с фрагментами использовали высокоактивную Т4 ДНК-лигазу (2000 U/мкл, СибЭнзим). Реакцию проводили в лигазном буфере в течение 18 часов при 16°C. Перед трансформацией бактерий лигазную смесь прогревали 10 минут при температуре 64°C.

2.2.10 Очистка ПЦР продукта

Для очистки использовали коммерческий набор «QIAquick PCR Purification Kit». К 5 объемам буфера РВ брали 1 объем продуктов полимеразной цепной реакции, смесь переносили в колонки QIAgene из набора «QIAquick PCR Purification Kit» и центрифугировали (1 мин, 14000 об/мин). Оставшуюся после

центрифугирования в пробирках жидкость сливали. Далее на колонку вносили 0.5 мл буфера PE, чтобы промыть сорбированную ДНК, инкубировали 5 мин и центрифугировали (1 мин, 12000 об/мин). Оставшуюся жидкость сливали. После этого вносили еще 250 мкл буфера PE, инкубировали 3 мин и центрифугировали (1 мин, 12000 об/мин). Оставшуюся жидкость сливали. Колонку с промытой ДНК помещали в чистую 1.5 мл пробирку. Сушили на воздухе 15 мин. Далее добавляли в центр фильтра 50 мкл элюционного буфера EB (с 10 mM ЭДТА, pH 8.5), инкубировали 3 мин и центрифугировали (2 мин, 12000 об/мин).

2.2.11 Трансфекция в HEK293

Клетки HEK293 культивировали при 37°C в атмосфере CO₂ (5%) в среде DMEM/F-12 (Gibco), содержащей 10% инактивированной термообработкой телячьей эмбриональной сыворотки (ТЭС) с добавлением GlutaMAX Supplement (100×, Thermo Fisher Scientific), содержащего стабилизированную форму L-глутамин, L-Аланил-L-Глютамин, и Antibiotic Antimycotic Solution (Corning). Для проведения трансфекции клетки HEK293 логарифмической фазе роста снимали с подложки при помощи рекомбинантного трипсина TripLE (Thermo Fisher Scientific) и рассеивали в лунки 96-луночного планшета по 10 тысяч клеток на лунку планшета.

Трансфекцию проводили в состоянии ~80% конфлюэнтности клеток с использованием трансфецирующего реагента Lipofectamine 2000 (L2000) (Invitrogen, США) согласно рекомендациям производителя. ДНК и L2000 по отдельности разводили Opti-MEM I бессывороточной средой (Gibco), затем смешивали, инкубировали 20 мин для формирования комплексов и вносили в соотношении 100 нг ДНК и 0.25 мкл L2000 (1:2.5) на каждую лунку 96-луночного планшета. При ко-трансфекции соответственно брали по 50 нг каждой конструкции, для контролей в качестве второй половины использовали 50 нг исходного вектора pCDNA3.1+. Каждую трансфекцию проводили в четырех повторах.

Через 24 ч для измерения биолюминесцентной активности трансфецированных клеток отбирали 10 мкл аликвоты среды в 50 мкл ML буфера в лунке непрозрачного 96-луночного планшета для измерения биолюминесценции. Измерения проводили с помощью планшетного люминометра Mithras (Berthold). Сигнал измеряли сразу после впрыска 50 мкл субстрата целентеразина (Prolume, США), растворенного в ML буфере, в каждой лунке отдельно. Финальная концентрация целентеразина была ~2 мкМ. Измерения проводили при комнатной температуре.

Далее среду удаляли, быстро промывали клетки раствором натрий-фосфатного буфера PBS и заливали 50 мкл измерительного ML буфера. Клетки разрушали тремя циклами замораживания-оттаивания при наличии осмотического шока от измерительного буфера и переносили в непрозрачный измерительный планшет. Измеряли уровень биолюминесцентной активности в лунках планшета как описано выше. Полученные данные сравнивали с биолюминесцентной активностью среды.

2.2.12. Приготовление компетентных клеток XL1-Blue

В 50 мл LB-среды бактериологической петлей вносили с чашки Петри колони. штамма XL1-Blue, и инкубировали при 37°C в шейкере инкубаторе при 220 об/мин 2 часа, до финальной оптической плотности $OD_{590}=0,6$. Далее клетки охлаждали во льду 15 мин, и осаждали центрифугированием (2 мин, 3500 об/мин, 4°C). Среду осторожно сливали, добавляли 5 мл холодного TFB-буфера, клетки держали во льду 15 мин, периодически встряхивая. Затем центрифугировали (2 мин, 3500 об/мин, при 4°C), супернатант сливали и к осадку клеток вносили 5 мл мкл TFB, осторожно растворяли. Для хранения к раствору суперкомпетентных клеток добавляли 80% глицерин и помещали в холодильник при -80°C.

