

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.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 – Биология

Создание термостабильных вариантов рекомбинантной люциферазы мягкого  
коралла *Renilla muelleri*

Руководитель	_____	<u>к.б.н., доцент</u>	<u>Е. В. Еремеева</u>
	Подпись, дата	Должность, ученая степень	Инициалы, фамилия
Выпускник	_____		<u>Ш. А. Нур</u>
	Подпись, дата		Инициалы, фамилия

Красноярск 2024

## РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Создание термостабильных вариантов рекомбинантной люциферазы мягкого коралла *Renilla muelleri*» содержит 57 страниц текстового документа, 3 таблицы, 72 использованных источников, и 18 рисунков.

Ключевые слова: ЛЮЦИФЕРАЗА, RENILLA MUELLERI, БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ, ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ.

Цель работы: увеличить устойчивость фермента RmY к температурным воздействиям путем внесения ряда аминокислотных замен сайт-направленным мутагенезом, предсказанных с использованием компьютерного моделирования.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

1. Получить высокоочищенные рекомбинантные варианты RmY с предсказанными методами компьютерного моделирования аминокислотными заменами.
2. Изучить спектральные и физико-химические свойства полученных мутантов RmY, такие как спектр биолюминесценции, устойчивость к высоким температурам, температуру теплового перехода и кинетические параметры ферментативной активности.
3. Оценить изменение физико-химических и биолюминесцентных свойств выделенных мутантов по сравнению с исходной люциферазой RmY.

Актуальность данной работы заключается в следующем.

Биолюминесцентная визуализация требует широкий спектр белков и их субстратов с различными биофизическими свойствами. Большинство люцифераз выделены из холодолюбивых морских организмов, поэтому имеют низкий температурный оптимум из-за этого их ферментативная активность значительно снижается при физиологических температурах. Данный недостаток значительно осложняет применение таких люцифераз в

работах *in vivo*, поэтому на сегодняшний день создание термостабильных вариантов люцифераз является актуальной задачей.

# СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТ .....	2
ВВЕДЕНИЕ.....	6
1. ОБЗОР НАУЧНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	9
1.1 Многообразие люцифераз.....	9
1.2 Использование аффинных меток и TEV-протеазы в очистке белков.	16
1.3 Искусственный интеллект в создании новых белков/ферментов .....	17
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	22
2.1 Материалы .....	22
2.2 Методы.....	24
2.2.1 Приготовление компетентных клеток <i>E. coli</i> .....	24
2.2.2 Трансформация компетентных клеток .....	24
2.2.3 Экспрессия рекомбинантной люциферазы RmY.....	25
2.2.4 Разрушение клеточного осадка .....	25
2.2.5 Аффинная хроматография RmY.....	25
2.2.6 Концентрирование белка и определение концентрации .....	25
2.2.7 Протеолитическое удаление His-метки и MBP .....	26
2.2.8 Электрофорез белка в полиакриламидном геле .....	26
2.2.9 Эксклюзионная хроматография (гель-фильтрация).....	26
2.2.10 Измерение биолюминесцентной активности белков .....	26
2.2.11 Измерение спектральных свойств люцифераз.....	27
2.2.12 Определение температурного оптимума биолюминесцентной реакции.....	27

2.2.13	Определение температуры теплового перехода по собственной триптофановой флуоресценции белка .....	28
2.2.14	Определение термостабильности белка .....	28
РЕЗУЛЬТАТЫ .....		29
1.	Получение люциферазы <i>Renilla</i> и ее мутантов.....	29
1.1	Оптимизация протокола выделения люцифераз .....	31
1.2	Оптимизация условий протеолиза .....	32
1.3	Вторая аффинная хроматография .....	34
1.4	Эксклюзионная хроматография (SEC) .....	35
2.	Анализ свойств мутантов люциферазы <i>Renilla</i> .....	36
2.1	Удельная активность. Параметры ферментативной кинетики .....	36
2.2	Температурный оптимум .....	39
2.3	Термостабильность .....	40
2.4	Параметры собственной триптофановой флуоресценции.....	41
2.5	Спектральные свойства .....	43
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....		47
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....		49
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....		50

## ВВЕДЕНИЕ

Биолюминесценция – это явление, связанное с излучением света живыми организмами. Излучать свет способны различные организмы: бактерии, грибы, простейшие, кишечнополостные, черви и т.д. Сегодня более чем 700 родов, принадлежащих к нескольким тысячам биолюминесцентных видов, имеют способность к излучению света. Такая способность актуальна на больших глубинах. Больше 90% глубоководных организмов способны к биолюминесценции, т.к. на такую глубину не проникает свет.

Биолюминесценция представляет собой окисление молекулами кислорода низкомолекулярного субстрата-люциферина, данную реакцию катализирует фермент люцифераза [1]. Продукт реакции представляет собой окисленное производное субстрата в возбужденном состоянии, его переход из возбужденного состояния в основное сопровождается излучением кванта света (рис. 1) [2].

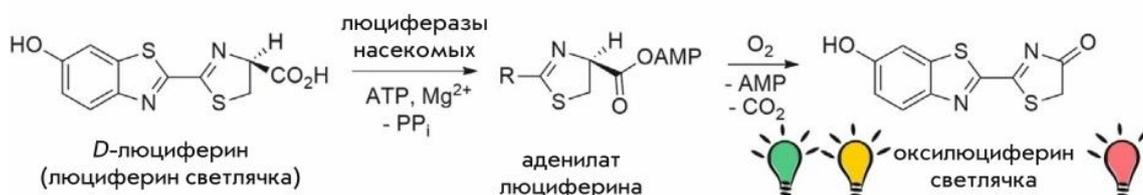


Рисунок 1 - Структура D-люциферина и механизм его биолюминесценции [3]

Несмотря на то, что биохимический процесс биолюминесценции приводит к излучению света, механизмы этого явления сильно различаются у различных организмов [1]. Различия в размере люциферазы, длине волны свечения, стабильности фермента при разных температурах, оптимальном pH и потребности в кофакторах могут быть замечены у разных групп организмов [2]. Это подталкивает к мысли, что способность к свечению у разных организмов возникла в ходе эволюции независимо друг от друга, благодаря соответствующим предковым белкам [3].

В природе существует около 30 различных биолюминесцентных систем, из которых только 9 изучены с точки зрения механизмов их реакции. Предполагается, что биолюминесценция играет роль в коммуникации, как между видами, так и внутри одного вида, также помогает организмам маскироваться или отпугивать хищников, помимо этого привлекать добычу световыми сигналами [2].

Биолюминесцентная визуализация требует широкий спектр белков и их субстратов с различными биофизическими свойствами. Сегодня многие имеющиеся биолюминесцентные репортерные системы несовершенны, что ограничивает их применение в биолюминесцентном имиджинге. Большинство природных и искусственно созданных белков биолюминесцируют в голубой области спектра. Такое излучение эффективно поглощается тканями и гемоглобином млекопитающих, поэтому накладывает ряд ограничений для использования биолюминесцентных методов. Помимо этого, большинство люцифераз имеют низкий температурный оптимум, т.к. выделены из холодолюбивых морских организмов, поэтому их использование в *in vivo* исследованиях затрудняется значительным снижением активности белка при физиологических температурах [4].

**Целью работы** является увеличение устойчивости фермента RmY к температурным воздействиям путем внесения ряда аминокислотных замен сайт-направленным мутагенезом, предсказанных с использованием компьютерного моделирования.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

1. Получить высокоочищенные рекомбинантные варианты RmY с предсказанными методами компьютерного моделирования аминокислотными заменами.

2. Изучить спектральные и физико-химические свойства полученных мутантов RmY, такие как спектр биолюминесценции,

устойчивость к высоким температурам, температуру теплового перехода и кинетические параметры ферментативной активности.

