На правах рукописи

Ларионова Марина Дмитриевна

НОВЫЕ ИЗОФОРМЫ ЛЮЦИФЕРАЗЫ ИЗ КОПЕПОДЫ *METRIDIA LONGA*: СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ

03.01.02 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Красноярск – 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН) – обособленном подразделении «Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИБФ СО РАН) и Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский федеральный университет»

Научный руководитель: **Высоцкий Евгений Степанович**
кандидат биологических наук

Официальные оппоненты:

Кичкайло Анна Сергеевна
доктор биологических наук,
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации (КрасГМУ), руководитель лаборатории биомолекулярных и медицинских технологий

Ямпольский Илья Викторович
доктор химических наук, профессор
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук» (ИБХ РАН), заместитель директора по научной работе, руководитель отдела биомолекулярной химии

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Защита диссертации состоится «27» сентября 2018 года в 14:00 на заседании диссертационного совета Д 003.075.04 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН) по адресу: 660036, г. Красноярск, Академгородок, д. 50, стр. 50.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБФ СО РАН и на сайте http://www.ibp.ru

Автореферат разослан «____» июня 2018 года

Ученый секретарь
диссертационного совета Есимбекова Елена Николаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В настоящее время стремительно развиваются методы неинвазивной визуализации молекулярных процессов *in vivo*. Технологии биоимиджинга стали прорывом в области прижизненных исследований динамических процессов в клетках, тканях и целых организмах и сегодня используются при проведении прикладных и фундаментальных исследований в области медицины, фармакологии и биохимии.

Наряду с технологиями, основанными на применении флуоресцентных белков и красителей, в биоимиджинге все активнее используют репортерные системы на основе биолюминесцентных белков. Популярность таких систем в первую очередь определяется высокой чувствительностью обнаружения биолюминесцентного репортера и отсутствием токсичности для клеток и организмов. Для совершенствования существующих технологий биолюминесцентного имиджинга, а также разработки новых методик необходим широкий спектр светоизлучающих белков с различными биохимическими свойствами. На сегодняшний день имеющиеся биолюминесцентные белки имеют некоторые ограничения для применения в качестве репортерных – потребность в дополнительных кофакторах, низкий квантовый выход биолюминесцентной реакции и т.д. Дальнейшее развитие биолюминесцентного имиджинга идет по пути поиска новых биолюминесцентных природных белков или улучшения свойств уже имеющихся репортеров методами белковой инженерии.

Сегодня среди известных биолюминесцентных белков в качестве репортерных часто используют люциферазы светляков, бактерий, кораллов и ракообразных, а также фотопротеины. Эти белки различаются аминокислотными последовательностями, структурами, субстратами и кофакторами и т.д. При выборе репортера для биоимиджинга учитывают особенности объекта исследования, в котором предполагается использовать репортерную систему, а также свойства самого репортера (спектр излучения, молекулярную массу, стабильность и пр.).

Биолюминесценция морских планктонных рачков копепод обусловлена секретируемыми люциферазами, использующими, аналогично многим другим биолюминесцентным белкам, целентеразин в качестве субстрата. На сегодняшний день идентифицированы гены люцифераз из копепод *Gaussia princeps*, *Metridia pacifica*, *Metridia longa* и др. Люциферазы имеют небольшую молекулярную массу (до 22 кДа), проявляют высокую степень идентичности первичных структур, катализируют окисление целентеразина только в присутствии кислорода, т.е. относятся к кофактор-независимым. С момента клонирования в начале 2000-х г. генов, кодирующих секретируемые люциферазы из *G. princeps* и *M. longa*, эти белки сразу же были применены в ряде *in vivo* и *in vitro* экспериментов, продемонстрировав свою перспективность и ряд преимуществ. Секретируемые копеподные люциферазы отличались высокой активностью и служили удобными инструментами визуализации с возможностью регистрации светового сигнала в культуральной среде, крови, лимфе и межклеточных жидкостях. Хотя сегодня люциферазы копепод (в основном из *G. princeps* и *M. longa*) широко используются в биоимиджинге, их люминесцентные и биохимические свойства изучены неполно. В первую очередь это обусловлено трудностями получения достаточных количеств высокоочищенных активных люцифераз с помощью бактериальных систем экспрессии: в нативной конформации белки содержат несколько внутримолекулярных дисульфидных связей, необходимых для функционирования ферментов.

Целью работы являлось изучение физико-химических свойств новых изоформ из *Metridia longa* и исследование их применимости в качестве репортерных молекул в *in vivo* и *in vitro* анализах.

Достижение поставленной цели требовало решения **следующих задач**:

1. Оптимизировать условия экспрессии секретируемых люцифераз копепод *M. longa* и *G. princeps* в клетках насекомых и разработать технологию получения высокоочищенных белков из культуральной среды;
2. Исследовать биолюминесцентные и биохимические свойства препаратов функционально активных копеподных люцифераз, имеющих нативную конформацию;
3. Идентифицировать аминокислотные остатки, входящие в состав субстрат-связывающей полости люцифераз *M. longa*;
4. Оценить применимость люциферазы *M. longa* в качестве секретируемого репортера *in vivo* при транзиентной экспрессии в клетках млекопитающих;
5. Сконструировать гибридный белок из люциферазы *M. longa* и миниантитела к вирусу клещевого энцефалита, исследовать свойства бифункционального белка и проверить его пригодность для применения в биолюминесцентном иммуноанализе.

Научная новизна

В настоящей работе впервые получены препараты копеподных люцифераз в природной форме, и описаны физико-химические, биохимические, биолюминесцентные свойства новых изоформ люциферазы Metridia. Одна из новых изоформ была применена в качестве биолюминесцентного *in vivo* репортера в клетках млекопитающих, а также в составе гибридного бифункционального белка использована в аналитической системе *in vitro* детекции.

Практическая значимость

Определение биохимических и биолюминесцентных свойств люцифераз копепод, обладающих нативной структурой, открывает возможности целенаправленного выбора репортера при разработке технологий биоимиджинга *in vivo* для клеточной биологии и экспериментальной медицины, а также методов анализа *in vitro* для медицинской диагностики.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Технология получения рекомбинантных высокоочищенных люцифераз копепод из культуральной среды клеток насекомых позволяет получать корректно свернутые белки с выходом до 7 мг/л. Полученные люциферазы обладают высокой удельной биолюминесцентной активностью и экстремально высокой термостабильностью;

2. Оптимум температуры биолюминесцентной реакции, катализируемой изоформой MLuc2 люциферазы *M. longa*, наблюдается при экстремально низких значениях (~5ºC), что позволяет отнести эту изоформу к психрофильным ферментам. Низкий температурный оптимум изоформы обусловлен более высокой пространственной гибкостью белка, возникающей вследствие отсутствия одной внутримолекулярной дисульфидной связи;

3. Аминокислотные остатки Tyr72 и Tyr80 входят в состав активного центра изоформы MLuc7 люциферазы *M. longa* и участвуют в координации субстрата реакции, целентеразина;

4. Применение изоформы MLuc7 люциферазы *M. longa* в качестве биолюминесцентной репортерной молекулы обеспечивает высокую чувствительность *in vitro* и *in vivo* анализов.

Личный вклад автора заключается в непосредственном участии во всех этапах исследования: от постановки цели и задач, выбора методов исследований до проведения экспериментов с последующим обобщением и интерпретацией результатов, подготовкой и оформлением публикаций.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту специальности 03.02.01 – биофизика. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пункту 3 паспорта специальности биофизика.

Степень достоверности результатов

Достоверность результатов подтверждена достаточным объемом данных, их внутренней согласованностью и воспроизводимостью, а также использованием современных методов исследования и статистического анализа. Результаты были изложены в ряде статей в специализированных международных журналах, которые обеспечивают критическое рассмотрение и рецензирование публикуемых работ научной общественностью.

