

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

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2024 г.

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

**Характеризация мутантов фотопротейна беровина с  
оптимумом активации при физиологических условиях,  
предсказанных с помощью методов молекулярного  
моделирования**

06.03.01 – Биология

06.04.01.01 –Микробиология и биотехнология

Научный руководитель	_____	<u>С.н.с, к.б.н.</u>	<u>Л.П. Буракова</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	
Выпускник	_____		<u>Н.В. Рукосуева</u>
	подпись, дата		
Рецензент	_____	<u>к.б.н.</u>	<u>М.Ю. Трусова</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	

Красноярск 2024

## РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация на тему «Характеризация мутантов фотопротейна беровина с оптимумом активации при физиологических условиях, предсказанных с помощью методов молекулярного моделирования» содержит 55 страниц текстового документа, 8 таблиц, 61 использованный источник, и 11 рисунков.

Ключевые слова: БЕРОВИН, ФОТОПРОТЕИН, БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ, МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ, МУТАГЕНЕЗ.

Цель работы: исследование свойств мутантов рекомбинантного фотопротейна беровина с измененными условиями активации, предсказанных методами молекулярного моделирования для его возможного использования в качестве внутриклеточного репортера.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

1. Провести сайт-направленный мутагенез на основе рЕТ22-ВAwт для введения мутаций, предсказанных с помощью методов молекулярного моделирования, и получить штаммы-продуценты для экспрессии генов мутантных вариантов беровина.
2. Получить высокоочищенные препараты мутантов беровина и проанализировать их условия активации, физико-химические и биолюминесцентные свойства.
3. С помощью ненаправленного мутагенеза получить мутанты беровина с более высокой удельной активностью.

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. Фотопротеины ктенофор .....	7
1.2. Беровин, как представитель фотопротеинов ктенофор.....	12
1.3. Структура активного центра беровина .....	15
1.4. Свойства мутантов беровина .....	16
1.5. Молекулярное моделирование как метод прогноза свойств мутантов 19	
1.6. Целентеразин-зависимые репортеры .....	21
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	23
2.1. Сайт-направленный мутагенез и получение штаммов-продуцентов	23
2.2. Получение апо-беровина .....	24
2.3. Определение оптимальных условий активации.....	25
2.4. Получение мономерных фракций апобелков.....	26
2.5. Очистка фотопротеиновых комплексов.....	26
2.6. Определение кажущейся константы диссоциации комплекса апобелок-целентеразин.....	27
2.7. Измерение билюминесцентной активности .....	28
2.8. Измерение константы спада билюминесцентной реакции.....	29
2.9. Измерение спектров билюминесценции и флуоресценции.....	29
2.10. Фото- и термо- инактивация .....	29
2.11. Ненаправленный мутагенез.....	29
2.12. Скрининг на колониях .....	31
2.13. Приборы и реактивы .....	32
3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	32
3.1. Условия активации мутантных вариантов беровина.....	33
3.2. Анализ физико-химических и билюминесцентных свойств .....	36
3.3. Термо- и фото- стабильность мутантных вариантов беровина.....	41
3.4. Определение кажущейся константы диссоциации .....	44
3.5. Поиск мутантов с повышенной активностью .....	46
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	47
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	48
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	49

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность работы

Биолюминесценция — это процесс, посредством которого живые организмы или их симбионты излучают видимый свет. Явление биолюминесценции возникает вследствие фермент-субстратной реакции. При участии фермента люциферазы происходит окисление молекулы субстрата, известного как люциферин, обуславливающее его переход в возбужденное состояние, возврат из которого в основное протекает с выделением энергии [1]. Отличительным свойством биолюминесцентной реакции является то, что большая часть энергии выделяется в процессе в виде света, а не тепла.

Биолюминесценция обнаружена у широкого круга организмов: от бактерий и простейших до кальмаров и рыб [2]. Большинство из них — это морские организмы. Одним из наиболее распространенных субстратов в морской среде является целентеразин. Ракообразные, гребневики, кальмары, радиолярии, кишечнополостные используют производные имидазопиразинона в качестве субстрата биолюминесцентной реакции [3].

Использование рекомбинантных биолюминесцентных белков в качестве молекул-индикаторов совместно с высокочувствительными записывающими устройствами позволяет измерять концентрации веществ с высочайшей точностью, достигая аттомолярных значений [4]. Среди  $Ca^{2+}$ -регулируемых фотопротейнов, относящихся к семейству EF-hand белков, наиболее изученными являются биолюминесцентные белки гидромедуз, такие, как акворин из *Aequorea victoria* [5] и обелин из *Obelia longissima* [6].

Одним из таких биолюминесцентных белков является беровин из гребневика *Beroe abyssicola*, который является наиболее исследованным фотопротейном ктенофор, поэтому и был выбран в качестве объекта исследования.

Рекомбинантный боровин наиболее эффективно активируется *in vitro* в щелочных условиях (рН 9,0) и в присутствии высокой концентрации соли (0,5 М NaCl), а также является светочувствительным и теряет активность при облучении светом широкого диапазона длин волн [7]. В предыдущей работе было показано, что замена лизина в 90 положении на глутаминовую кислоту привела к изменению условий активации боровина в сторону физиологических [8]. Образование фотопротеинового комплекса боровина при условиях, близких к физиологическим внутриклеточным, происходит со значительно меньшим выходом активного белка. Это затрудняет его использование в качестве маркерной молекулы в работах с эукариотическими клетками. Поэтому важной является задача получения мутантов с подходящими свойствами. Одним из подходов, применяемых для прогнозирования влияния аминокислотных замен на свойства белка, является молекулярное моделирование. На основе таких расчетов с помощью сайт-направленного мутагенеза можно создавать варианты белков с заданными параметрами.

**Цель работы** заключается в исследовании свойств мутантов рекомбинантного фотопротеина боровина с измененными условиями активации, предсказанных методами молекулярного моделирования, в том числе и для его возможного использования в качестве внутриклеточного репортера.

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

1. Провести сайт-направленный мутагенез на основе рЕТ22-ВАwt для введения мутаций, предсказанных с помощью методов молекулярного моделирования, и получить штаммы-продуценты для экспрессии генов мутантных вариантов боровина.
2. Получить высокоочищенные препараты мутантов боровина и проанализировать их условия активации, физико-химические и биолюминесцентные свойства.

3. С помощью ненаправленного мутагенеза получить мутанты беровина с более высокой удельной активностью.

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. Фотопротеины ктенофор

Ктенофоры, также известные как гребневики, вызывают интерес у исследователей из-за своих уникальных фотопротеинов, которые обладают биолюминесцентными свойствами и имеют потенциал для применения в различных научных областях. Несмотря на то, что они относительно мало изучены по сравнению с другими биолюминесцентными организмами, такими как медузы и светляки, фотопротеины ктенофор привлекают все большее внимание в последние годы, благодаря своим уникальным свойствам. Биолюминесценция у живых гребневиков происходит благодаря скоплениям люминесцирующих клеток – фотоцитов, содержащих фотопротеины (Рис. 1).