3. Оценить изменение физико-химических и биолюминесцентных свойств выделенных мутантов по сравнению с исходной люциферазой RmY.

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

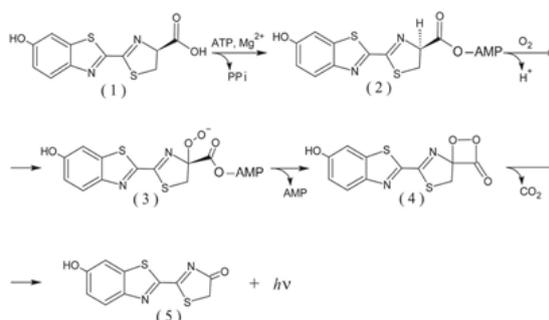
# 1. ОБЗОР НАУЧНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 Многообразие люцифераз

Люциферазы – это ферменты, которые катализируют окисление субстрата (люциферина) молекулярным кислородом. Продукт реакции представляет собой окисленное производное субстрата в возбужденном состоянии, его переход из возбужденного состояния в основное сопровождается излучением кванта света [5].

Французский ученый Дюбуа в 1875 г. получил экстракты некоторых светящихся организмов и установил, что их свечение генерируется в присутствии фермента (люциферазы), который содержался в экстракте полученном при низкой температуре, и субстрата (люциферина), который получался экстракцией при кипячении. Так впервые были введены термины «люциферин» и «люцифераза» [6].

Одной из первых люцифераз, которую удалось изучить была люцифераза светляков. У светляков реакция биолюминесценции воспроизводится, когда в системе присутствуют 4 компонента, а именно люцифераза (фермент, Luc), люциферин (субстрат, LH<sub>2</sub>), кислород, Mg<sup>2+</sup> и АТФ. Продуктами реакции являются – пирофосфат (PPi) и АМР, на основе этих данных была предложена схема люциферазной реакции (рис. 2) [7, 8].



1 – люциферин, 2 – люциферил аденилат, 3 – промежуточное гидропероксидное производное люциферил аденилата, 4 – диоксетанон, 5 – оксилюциферин в форме кетона

Рисунок 2 – Схема люциферазной реакции [9]

Природная биолюминесценция светляков варьируется от 545 до 610 нм, что свидетельствует о влиянии микроокружения эмиттера в активном центре фермента на спектры биолюминесценции [10].

Эмиттер рассматривают как внутримолекулярную метку, поскольку в активном центре фермента может образоваться только одна молекула электронно-возбужденного продукта. Суперпозиция эмиттера, которая фиксируется в спектрах биолюминесценции, свидетельствуют о присутствии разных конформационных форм люциферазы в реакционной среде [9].

Для модулирования физических и химических свойств микроокружения эмиттера в активном центре белка применяют направленный или случайный мутагенез белковой глобулы люциферазы, что позволяет менять «зеленую» биолюминесценцию на «красную», или наоборот.

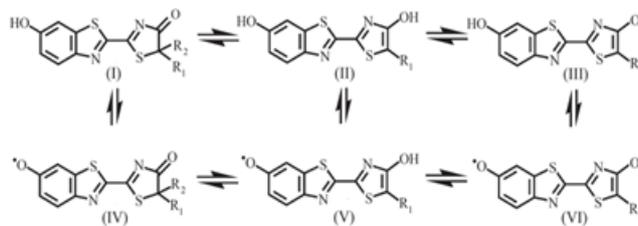
Анализ светляковой люциферазы показал, что имеется зависимость спектра биолюминесценции от pH [10]. Спектр биолюминесценции люциферазы из *L. mingrelica* смещается с 564 до 610 нм при понижении pH от 7.8 до 6.0. Учеными было показано, что внесение единичной мутации Y35H приводит к сохранению спектра биолюминесценции с максимумом при 564 нм на интервале pH от 6.0 до 7.8, что свидетельствует о существовании данного мутанта в виде одного конформера [11]. Схожий эффект был описан для мутанта с заменой H433Y [12].

Сравнение кристаллических структур для комплексов WT и мутантной (S286N) люциферазы *L. cruciata* с аналогом аденилата люциферина (DLSA) (комплексы LucDLSA и mLucDLSA) позволил ученым сделать вывод, что степень жесткости молекулы из-за гидрофобности микроокружения оксильюциферина в возбужденном состоянии провоцирует зеленое свечение. Так же было выявлено, что изменение в комплексе mLucDLSA ориентации остатка изолейцина в 288 положении приводит к «раскрытию» конформации активного центра с менее «жестким» окружением субстрата, из-за чего наблюдается красная биолюминесценция [13]. Пространственные структуры

этих комплексов аналогичны, но происходит изменение ориентации участка, граничащего с остатком тирозина в 35 положении, 233–237 петли. Предполагается, что данная локализация способствует формированию конформации фермента, которая приводит к зеленому свечению. При понижении рН «раскрывается» конформация активного центра белка, из-за чего спектр биолюминесценции смещается в красную область. Замена ароматического остатка тирозина в 35 положении на гистидин, который меньше по размеру, способствует образованию более устойчивой плотной упаковки вблизи 35 остатка. Так же было показано, что понижение рН не влияет на положение 233–237 петли и не приводит к нарушению «закрытой» конформация [9].

У такого результата существует и другое объяснение. Считается, что для образования енола и енолята необходима четкая фиксация донора и акцептора протонов в ближнем окружении к атому кислорода тиазольной группы оксильюциферина. Роль таких соединений способны играть молекулы воды, которые водородной связью связаны с одной стороны с атомом кислорода тиазольного цикла оксильюциферина, а с другой с остатками лизина в 531 и тирозина в 529 положениях из С-домена [13]. Разрушение этих водородных связей в мутантной люциферазе приводит к увеличению содержания конформера люциферазы, генерирующего «красную» форму эмиттера. Ученые считают, что именно водородные связи способны стабилизировать конформеры люциферазы, которые отвечают за «зеленое» свечение, а их удаление приводит к конформеру люциферазы, ответственному за красное свечение. Остаток тирозина в 35 положении консервативен во всех люциферазах светляков [14].

Исследования показали [15–17], что одной из причин изменчивости спектров биолюминесценции является особая структура продукта реакции — оксильюциферина, который может существовать в шести различных формах (рис. 3) благодаря кетознольной таутомерии.



I – III – фенольные, IV – VI – фенолятные, I, IV – кетонные,  
II, V – енольные, III, VI – енолятные

Рисунок 3 – Разнообразие форм оксилуциферина и его производных

**Целентеразин-зависимые люциферазы** представляют собой небольшие одноцепочечные полипептиды (16-36 кДа) [5].

К представителям организмов, использующих целентеразин-зависимую биолюминесцентную систему, относятся: мягкий коралл *Renilla* [18, 19], копеподы надсемейства *Augaptiloidea* [20], глубоководная креветка *Oplophorus* [21], ракушковые раки остракоды *C. pseudodiscophora* [22], кальмар *Watasenia*, *Symplectoteuthis*, двустворчатый моллюск *P. dactylus* [23]. Имеется информация о том, что ракушковые раки остракоды *V. hilgendorfi* используют *Cypridina* люциферин (варгулин), он же является субстратом для биолюминесцентных систем костных рыб *Porichthys*, *Apogon* и *Parapriacanthus* [24].

До сегодняшнего дня были клонированы гены, кодирующие 4 типа целентеразин-зависимых люцифераз, несмотря на большое разнообразие биолюминесцирующих организмов (люцифераза *Renilla*, люциферазы копепод, люцифераза *Oplophorus*, ципридинидные люциферазы).