Апробация работы

Материалы диссертации представлены в виде научных докладов и постерных сообщений на Международном семинаре AIST (Цукуба, Япония, 2014), Международных симпозиумах «Белки и пептиды» (Новосибирск, Россия, 2015; Москва, Россия, 2017), VII и VIII съездах Российского фотобиологического общества (Шепси, Россия, 2014, 2017), молодежной школе «North-Biotech Young» (Архангельск, Россия, 2017), конференциях «Ломоносов-2016» и «Ломоносов-2018» (Москва, Россия, 2016, 2018), а также на конференциях, ежегодно проводимых ФИЦ «КНЦ СО РАН» и «Сибирским Федеральным Университетом».

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 10 печатных работ, из них: 4 статьи в зарубежных рецензируемых журналах и 6 публикаций в сборниках докладов научных конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 129 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (методы исследования, результаты исследований и их обсуждение), заключения, выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы. Работа иллюстрирована 5 таблицами и 33 рисунками. Список литературы включает 174 источника, из них 173 иностранных. Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РНФ №14-14-01119, РФФИ, Правительства Красноярского края и Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности №16-44-242099, а также гранта Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере №0019849.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1 диссертации посвящена рассмотрению разнообразия целентеразин-зависимых биолюминесцентных систем, применению секретируемых люцифераз из копепод в разработке комплементационных, иммунологических анализов, а также в технологиях *in vivo* биоимиджинга.

В **главе 2** представлены использованные в работе материалы, растворы и среды, описаны методики исследований.

Получение конструкций для экспрессии люцифераз и гибридных белков

В работе использовали гены изоформ люциферазы Metridia (*mluc2*, *mluc7*), ранее полученные путем функционального скрининга, проведенного в лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН. Кроме этого, для получения люциферазы из копеподы *Gaussia princeps* (GpLuc) был использован ген *gpluc*, амплифицированный из плазмиды pCMV-GpLuc (NanoLight Technology, США).

Для получения экспрессионных плазмид, обеспечивающих бакуловирусную экспрессию (Рис. 1), методом ПЦР проводили амплификацию вставок с использованием олигонуклеотидов, которые вводили терминальные рестрикционные сайты, а также кодировали полигистидиновый фрагмент, расположенный через последовательность ENLYFQG, специфичную для TEV-протеазы.

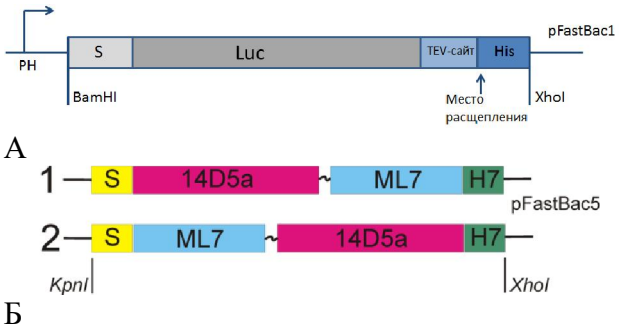


Рисунок 1 – Схемы генетических конструкций на основе векторов pFastBac1 (А) и pFastBac5 (Б), где S – сигнальный пептид; PH – полиэдриновый промотор; His, H7 – полигистидиновые фрагменты; TEV-сайт – последовательность, специфичная для протеазы; ML7, 14D5a – последовательности, кодирующие люциферазу и миниантитело, соответственно

В случае создания генетических конструкций, необходимых для продукции гибридных белков, использовали ген *mluc7* и ген, кодирующий тяжелую и легкую цепи миниантитела 14D5a, в разных комбинациях (Рис. 1Б). Домены располагались через глицин-сериновый мостик, обеспечивающий подвижность элементов, а также являющийся уникальным сайтом BamHI. Сборку целевых конструктов ~1400 н.п. осуществляли методом ПЦР-слияния предварительно амплифицированных фрагментов ДНК, с использованием терминальных олигонуклеотидов в режиме с постепенным понижением температуры отжига праймеров.

ПЦР-продукты очищали, проводили препаративную рестрикцию путем инкубирования ДНК с эндонуклеазами рестрикции. Вставки с «липкими» концами очищали из агарозного геля и использовали для лигирования с векторами pFastBac1 и pFastBac5 (Invitrogen, США), предварительно обработанными соответствующими рестриктазами. Лигазные смеси использовали для трансформации клеток *E. coli* (штамм XL1Blue). Из полученных бактериальных колоний препаративно получали плазмидную ДНК. ДНК на всех этапах выделяли с помощью наборов (Qiagen, Германия). Правильность конструкций подтверждена рестриктным анализом и секвенированием, проведенном в ЦКП «Геномика» (г. Новосибирск).

Бакуловирусная экспрессия рекомбинантных люцифераз

Конструкции в бакуловирусных векторах использовали для трансформации в штамм *E. coli* (DH10Bac). Методом бело-голубой селекции на LB-агаре с реагентом «X-gal» (Sigma, США) отбирали белые рекомбинантные колонии, несущие бакмидные ДНК с интересующими вставками. После ПЦР-скрининга выделяли бакмиды, которыми трансфецировали клетки Sf9 (~10^6 кл/мл) с помощью реагента «Cellfectin» в среде Грэйса (Invitrogen, США). Полученные вирусные стоки использовали для инфицирования терминальных культур клеток Sf9. Культивирование проводили в среде «SF-900 II SFM» (Invitrogen, США) при 28ºС с постоянным перемешиванием в течение 2,5–3 дней.

Выделение и очистка белков из культуральной среды клеток Sf9

Для концентрирования белков культуральной среды применялась методика дифференциального высаливания белков 40–65% сульфатом аммония. Белковый осадок растворяли в буфере для металл-аффинной хроматографии (IMAC), содержащем 20 мМ Трис-HCl, pH 7,5, 150 мМ NaCl, 5% глицерина, 20 мМ имидазола. IMAC проводили на колонке «His-trap HP» (GE Healthcare, Великобритания). Фракцию, элюированную 300 мМ имидазола, концентрировали и переводили в буфер 20 мМ Трис-HCl, pH 7,5, 150 мМ NaCl, 0,5 мМ ЭДТА, в течение 10 ч обрабатывали TEV-протеазой. Разделение продуктов сайт-направленного протеолиза осуществляли путем IMAC. Далее проводили гель-фильтрацию на колонке «Superdex-75» (GE Healthcare, США) в буфере, содержащем 20 мМ Трис-HCl, pH 7,5, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 5% глицерина, 0,02% NP-40. Хроматографические очистки были проведены на системах низкого и высокого давления BioLogic LP (Bio-Rad, США), AKTA purifier (GE Healthcare, Великобритания).

Спектральные исследования

Спектры биолюминесценции и флуоресценции регистрировались на флуоресцентном спектрофотометре «Varian Cary Eclipse» (Agilent, США), оснащенном термоконтроллером. Tyr- и Trp-флуоресценцию возбуждали 275 и 295 нм, соответственно, при установленной ширине щели 5 мм. Спектры поглощения, спектры флуоресценции белков в концентрации 0,05–0,15 мг/мл измеряли в буфере, содержащем 20 мМ Трис-HCl, pH 7,5, 150 мМ NaCl, спектры биолюминесценции регистрировали после добавления 1 мкМ целентеразина. В случае исследования термического тушения Trp-флуоресценции использовали 150 мМ NaCl, 20 мМ HEPES, pH 7,5. Нагревание кюветы с образцом проводили со скоростью 1ºC/мин в диапазоне 20–95ºC. Расчет завершенности теплового перехода α производили, используя уравнение: $\alpha=(I - I_f)/(I_u-I_f)$, где I – исходная интенсивность флуоресценции, I_f и I_u – интенсивность флуоресценции до и после теплового перехода. Финальные кривые были нормализованы и описаны сигмоидной функцей, определяющей завершенность перехода α от значения температуры T: $\alpha(T)=1-[1/(1+\exp((T-T_{0,5})/d))]$, где $T_{0,5}$ – температура полуперехода, (T_m), d – коэффициент наклона нормализованной кривой. Расчеты были произведены с помощью программного обеспечения «OriginPro 9.0» (OriginLab Corp., США).