Страницы с 23 по 44 изъяты в связи с авторскими правами

ВЫВОДЫ

1. Подобраны варианты разрыва молекулы люциферазы *Metridia* на потенциально комплементирующие фрагменты исходя из данных о экзон-интронной структуре люциферазы *Metridia* и модели пространственной структуры ML7.
2. Для люциферазы *Metridia* были сконструированы и исследованы пары N- и C- концевых фрагментов люциферазы для поиска комбинаций, наиболее эффективно восстанавливающих биолюминесцентную активность при близком взаиморасположении лейциновых zipperов.
3. Произведена экспрессия фрагментов люциферазы *Metridia* потенциально способных к комплементации в клетках человека HEK293.
4. Значимая комплементация была обнаружена в случае вариантов типа ML71n-Zip + ML72n-Zip и ML72n-Zip + ML73n-Zip. Максимальная внутриклеточная биолюминесцентная активность, наблюдаемая при комплементации конструкторов sML2n-Zip и sML3n-Zip в лизатах HEK293 составила 10.5% по сравнению с полноразмерной люциферазой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lupold S. E. et al. A real time *Metridia* luciferase based non-invasive reporter assay of mammalian cell viability and cytotoxicity via the β -actin promoter and enhancer //PloS one. – 2012. – Т. 7. – №. 5. – С. e36535.
2. Markova S. V. et al. Cloning and expression of cDNA for a luciferase from the marine copepod *Metridia longa*: a novel secreted bioluminescent reporter enzyme //Journal of Biological Chemistry. – 2004. – Т. 279. – №. 5. – С. 3212-3217.
3. Inouye S. Firefly luciferase: an adenylate-forming enzyme for multicatalytic functions //Cellular and molecular life sciences. – 2010. – Т. 67. – №. 3. – С. 387-404.
4. Markova S. V., Burakova L. P., Vysotski E. S. High-active truncated luciferase of copepod *Metridia longa* //Biochemical and biophysical research communications. – 2012. – Т. 417. – №. 1. – С. 98-103.
5. Borisova V. V. et al. Recombinant *Metridia* luciferase isoforms: expression, refolding and applicability for in vitro assay //Photochemical & Photobiological Sciences. – 2008. – Т. 7. – №. 9. – С. 1025-1031.
6. Markova S. V., Larionova M. D., Vysotski E. S. Shining light on the secreted luciferases of marine copepods: Current knowledge and applications //Photochemistry and photobiology. – 2019. – Т. 95. – №. 3. – С. 705-721.
7. Markova S. V. et al. The smallest natural high-active luciferase: cloning and characterization of novel 16.5-kDa luciferase from copepod *Metridia longa* //Biochemical and biophysical research communications. – 2015. – Т. 457. – №. 1. – С. 77-82.
8. Close, D.M. *In vivo* bioluminescent imaging (BLI): noninvasive visualization and interrogation of biological processes in living animals / D.M. Close, T. Xu, G.S. Sayler, S. Ripp // Sensors (Basel). – 2011. – 11, №1. – P. 180–206.
9. Remy I., Michnick S. W. Application of protein-fragment complementation assays in cell biology //Biotechniques. – 2007. – Т. 42. – №. 2. – С. 137-145.