Несмотря на большое разнообразие светящихся морских организмов, использующих целентеразин в качестве субстрата, они все относятся к группе кофактор-независимых монооксигеназ, поскольку катализируют простую реакцию (рис. 4), в которой участвуют только люцифераза, субстрат (целентеразин или люциферин) и молекулярный кислород [5].

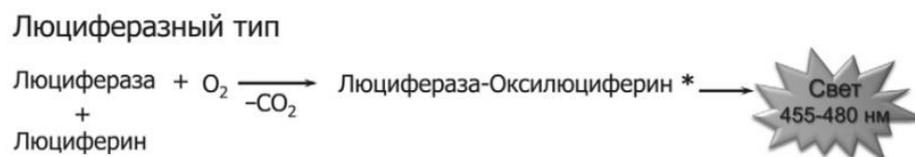


Рисунок 4 - Схема билюминесцентной реакции люциферазного типа [5]

Изучение последовательностей клонированных целентеразин-зависимых люцифераз показало их значительное разнообразие и отсутствие гомологии между ними, несмотря на сходство в катализируемых реакциях [5].

**Люциферазу коралла рода *Renilla* (RLuc)** клонировали одной из первых [25]. Сегодня данная люцифераза является единственной клонированной внутриклеточной целентеразин-зависимой люциферазой. RLuc – односубъединичный белок, состоящий из 311 аминокислот. Люцифераза *Renilla muelleri* является одноцепочечным полипептидом (36 кДа), который катализирует реакцию окисления целентеразина, которая сопровождается излучением голубого света с пиком при 478 нм [5]. Помимо люциферазы в билюминесцентной реакции *Renilla in vivo* участвуют еще, как минимум, два белка – Ca<sup>2+</sup>-регулируемый целентеразин-связывающий белок (CBP) [26], стабилизирующий субстрат, и зеленый флуоресцентный белок (GFP) [27], который является вторичным эмиттером и модулятором реакции. Билюминесцентная система *Renilla* достаточно хорошо исследована – все три белка клонированы [25, 28, 29], охарактеризованы, их пространственные структуры определены [30–32].

Ряд замен 7 аминокислотных остатков в люциферазе мягкого коралла *Renilla muelleri* позволила получить устойчивый к температурным воздействиям вариант белка Rm7, который стал шаблоном для создания большого количества мутантов и гибридных белков. В термостабильном варианте люциферазы Rm7 были произведены следующие аминокислотные замены: A55T, C124A, C130A, A143M, M185V, M253L, S287L [33]. Rm7

демонстрирует существенно большую устойчивость к инактивации при 37 °С и почти в 1,5 раза большую активность по сравнению с нативной RmLuc [5].

На сегодняшний день светящиеся белки активно используются в качестве биолюминесцентных меток или репортеров во многих методах *in vivo* и *in vitro* и являются альтернативой флуоресцентным и радиоизотопным меткам. Биолюминесцентные белки вызывают интерес, поскольку имеют высокий квантовый выход реакций, и высоким соотношением сигнала/шума, потенциально обеспечивающими высокую чувствительность анализов на основе этих ферментов в качестве репортеров. Следует отметить, что преимущество метки на основе люциферазы — способность повышать чувствительность анализа за счет накопления сигнала при избытке субстрата [34], а использование фотопротеинов в качестве репортеров обеспечивает чувствительность на уровне радиоизотопных меток. Несмотря на это, для *in vivo* работ больше подходят «желтые» или «красные» репортеры. Поэтому поиск методов создания таких репортеров на сегодняшний день является актуальным.

Так, был создан мутант люциферазы RmY, у которого спектр биолюминесценции смещен в красную область. В качестве матрицы для создания RmY использовали плазмидную конструкцию pDONR221-RM, содержащую нативную последовательность люциферазы *R. muelleri*. В RmLuc последовательно были внесены аминокислотные замены A55T, C124A, C130A, A143M, M253L, S287L, A123T, D154M, E155G, D162E, I163L и V185L. Эти мутации были выбраны на основе знаний о заменах, приводящих к смещению спектра биолюминесценции белков в красную область.

Кроме того, к последовательности RmY была добавлена последовательность мальтоза-связывающего белка, чтобы усилить растворимость люциферазы при ее экспрессии в клетках *E. coli* [35]. При таком подходе выход чистой RmY составляет ~50–60 мг/л клеточной культуры.

Визуально билюминесценция RmY имеет желто-оранжевый и зелено-желтоватый цвет (рис. 5.1). Цвет излучения RmY зависит от типа целентеразина, которым запускается реакция. При запуске реакции нативным целентеразином цвет излучения более зеленый (535 нм), а при использовании в качестве субстрата синтетический аналог целентерамид-*ν* – цвет излучения более желтый (574) (рис. 5.2).

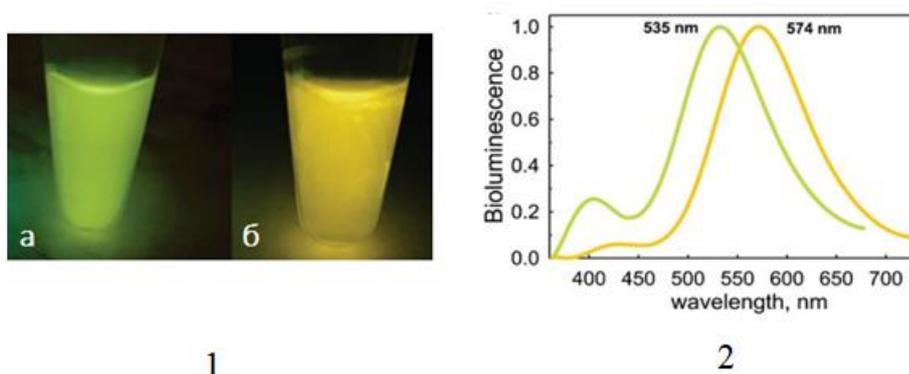


Рисунок 5 – Фотография билюминесценции RmY (1): а – активация нативной формой целентеразина, б – активация целентеразином-*ν*. Спектры билюминесценции RmY (2) при запуске реакции нативным целентеразином (535 нм) и целентеразином-*ν* (574 нм) [33]

Для разработки высокоспецифичных и чувствительных меток на основе люцифераз также успешно применялась гибридная белковая технология. Люциферазы считаются нестабильными, и билюминесцентные метки на их основе обычно получают путем генетического слияния.

Интересным для изучения является гибрид, созданный для обнаружения вируса клещевого энцефалита. На основе люциферазы Rm7 был создан билюминесцентный зонд к вирусу клещевого энцефалита. Он был слит с одноцепочечным антителом sc14D5a на С-конце. Этот гибрид содержал разные домены мышинового моноклонального антитела с высоким сродством к оболочечному гликопротеину Е. Целевой гибрид 14D5a-Rm7 экспрессировался в виде растворимого белка с надлежащим сворачиванием:

оба домена показали аффинность к целевому антигену и к белку E, а также достаточную биолюминесцентную активность [36].

## **1.2 Использование аффинных меток и TEV-протеазы в очистке белков**

На сегодняшний день аффинные метки стали незаменимыми инструментами для экспрессии и очистки белков. Помимо непосредственного участия в процессе очистки белка методом аффинной хроматографии, аффинные метки могут улучшить выход рекомбинантных белков, защитив их от внутриклеточного протеолиза и повысив растворимость белка [37, 38, 39, 40, 41].