Исследование кинетики

Кинетику биолюминесценции люцифераз регистрировали методом «остановленной струи» на спектрометре «SX-20» (Applied Photophysics, Великобритания) с объемом камеры 20 мкл и мертвым временем 1,1 мсек. Контроль температуры обеспечивался с помощью водяного термостата. Измерения проводились при оптимальной для каждого белка температуре. В шприцы, предназначенные для одновременного впрыска в измерительную камеру, помещали образец белка с концентрацией 5 нМ в 20 мМ Трис-HCl, pH 7,5 и 150 мМ NaCl и раствор с насыщающей концентрацией целентеразина в том же буфере. Константы кинетики подъема и спада биолюминесцентных реакций были рассчитаны программой «Sigma Plot 12.5» (Systat Software, Inc., США).

Экспрессия люциферазных изоформ в клетках HEK293

Для исследования транзиентной экспрессии изоформ люциферазы MLuc7 и MLuc164 в клетках HEK293 (Human embryo kidney) полноразмерные гены

клонировали в экспрессионный эукариотический вектор pcDNA3.1+, содержащий цитомегаловирусный промотор (CMV). В качестве контроля использовали клетки, трансфецированные исходным вектором pcDNA3.1+. Клетки культивировали в 96-луночном планшете в питательной среде DMEM (ПанЭко, Россия), с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки в условиях 5% CO_2 при 37ºС. Трансфекцию HEK293 проводили с помощью реагента «Lipofectamine 2000» (Invitrogen, США) согласно протоколу производителя. Через 7 ч среду заменяли на свежую, отбирали аликвоты и измеряли биолюминесценцию культуральной жидкости.

Биолюминесцентный иммуноанализ

Модельный анализ с использованием биоспецифических биолюминесцентных меток проводился в иммунологическом планшете. В лунки вносили по 100 мкл гликопротеина Е, растворенного в буфере PBS, pH 7,0, в концентрациях 0,05–1000 нг/мл, инкубировали в течение 1 ч при 37ºС. Лунки планшета промывали в автоматическом режиме прибором «Аквамарин» (BioSan, Россия) буфером (PBS, pH 7,0, 150 мМ NaCl, 0,02% Tween-20, 5 мМ ЭДТА). Далее проводили блокировку, внося 0,5% БСА в растворе PBS, pH 7,0, инкубировали при 23ºС 1 ч с интенсивным перемешиванием. После удаления содержимого и последующей промывки сорбировали анализируемые метки, внося препараты белков (10 нг/мл, по 100 мкл в лунку). После 1 ч перемешивания при 23ºС содержимое выливали, вносили промывочный буфер с добавлением 0,07% NP-40, инкубировали в течение 10 мин, проводили 1 цикл промывки. Световой сигнал регистрировали на люминометре «Mithras» (Berthold, Германия) путем впрыска 100 мкл 2 мкМ целентеразина, растворенного в буфере ML.

Для тестирования меток на биопрепаратах использовались клещевые экстракты, предоставленные Красноярской санитарно-эпидемиологической службой. В анализе сорбировали полноразмерное антитело 1B1, специфичное к гликопротеину Е (5 мкг/мл, 100 мкл). После блокировки поверхности лунок 0,5% БСА и промывки вносили лизированные клещевые препараты в объеме 100 мкл. Далее в лунки помещали гибридные белки миниантитело–люцифераза (10 нг/мл, 100 мкл) и действовали по схеме, описанной для модельного твердофазного анализа. Для подтверждения данных одновременно тестировали образцы клещевых экстрактов с использованием набора «ВектоВКЭ-антиген» (Вектор-БЕСТ, Россия) по протоколу.

Главы 3-6 посвящены описанию результатов исследования: получению препаратов копеподных люцифераз в нативной конформации с помощью бакуловирусной системы экспрессии, изучению их физико-химических свойств и структурных особенностей, а также применению в качестве *in vivo* и *in vitro* репортеров.

ПОЛУЧЕНИЕ ИЗОФОРМ РЕКОМБИНАНТНЫХ ЛЮЦИФЕРАЗ *METRIDIA LONGA* В НАТИВНОЙ ФОРМЕ ИЗ КЛЕТОК НАСЕКОМЫХ

Ранее в лаборатории фотобиологии Института биофизики СО РАН была создана библиотека генов светящихся планктонных рачков-копепод *Metridia longa,* собранных в ходе экспедиции на Белое море, Россия. Методом функционального скрининга по биолюминесцентной активности из кДНК-библиотеки был выделен ряд клонов, несущих гены изоформ люциферазы. Две из изолированных изоформ, MLuc164 и MLuc39, уже были частично описаны и успешно применены в анализах.

Основной проблемой, препятствовавшей характеризации люцифераз *M. longa,* было получение достаточных количеств рекомбинантного белка в природной форме. Рассмотренные в исследовании люциферазы имеют внутримолекулярные дисульфидные связи – это обстоятельство затрудняет корректный фолдинг белков при использовании бактериальных систем экспрессии. Ранее для изоформы MLuc164 была показана возможность получения люциферазы в нативной форме из клеток насекомых. В настоящем исследовании эта работа продолжена и расширена, в результате чего на основе использования бакуловирусной секретируемой экспрессии разработана технология получения препаратов люцифераз, имеющих правильную конформацию. В работе впервые в чистом виде получены и охарактеризованы две новые люциферазные изоформы, MLuc7 и MLuc2, обладающие уникальными свойствами, потенциально расширяющие спектр применения биолюминесцентных репортеров. Свойства новых изоформ сопоставлены с характеристиками активно используемой люциферазы GpLuc из близкородственной копеподы *Gaussia princeps,* которая также была впервые получена в нативном виде.

Новые изоформы люциферазы *Metridia longa*

Одной из новых изоформ люциферазы из копеподы *Metridia longa* стал фермент под названием MLuc7. Аминокислотная последовательность изоформы включает 169 аминокислотных остатков, кодирующих 16,5-кДа зрелый белок (Рис. 2). На сегодняшний день такая молекулярная масса люциферазы является наименьшей среди известных люцифераз, вовлеченных в обнаруженные биолюминесцентные системы различных организмов.

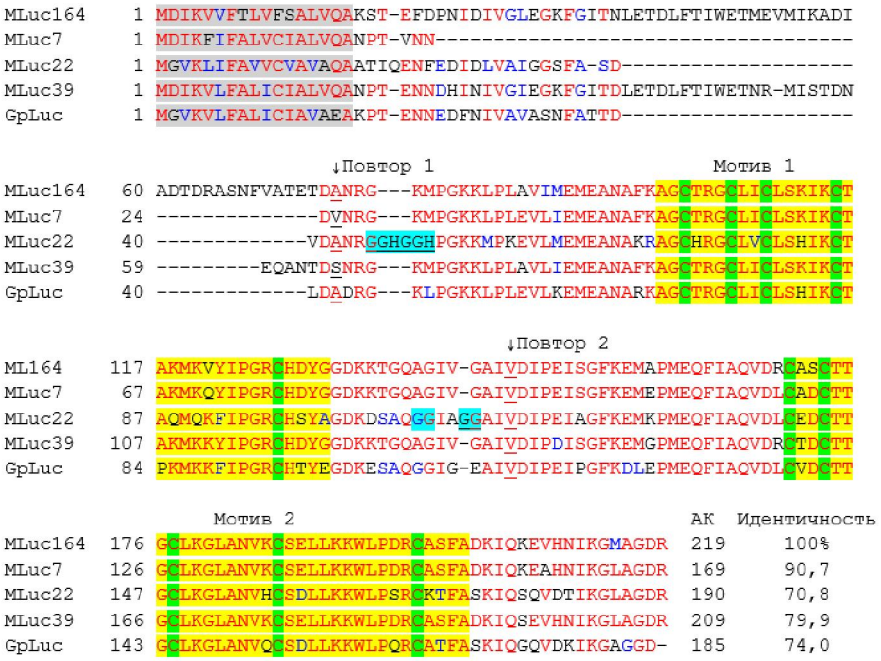


Рисунок 2 – Аминокислотные последовательности изоформ MLuc и GpLuc. Серым цветом обозначен сигнальный пептид, зеленым выделены консервативные цистеиновые остатки. Выравнивание последовательностей производилось на платформе ClustalW; красные – одинаковые аминокислотные остатки, синие – схожие, черные – различные