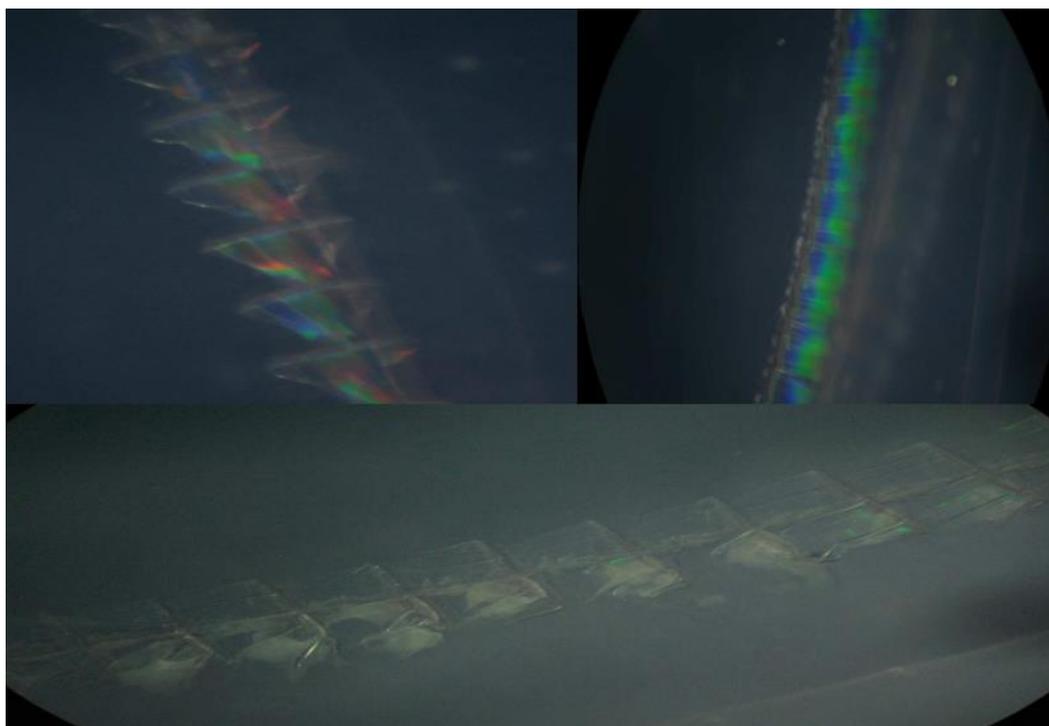


Рисунок 1 – Преломление света гребными пластинками, содержащими фотоциты, у *Mnemiopsis leidyi* [9].

В 1974 году началось изучение биохимии фотопротеинов гребневиков, когда были выделены и очищены белки данной группы мнemiопсин и беровин из *Mnemiopsis sp.* и *Beroe ovata*, соответственно [10].

Функциональная роль биолюминесценции ктенофор связана с привлечением жертв и отпугиванием хищников [11]. Свет, который излучают гребневики, приводит в заблуждение хищников с хорошим зрением и отпугивает крупных быстро движущихся животных, которые могут повредить желеобразное тело при столкновении. В своем исследовании Токарев и другие показали, что защитная импульсная биолюминесценция часто совпадает с двигательной реакцией на испуг. «Вполне вероятно, что биолюминесценция гребневиков является средством их коммуникации. Так, по нашим визуальным наблюдениям, реакция механически потревоженной особи как у *Beroe ovata*, так и *Mnemiopsis leidyi* вызывает раздражительное свечение других особей, находящихся поблизости» [12]. Такое же явление также наблюдали и у гребневиков *Bolinopsis* в экспериментах Лабаса и Гурской [13].

$Ca^{2+}$ -регулируемые фотопротеины представляют собой уникальный класс биолюминесцентных белков, которые используют целентеразин в качестве субстрата реакции. Фактически фотопротеины представляют собой стабильный фермент-субстратный комплекс, состоящий из односубъединичного глобулярного белка, в котором активируется кислородом прочно, но нековалентно связанная молекула целентеразина, 2-гидропероксицелентеразин [14, 15]. Таким образом, в отличие от классической биолюминесцентной реакции, в которой люциферазы катализируют окисление органического субстрата, люциферина, фотопротеиновая реакция не требует молекулярного кислорода или любого другого кофактора. Добавление ионов необходимо только для инициирования реакции декарбоксилирования 2-гидропероксицелентеразина, в результате чего происходит образование связанного с белком продукта — целентерамида в возбужденном состоянии [16,17]. Его релаксация в основное состояние сопровождается свечением со спектральными максимумами при 465–495 нм в зависимости от организма, из которого получен фотопротеин [18]. Все фотопротеины, регулируемые ионами кальция, представляют собой односубъединичные белки с молекулярной

массой ~ 21-25 кДа [15], и обладают высокой степенью схожести пространственных структур, а также содержат три  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих центра «EF-hand», характерных для семейства  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих протеинов.

В настоящее время известно более 25 различных видов фотопротеинов, световая активность которых зависит от регуляции ионами  $\text{Ca}^{2+}$ . Однако только семь из них были выделены из природных источников и подробно охарактеризованы: акворин [5], митрокомин [19], клитин [20] из медуз *Aequorea victoria*, *Mitrocoma cellularia* и *Clytia gregaria*, соответственно, обелин из гидроидов *Obelia geniculata* [21] и *Obelia longissima* [6], мнemiопсин и беровин из гребневигов *Mnemiopsis leidyi* и *Beroe ovata*, соответственно [22]. К настоящему времени клонировано несколько представителей фотопротеинов гребневигов: беровин из *Beroe abyssicola* [8], болинопсин из *Bolinopsis infundibulum* [23], мнemiопсин из *Mnemiopsis leidyi* [24], и фотопротейн из *Bathocyroe fosteri* [25].

Ученые проявляют интерес к фотопротеинам кишечнорастворимых, так как они могут быть эффективно использованы в качестве индикаторов  $\text{Ca}^{2+}$ , которые инициируют процесс биолюминесценции. Кроме того, были найдены фотопротеины, активность биолюминесценции которых зависит от присутствия  $\text{H}_2\text{O}_2$ , АТФ и  $\text{Mg}^{2+}$  [26]. Но большая часть исследований посвящена изучению фотопротеинов, которые регулируются ионами  $\text{Ca}^{2+}$ , таких как акворин, обелин, беровин и другие.

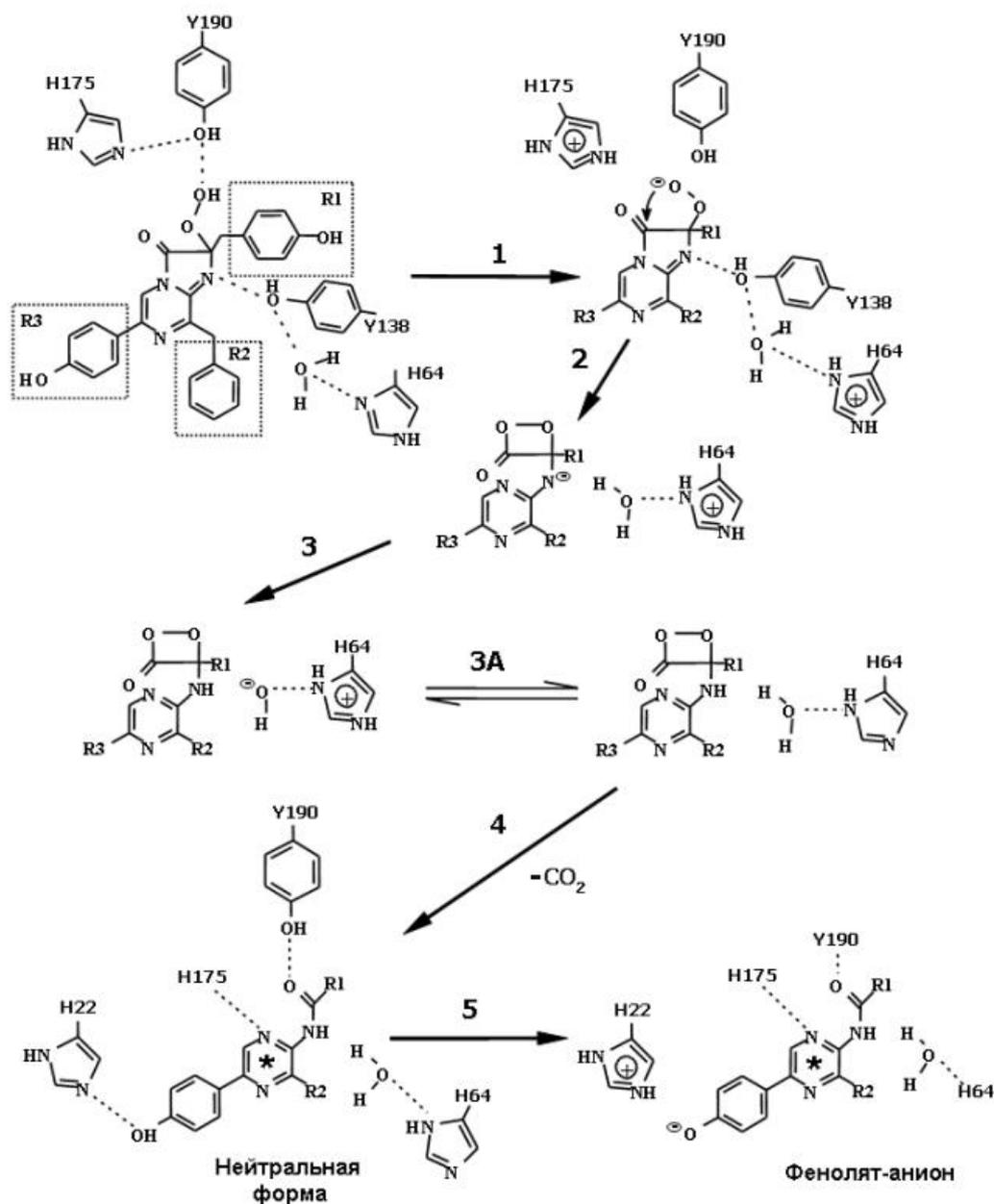


Рисунок 2 – Схема биолуминесцентной реакции фотопroteина акворина [27].