Тем не менее, поскольку аффинные метки могут влиять на результаты последующих структурных и функциональных исследований, желательно удалять эти последовательности из целевого белка. Высокая специфичность протеазы вируса гравировки табака (TEV) сделала ее полезным реагентом для удаления аффинной метки [42]. Однако, у TEV-протеазы есть и недостатки: считается, что для того, чтобы обрабатывать субстрат со значительной скоростью, ей необходимо узнать остаток Gly или Ser в последовательности целевого белка. Следовательно, после удаления N-концевой аффинной метки с помощью TEV-протеазы белок сохраняет ненативный остаток Ser или Gly на своем N-конце и в некоторых случаях это может влиять на его биологическую активность [42].

TEV-протеазу можно легко получать самостоятельно в лаборатории, что исключает необходимость приобретать дорогие коммерческие ферменты. Протеаза TEV содержит встроенную His-метку, которая позволяет очищать целевые белки от фермента на том же этапе хроматографии, на котором удаляется отщепленная аффинная метка от самого белка. Кроме того, типичная экспрессионная конструкция для получения TEV-протеазы содержит мальтоза-связывающий белок (MBP), слитый с каталитическим

доменом протеазы TEV, с сайтом саморасщепления между этими двумя белками. После саморасщепления полипептида MBP-TEV протеаза TEV сохраняет N-концевую His-метку, что позволяет легко удалить ее из раствора целевого белка после расщепления. Также в протеазу TEV введены дополнительные мутации, например, S219V, которая придает ферменту устойчивость к аутоинактивации и примерно в 2 раза увеличивает его каталитическую активность по сравнению с протеазой TEV дикого типа [43].

Неоспоримым достоинством TEV-протеазы является высокая ферментативная активность при комнатной температуре. Многие другие протеазы требуют повышенных температур для расщепления субстрата, однако такие температуры могут активировать примесные протеазы, которые способны разрушить целевой белок. Кроме того, короткое время инкубации при более низкой температуре минимизирует окисление и другие модификации целевого белка, которые могут повлиять на его структуру и функцию [43].

### **1.3 Искусственный интеллект в создании новых белков/ферментов**

За миллиарды лет эволюции на Земле сформировалось современное пространство белковых последовательностей [44], а за почти 200 лет ученые-биологи создали богатую базу данных о белках, их структурах и функциях [45]. В настоящее время перед учеными остро стоит проблема получения новых белков с заданными свойствами, для чего необходимо выйти за пределы природного спектра белковых последовательностей и научиться точно интерпретировать влияние отдельных мутаций на структуру и функцию мутируемого белка.

Обычно для создания новых белков/ферментов ученые модифицируют уже существующие. Например, в промышленном производстве природные ферменты часто приходится модифицировать в промышленные ферменты,

чтобы адаптировать их к производству и его условиям, а также повысить их экономическую ценность [46]. При этом традиционные стратегии модификации ферментов с помощью биохимических методов отнимают много времени и средств, и дают результаты низкого качества в небольших масштабах. Разработка ферментов прошла путь от случайно управляемого нерационального дизайна к эмпирически управляемому полу рациональному дизайну и к рациональному дизайну, основанному на вычислениях. С развитием технологии секвенирования, алгоритмов искусственного интеллекта и высокопроизводительного компьютерного оборудования возможности моделирования и анализа сложных биологических систем значительно улучшились. Это ускорило разработку существующих стратегий молекулярного проектирования ферментов в сторону проектирования, основанного на алгоритмах и данных.

Искусственные нейронные сети (ИНС) [47] – это система обработки информации, основанная на имитации структуры и функций нейронной сети мозга для моделирования нейронной активности с помощью математической модели. За последние годы было разработано большое количество алгоритмов и инструментов на ИНС для дизайна как белковых последовательностей, так и белковых структур, включая ProteinMPNN [48], ESMFold [49], Alphafold2 [50,51], Rosetta [52], RosettaFold [53], FireProt [54–56], которые позволяют использовать алгоритмы и данные для реализации управляемого дизайна с использованием искусственного интеллекта (ИИ) для прогнозирования поиска новых ферментов автоматизированным, удобным и адаптированным способом [45]. Скорость работы и производительность ИИ впечатляет: так, например, прогнозирование 600 миллионов белковых структур ESMFold завершил за две недели, что обещает большое количество надежных моделей прогнозирования в условиях резкого увеличения данных о последовательностях [57]. CUPSAT [58] — сетевой инструмент для прогнозирования нестабильности белка на основе структурной информации.

PROTS-RF – целевой алгоритм, разработанный Ли и его командой [59] для прогнозирования изменений стабильности после белковых мутаций. Он может предсказывать не только одноточечные мутации, но также двойные и множественные мутации с точностью 0.800, 0.782 и 0.787 соответственно. Цзянь Тианетал [60] разработал инструмент Prethermut, который может идентифицировать влияние как одиночных, так и множественных мутаций на термостабильность белка. Общая точность классификации и коэффициент корреляции регрессии составляют 0.792 и 0.720 соответственно.

В настоящее время четыре крупных центра биоинформатики (NCBI, EBI, EMBnet, CNCB-NGDC) содержат множество данных, предсказанных веб-сканерами, семантическим анализом и различными моделями. Так, например, с момента создания AlphaFoldDB [61] предсказал более 200 миллионов белковых структур.

Проектирование белков с помощью ИИ (искусственного интеллекта) подразумевает решение таких задач как: изменение энергии денатурации ( $\Delta\Delta G$ ), температуры плавления ( $\Delta T_m$ ), оптимальной температуры ( $T_{opt}$ ), оптимального pH ( $pH_{opt}$ ) и других физико-химических параметров. С помощью ИИ ученые стремятся улучшить каталитическую активность ферментов, в том числе при работе при комнатной температуре в течение длительного времени, повысить устойчивость ферментов к протеазам и увеличить скорость производства ферментов, создать ферменты, переносящие высокую кислотность, высокое содержание щелочи и солей в растворе [62].

Экспериментальные данные о белках, используемые искусственным интеллектом в качестве входных данных, в основном включают информацию о мутации, положении аминокислотных остатков и их окружения, условиях эксперимента, различные характеристики аминокислот и т.д. [63, 64]. В зависимости от типа данных можно использовать наиболее подходящий

алгоритм искусственного интеллекта для выполнения различных задач для реализации различных аспектов проектирования ферментов.

ИИ использует три основные стратегии для создания ферментов (рис. б):

А) Оптимизированный дизайн с шаблоном. Эта стратегия использует шаблон фермента дикого типа, аминокислотная последовательность и структура которого берется в качестве входных данных. Новые аминокислотные последовательности получаются с использованием точечных, случайных или автоматических оптимизационных мутаций. Затем на основе имеющейся модели прогнозируется, анализируется и фильтруется каталитическая стабильность мутированных последовательностей в соответствии с заданными условиями для создания нового варианта фермента.

В) Дизайн de novo без шаблонов. Эта стратегия определяет белковый скелет непосредственно с помощью вычислений. Аминокислотный состав скелета определяется с помощью кинетических расчетов, а идеальная структура фермента прогнозируется и проверяется в соответствии с эмпирической оценочной функций.

С) Самостоятельный дизайн, управляемый данными. В этом случае искусственный интеллект будет учиться непосредственно из базы данных природных ферментов. Начиная с известного пространства последовательностей, исходное пространство последовательностей расширяется с использованием алгоритмов, таких как генеративные модели. Выходные данные включают в себя всю или часть последовательности, структуру или комбинацию последовательности и структуры [45].

Новые ферменты, полученные с помощью трех вышеперечисленных стратегий, проверяются экспериментально, а затем подвергаются дополнительным раундам оптимизации с помощью методов направленной эволюции.