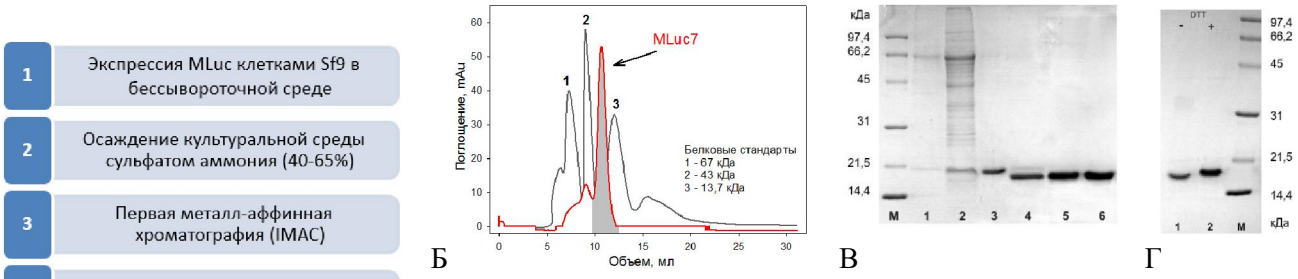
Аминокислотная структура изоформы MLuc7 проявляет достаточно высокую степень гомологии с остальными копеподными люциферазами. N-концевая часть

зрелого фермента MLuc7 является короткой и близкой по размеру с ранее описанными делетированными вариантами MLuc164. Предположительно, этот небольшой среди разнообразия изоформ фермент может являться минимальной основой каталитического домена гомологичных копеподных люцифераз. Как и остальные изоформы, MLuc7 представляет собой цистеин-богатый белок, несущий в консервативной части 10 цистеиновых остатков. Ранее экспериментально было показано, что восстановительные условия приводят к полной потере активности фермента. Из этого следует, что нативная люцифераза содержит дисульфидные связи, необходимые для функционирования биолюминесцентного белка.

Другая изолированная новая изоформа MLuc2 (зрелый белок обладает молекулярной массой 18,5 кДа) явно представляет другую паралогичную группу, поскольку различается с последовательностями 3-х других изоформ люциферазы *M. longa*, выявляя 70% идентичность. Анализ аминокислотных гомологий выявил, что изоформа MLuc2 имеет большее сходство с люциферазами *M. pacifica* и *M. okhotensis* (идентичность до 91%). Кроме этого, новая изоформа MLuc2 проявляет различия в строении структуры повторов, находящихся в консервативной области люцифераз. MLuc2 имеет укороченные консенсусные последовательности по сравнению с остальными описанными люциферазами Metridia и меньшую степень идентичности между повторами. Можно предположить, что такие различия возникли благодаря тому, что данная изоформа является эволюционно более молодой, что и обусловливает значительную отдаленность от предковых генов.

Использование бакуловирусной системы экспрессии в клетках насекомых для секреции рекомбинантных люцифераз

Получение рекомбинантных белков, имеющих множественные дисульфидные связи – проблематичная задача при использовании бактериальной экспрессии в *E. coli*. Условия бактериальной цитоплазмы не позволяют сформировать растворимый белок в правильной природной конформации. Ранее предпринятые попытки получения люциферазы в нативном виде (рефолдинг из телец включения, экстракция периплазмы, растворимая экспрессия в цитоплазме в специальных штаммах) не позволили обеспечить продукцию гомогенных препаратов в нативном виде в существенном количестве. Поэтому был предложен альтернативный путь получения люцифераз в природной форме для последующего анализа и описания (Рис. 3А).



А Б В Г

Рисунок 3 – Очистка MLuc7: А – схема; Б – профиль гель-фильтрации с разделением стандартных белков; В – ДСН-ПААГ-электрофорез: 1 – культуральная жидкость, 2 – растворенный осадок, 3 – пик на IMAC, 4 – расщепление протеазой; 5 – препарат после IMAC, 6 – пик на «Superdex-75»; Г – ДСН-ПААГ-электрофорез в полунативных условиях: 1 – нативный образец, 2 – с добавлением ДТТ

Для получения копеподных люцифераз были использованы бакуловирусная экспрессионная система «Bac-to-Bac» и клетки Sf9 из насекомого *Spodoptera frugiperda* (Invitrogen, США). Для обеспечения эффективной экспрессии рекомбинантных белков и их секреции в культуральную среду были сконструированы бакмидные ДНК, использованные для проведения трансфекции клеток насекомых.

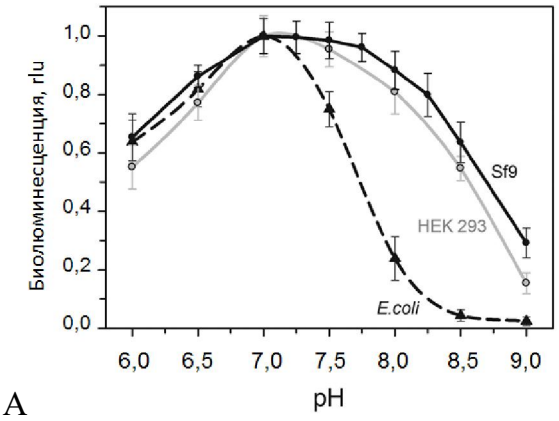
В ходе работы была разработана эффективная система продукции и очистки целевых белков. Подобранная оптимизированная схема очистки, включающая металл-аффинные хроматографии (IMAC), гель-фильтрацию на колонке «Superdex-75», позволила получить гомогенные белковые препараты, обладающие высокой люциферазной активностью. На рисунке 3 представлены результаты очистки изоформы MLuc7, где подтверждено мономерное состояние белкового препарата (Рис. 3Г). Продукция составила 6–7 мг из 1 л культуральной среды клеток насекомых.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ИЗОФОРМ ЛЮЦИФЕРАЗЫ ИЗ *M. LONGA* И ЛЮЦИФЕРАЗЫ GAUSSIA

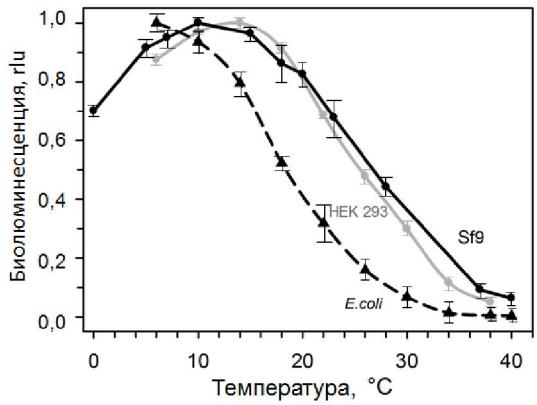
Свойства новой изоформы MLuc7

В работе исследовались физико-химические свойства полученного препарата люциферазы MLuc7 из клеток насекомых в сравнении с белком, выделенным из телец включения *E. coli* и секретируемым клетками человека (Рис. 4).