Несмотря на функциональное сходство фотопroteинов ктенофор и гидромедуз, они имеют значительные различия в свойствах. Например, максимум спектра поглощения фотопroteинов гребневиков находится при 437 нм [28], тогда как для фотопroteинов гидромедуз – при 460 нм [14]. Это свидетельствует о различиях в аминокислотном окружении связанного субстрата в активных центрах фотопroteинов ктенофор и гидромедуз. Следовательно, различаются и аминокислотные остатки, участвующие в

стабилизации пероксипроизводного целентеразина, его каталитическом окислении и образовании эмиттера.

Фотопротеины гидромедуз демонстрируют высокую степень сходства аминокислотных последовательностей, составляющую от 65% до 75%, а также в пространственных структурах [29]. При этом фотопротеины гребневиков характеризуются низкой степенью гомологии аминокислотных последовательностей с фотопротеинами гидромедуз. Максимальное сходство, которое наблюдается у беровина из гребневика *Beroe abyssicola* и обелина из гидроида *Obelia longissima*, составляет около 29,4% [15].

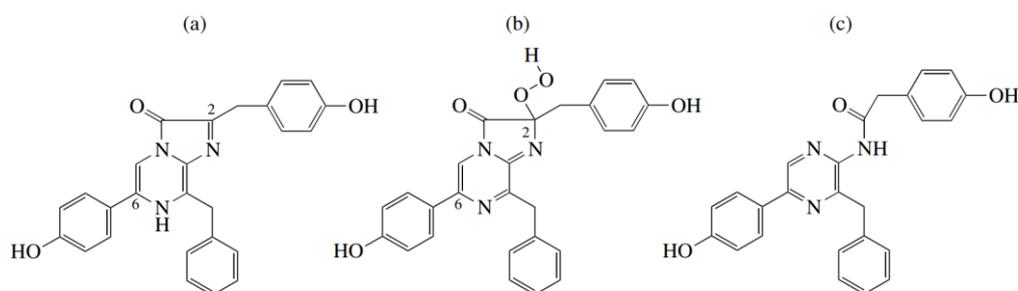


Рисунок 3 – Химическая структура целентеразина (a), 2-гидропероксицелентеразина (b) и целентерамида (c) [15].

Пространственные структуры в различных конформационных состояниях были определены для акворина [30], обелина [31] и клитина [32]. Структуры беровина и мнемииопсина получены только для апобелков, нагруженных ионами двухвалентных металлов [33, 24]. Все они имеют одинаковую компактную глобулярную форму. Карман, который связывает 2-гидропероксицелентеразин, главным образом, формируется боковыми цепями гидрофобных остатков, однако внутрь также направлены несколько боковых цепей с гидрофильными остатками: His22, Tyr138, His175 и Tyr190. Согласно модели пространственной структуры беровина предполагается, что его субстрат-связывающую полость формируют аминокислотные остатки с более выраженными гидрофильными свойствами: Tyr133, Tyr134, Tyr204, Trp192, Met153, Met154, Ser130 и два Phe [34]. Лишь 10 из 21 аминокислотного остатка беровина соответствуют тем, что образуют целентеразин-связывающую полость у обелина и акворина. В

мнемиопсине такую 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 [35].

Стоит отметить, что фотопротеины ктенофор подвержены фотоинактивации – при облучении светом видимого диапазона активный фотопротеиновый комплекс теряет способность к биолюминесценции [36]. Это необычное свойство было замечено у живых особей *Renilla*, но в экспериментах *in vitro* с образцами содержащими люциферин и люциферазу, разницы между облученными и не облученными образцами не было [37]. Поэтому, только белки гребневиков проявляют фоточувствительность как *in vivo*, так и *in vitro* и представляют собой отдельный тип фотопротеинов, структурная организация и механизмы биолюминесценции и фотоинактивации которых пока остаются не изучены в достаточной степени.

## 1.2. Беровин, как представитель фотопротеинов ктенофор

Светочувствительный фотопроtein беровин обеспечивает яркое свечение гребневика *Beroe abyssicola*. Он также относится к  $Ca^{2+}$ -регулируемым целентеразин-зависимым фотопротеинам и белкам семейства EF-hand, следовательно содержит три функциональных  $Ca^{2+}$ -связывающих сайта [38]. Беровин функционально идентичен  $Ca^{2+}$ -регулируемым фотопротеинам медуз, однако, в отличие от них, он чрезвычайно чувствителен к облучению видимым светом. Апо-беровин – это компактный односубъединичный



Рисунок 4 – Беломорский экземпляр *Beroe abyssicola* (фото Натальи Червяковой, МГУ).

глобулярный белок с молекулярной массой около 25 кДа, внутренняя полость которого образована аминокислотными остатками, расположенными на внутренних сторонах  $\alpha$ -спиралей [9], с небольшой асимметрией и  $\alpha$ -спиралью на N-конце (остатки 1-35), расположенной в боковой бороздке белка [33]. Глобула апо-беровина образована двумя чашеподобными доменами, как у фотопротеинов гидромедуз. Каждая чаша имеет 4  $\alpha$ -спиралей A-D и E-H в N- и C-концевых доменах соответственно, расположенных в виде спираль-петля-спираль (НТН) мотивов. Стабильность двухдоменной структуры апоберовина обеспечивается несколькими внутримолекулярными водородными связями, включая взаимодействия между N- и C-концевыми доменами. Остатки C-концевого и N-концевого доменов апоберовина (194-208 и 27-35 соответственно) не образуют структуры и, следовательно, в этих регионах отсутствуют данные электронной плотности [33].

Замыкание субстрат-связывающей полости беровина предположительно происходит за счет  $\pi$ - $\pi$  взаимодействия Tyr13 и Tyr208 [39], тогда как у всех фотопротеинов гидромедуз это осуществляется путем образования водородной связи между C-концевой карбоксильной группой и  $\text{NH}_2$ -группой Arg первой  $\alpha$ -спирали [40].

Рекомбинантный апо-беровин обладает максимум поглощения при 280 нм. Активированный фотопротеин со связанным предокисленным целентеразином имеет дополнительный максимум поглощения при 437 нм.  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженный беровин не поглощает в видимой области спектра, но приобретает новый максимум поглощения при 335 нм [33]. Излучение спектра рекомбинантного беровина достигает своего максимума на длине волны 491 нм.  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженный беровин, аналогично акворину и обелину, обладает яркой биолюминесценцией, но, в отличие от них, зависит от pH. При нейтральных и кислых значениях pH максимум флуоресценции наблюдается при 420 нм, что на 70 нм смещено в коротковолновую область от спектра биолюминесценции. При щелочном pH спектр флуоресценции бимодальный с максимумами при 410

нм и 485 нм, последний близок к максимуму биолюминесценции. Из того, что спектр флуоресценции зависит от pH, можно сделать вывод, что внутренняя полость  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного беровина может быть доступна для растворителя, в отличие от фотопротеинов медуз [8].