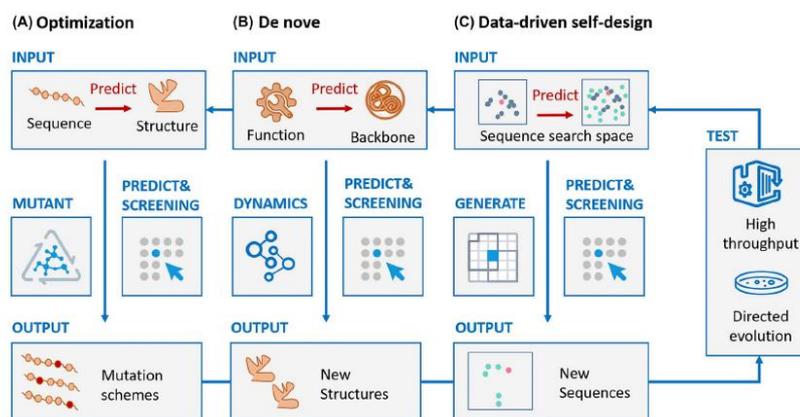


Рисунок 6 – Стратегии и процессы проектирования ферментов с помощью искусственного интеллекта [45]

Важным источником входных данных для предобученных моделей является технология интеллектуального анализа текста, которая с эффективностью используется для поиска и стандартизации экспериментальных данных из доступной литературы по белковой инженерии, а также для создания баз данных с различными характеристиками ферментов, включая мутации. Благодаря сочетанию предсказательного подхода с высокопроизводительными экспериментальными методами ожидается, что проблема создания точных и эффективных методов дизайна новых ферментов с заданными характеристиками с помощью искусственного интеллекта будет решена в ближайшем будущем.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Материалы

Объекты:

1. RmY mut #1 (Мутации: F180Y, K189Q)
2. RmY mut #2 (Мутации: F180Y, K189Q, E162N)
3. RmY mut #3 (Мутации: F180Y, K189A, E162Q)
4. RmY mut #4 (Мутации: K189Q)
5. RmY

Реактивы:

NaCl, Трис-НСl, ЭДТА, ДТТ, целентеразин, IPTG, имидазол, глицерол, SDS, TEMED, AA, PSA

Буферы:

1. *Буфер для измерения биолюминесцентной активности и съемки спектров биолюминесценции:* 25 мМ NaCl, 0.5 мМ ЭДТА, 20 мМ Трис-НСl 7.0, 5% глицерол
2. *Буферы для аффинной хроматографии:*  
буфер А<sub>1</sub> (20 мМ Трис-НСl 7.0, 30 мМ имидазол, 0.15 М NaCl, 5% глицерол)  
буфер А<sub>2</sub> (20 мМ Трис-НСl 7.0, 250 мМ имидазол, 0.15 М NaCl, 5% глицерол)  
буфер В (20 мМ Трис-НСl 7.0, 500 мМ имидазол, 0.15 М NaCl, 5% глицерол)
3. *Буферы для 12.5% SDS-электрофореза:*  
Буфер С (0.5М Трис-НСl рН 6.8)  
Буфер В (1М Трис-НСl рН 8.8)  
30% акриламид  
0.8% бисакриламид
4. *Лизирующий буфер для 12.5% SDS-электрофореза в денатурирующих условиях:* 2% SDS, 45 мМ Трис-НСl 6.8, 50 мМ ДТТ, 10% глицерол, 5% β-меркаптоэтанол, 0.25% бромфеноловый синий
5. *Буфер для 12.5% SDS-электрофореза в нативных условиях:* 45 мМ Трис-НСl 7.0, 10% глицерол, бромфеноловый синий

6. *Трис-глицериновый буфер разведенный в 4 раза: 25 мМ Трис-НСl, 200 мМ глицин, 0.1% SDS*
7. *Буфер для протеолиза и SEC (гель-фильтрации):  
Буфер A<sub>0</sub> (150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 20 мМ Трис-НСl 7.5, 5% глицерол)*
8. *Буфер для измерения термостабильности температурного оптимума:  
25 мМ NaCl, 0.5 мМ ЭДТА, 20 мМ Трис-НСl 7.0, 5% глицерол, 0.02% NP-40*
9. *Буфер для определения температуры теплового перехода по собственной триптофановой флуоресценции белка: 20 мМ HEPES pH 7.5, 0.15 M NaCl*

**Среды:**

1. LB-среда (на 1 л: 10 г бакто-триптона; 5 г дрожжевого экстракта; 7,5 г NaCl; pH 7.0;)
2. SOC-среда (на 1 л: 20 г бакто-триптона, 5 г дрожжевого экстракта, 0,5 г NaCl, 20 мМ глюкоза; pH 7.5)
3. LB-агар (1.5% агара в LB-среде)

## 2.2 Методы

### 2.2.1 Приготовление компетентных клеток *E. coli*

50 мл клеток вносили в LB-среду (без добавления антибиотиков). Клетки растили при 37°C до плотности  $OD_{600} = 0.8$ , после чего помещали в лед на 10 мин и переносили в стерильную пробирку на 50 мл с финальным объемом ~40-45 мл.

Суспензию клеток центрифугировали при 3000g, 10 мин, 4°C. Полученный осадок ресуспендировали в 15 мл холодного стерильного раствора (80 mM  $MgCl_2$ , 20 mM  $CaCl_2$ ) и инкубировали во льду 30 мин. Ресуспендирование проводили мягко, без использования вортекса.

После растворения осадка в стерильном растворе проводили повторное центрифугирование (3000g, 10 мин, 4°C). Полученный осадок ресуспендировали в 1.6 мл стерильного холодного раствора (100 mM  $CaCl_2$ ) и инкубировали во льду 20 мин. В ламинарном шкафу к клеткам добавляли 400 мкл 80% чистого глицерина. Разливали по 200 мкл в пробирки на 1.5 мл и помещали в морозильную камеру на хранение при -80°C.

### 2.2.2 Трансформация компетентных клеток

Заранее приготовленные суперкомпетентные клетки *E. coli* (штамм RIPL) трансформировали плазмидой с ДНК рекомбинантной люциферазы – RmY. Суперкомпетентные клетки для трансформации брали в объеме 25 мкл клеток на пробирку, добавляли 0.5 мкл ДНК и инкубировали при 0°C 30 мин. Затем проводили heat-shock: клетки инкубировали в течение 25 сек при температуре 42°C и затем снова переносили в лед. В ламинарном шкафу в пробирку добавляли 200 мкл среды SOC, инкубировали 1 час при 37°C. Далее клетки высевали на LB-агар, содержащий ампициллин (20 мкл раствора с концентрацией 200 мг/мл на чашку), и растили при 37°C.

### **2.2.3 Экспрессия рекомбинантной люциферазы RmY**

В 100 мл LB-среды вносили 100 мкл ампициллина (с концентрацией 200 мг/мл) и единичную колонию клеток с чашки после трансформации. При интенсивном перемешивании (220 об/мин) клетки растили 3-5 часов при 37°C (шейкер-инкубатор Excella E25R) до оптической плотности  $OD_{590} = 0.9-1.0$ . Затем вносили 50 мкл 1М раствора IPTG (финальная концентрация – 0.5 мМ) и при интенсивном перемешивании клетки растили при 23°C в течение ночи. Затем клетки центрифугировали 20 минут при 4°C и 3500g и помещали на хранение в морозильную камеру.

### **2.2.4 Разрушение клеточного осадка**

Клеточный осадок суспендировали в 5 мл буфера A<sub>1</sub> (20 мМ Трис-НСl 7.0, 30 мМ имидазол, 0.15 М NaCl, 5% глицерол) и разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе Ultrasonic SA при 44 кГц (5x15 сек, с охлаждением во льду с интервалом 2 мин). Смесь центрифугировали 20 мин (10000g, 4°C). Супернатант переносили в отдельную пробирку и далее использовали для выделения белка, осадок отбрасывали.