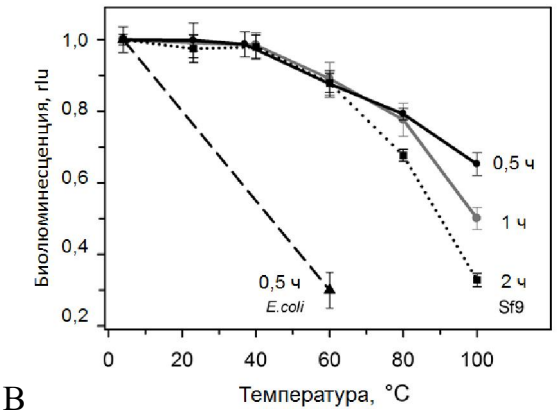
Удельная биолюминесцентная активность люциферазы MLuc7, полученной при экспрессии в клетках насекомых, в ~10^2 превышала активность препарата, выделенного из телец включения *E. coli*. Вероятно, в результате рефолдинга лишь около 1% целевого белка находится в правильном конформационном состоянии.



А



Б



В

Рисунок 4 – Исследование свойств MLuc7, полученной при бакуловирусной экспрессии (черные линии) в сравнении с MLuc7, выделенной из телец включения (штриховые линии) и находящейся в культуральной среде HEK293 (серые линии). Зависимость максимума биолюминесценции от pH (А), температуры (Б); В – исследование термостабильности MLuc7 из Sf9 и E. coli при инкубации при соответствующих температурах

Кроме рефолдированного препарата MLuc7 для сопоставления свойств люциферазы также использовалась культуральная среда линии человеческих клеток

HEK293, транзиентно экспрессирующих секретируемый репортерный белок (Рис. 4). Биохимические параметры люциферазы из эукариотических клеток служили контролем нативного фолдинга репортера.

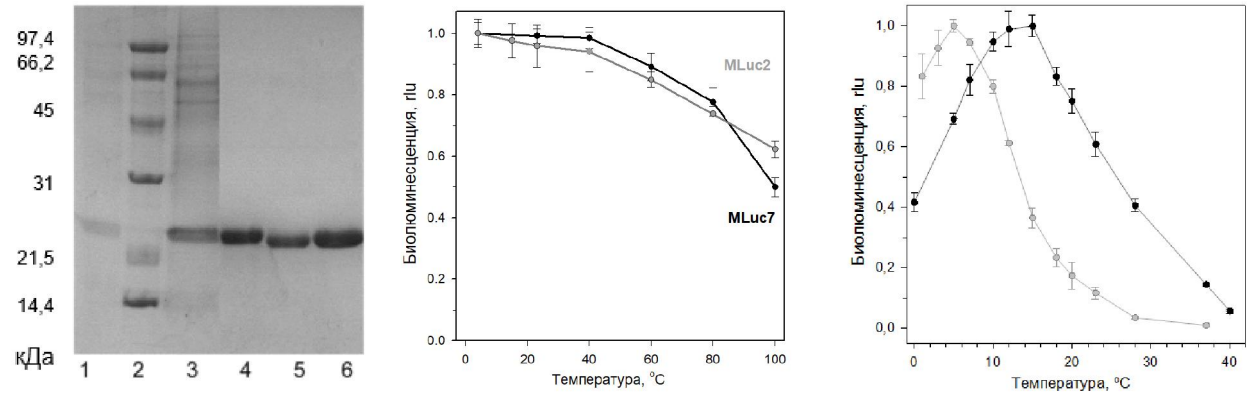
Экспериментально было показано, что новая изоформа MLuc7, полученная при бакуловирусной экспрессии, обладала свойствами, близкими к свойствам культуральной среды клеток HEK293 (Рис. 4А, Б). Данный препарат люциферазы, однако, отличался от MLuc7, полученного из *E. coli*, оптимумами значений pH, а также более высоким температурным оптимумом (15°C). Кроме этого, полученная изоформа характеризовалась большей термостабильностью, позволяющей сохранять до 30% изначальной активности после 2 ч инкубации при 100°C (Рис. 4В).

В результате проведенных исследований определены физико-химические характеристики новой изоформы и показана идентичность свойств рекомбинантной MLuc7 из клеток насекомых и люциферазы, экспрессируемой клетками HEK293, что подтверждает нативную конформацию выделенной люциферазы MLuc7.

Свойства новой психрофильной изоформы MLuc2

В исследовании описана новая изоформа MLuc2, обладающая молекулярной массой 18,5 кДа. Для оценки ее физико-химических параметров был проведен анализ свойств люциферазы MLuc2 в сравнении с ранее описанной изоформой MLuc7.

MLuc2-люцифераза обладала высокой активностью (Табл. 1), при оптимальных условиях превышающей MLuc7, а также являлась термостабильным ферментом, имея до 60% начальной активности после 1 ч кипячения (Рис. 5Б). Кроме этого, MLuc2 отличалась чрезвычайно низким температурным оптимумом биолюминесцентной активности (~5°C), что позволило отнести ее к экстремально психрофильным ферментам (Рис. 5В).



А Б В

Рисунок 5 – А – ДСН-ПААГ-электрофорез MLuc2 из Sf9 клеток: 1 – культуральная среда, 2 – стандарты молекулярного веса, 3 – белковый осадок, 4 – после IMAC, 5 – расщепленный TEV-протеазой белок, 6 – MLuc2 после «Superdex-75»; Б – исследование термостабильности при инкубации при температурах в течение 1 ч; В – зависимость ферментативной активности MLuc2 (серые) и MLuc7 (черные линии) от температуры

Предположительно, существенные различия родственных гомологичных ферментов могут быть связаны с особенностями жизнедеятельности планктонных рачков, которые в течение суток вертикально мигрируют на глубину до 100 м. В Белом море, где были собраны образцы биомассы копепод *M. longa*, температурный диапазон глубинных и поверхностных вод составляет 0–20°C.

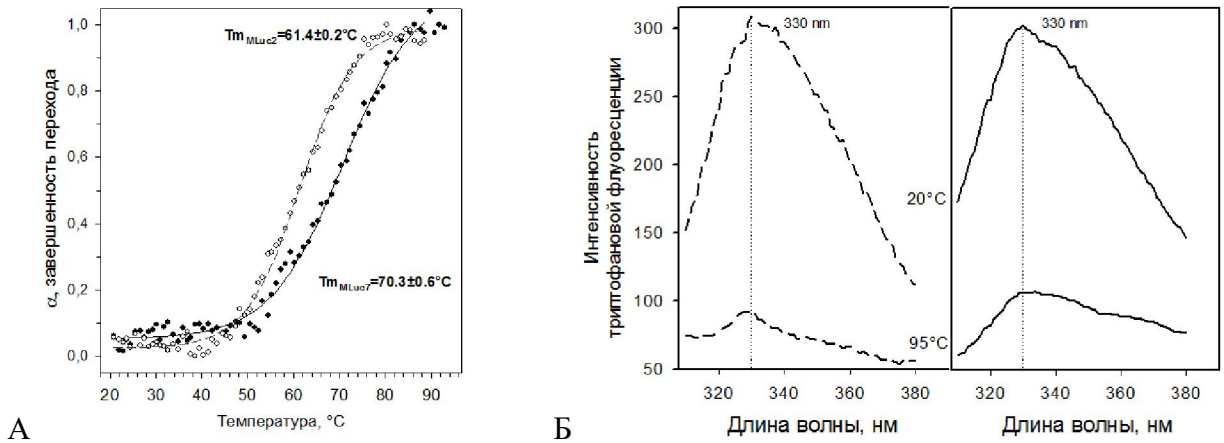
Таблица 1. Свойства изоформ MLuc7 и MLuc2, выделенных из Sf9 (показана удельная активность, измеренная при оптимальных условиях)

Изоформа	Удельная активность, rlu/мг × 10^{10}	Относительная удельная активность, %	λ_{max}, нм	K_M, мкМ
MLuc2	189	112	487	4,7±0,3
MLuc7	168	100	487	3,2±0,2

Известно, что психрофильные свойства белков часто определяются их структурными особенностями. В частности, белки, предпочитающие холодные условия, отличаются от близких мезофильных гомологов большей конформационной мобильностью белковой структуры. Такая подвижность может быть обусловлена ослаблением внутримолекулярных взаимодействий (водородных, ковалентных, ионных связей).