Основной отличительной особенностью фотопротеинов гребневиков является фотоинактивация, представляющая собой потерю люминесцентной активности фотопротеинового комплекса. В эксперименте Варда и Селиджера экстракт субстрата фотоинaktivированного мнemiопсина реагировал с люциферазой *Renilla*, поэтому был сделан вывод о том, что фотоинактивация не затрагивает субстрат мнemiопсина [36]. Также авторы предполагали, что фоточувствительной мишенью может быть участок связывания кислорода, однако эксперименты в анаэробных и аэробных условиях доказали, что кислород для фотоинактивации не требуется, более того при отсутствии кислорода фотоинактивация ускорялась. Однако позже в 1984 году эксперимент с экстрактом субстрата фотоинaktivированного мнemiопсина и люциферазой из рачка *Oplophorus* не был воспроизведен, реакции с люциферазой не наблюдалось [41]. Также было выяснено, что для реактивации мнemiопсина необходимо добавить нативный целентеразин, и что фотоинaktivированный мнemiопсин не восстанавливает свою активность при последующей инкубации в темноте.

При облучении светом широкого диапазона длин волн. в процессе фотоинактивации предокисленный субстрат (предположительно пероксианион целентеразина [34]) претерпевает изменения, приводящие к образованию пероксикислоты, которая выходит из субстрат-связывающей полости, в результате чего апобелок может реактивироваться при условии добавления к нему нативного целентеразина [42]. В этом эксперименте авторы обнаружили неожиданные продукты дегратации целентеразина, образующиеся в результате фотоинактивации фотопротеина беровина, которые оказались замещенными гидантоинами.

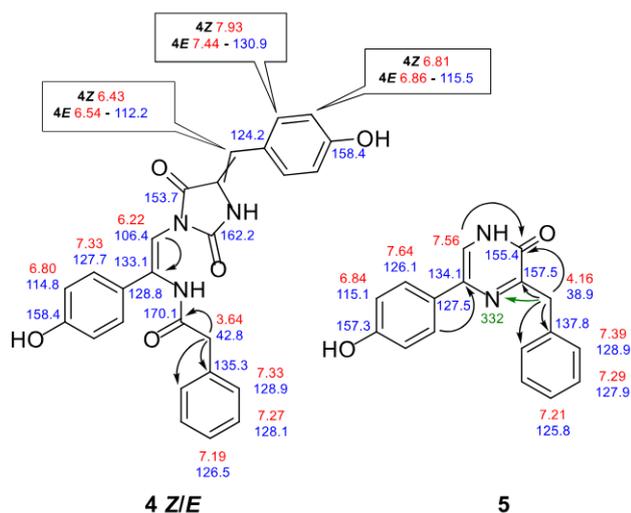


Рисунок 5 – Химические структуры продуктов фотоинактивации беровина [42].

### 1.3. Структура активного центра беровина

Строение активного центра беровина, основывается на модели пространственной структуры 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 Trp204 [34].

У фотопротеинов гидромедуз наряду с боковыми цепями гидрофобных аминокислот несколько боковых цепей гистидина и тирозина также обращены к полости. Остатки His и Trp спарены и тесно связаны с остатками Trp, образующими три триады Trp-His-Trp. Показана важность каждой триады для координации субстрата и протекания биолюминесцентной реакции [34]. Аминокислотные остатки триады, расположенной вблизи OH-группы 6-р-гидроксифенильного заместителя, влияют на цвет излучения и, следовательно, на образование возбужденного состояния продукта реакции, но практически не влияют на биолюминесценцию активность.

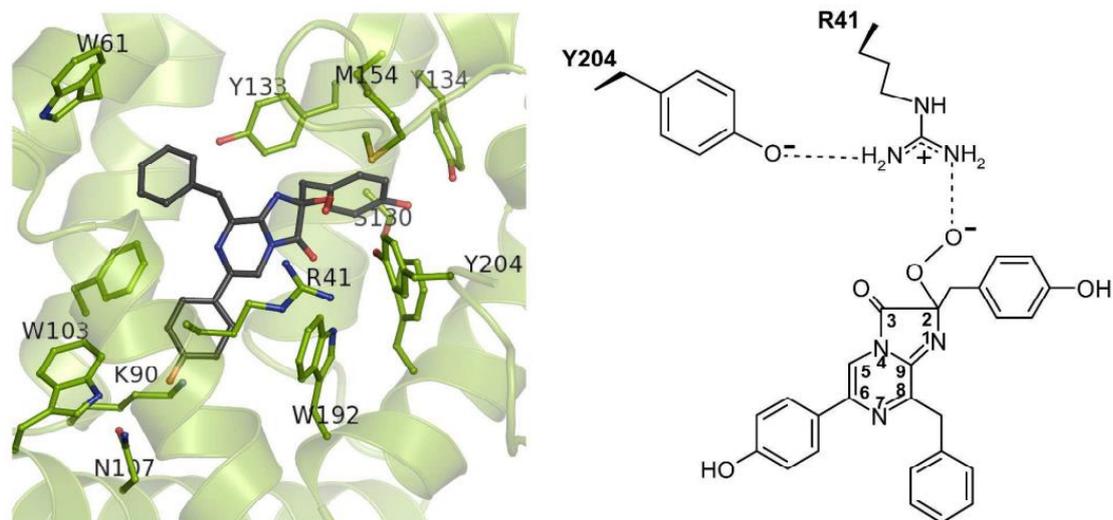


Рисунок 6 – Пространственная модель фотопротейна беровина [34].

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 фотопротейнов гребневиков отличаются от таковых в фотопротейнах гидромедуз [34]. Поскольку триад аминокислотных остатков, координирующих активные группы предокисленного целентеразина, аналогично таковым в фотопротейнах гидромедуз, в фотопротейнах ктенофор обнаружено не было, то согласно расположению боковых радикалов аминокислот в беровине относительно этих групп, 6-(p)-гидроксифенильная группа предположительно может координироваться Lys90 и Asn107, а N1 атом - Phe188 и Trp192.

#### 1.4. Свойства мутантов беровина

Замена аминокислотных остатков в белках на другие с различными свойствами боковых радикалов позволяет выяснить их роль в реализации их основных функций. Фотопротейны 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 фотопротейна. 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 фотопротейна. 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. Однако в мнемипсине, имеющем высокую степень гомологии аминокислотных остатков с беровином, замена R41K привела даже к повышению активности [43].

Центральная и С-концевая части внутренней полости беровина более гидрофобны и сформированы в основном Tyr133, Tyr134, Tyr204, Trp192, Met153, Met154, Ser130, и двумя Phe остатками, содержат одну молекулу воды, которая связана с Tyr133 через ОН-группу. Большинство мутантов с заменой 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 фотопротейна. 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 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 [8].

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  $\alpha$ -спиралях, соответственно. Боковые цепи остатков Trp92 и Trp179 находятся по обе стороны от 6-(p)-гидроксифенильного кольца целентеразина; а боковые цепи Trp114 и Trp135 располагаются вблизи 2-(p)-гидроксibenзильной группы целентеразина. Эти триптофаны важны в биолюминесценции, так как атомы азота индольных колец Trp92 и Trp179 формируют водородные связи с атомами кислорода 6-(p)-гидроксифенильной группы и C3-карбониллом целентеразина [27]. В активном центре беровина 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 Trp приводит к почти полной потере биолюминесценции [34]. В случае мнемипсина аналогичная замена W101F имела схожий эффект, тогда как замена W101Y приводила к гораздо меньшему снижению активности [43]. Определение кажущихся констант диссоциации у триптофановых мутантов беровина показало, что при заменах W103F и W103Y сродство к субстрату увеличивается, хотя выход активного белка при этом наблюдался значительно ниже, чем у дикого беровина [34].

Спектры биолюминесценции мутантов практически соответствуют спектру биолюминесценции беровина дикого типа ( $\lambda_{\max} = 490 \pm 5$  нм). Мутация только двух остатков, Asn107 и Tyr134, приводила к изменению спектра биолюминесценции. При замене Tyr134 на Phe максимум излучения сдвигался в сторону более коротких длин волн ( $\lambda_{\max} = 482-483$  нм), в то время как замена Asn107 на Trp приводила к более значительному смещению спектра биолюминесценции ( $\lambda_{\max} = 535$  нм) [34].