### **2.2.5 Аффинная хроматография RmY**

Для получения очищенной люциферазы клеточный лизат наносили на колонку His-Trap FF 5 мл (сорбент с ионами Ni<sup>2+</sup>). Нанесение образца на колонку и элюцию веществ с колонки производили в ручном режиме. Элюцию белков с колонки проводили последовательно тремя буферами – A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> и B, содержащими 0.15 М NaCl, 20 мМ Трис-НСl, рН 7.0 и возрастающую концентрацию имидазола (30 мМ, 250 мМ, 500 мМ, соответственно).

### **2.2.6 Концентрирование белка и определение концентрации**

Белок концентрировали с помощью центрифужных фильтров (концентрационных ячеек) Amicon-Ultracel 10K (Millipore, США), 15 минут,

3700g, 4°C. Центрифугирование повторяли до тех пор, пока не был получен нужный объем белка. Концентрацию полученного образца определяли колориметрически методом BCA (Pierce, США).

### **2.2.7 Протеолитическое удаление His-метки и MBP**

Протеолитическое расщепление белка с целью удаления His-Tag и MBP из последовательности люциферазы производили инкубацией с TEV-протеазой в молярном соотношении 1:70 при 23°C в течение ночи.

### **2.2.8 Электрофорез белка в полиакриламидном геле**

Анализ белковых растворов проводили с помощью электрофореза в 12,5% полиакриламидном геле по методу Лаэммли [65].

### **2.2.9 Эксклюзионная хроматография (гель-фильтрация)**

Для гель-фильтрации использовали колонку Superdex 75 30/100 и хроматографическую систему АКТА. Колонку уравнивали буфером 25 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 20 mM Трис-HCl 7.5, 5% глицерол. Нанесение образца на колонку и элюция веществ с колонки осуществлялась в ручном режиме. Образец наносили на колонку в объёме 500 мкл. Собирали 6 фракций на образец.

### **2.2.10 Измерение биолюминесцентной активности белков**

Измерение биолюминесцентной активности белков проводили с использованием люминометра (модель БЛМ-003) и компьютерной программы BioLum V1.2. В кювету для измерения вносили 5 мкл образца и 495 мкл буфера, содержащего 25 mM NaCl, 0.5 mM ЭДТА, 20 mM Трис-HCl 7.0. Кюветы с буфером инкубировались в термомиксере с установленной температурой 23°C. Для запуска реакции в кювету впрыскивали 5 мкл рабочего раствора целентеразина с насыщающей концентрацией –  $2 \times 10^{-4}$  M. Впрыск производили с помощью автоматического дозатора Hamilton.

Измерения в люминометре производились при 23°C. Для каждого образца кинетика биолюминесцентной реакции записывалась в течение 2-3 мин.

### **2.2.11 Измерение спектральных свойств люцифераз**

Спектры биолюминесценции регистрировались в 495 мкл буфера 25 мМ NaCl, 0.5 мМ ЭДТА, 20 мМ Трис-HCl 7.0, 5% глицерол при температуре 23°C на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse (Agilent, США). Для инициирования реакции биолюминесценции в кварцевую кювету добавляли 5 мкл белка и 5 мкл рабочего раствора целентеразина с насыщающей концентрацией –  $2 \times 10^{-4}$  М. Диапазон измерения: 370-600 нм. Скорость измерения: 12000 нм/мин. Каждый спектр записывался в пяти повторностях.

### **2.2.12 Определение температурного оптимума биолюминесцентной реакции**

Определение температурного оптимума биолюминесцентной реакции люцифераз производили с помощью люменометра (модель БЛМ-003) и компьютерной программы BioLum V1.2. Предварительно кюветы с буфером инкубировали при заданной температуре в термомиксере, после чего в них добавляли по 5 мкл образца, хранящегося на льду, и затем кюветы помещали в люминометр, блок которого поддерживал установленную температуру. Реакция биолюминесценции инициировалась впрыском 5 мкл целентеразина с концентрацией  $2 \times 10^{-4}$  М. Для определения температурного оптимума белков осуществляли измерение их биолюминесцентной активности при 9 температурах: 0°C, 10°C, 23°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C и 50°C.

### **2.2.13 Определение температуры теплового перехода по собственной триптофановой флуоресценции белка**

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

Для измерения флуоресценции люциферазы использовали флуоресцентный спектрофотометр Varian Cary Eclipse, оснащенного термоконтроллером Cary 30 Single cell Peltier Accessory (Agilent Technologies, США). 20 мкл белка вносили в кювету с 800 мкл буфера 20 мМ HEPES pH 7.5, 150 мМ NaCl, после чего регистрировали триптофановый флуоресцентный сигнал в диапазоне 20–90°C (скорость 1°C/мин). Возбуждение флуоресценции проводили при длине волны 295 нм, регистрация интенсивности флуоресценции проводилась на трех длинах волн: 310, 330, 360 нм [66].

### **2.2.14 Определение термостабильности белка**

Определение термостабильности белков производили с помощью люминометра (модель БЛМ-003) и компьютерной программы BioLum V1.2. Образцы инкубировали при различных температурах (23°C, 30°C, 37°C, 45°C, 50°C) в течение 5 минут, после чего производили измерение биолюминесцентной активности при 23°C.

### **3. РЕЗУЛЬТАТЫ**

Страницы 29-46 изъяты в связи с авторским правом.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данной работы были получены и охарактеризованы 4 мутанта люциферазы *Renilla*, мутации в которых были предсказаны современными методами молекулярного моделирования с применением пакетов программ RosettaFold, AlphaFold2, ProteinMPNN, последний из которых основан на приеме обратного фолдинга, для повышения термостабильности люциферазы *Renilla*.

Было показано, что все полученные мутанты показали себя как термостабильные варианты люциферазы RmY, практически не теряющие биолюминесцентную активность при длительной инкубации при 37°C. Кроме того, анализ спектров излучения данных мутантов позволил предположить, что аминокислотные остатки в 180 положении люциферазы играют важную роль в образовании эмиттера биолюминесцентной реакции. Помимо этого, было установлено, что единственная аминокислотная замена K189Q повышает оптимум ферментативной реакции белка до 37°C. Также все полученные мутанты проявили свойства «медленных» люцифераз, что является несомненным преимуществом в ряде биолюминесцентных анализов. Интересно, что мутант 3 (K189A, E162Q, F180Y) оказался «фиолетовой» версией люциферазы с пиком эмиссии при 403 нм и в перспективе его можно будет применять для разработки анализов, основанных на одновременной двухволновой детекции эмиссии.