При анализе аминокислотной структуры люциферазы MLuc2 были обнаружены кластеры, богатые глициновыми остатками (см. Рис. 2, выделено голубым). Эти участки, вероятно, могут обеспечивать большую гибкость. Подобные глицин-содержащие вставки наблюдаются у люцифераз из близкородственных копепод рода Metridia (по данным «GeneBank»). Однако эти ферменты еще не охарактеризованы, и их температурный оптимум неизвестен.

Для оценки структурных различий MLuc7 и MLuc2, значительно отличающихся свойствами, проведены спектральные исследования (Рис. 6). Наблюдение за интенсивностью триптофановой флуоресценции при последовательной тепловой денатурации показало, что для обоих ферментов максимум спектра флуоресценции (330 нм) не изменяется (Рис. 6Б). Это может указывать на схожее окружение Trp-остатков, в том числе во время денатурации. Температура плавления (T_m) для MLuc2 составила 61,4±0,2ºC, в то время как для MLuc7 наблюдалась при 70,3±0,6ºC. Существенное различие в значениях температурного перехода между гомологичными белками может свидетельствовать, что для психрофильного белка характерна менее жесткая структура.



А Б

Рисунок 6 – Исследование зависимости тушения собственной Trp-флуоресценции MLuc2 (○, штриховые линии) и MLuc7 (●, черные линии) от температуры: А – определение температуры плавления белков по степени завершенности теплового перехода α из нативного в денатурированное состояние, Б – положение максимумов спектров флуоресценции MLuc7 при терминальных температурах эксперимента

Для идентификации особенностей, придающих, предположительно, структурную гибкость психрофильному белку, препараты дополнительно анализировались на наличие свободных SH-групп по Эллману. Доля свободных

тиольных групп для изоформы MLuc7 составила 0,2±0,1, в то время как для MLuc2 – 1,5±0,2. Это позволяет предположить, что в более мезофильном гомологичном белке все Cys-остатки образовывали дисульфидные связи, а в психрофильном белке наблюдалась пара несвязанных цистеинов.

Новая уникальная изоформа MLuc2, расширяющая спектр существующих репортерных молекул, в перспективе может быть применена при исследовании других психрофильных белков, а также может использоваться как *in vivo* репортер для изучения экстремальных психрофильных организмов.

Свойства люциферазы Gaussia

Люцифераза GpLuc из *Gaussia princeps* – широко используемый биолюминесцентный репортер в биологических исследованиях, имеющий активность, в ~10^3 раз превышающую таковую светлячковой и Renilla-люциферазы. Несмотря на огромный интерес к белку и спектр применения, физико-химические параметры GpLuc описаны неполно. В настоящей работе полученный нативный препарат рекомбинантной GpLuc из клеток насекомых был использован для определения люминесцентных свойств.

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

Luc	Относительная активность, %	Оптимум			λ_{max}, нм	Tm, °C	Свободные SH-группы
		T, °C	NaCl, M	pH			
GpLuc	100	18–20	1,0–1,5	7,5–8,5	487	72,1±0,6	0,2±0,1
MLuc2	77	5	1,0	7,0–7,8	487	61,4±0,2	1,5±0,2
MLuc7	68	15	0,5	7,0–8,0	487	70,3±0,6	0,2±0,1

Биолюминесцентные спектры всех исследованных в данной работе люцифераз оказались сходны, проявляя максимум в области 487 нм, что может говорить о схожем аминокислотном окружении субстрата в субстрат-связывающей полости в процессе реакции. Стоит отметить, что рассматриваемые копеподные люциферазы проявляли биолюминесцентную активность при разных температурных условиях (Рис. 6Б, Табл. 2): значительные различия могут быть обусловлены структурными особенностями гомологичных белков, приводящих к адаптации к температурным условиям, а также обитанием светящихся копепод в северных и умеренных широтах.

Ранее сообщалось, что оптимум для GpLuc составляет 0,15 M NaCl. Можно предположить, что различие свойств было обусловлено схемами получения рекомбинантного белка. В одной из работ (Ratnayaka et al., 2010) изучали свойства препаратов из бактериальной системы экспрессии, в недавнем исследовании (Inouye, 2018) GpLuc выделяли из культуральной среды клеток CHO, однако, не расщепляли концевой His-пептид. В настоящей работе процедура очистки включала отщепление His7, и ранее уже продемонстрировано, что свойства люциферазы, полученной из Sf9, идентичны характеристикам белка, секретируемого клетками HEK293. Исходя из этого, можно утверждать о получении препаратов белков, проявляющих свойства природных люцифераз.

Кроме этого, установлено, что GpLuc, как и MLuc-изоформы, является термостабильным ферментом – долгое инкубирование при повышенных температурах,

включая условия кипячения, не приводит к полной потере активности. Такая экстремальная термостабильность, вероятно, связана с наличием множественных стабилизирующих структуру дисульфидных связей. В данной работе было определено, что GpLuc не имеет в своей структуре свободных SH-групп и обладает жесткой структурой с температурой плавления, составляющей 72,1±0,6°C (Рис. 7Г, Табл. 3).

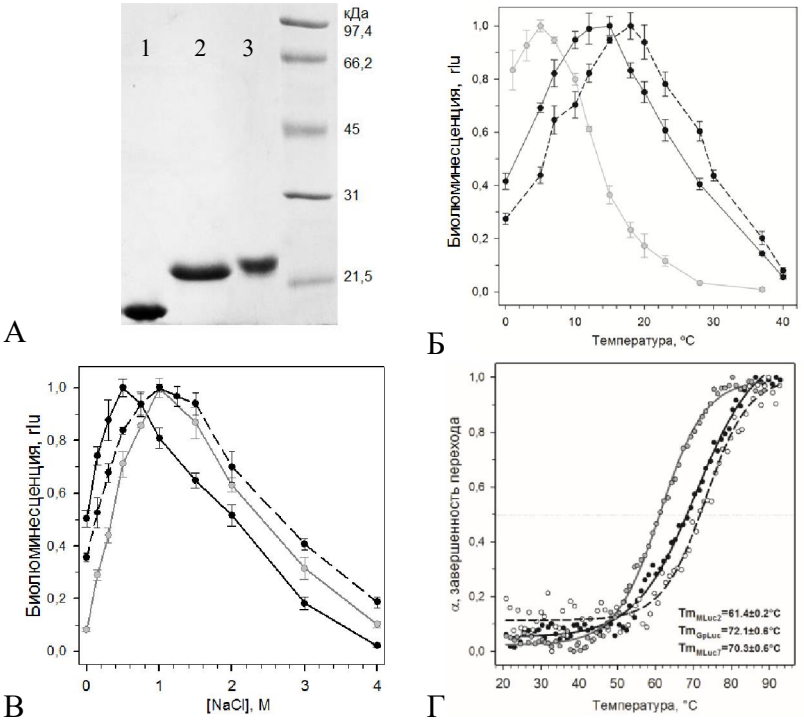


Рисунок 7 – А – ДСН-ПААГ-электрофорез образцов копеподных люцифераз, очищенных из культуральной среды Sf9: 1 – MLuc7, 2 – MLuc2, 3 – GpLuc; Б – зависимость биолюминесценции от температуры, В – концентрации NaCl; Г – кривые тушения Trp-флуоресценции во время последовательной тепловой денатурации. MLuc7 – черные, MLuc2 – серые, GpLuc – штриховые линии

Таким образом, использование бакуловирусной экспрессионной системы, обеспечивающей продукцию корректно свернутых белков с S-S связями, позволило получить новые данные о люминесцентных и биохимических параметрах люцифераз копепод и объективно сравнить их свойства. Определение оптимальных условий биолюминесцентных реакций может быть в дальнейшем использовано для оптимизации оценки активности репортеров в различных схемах анализа.