10. Shimomura O. Bioluminescence in the sea: photoprotein systems //Symposia of the Society for Experimental Biology. – 1985. – T. 39. – C. 351-372.
11. Pelletier J. N. et al. An in vivo library-versus-library selection of optimized protein–protein interactions //Nature biotechnology. – 1999. – T. 17. – №. 7. – C. 683-690.
12. Rossi F., Charlton C. A., Blau H. M. Monitoring protein–protein interactions in intact eukaryotic cells by β -galactosidase complementation //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1997. – T. 94. – №. 16. – C. 8405-8410.
13. Rossi F., Charlton C. A., Blau H. M. Monitoring protein–protein interactions in intact eukaryotic cells by β -galactosidase complementation //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1997. – T. 94. – №. 16. – C. 8405-8410.
14. Paulmurugan R., Gambhir S. S. Monitoring protein– protein interactions using split synthetic renilla luciferase protein-fragment-assisted complementation //Analytical chemistry. – 2003. – T. 75. – №. 7. – C. 1584-1589.
15. Shekhawat S. S., Ghosh I. Split-protein systems: beyond binary protein–protein interactions //Current opinion in chemical biology. – 2011. – T. 15. – №. 6. – C. 789-797.
16. Magliery T. J. et al. Detecting protein– protein interactions with a green fluorescent protein fragment reassembly trap: scope and mechanism //Journal of the American Chemical Society. – 2005. – T. 127. – №. 1. – C. 146-157.
17. Hu C. D., Kerppola T. K. Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis //Nature biotechnology. – 2003. – T. 21. – №. 5. – C. 539-545.
18. Zhao J. et al. Self-assembling NanoLuc luciferase fragments as probes for protein aggregation in living cells //ACS chemical biology. – 2016. – T. 11. – №. 1. – C. 132-138.
19. Remy I., Michnick S. W. A highly sensitive protein-protein interaction assay based on Gaussia luciferase //Nature methods. – 2006. – T. 3. – №. 12. – C. 977-979.

20. Maguire C. A. et al. Gaussia luciferase variant for high-throughput functional screening applications // *Analytical chemistry*. – 2009. – T. 81. – №. 16. – C. 7102-7106.
21. Luker K. E. et al. In vivo imaging of ligand receptor binding with Gaussia luciferase complementation // *Nature medicine*. – 2012. – T. 18. – №. 1. – C. 172-177.
22. Liu Y. et al. A high-throughput Gaussia luciferase reporter assay for screening potential gasdermin E activators against pancreatic cancer // *Acta Pharmaceutica Sinica B*. – 2023. – T. 13. – №. 10. – C. 4253-4272.
23. Ghosh I., Hamilton A. D., Regan L. Antiparallel leucine zipper-directed protein reassembly: application to the green fluorescent protein // *Journal of the American Chemical Society*. – 2000. – T. 122. – №. 23. – C. 5658-5659.
24. Lumb K. J., Kim P. S. Measurement of interhelical electrostatic interactions in the GCN4 leucine zipper // *Science*. – 1995. – T. 268. – №. 5209. – C. 436-439.
25. Jiang P. et al. Using leucine zipper to facilitate α -synuclein assembly // *The FASEB Journal*. – 2008. – T. 22. – №. 9. – C. 3165.
26. Cabantous S. et al. A new protein-protein interaction sensor based on tripartite split-GFP association // *Scientific reports*. – 2013. – T. 3. – №. 1. – C. 2854.
27. Yang J. et al. FLIM-FRET-Based Structural Characterization of a Class-A GPCR Dimer in the Cell Membrane // *Journal of molecular biology*. – 2020. – T. 432. – №. 16. – C. 4596-4611.
28. Banaszynski L. A., Liu C. W., Wandless T. J. Characterization of the FKBP – Rapamycin - FRB ternary complex // *Journal of the American Chemical Society*. – 2005. – T. 127. – №. 13. – C. 4715-4721.
29. Brown E. J. et al. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex // *Nature*. – 1994. – T. 369. – №. 6483. – C. 756-758.
30. Clemons P. A. Commentary: Design and discovery of protein dimerizers // *Current Opinion in Chemical Biology*. – 1999. – T. 3. – №. 1. – C. 112-115.

31. Larionova M. D. et al. The smallest isoform of *Metridia longa* luciferase as a fusion partner for hybrid proteins //International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Т. 21. – №. 14. – С. 4971.
32. Larionova M. D., Markova S. V., Vysotski E. S. The novel extremely psychrophilic luciferase from *Metridia longa*: Properties of a high-purity protein produced in insect cells //Biochemical and biophysical research communications. – 2017. – Т. 483. – №. 1. – С. 772-778.
33. I-TASSER. URL <https://zhanggroup.org/I-TASSER/> (дата обращения 17.05.2023).
34. Wu N. et al. Solution structure of *Gaussia* Luciferase with five disulfide bonds and identification of a putative coelenterazine binding cavity by heteronuclear NMR //Scientific Reports. – 2020. – Т. 10. – №. 1. – С. 20069.
35. SignalP 5.0. URL <https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/> (дата обращения 17.05.2023).