Таким образом, сходство фотопротеинов гребневиков и гидромедуз обуславливается только их функциональными особенностями и общим субстратом, тогда как строение активного центра и механизмы биолюминесценции значительно отличаются.

### **1.5. Молекулярное моделирование как метод прогноза свойств мутантов**

Предсказание посттрансляционных модификаций (ПТМ) белка является важной задачей современной компьютерной протеомики. Большинство белков подвергается посттрансляционным модификациям после синтеза, и ПТМ также могут контролировать состояние активности белков [44], их локализацию [45], фолдинг [46]. Фосфорилирование серина, треонина, и тирозиновых остатков ферментами является наиболее распространенным и важным регулятором функции белка [47]. N-концевые участки молекул или их C-концевые участки (гликозилирование и фосфорилирование), или их боковые цепи (амидирование и пренилирование) могут быть модифицированы посттрансляционно. Некоторые ПТМ зависят от частных аминокислотных последовательностей. Эти зависимости можно наблюдать в виде аминокислотных мотивов, которые характеризуют сайты посттрансляционной модификации, применимые для их распознавания в первичных структурах белка. Эти контекстные сигналы были идентифицированы и описаны как мотивы фосфорилирования [48], ацетилирования [49] и многих других сайтов. Более сложные зависимости

могут быть идентифицированы с помощью алгоритмов машинного обучения, и они доказали свою полезность для распознавания ПТМ в белковых последовательностях [ 50 ]. Сайты посттрансляционной модификации также могут быть описаны в трехмерных структурах белков [ 51 ]. Это описание выгодно, поскольку оно позволяет локализовать сайтообразующие остатки, даже если они расположены далеко друг от друга в первичной структуре, что их одномерные структуры не позволяют обнаружить.

Таким образом, молекулярное моделирование является мощным инструментом в современной науке, особенно в области протеомики. Его применение становится все более значимым в анализе и прогнозировании свойств молекул, играя ключевую роль в понимании их структуры, функции и влияния на биологические процессы. Одним из основных преимуществ молекулярного моделирования является возможность визуализации трехмерной структуры молекул, включая белки, нуклеиновые кислоты и другие биомолекулы. Это позволяет анализировать влияние мутаций на конформацию молекулы и их взаимодействие с другими компонентами клетки или организма в целом.

Для анализа сходства и различий в строении различных классов фотопротеинов применяются методы молекулярного моделирования их третичных структур, используя подход AlphaFold [ 52 ], а также методы моделирования по гомологии с использованием пакетов Swiss-Model и I-Tasser. Для предсказания структур фотопротеинов в апо- и холо-формах используются соответствующие шаблоны структур гомологичных фотопротеинов с доступными кристаллическими структурами. Таким образом, выделяются основные структурные фрагменты, которые потенциально могут быть ответственными за различные физико-химические свойства фотопротеинов.

Существует два подхода построения предсказательных моделей, связанных аминокислотной последовательностью и физико-химическими свойствами:

1) с использованием регрессионной модели через пакет WebProAnalyst, способной выявлять взаимосвязь между аминокислотным составом активного сайта и физико-химическими свойствами фотопротеинов [53];

2) с применением предобученных лингвистических моделей, основанных на белковых последовательностях базы данных UniProt50 или UniProt90, для построения предсказательных моделей, таких как модели ProtT5-XXL-UniRef50, ProtBert-BFD, ProtXLNet из проекта ProtTrans [54] и модель ESM-1b [55].

Прогнозирование набора мутаций, способных улучшить функциональные свойства фотопротеинов, осуществляется с помощью моделей, созданных методами молекулярного моделирования. Для предсказания применяются как метод полного перебора комбинаций одиночных, так и парных или тройных мутаций, так и алгоритмы оптимизации, основанные на методе Монте-Карло. Для каждой структуры генерируется не менее 10000 последовательностей, среди которых отбираются те, что имеют наилучшие значения оценочной функции DeepAccNet, энергетического функционала Rosetta и значения метрики LDDT, рассчитанные с помощью AlphaFold.

## **1.6. Целентеразин-зависимые репортеры**

В настоящее время широкое использование биолюминесцентных репортерных молекул бывает затруднено из-за некоторых недостатков уже изученных биолюминесцентных белков. Главными проблемами существующих биолюминесцентных репортеров являются: не очень высокий квантовый выход, высокая поглощаемость излучаемого света живой тканью из-за сдвига эмиссионного спектра к синей области, температурный оптимум реакции, который сильно отличается от температуры тела млекопитающих. Например, люциферазы насекомых, которые имеют спектр излучения, наиболее близкий к красной области и частично попадающий в «окно прозрачности» для животных тканей, катализируют сложную реакцию, требующую АТФ и  $Mg^{2+}$ . Кроме того, люциферазы довольно чувствительны к температуре, рН и буферным условиям,

а их спектр и активность будут зависеть от температуры. Также, известно, что свечение светлячковой люциферазы может быть подавлено активными формами кислорода.

Целентеразин-зависимые фотопротеины, которые являются более активными и могут окислять субстрат без кофакторов, а также бактериальная люцифераза, имеют спектры синего и зеленого цветов, которые не являются оптимальными для распространения в животных тканях. Таким образом, все существующие на сегодняшний день биолюминесцентные репортеры далеки от идеальных.

Для того чтобы продолжить разработку биолюминесцентных технологий для визуализации молекулярных процессов в клетке *in vivo*, нужны более совершенные репортеры. При этом биолюминесцентные белки должны соответствовать нескольким требованиям:

- 1) демонстрировать высокий квантовый выход;
- 2) иметь температурный оптимум, близкий к температуре тела млекопитающих;
- 3) быть устойчивыми к внутриклеточному окружению, как сами белки, так и катализируемые ими реакции. Кроме того, биолюминесцентная реакция должна быть простой (не требовать несколько субстратов или кофакторов), а молекулярная масса белков должна быть минимальной, чтобы не нагружать клетку-хозяина [56].

В связи с вышесказанным, работа над созданием репортерных биолюминесцентных молекул с оптимальным сочетанием требуемых параметров является актуальной задачей молекулярной биологии и биотехнологии. Анализ литературных данных показывает, что наиболее изученным фотопротеином гребневиков является беровин из ктенофор *Beroë abyssicola*. Анализ свойств фотопротеинов осуществляется с применением различных методов, включая молекулярное моделирование и последующее использование сайт-направленного мутагенеза [34, 57], который обеспечивает

возможность точечной замены аминокислотных остатков. Исследование и создание мутантных биолюминесцентных белков способствует выяснению функциональной значимости отдельных аминокислотных остатков, а также направлено на придание новых свойств белкам, что может иметь значительное значение для прикладных научных исследований.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ Сайт-направленный мутагенез и получение штаммов-продуцентов

Сайт-направленный мутагенез проводили с использованием набора QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, США) согласно протоколу производителя. В качестве матрицы использовали ранее созданную экспрессионную конструкцию рЕТ22-ВAwт содержащую кодирующую часть гена беровина дикого типа. Последовательности праймеров для мутагенеза представлены в таблице:

Таблица 1 – Праймеры для мутагенеза

Мутации в беровине	Праймеры	Последовательности праймеров
K90A	Прямой	5'-GTTTTCTTTTTGCACGCGGGAGTGGAGC-3'
	Обратный	5'-GCTCCAСТСССGCGTGCAAAAAGAAAAC-3'
K90M	Прямой	5'-GAGTTTTCTTTTTGCACATGGGAGTGGAGC-3'
	Обратный	5'-GCTCCAСТСССATGTGCAAAAAGAAAАСТС-3'
N107M	Прямой	5'-GTGGAAGCTATGAGAGTCTTCGC-3'
	Обратный	5'-GCGAAGACTCTCATAGCTCCAC-3'
N107S	Прямой	5'-GTGGAAGCTAGCAGAGTCTTCGC-3'
	Обратный	5'-GCGAAGACTCTGCTAGCTCCAC-3'
W103Y	Прямой	5'-CCTCAGAGAGGACTACGTGGAAGCTAACAGAG-3'
	Обратный	5'-СТСТGTTAGCTTCCACGTAGTCCTCTCTGAGG-3'
W103F	Прямой	5'-CCTCAGAGAGGACTTCGTGGAAGCTAACAGAG-3'
	Обратный	5'-СТСТGTTAGCTTCCACGAAGTCCTCTCTGAGG-3'

	Обратный	5'-GAAGACTCTCATAGCTTCCACAAAGTCCTCTCTG-3'
--	----------	--

Программа амплификации:

95°C-30сек	} 17 циклов
95°C-30сек	
56°C-1 минута	
68°C-14 минут	

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

Наличие соответствующих мутаций подтверждали секвенированием. Далее плазмиды с мутантными генами беровина были использованы для трансформации штамма BL21(DE3) Codon Plus RIPL *E. coli*.