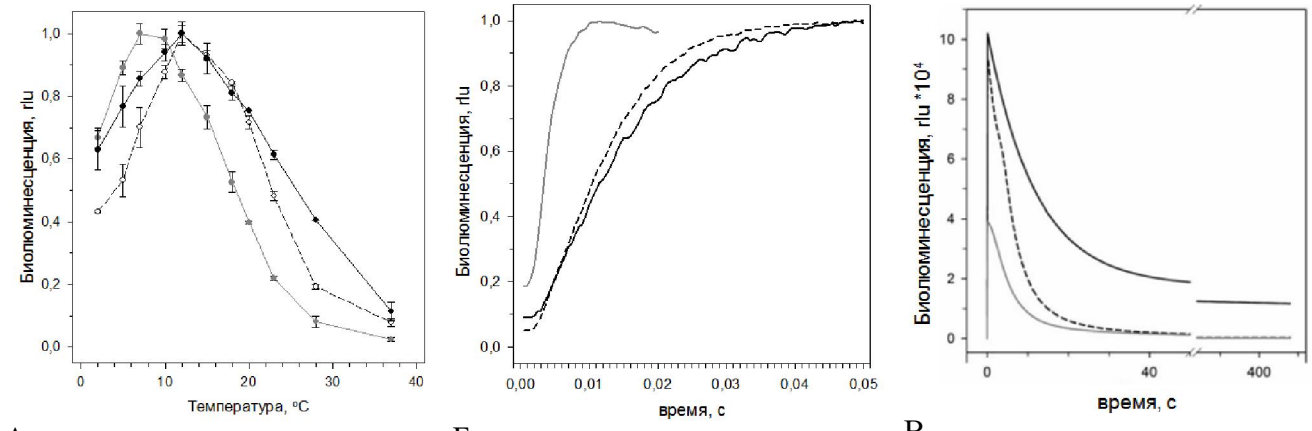
ЛОКАЛИЗАЦИЯ АМИНОКИСЛОТ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ЛЮЦИФЕРАЗЫ MLuc7

Исследование хемилюминесценции имидазолпиразиноновых производных позволило предложить механизм биолюминесцентной реакции, катализируемой целентеразин-зависимыми ферментами. В результате изучения известных пространственных структур, биохимических и кинетических параметров белков была предложена схема, согласно которой молекула целентеразина, оказавшись в субстратной полости фермента, претерпевает ряд преобразований, заключающихся в последовательном депротонировании, образовании пероксид-аниона, далее – диокси-этанона, распадающегося с высвобождением CO_2, и формированием амид-аниона в возбужденном состоянии. Белковое окружение может значительно влиять на этапы преобразования целентеразина через формирование водородных связей боковых цепей аминокислотных остатков субстрат-связывающей полости с его атомами. Модификация этого окружения (как показано на фотопротеинах с заменами ароматических аминокислот) может приводить к изменениям кинетики реакции, интенсивности светового сигнала и т.д.

В настоящей работе были предприняты попытки идентификации остатков люциферазы MLuc7, имеющих существенное значение в реализации каталитической функции и потенциально входящих в активный центр фермента. Копеподная целентеразин-зависимая люцифераза MLuc7 содержит среди ароматических аминокислотных остатков 4 Phe, 2 Tyr, 2 His и Trp (см. Рис. 2). Было выдвинуто предположение, что гидроксильные группы тирозиновых остатков, Tyr72 и Tyr80, потенциально образующих водородные связи, могут находиться в субстратной полости люциферазы и принимать участие в связывании целентеразина. Для оценки функциональной роли отдельных Tyr-остатков методом олигонуклеотид-направленного мутагенеза были созданы варианты люциферазы с точечными заменами (Y72F и Y80F). Белковые препараты выделяли по разработанной схеме.

Мутантные белки проявляли биолюминесцентную активность с сохранением 90% исходной активности у варианта Y80F и 15% – у Y72F. Однако мутант с заменой Y72F имел значительный сдвиг температурного оптимума в сторону низких температур (7°C), тогда как вариант Y80F характеризовался неизменным оптимумом по сравнению с диким типом MLuc7 (~15°C) (Рис. 8A). Стоит отметить, что вариант Y72F имел идентичную комбинацию ароматических остатков в консервативной части белка с психрофильной MLuc2 (см. Рис. 2). Предположительно, данная OH-группа оказывает существенное влияние на формирование структурных элементов, участвующих в каталитическом окислении целентеразина.

Исследования спектрокинетики методом «остановленной струи» выявили значительные отличия ферментов по начальной скорости биолюминесцентной реакции. Результаты данного метода, позволяющего проводить сверхбыстрые измерения интенсивности светового потока с мертвым временем 1,1 мс, демонстрируют, что Y72F характеризуется более быстрым преобразованием целентеразина с константой подъема (k_{rise}) 256 c^{-1}, в то время как природный вариант, имеющий два тирозина, и мутант Y80F с оставшимся Tyr72 имеют скорости подъема в ~5 раз ниже (Табл. 3). Мутантные варианты люциферазы MLuc7, как и дикий тип, характеризовались вспышкообразной кинетикой биолюминесции (Рис. 8B). Однако тирозиновые мутанты имели более быструю скорость затухания биолюминесценции с ~2-кратным повышением константы спада (k_{decay}), что приводило к уменьшению интегрированного светового сигнала.



А Б В

Рисунок 8 – А – температурные зависимости вариантов MLuc7 (дикий тип – черные, Y80F – штриховые, Y72F – серые линии); Б – измерения кинетики реакции методом «остановленной струи»; В – кинетика биолюминесцентной реакции, зарегистрированная за 420 с; все измерения выполнены при оптимальной для каждого белка температуре

Таблица 3. Свойства тирозиновых мутантов люциферазы MLuc7

Белок	Относительная начальная скорость реакции, %	λ_{max}, нм	Topt, °C	k_{rise}, c^{-1}	k_{decay}, c^{-1}	K_D, мкМ
MLuc7	100	487	15	56	0,085	17,3±0,6
Y72F	15	487	7	256	0,176	44,9±3,6
Y80F	90	487	15	65	0,157	40,3±2,4

Спектры тирозиновой флуоресценции имели максимумы при 303 нм (Рис. 9А, Б, В). Мутант Y72F демонстрировал появление дополнительного максимума при 330 нм (Рис. 9Б) – эмиссия в этой области спектра может наблюдаться у остатков триптофана: единственный Trp143, находящийся во втором консервативном повторе, флуоресцирует с λ_{max}=330 нм (см. Рис. 6Б). Этот эффект может наблюдаться вследствие переизлучения, возникающего по причине близкого расположения остатков и переноса энергии по Ферстеровскому механизму. Это позволяет предположить, что консервативные участки могут формировать активный центр люциферазы.