Таким образом, были получены мутанты, обладающие свойствами усовершенствованных биолюминесцентных репортеров - с температурным оптимумом в области 37°C, измененным спектром излучения и повышенной стабильностью при длительных экспозициях при высоких температурах. Проведенное исследование позволило расширить спектр имеющихся репортеров для биолюминесцентных тест-систем, пополнив его новыми перспективными мутантами, и в то же время был подтвержден высокий

потенциал подходов рационального моделирования белковых молекул, предназначенных для повышения термостабильности.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ДТТ – дитиотреитол
- ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
- LB – культуральная среда Lysogeny Broth
- SOC – культуральная среда Super Optimal Broth for Catabolic repression
- IPTG – изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид
- SDS – додецилсульфат натрия
- TEMED – N, N, N', N'-Тетраметилэтилендиамин
- RmY – мутантная люцифераза коралла *Renilla muelleri*
- SEC – эксклюзионная хроматография
- IMAC – металл-аффинная хроматография
- TEV – протеаза – высокоспецифичная цистеиновая протеаза вируса гравировки табака
- MBP – мальтоза-связывающий белок
- CTZ – целентеразин
- AA – акриламид
- PSA – персульфат аммония
- HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота
- БЛ сигнал – биолюминесцентный сигнал

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Маркова С. В., Высоцкий Е. С. Целентеразин-зависимые люциферазы (обзор) //Биохимия. – 2015. – Т. 80. – №. 6. – С. 845-866.
2. Kaskova Z. M., Tsarkova A. S., Yampolsky I. V. 1001 lights: luciferins, luciferases, their mechanisms of action and applications in chemical analysis, biology and medicine //Chemical Society Reviews. – 2016. – V. 45(21). – P. 6048-6077.
3. Котлобай А. А., Каськова З. М., Ямпольский И. В. Палитра люцифераз: природные инструменты для новых методов в биомедицине //Acta Naturae (русскаяязычная версия). – 2020. – Т. 12. – №. 2 (45). – С. 15-27.
4. Hiramatsu N. Alkaline phosphatase vs luciferase as secreted reporter molecules in vivo /N. Hiramatsu, A. Kasai, Y. Meng, K. Hayakawa, J. Yao, M. Kitamura //Anal Biochem. – 2005. – V. 339(2). – P. 249-256.
5. Франк, Л. А., Башмакова, Е. Е., Красицкая, В. В., Кудрявцев, А. Н. Генетически модифицированные целентеразин-зависимые люциферазы как репортеры для анализа in vitro. – 2017.
6. McElroy W.D. // Proc. Nat. Acad. Science. – 1947. – V. 33. – P. 342.
7. Hastings J.W., McElroy W.D. Coulombre J. //J. Cell. Comp. Physiol. – 1953. – V. 42. – P. 137.
8. McElroy W. D., Green A. //Arch. Biochem. Biophys. – 1956. – V. 46. – P. 399.
9. Угарова Н. Н., Ломакина Г. Ю. Эмиттер как внутримолекулярная метка в активном центре люциферазы светляков //Вестник Московского университета. Химия. – 2020. – Т. 61. – №. 1. – С. 19-26.
10. Seliger H. H., McElroy W. D. //Proc. Natl. Acad.Sci. USA. – 1964. – V. 52. – P. 75.
11. Koksharov M. I., Ugarova N. N. //Biochemistry (Moscow). – 2008. – V. 73(8). – P. 862.

12. Ugarova N. N., Maloshenok L. G., Uporov I. V., Koksharov M. I. //Biochemistry (Moscow). – 2005. – V. 70(11). – P. 1262.
13. Nakatsu T., Ichiyama S., Hiratake J., Saldanha A., Kobashi N., Sakata K., Kato H. //Nature. – 2006. – V. 440. – P. 372.
14. Wood K. V., Lam Y. A., McElroy W. D., Seliger H. H. //J. Biolum. Chemilum. – 1989. – V. 4. – P. 31.
15. Hopkins T. A., Seliger H. H., White E. H., Cass M. W. //J. Am. Chem. Soc. – 1967. – V. 89. – P. 7148.
16. White E. H., Rapapor E., Hopkins T. A., Seliger H. H. //J. Am. Chem. Soc. – 1969. – V. 91. – P. 2178.
17. Morton R. A., Hopkins T. A., Seliger H. H. //Biochemistry. – 1969. – V.8(4). – P. 1598.
18. Matthews J. C. Purification and properties of Renilla reniformis luciferase /J. C. Matthews, K. Hori, M. J. Cormier //Biochemistry. – 1977. – V. 16. – P. 85-91.
19. Titushin M. S. Coelenterazine-binding protein of Renilla muelleri: cDNA cloning, overexpression, and characterization as a substrate of luciferase /M. S. Titushin, S. V. Markova, L. A. Frank, N. P. Malikova, G. A. Stepanyuk, J. Lee, E. S. Vysotski //Photochem Photobiol Sci. – 2008. – V. 7. – P. 189-196.
20. Takenaka Y. A light in the dark: ecology, evolution and molecular basis of copepod bioluminescence. Horizons /Y. Takenaka, A. Yamaguchi, Y. Shigeri //J Plankton Res. – 2017. – V. 39(3). – P. 369-378.
21. Inouye S., Secretional luciferase of the luminous shrimp Oplophorus gracilirostris: cDNA cloning of a novel imidazopyrazinone luciferase / S. Inouye, K. Watanabe, H. Nakamura, O. Shimomura //FEBS Lett. – 2000. – V. 481. – P. 19-25.
22. Oba Y., Identification of the luciferin-luciferase system and quantification of coelenterazine by mass spectrometry in the deep-sea luminous

ostracod *Conchoecia pseudodiscophora* /Y. Oba, H. Tsuduki, S. Kato, M. Ojika, S. Inouye //Chembiochem. – 2004. – V. 5. – P. 1495-1499.

23. Ларионова М. Д. Новые изоформы люциферазы из копеподы *Metridia longa*: свойства и применение: специальность 03.01.02 "Биофизика": диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук /Ларионова Марина Дмитриевна (Красноярск), 2018. – 129 с.

24. Cormier M.J. Application of *Renilla* bioluminescence: an introduction //Methods Enzymol. – 1978. – V. 57. – P. 237-244

25. Lorenz W. W., McCann R. O., Longiaru M., Cormier M. J. Isolation and expression of a cDNA encoding *Renilla reniformis* luciferase //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1991. – V. 88. – P. 4438-4442.

26. Charbonneau H., Cormier M. J. Ca<sup>2+</sup> induced bioluminescence in *Renilla reniformis*. Purification and characterization of calcium triggered luciferin-binding protein //J. Biol. Chem. – 1979. – V. 254. – P. 769-780.

27. Ward W. W., Cormier M.J. An energy transfer protein in coelenterate bioluminescence. Characterization of the *Renilla* green fluorescent protein //J. Biol. Chem. – 1979. – V. 254. – P. 781-788.

28. Bryan B. Fluorescent proteins, nucleic acids encoding the luciferases and fluorescent proteins and the use thereof in diagnostics /Szent Gyorgyi C. //Luciferases. – 1999. – V. 9. – P. 277-716.

29. Titushin M. S., Markova S. V., Frank L. A. et al. Coelenterazine-binding protein of *Renilla muelleri*: cDNA cloning, overexpression, and characterization as a substrate of luciferase //Photochem. Photobiol. Sci. – 2008. – V. 7. – P. 189-196.

30. Loening A. M., Fenn T. D., Gambhir S. S. Crystal structures of the luciferase and green fluorescent protein from *Renilla reniformis* //J. Mol. Biol. – 2007. – V. 374. – P. 1017-1028.

31. Stepanyuk G.A. Crystal structure of coelenterazine-binding protein from *Renilla muelleri* at 1.7 Å: why it is not a calcium-regulated photoprotein / Z.J. Liu,

S. V. Markova, L. A. Frank, J. Lee, E. S. Vysotski, B. C. Wang //Photochem. Photobiol. Sci. – 2008. – V. 7. – P. 442-447.

32. Stepanyuk G. A. Structure based mechanism of the  $\text{Ca}^{2+}$ - induced release of coelenterazine from the Renilla binding protein / Z. J. Liu, E. S. Vysotski, J. Lee, J. P. Rose, B. C. Wang //Proteins. – 2009. – V. 74. – P. 583-593.

33. Stepanyuk G. A. Coelenterazine-v ligated to  $\text{Ca}^{2+}$ -triggered coelenterazine-binding protein is a stable and efficient substrate of the red-shifted mutant of Renilla muelleri luciferase / J. Unch, N. P. Malikova, S. V. Markova, J. Lee, E. S. Vysotski //Anal. Bioanal. Chem. – 2010. – V. 398. – P. 1809-1817.