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 наращивания биомассы и получения апобелка.

## 2.2. Получение апо-беровина

Наращивание бактериальной культуры проводили путем посева 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  $OD_{590}=0,7$ . Индукцию синтеза белка осуществляли добавлением раствора ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ, после чего растили еще 3 часа.

Для получения тельц включения, содержащих апобелок, клеточный осадок ресуспендировали в буфере 20 мМ Трис-НСl, рН 7,0, а затем клетки разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора УЗДН-2Т (РосПрибор, Россия) четырехкратной 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 рН 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 рН 7,0. Затем образец вновь центрифугировали 10 минут при 10000 g.

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

### **2.3. Определение оптимальных условий активации**

Все мутантные варианты боровина были выделены в виде апобелков и использованы для анализа условий активации, включающих такие параметры, как рН (6,0-9,0 с шагом 0,5) и концентрация NaCl (0-1 М с шагом 0,1 М), а также время инкубации.

Растворы для определения оптимума pH содержали: 480 мкл 50 мМ bis-Tris-propane-HCl с соответствующим значением pH; 5 мМ ЭДТА; 0 или 0,5 М NaCl, 10 мкл раствора апобелка с концентрацией ~ 1мг/мл; 10 мкл раствора целентеразина в 95% этиловом спирте с концентрацией  $4,6 \times 10^{-4}$  (молярное соотношение белок:целентеразин ~ 1:5). Растворы для определения оптимума концентрации NaCl имели тот же состав, но при этом содержали соль в диапазоне 0-1 М. Инкубацию проводили при 4 °С. Все манипуляции с фотопротеинами проводили без доступа света для предотвращения его инактивации. Выход активного белка косвенно оценивали по уровню биолюминесцентной активности после 24 и 48 часов инкубации.

Биолюминесцентную активность измеряли с помощью биолюминометра БЛМ-8812 (СКБТ «Наука», Россия) путем быстрого внесения 10 мкл раствора белка в кювету люминометра, содержащую 490 мкл измерительного буфера (50 мМ Трис-HCl, pH 8,8, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>). Каждое измерение проводили не менее 3-х раз. В качестве основного результата брали среднее арифметическое трех измерений с учетом ошибки среднего.

#### **2.4. Получение мономерных фракций апобелков**

Разделение апобелков на полимерную и мономерную фракции проводили путем гель-фильтрации на колонке Superdex 75 (GE Healthcare, США) в буфере 20 мМ pH 7,0, 5 мМ ЭДТА со скоростью элюции 0,5 мл/мин. Концентрацию белка определяли по методу Лоури [58].

#### **2.5. Очистка фотопротеиновых комплексов**

Белок активировали инкубацией с целентеразином (молярное соотношение белок:целентеразин 1:1,1) при 4°С в течение оптимального времени зарядки комплекса. Очистку заряженного белка проводили с помощью ионообменной хроматографии на колонке Capto HiRes Q5/50 (GE Healthcare, США) в линейном градиенте NaCl (0-0,5 М), скорость элюции 1 мл/мин. Выход активного фотопротеина оценивали с помощью уравнения:

$$A(\%) = \frac{C_{charg}}{C_{charg} + C_{apo}} \times 100\% , \quad (1),$$

где  $A$  (%) – выход активного белка (%),  $C_{charg}$  – концентрация белка в хроматографической фракции активного фотопротейна (мг/мл),  $C_{apo}$  – концентрация белка в хроматографической фракции апофотопротейна (мг/мл). Все манипуляции с активными фотопротейнами проводили без доступа света. Концентрацию белка определяли по методу Лоури [57].

## 2.6. Определение кажущейся константы диссоциации комплекса апобелок-целентеразин

Кажущуюся константу диссоциации комплекса апобелок-целентеразин определяли по тушению триптофановой флуоресценции апо-бировина при связывании с целентеразином. Тушение флуоресценции оценивали по изменению интенсивности излучения при 336 нм. Интенсивность флуоресценции корректировали на разведение образца за счет добавления раствора целентеразина. Кажущиеся константы диссоциации для комплекса апофотопротейн-целентеразин определяли из тушения флуоресценции апофотопротейна разными концентрациями целентеразина [ 59 ]. Долю связанного лиганда рассчитывали, как отношение тушения флуоресценции ( $Q = F_o - F_q$ ) к максимальному тушению ( $Q_{max} = F_o - F_{qmax}$ ), где  $F_o$ ,  $F_q$  и  $F_{qmax}$  – интенсивность флуоресценции при 336 нм, измеренная в отсутствие добавленного лиганда, интенсивность тушения флуоресценции в присутствии лиганда и максимальное тушение флуоресценции при уровне насыщения лиганда соответственно. Кажущиеся константы диссоциации рассчитывали, приводя относительную эмиссию флуоресценции к уравнению:

$$\frac{Q}{Q_{max}} = \frac{(C + L + K_D) - \sqrt{(C + L + K_D)^2 - 4CL}}{2} \quad (2),$$

где  $C$ ,  $L$  – концентрации апобелка и целентеразина, соответственно, а  $K_D$  – кажущаяся константа диссоциации.

Флуоресценцию измеряли с помощью спектрофлуориметра Cary Eclipse (Varian, США) в 20 мМТрис-НСl рН 7,0, 5 мМ ЭДТА при 20°С. Все спектры флуоресценции получены с использованием кварцевой кюветы (1x1 см) при постоянном перемешивании в начальном объеме раствора апобелка 1 мл, к которому затем добавляли раствор целентеразина порциями от 1 до 15 мкл до насыщения.

Для исключения влияния эффекта внутреннего фильтра, наблюдающегося при взаимодействии белка и лиганда, и проведения коррекции значений флуоресценции измерялось поглощение образца при длинах волн возбуждения и излучения, использованных при измерении флуоресценции. Концентрацию белка определяли по методу Лоури [57].

## **2.7. Измерение биолюминесцентной активности**

Биолюминесцентную активность измеряли с помощью биолюминометра БЛМ-8812 (Оберон-К СКТБ "Наука", Россия) путем быстрого внесения 10 мкл раствора белка с помощью шприца CR 700–20 (Hamilton, США) в кювету люминометра, содержащую 490 мкл измерительного буфера (50 мМ Трис-НСl, рН 8,8, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>). Каждое измерение проводили не менее 3-х раз. В качестве основного результата брали среднее арифметическое трех измерений с учетом ошибки среднего.

Максимальную Ca<sup>2+</sup>-независимую биолюминесценцию измеряли, помещая 500 мкл очищенного фотопротеина в 20 мМ Трис-НСl, 5 мМ ЭДТА и ~ 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 Ca<sup>2+</sup>-независимую биолюминесценцию рассчитывали как отношение удельной активности в бескальциевых условиях к максимальной удельной активности при добавлении кальция.

## **2.8. Измерение константы спада биолюминесцентной реакции**

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

## **2.9. 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 370 нм до 600 нм, длина волны облучения 350 нм, напряжение на ФЭУ 600 В. Измерения проводили в буфере 50 мМ бис-Трис пропан рН 7,0, биолюминесценцию инициировали добавлением 40 мкл 100 мМ раствора CaCl<sub>2</sub> в том же буфере.

## **2.10. Фото- и термо- инактивация**

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

## **2.11. Ненаправленный мутагенез**

В качестве матриц для ненаправленного мутагенеза использовали ранее полученные экспрессионные плазмиды pQE60-BAK90M/N107S, pQE60-BAK90M/W103F/N107S, pET22b-BAK90M/N107S, pET22b-

ВАК90М/В103F/Н107S, содержащие гены мутантов боровина. Мутагенез (один раунд) проводили с использованием набора Diversity PCR Random Mutagenesis Kit (Clontech, США), в соответствии с прилагаемым протоколом. Последовательности праймеров для синтеза, содержащих сайты рестрикции для последующего клонирования в векторы, приведены в Таблице 2.

Таблица 2 – Последовательности праймеров для синтеза фрагментов со случайными мутациями

Вектор для клонирования	Праймеры	Последовательности праймеров
pQE60 NcoI/BamHI deph	Прямой	5'-AGTTACATATGACTGAACGTCTGAACG-3'
	Обратный	5'-TACCTCGAGATTAGTACTTATAAGCGTAGACTC-3'
pET22b NdeI/XhoI deph	Прямой	5'-CATTACCATGGATGACTGAACGTCTGAACGAGC-3'
	Обратный	5'-CATATGGATCCTTAGTACTTATAAGCGTAGACTCCGTC-3'

Программа амплификации:

94°C-30сек

94°C-30сек

58°C-20сек

68°C-1 минута

} 25 циклов

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

Продукты реакции анализировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле, очищали с помощью QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, США) согласно протоколу производителя, подвергали рестрикции Bsp19I

(аналог NcoI) и BamHI для клонирования в pQE60, FauNDI (аналог NdeI) и XhoI для клонирования в pET22b. Вставки после рестрикции очищали с помощью препаративного электрофореза в 1% агарозном геле. Экстракцию фрагментов ДНК из геля осуществляли с помощью QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, США) согласно протоколу производителя. Лигирование вставок и векторов проводили с помощью T4 DNA ligase (СибЭнзим, Новосибирск, Россия) в течение ночи при 16 °С. Далее проводили электротрансформацию лигазными смесями клеток *E. coli* XL1Blue (для конструкций в pQE60) и BL21 (DE3) Codon Plus RIPL (для конструкций в pET22b).

## 2.12. Скрининг на колониях

Для скрининга клетки *E. Coli* XL1Blue и RIPL, трансформированные плазмидами pQE60 или pET22b, соответственно, несущими гены мутантов боровина после ненаправленного мутагенеза, высевали на чашки Петри с LB-агаром, содержащим 200 мг/л ампициллина. Количество колоний на каждой чашке подсчитывали вручную и суммировали. Колонии обильно опрыскивали 40 мМ водным раствором ИПТГ в H<sub>2</sub>O и инкубировали в течение 1 ч при 37°С для индукции экспрессии гена. Затем колонии обрабатывали 0,7 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 CaCl<sub>2</sub> в 100 мМ Трис-НСl рН 7,0, после чего визуализировали свечение с помощью CCD-камеры в течение 3 минут. В качестве контроля использовали XL1Blue, трансформированные pET22b-OLwt, pQE60-OLwt и pQE60-BAwt.

### 2.13. 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) и XL1Blue (Stratagene, США). В работе был использован вектор pET22b (Novagen, США) и pQE60 (QIAGEN, США). При скрининге использовались: LB-среда, ампициллин, изопропил  $\beta$ -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, HiTrap Q HP5, Capto HiRes 50/50 и Superdex 75 (GE Healthcare, США).

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

## 3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изъяты страницы 32-46 в связи с авторским правом

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рекомбинантные фотопротеины гребневиков наиболее эффективно образуют фотопротеиновый комплекс с целентеразином в щелочных условиях и при высокой концентрации соли, а также являются термолабильными, что препятствует их использованию в качестве репортерных молекул *in vivo*, а также получению кристаллов белка в его активированном состоянии. Поэтому модификация этих молекул с целью получения на их основе фотопротеинов с новыми свойствами, является актуальной задачей, которая может быть решена с помощью сочетания различных подходов – расчетных методов и непосредственных манипуляций с молекулами, включающих сайт-направленный мутагенез, основывающийся на теоретических предсказаниях, и ненаправленный мутагенез.

В данной работе мы применили все эти подходы для создания фотопротеина на основе рекомбинантного беровина из *Beroe abyssicola* с оптимумом активации *in vitro* при физиологических условиях, а также с повышенной термостабильностью и сниженной чувствительностью к облучению светом. Был получен и охарактеризован ряд мутантов беровина, в результате чего обозначена роль одного из ключевых аминокислотных остатков Lys90, а также подобрана комбинация из трех аминокислотных замен: K90M, W103F и N107S, позволяющая получать апобелок, активирующийся при физиологических значениях pH и соли с приемлемым выходом активного белка, а также с повышенной термо- и фотостабильностью по сравнению с диким беровином.

Остается не до конца решенной проблема снижения удельной активности в результате таких замен. Таким образом, мы экспериментально подтвердили правомерность использования методов молекулярного моделирования, как AlphaFold и другие для прогнозирования влияния тех или иных мутаций на свойства фотопротеинов. Работа в этом направлении будет продолжена.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфат

DEAE – диэтиламиноэтил

LB – Lysogeny Broth

SOC – Super Optimal Broth for Catabolic repression

ИПТГ – изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид

ПААГ – полиакриламидный гель

ФЭУ – фотоэлектронный умножитель

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ПТМ – предсказание посттрансляционных модификаций

## 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 Haddock S. H. D., Moline M. A., Case J. F. Bioluminescence in the sea // *Annual review of marine science*. – 2010. – V. 2. – P. 443-493.

3 Markova S. V., Vysotski E. S. Coelenterazine-dependent luciferases // *Biochemistry*. – 2015. – V. 80. – P. 714-732.

4 Еремеева Е. В. Формирование активного фотопротеинового комплекса на примере обелина и акворина и их мутантных форм дис. – Красноярск: ЕВ Еремеева, 2010.

5 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. – P. 223-239.

6 Бондарь В. С. Физико-химические свойства фотопротеина из гидроидного полипа *Obelia longissima* // *Биохимия*. – 1992. – Т. 57. – С. 1481-1490.

7 Markova, S. V. et al. The light-sensitive photoprotein berovin from the bioluminescent ctenophore *Beroe abyssicola*: A novel type of Ca<sup>2+</sup>-regulated photoprotein // *FEBS Journal*. – 2012. – V. 279. – P. 856-870.

8 Рукосуева Н. В. Влияние аминокислотных замен на фолдинг и свойства рекомбинантного фотопротеина беровина гребневика *Beroe abyssicola* :дис. – Сибирский федеральный университет, 2022.

9 Машукова О. В., Токарев Ю. Н. Вариабельность биолюминесценции *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz (Ctenophora: Lobata) при регенерации // *Морской биологический журнал*. – 2016. – Т. 1. – С. 36-42.

10 Ward W. W., Seliger H. H. Extraction and purification of calcium-activated photoproteins from the ctenophores *Mnemiopsis species* and *Beroe ovata* //Biochemistry. – 1974. – V. 13. – P. 1491-1499.

11 Labas Y. A. et al. Diversity and evolution of the green fluorescent protein family //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2002. – V. 99. – P. 4256-4261.

12 Токарев Ю. Н., Машукова О. В., Василенко В. И. Биолюминесценция черноморских гребневиков-вселенцев *Mnemiopsis leidyi* и *Beroe ovata* при механической и химической стимуляции //Экология моря. – 2008. – Т. 76. – С. 61-66.

13 Labas Y. A. et al. Diversity and evolution of the green fluorescent protein family //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2002. – V. 99. – P. 4256-4261.

14 Shimomura O. Bioluminescence: Chemical Principles and Methods. – World Scientific, 2006.

15 Vysotski E. S., Markova S. V., Frank L. A. Calcium-regulated photoproteins of marine coelenterates //Molecular Biology. – 2006. – V. 40. – P. 355-367.