34. Kratasyuk V. A., Oba Yu., Schultz D. T. et al. Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology /Editors: Thouand, Gérald, Marks, Rober. //Berlin Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. – 2014. – V. 1. – 206 p.

35. Kataeva I., Chang J., Xu H. et al. Improving solubility of Shewanella oneidensis MR-1 and Clostridium thermocellum JW-20 proteins expressed into Escherichia coli //J Proteome Res. – 2005 – V. 4. – P.1942-1951.

36. Burakova L. P., Kudryavtsev A.N., Stepanyuk G.A. et al. Bioluminescent detection probe for tick-borne encephalitis virus immunoassay //Anal. Bioanal. Chem. – 2015. – V. 407. – P. 5417-5423

37. Maina C. V., Riggs P. D., Grandea A. G. et al. An Escherichia coli vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein //Gene. – 1988. – V.74. – P. 365-373.

38. Smith D. B., Johnson K. S. Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione Stransferase //Gene. – 1988. – V.67. – P. 31–40.

39. Jacquet A., Daminet V., Haumont M., et al. Expression of a recombinant Toxoplasma gondii ROP2 fragment as a fusion protein in bacteria circumvents insolubility and proteolytic degradation //Protein Expr. Purif. – 1999. – V.17. – P. 392-400.

40. Butt T.R., Jonnalagadda S., Monia B.P. et al. Crooke, Ubiquitin fusion augments the yield of cloned gene products in *Escherichia coli* //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1989. – V.86. – P. 2540-2544.
41. Kapust R.B., Waugh D.S. *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused //Protein Sci. – 1999. – V.8. – P. 1668-1674.
42. Kapust R. B. et al. The P1' specificity of tobacco etch virus protease //Biochemical and biophysical research communications. – 2002. – T. 294(5). – C. 949-955.
43. Tubb M. R., Smith L. E., Davidson W. S. Purification of recombinant apolipoproteins AI and A-IV and efficient affinity tag cleavage by tobacco etch virus protease //Journal of lipid research. – 2009. – T. 50(7). – C. 1497-1504.
44. Pikalyova K., Orlov A., Lin A., et al. HIV-1 drug resistance profiling using amino acid sequence space cartography //Bioinformatics. – 2022. – V.38(8). – P. 2307-14.
45. Ming Y. et al. A review of enzyme design in catalytic stability by artificial intelligence //Briefings in Bioinformatics. – 2023. – V. 24(3). – doi: 10.1093/bib/bbad065.
46. Prasad S., Roy I. Converting enzymes into tools of industrial importance //Recent Pat Biotechnol. – 2018. – V.12(1). – P. 33–56.
47. Walczak S. Artificial neural networks. In: Advanced Methodologies and Technologies in Artificial Intelligence, Computer Simulation, and Human Computer Interaction //Encyclopedia of Physical Science and Technology. – 2003. – V. 3 – P. 631-45.
48. Dauparas J. et al. Robust deep learning–based protein sequence design using ProteinMPNN //Science. – 2022. – V. 378. – P. 49-56.
49. Lin Z., Akin H., Rao R. et al. Evolutionary-scale prediction of atomic level protein structure with a language model //bioRxiv. – 2022.

50. Tunyasuvunakool K., Adler J., Wu Z., et al. Highly accurate protein structure prediction for the human proteome //Nature. – 2021. – V.596. – P.590-6.
51. AlQuraishi M. AlphaFold at CASP13 //Bioinformatics. – 2019. – V.35(22). – P. 4862-5.
52. Koehler Leman J., Weitzner B. D., Lewis S. M. et al. Macromolecular modeling and design in Rosetta //New Methods and FraMeworks. – 2020. V.17(7). – P. 665-80.
53. Baek M., DiMaio F., Anishchenko I., et al. Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network //Science. – 2021. – V.373(6557). – P. 871–6.
54. Bednar D., Beerens K., Sebestova E. et al. FireProt: energy- and evolution-based computational design of thermostable multiple-point mutants //PLoS CoMput Biol. – 2015. V.11(11): e1004556.
55. Musil M., Khan R. T., Beier A. et al. FireProtASR: a web server for fully automated ancestral sequence reconstruction //Brief Bioinform. – 2020. – V.17(7). – P. 665-80.
56. Stourac J., Dubrava J., Musil M. et al. FireProtDB: database of manually curated protein stability data //Nucleic Acids Res. – 2021. – V.49(1). – P. 319-24.
57. Dehouck Y., Kwasigroch J. M., Gilis D. et al. PoPMuSiC 2.1: a web server for the estimation of protein stability changes upon mutation and sequence optimality //BMC Bioinformatics. – 2011. – V.12(1). – P. 1-12.
58. Parthiban V., Gromiha M. M., Schomburg D. CUPSAT: prediction of protein stability upon point mutations //Nucleic Acids Res. – 2006. – V.34(2). – P. 239-42.
59. Li Y., Fang J. PROTS-RF: a robust model for predicting mutation-induced protein stability changes //PloS One. – 2012. – V.7(10): e47247.

60. Tian J., Wu N., Chu X. et al. Predicting changes in protein thermostability brought about by single- or multi-site mutations //BMC Bioinformatics. – 2010. – V. 11. – P.370.

61. Mihaly V., Stephen A., Mandar D. et al. AlphaFold protein structure database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models //Nucleic Acids Res. – 2021. – V.1. – P. 1.

62. Kazlauskas R. Engineering more stable proteins //Chem Soc Rev. – 2018. – V.47(24). – P. 9026-45.

63. Liu J., Kang X. Grading amino acid properties increased accuracies of single point mutation on protein stability prediction //BMC Bioinformatics. – 2012. – V.13(1). – P. 44.

64. Folkman L., Stantic B., Sattar A. Towards sequence-based prediction of mutation-induced stability changes in unseen non-homologous proteins //BMC GenoMics. – 2014. – V.15(1). – P. 4.

65. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4 //Nature. – 1970. – V. 227. – P.680-685.

66. Горбунова Д. А. Получение нативной MLuc164 изоформы люциферазы *Metridia longa* из телец включения *E. coli* и исследование ее физико-химических свойств: дис. – Сибирский федеральный университет, 2019.

67. Schenkmyerova A., Toul M., Pluskal D. et al. Catalytic mechanism for Renilla-type luciferases //Nat Catal. – 2023. – V.6. – P. 23-38.

68. Woo A. G. Mutational optimization of the coelenterazine-dependent luciferase from Renilla //Plant methods. – 2008. – V. 4. – P. 23.

69. Shigehisa M. et al. Stabilization of luciferase from Renilla reniformis using random mutations //Protein Engineering, Design and Selection. – 2017. – V. 30(1). – P. 7–13.

70. Markova S. V., Larionova M. D., Burakova L. P., Vysotski E. S. The smallest natural high-active luciferase: cloning and characterization of novel 16.5-

kDa luciferase from copepod *Metridia longa* //Biochem Biophys Res Commun. – 2015. – V.457(1). – P. 77-82.

71. Пермяков Е.А. Метод собственной люминесценции белка /Е.А. Пермяков. – М.: Наука. – 2003. – 189 с.

72. Shimomura O., Teranishi K. Light-emitters involved in the luminescence of coelenterazine //Luminescence. – 2000. – V.15. – P. 51-58.

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

 Г. Г. Волова

« 20 » июля 2024 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 – Биология

Создание термостабильных вариантов рекомбинантной люциферазы мягкого  
коралла *Renilla muelleri*

Руководитель



Подпись, дата

к.б.н., доцент

Должность, ученая степень

Е. В. Еремеева

Инициалы, фамилия

Выпускник



Подпись, дата

Ш. А. Нур

Инициалы, фамилия

Красноярск 2024