16 Shimomura O., Johnson F. H. Structure of the light-emitting moiety of aequorin //Biochemistry. – 1972. – V. 11. – P. 1602-1608.

17 Cormier M. J. et al. Evidence for similar biochemical requirements for bioluminescence among the coelenterates //Journal of cellular physiology. – 1973. – V. 81. – P. 291-297.

18 Vysotski E. S., Lee J. Ca<sup>2+</sup>-regulated photoproteins: structural insight into the bioluminescence mechanism //Accounts of chemical research. – 2004. – V. 37. – P. 405-415.

19 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. – P. 9-15.

20 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. – P. 77-85.

21 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. – P. 411-418.

22 Widder, E.A. Bioluminescence in the ocean: origins of biological, chemical, and ecological diversity // Science. - 2010. – V. 328. – P. 704-708.

23 Golz S. et al. Isolated photoprotein bolinopsin, and the use thereof //Patent No. WO. – 2005. – P. 2005000885-A1

24 Aghamaali M. R. et al. Cloning, sequencing, expression and structural investigation of mnemiopsin from *Mnemiopsis leidyi*: an attempt toward understanding Ca<sup>2+</sup>-regulated photoproteins //The protein journal. – 2011. – V. 30. – P. 566-574.

25 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. – P. 360-366.

26 Tsuji F. I. ATP-dependent bioluminescence in the firefly squid, *Watasenia scintillans* //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1985. – V. 82. – P. 4629-4632.

27 Vysotski E. S., Lee J. Bioluminescent mechanism of Ca<sup>2+</sup>-regulated photoproteins from three-dimensional structures //Luciferases and fluorescent

proteins: principles and advances in biotechnology and bioimaging. – 2007. – P. 19-41.

28 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. – P. 559-570.

29 Tsuji F. I. et al. Molecular evolution of the  $\text{Ca}^{2+}$ -binding photoproteins of the hydrozoa // *Photochemistry and photobiology.* – 1995. – V. 62. – P. 657-661.

30 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.

31 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.

32 Titushin M. S. et al. NMR-derived topology of a GFP-photoprotein energy transfer complex // *Journal of Biological Chemistry.* – 2010. – V. 285. – P. 40891-40900.

33 Stepanyuk, G. et al. Spatial structure of the novel light-sensitive photoprotein berovin from the ctenophore *Beroë abyssicola* in the  $\text{Ca}^{2+}$ -loaded apoprotein conformation state // *Biochimica et Biophysica Acta.* -2013. – V. 1834. – P 2139-2146.

34 Burakova, L. P. et al. Role of certain amino acid residues of the coelenterazinebinding cavity in bioluminescence of light-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated photoprotein berovin/ L.P. Burakova, G.A. Stepanyuk, E.V. Eremeeva, E.S. Vysotski // *Photochem Photobiol. Sci.* – 2016. – V.15. – P. 691-704.

35 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. – P. 164-170.

36 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.

37 Kreiss P. L., Cormier M. J. Inhibition of *Renilla reniformis* bioluminescence by light: Effects of luciferase and its substrates //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. – 1967. – V. 141. – P. 181-183.

38 Burakova L. P. et al. Recombinant Ca<sup>2+</sup>-regulated photoproteins of ctenophores: current knowledge and application prospects // Appl MicrobiolBiotechnol. – 2019. – V. 103. – P.5929-5946.

39 Burakova L. P., Ereemeeva E. V., Vysotski E. S. The interaction of C-terminal Tyr208 and Tyr13 of the first  $\alpha$ -helix ensures a closed conformation of ctenophore photoprotein berovin //Photochemical & Photobiological Sciences. – 2020. – V. 19. – P. 313-323.

40 Ereemeeva E. V. et al. Hydrogen-bond networks between the C-terminus and Arg from the first  $\alpha$ -helix stabilize photoprotein molecules //Photochemical & Photobiological Sciences. – 2014. – V. 13. – P. 541-547.

41 Anctil M., Shimomura O. Mechanism of photoinactivation and re-activation in the bioluminescence system of the ctenophore *Mnemiopsis* //Biochemical Journal. – 1984. – V. 221. – P. 269-272.

42 Burakova L. P. et al. Unexpected coelenterazine degradation products of *Beroe abyssicola* photoprotein photoinactivation //Organic Letters. – 2021. – V. 23. – P. 6846-6849.

43 Mahdavi A. et al. Site-directed mutagenesis of photoprotein mnemiopsin: implication of some conserved residues in bioluminescence properties //Photochemical & Photobiological Sciences. – 2013. – V. 12. – P. 467-478.

44 Kaiser W. M., Huber S. C. Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers //Journal of experimental botany. – 2001. – V. 52. – P. 1981-1989.

45 Rocks O. et al. An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms //Science. – 2005. – V. 307. – P. 1746-1752.

46 Goldberg A. L. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins //Nature. – 2003. – V. 426. – P. 895-899.

47 McLachlin D. T., Chait B. T. Analysis of phosphorylated proteins and peptides by mass spectrometry //Current opinion in chemical biology. – 2001. – V. 5. – P. 591-602.

48 Kemp B. E., Pearson R. B. Protein kinase recognition sequence motifs //Trends in biochemical sciences. – 1990. – V. 15. – P. 342-346.

49 Persson B. et al. Structures of N-terminally acetylated proteins //European journal of biochemistry. – 1985. – V. 152. – P. 523-527.

50 Blom N. et al. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence //Proteomics. – 2004. – V. 4. – P. 1633-1649.

51 Ivanisenko V. A. et al. PDBSite: a database of the 3D structure of protein functional sites //Nucleic Acids Research. – 2005. – V. 33. – P. D183-D187.

52 Jumper J. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold //Nature. – 2021. – V. 596. – P. 583-589.

53 Ivanisenko V. A., Eroshkin A. M., Kolchanov N. A. WebProAnalyst: an interactive tool for analysis of quantitative structure–activity relationships in protein families //Nucleic acids research. – 2005. – V. 33. – P. W99-W104.

54 Elnaggar A. et al. Prottrans: Toward understanding the language of life through self-supervised learning //IEEE transactions on pattern analysis and machine intelligence. – 2021. – V. 44. – P. 7112-7127.

55 Rives A. et al. Biological structure and function emerge from scaling unsupervised learning to 250 million protein sequences //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2021. – V. 118.

56 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. – P. 77-85.

57 Mahdavi A. et al. Site-directed mutagenesis of photoprotein mnemiopsin: implication of some conserved residues in bioluminescence properties //Photochemical & Photobiological Sciences. – 2013. – V. 12. – P. 467-478

58 Lowry O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent //Journal of biological chemistry. – 1951. – V. 193. – P. 265-275.

59 Ereemeeva E. V. et al. The intrinsic fluorescence of apo-obelin and apo-aequorin and use of its quenching to characterize coelenterazine binding //FEBS letters. – 2009. – V. 583. – P. 1939-1944.

60 Burakova L. P., Kolmakova A. A., Vysotski E. S. Recombinant light-sensitive photoprotein berovin from ctenophore *Beroe abyssicola*: Bioluminescence and absorbance characteristics //Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2022. – V. 624. – P. 23-27.

61 Ereemeeva E. V. et al. The intrinsic fluorescence of apo-obelin and apo-aequorin and use of its quenching to characterize coelenterazine binding //FEBS letters. – 2009. – V. 583. – P. 1939-1944.

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 2024 г.

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

**Характеризация мутантов фотопротейна беровина с  
оптимумом активации при физиологических условиях,  
предсказанных с помощью методов молекулярного  
моделирования**

06.03.01 – Биология

06.04.01.01 –Микробиология и биотехнология

Научный руководитель

  
подпись, дата

С.н.с, к.б.н.  
должность, ученая степень

Л.П. Буракова

Выпускник

  
подпись, дата

Н.В. Рукосуева

Рецензент

  
подпись, дата

к.б.н.  
должность, ученая степень

М.Ю. Трусова

Красноярск 2024