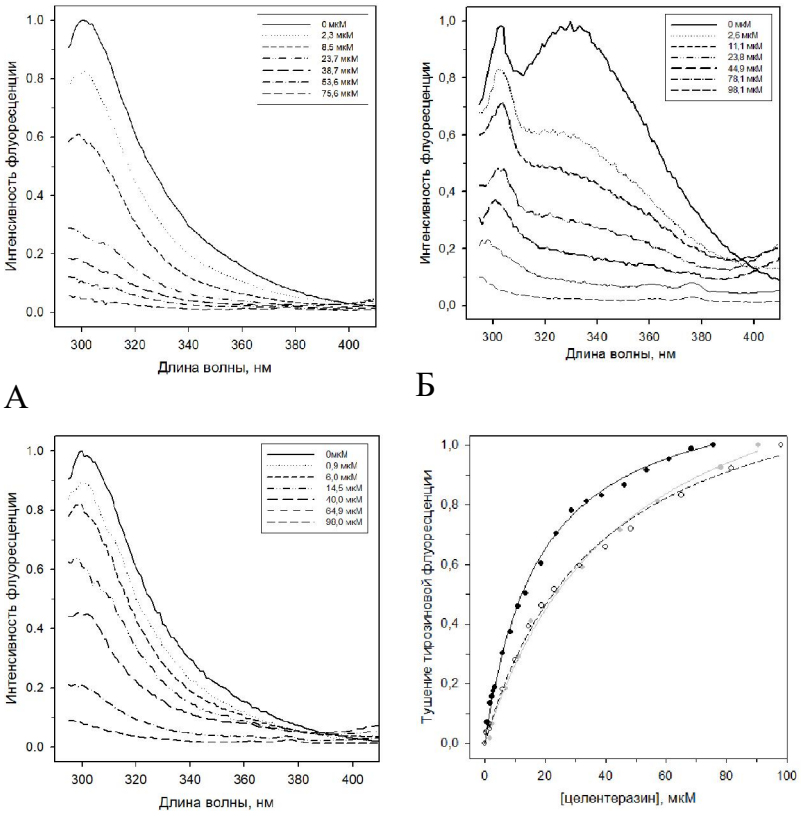


Рисунок 9 – Тушение тирозиновой флуоресценции образцов дикого типа MLuc7 и мутантов целентеразином. А, Б, В – нормализованные спектры тушения флуоресценции MLuc7 и мутантов Y72F и Y80F, соответственно, Г – кривые для определения K_D для MLuc7 (•), мутантов Y72F (•) и Y80F (о)

Параметры связывания MLuc7–целентеразин определялись в результате анализа тушения собственной Tyr-флуоресценции, наблюдаемого во время титрования препаратов люцифераз субстратом. В данном эксперименте рассчитывались значения кажущейся константы диссоциации, так как наблюдаемое снижение интенсивности флуоресценции было обусловлено связыванием с продуктом реакции, а не с добавляемым субстратом. Значения кажущейся K_D определялись с помощью уравнения (1), аппроксимирующего нормализованные данные на рисунке 9Г:

$$\frac{Q}{Q_{max}} = \frac{(C + L + K_D) - \sqrt{(C + L + K_D)^2 - 4CL}}{2} \qquad (1),$$

где $Q = F_o - F_q$, $Q_{max} = F_o - F_{qmax}$, (F_o – начальная интенсивность Tyr-флуоресценции при 303 нм, F_q – флуоресценция в присутствии субстрата, F_{qmax} – потушенная флуоресценция). Параметры C, L, K_D – концентрации белка и лиганда, константа диссоциации, соответственно.

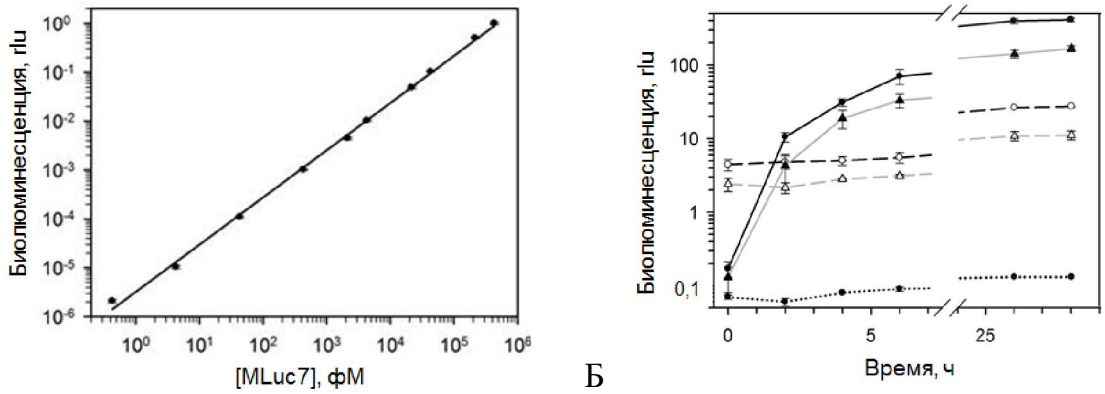
Произведенные расчеты показали, что значения констант диссоциации для фермент-субстратных комплексов с участием тирозиновых мутантов повышены по сравнению с MLuc7 (Табл. 3). Это может свидетельствовать о том, что исследованные мутантные варианты MLuc7 по ряду причин проявляли меньшую аффинность к субстрату. Исследование мутантов MLuc7 с заменой остатков Tyr на Phe показало, что появление аминокислоты с боковой цепью, в которой отсутствует OH-группа, способная формировать водородные связи с атомами других аминокислотных остатков и с атомами субстрата, приводит к значительным изменениям физико-химических свойств люциферазы. Эти результаты позволяют сделать выводы о вовлеченности каждого из тирозинов в формирование активного центра MLuc7 и их существенной роли в каталитическом окислении целентеразина.

ПРИМЕНЕНИЕ ЛЮЦИФЕРАЗЫ METRIDIA КАК БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО РЕПОРТЕРА *IN VIVO* И *IN VITRO*

Изоформа MLuc7 люциферазы *M. longa* является активным ферментом с минимальной молекулярной массой (16,5 кДа) среди всех известных на сегодняшний день люцифераз, поэтому ее применение как генетически кодируемого репортера *in vivo* позволяет уменьшить метаболическую нагрузку клетки на биосинтез репортера, имитируя максимально естественные условия для анализа. Кроме того, минимальные размеры репортера привлекательны с точки зрения конструирования различных гибридных белков, где требуется небольшая репортерная часть.

Использование люциферазы MLuc7 как репортера в клетках млекопитающих

Важной характеристикой биолюминесцентных белков как потенциальных репортеров является их чувствительность, а также линейный диапазон детекции. Для оценки эффективности использования люциферазы MLuc7 как метки был зарегистрирован предел обнаружения белка в растворе (Рис. 10А). Биолюминесцентная активность была строго пропорциональна концентрации фермента в исследуемом диапазоне (0,4 фМ–0,4 нМ) и ограничивалась лишь характеристиками люминометра.



А Б

Рисунок 10 – А – обнаружение люциферазы MLuc7 в диапазоне 0,4 фМ–0,4 нМ; Б – биолюминесцентная активность среды клеток HEK293, экспрессирующих секретируемые люциферазы MLuc7 (●) и MLuc164 (▲), (○ и Δ – активность в целых клетках)

Для оценки белка MLuc7 как биолюминесцентного *in vivo* репортера проводили трансфекцию линии клеток почек человека HEK293. В ходе эксперимента новая изоформа MLuc7 сравнивалась с ранее описанной люциферазой MLuc164, эффективно используемой в качестве секретируемого репортера *in vivo*.

Люцифераза MLuc7 эффективно секретировалась сразу же после трансфекции и накапливалась в клеточной культуральной среде (Рис. 10Б). В ходе эксперимента биолюминесцентная активность определялась в миниаликвотах отбираемой клеточной среды, что позволяло наблюдать за активностью репортера (в данном случае свидетельствующей о функциональном состоянии клеток) *in vivo* в реальном времени без разрушения клеток. В аликвотах отобранной для анализа среды каталитическая активность репортера стабильно сохранялась более суток, что позволяет хранить образцы и проводить отсроченные измерения. Активность новой изоформы превышала в ~3 раза активность MLuc164, что потенциально позволяет проводить тестирование с большей чувствительностью. Полученные результаты однозначно показывают, что изоформа MLuc7 может быть использована в качестве высокочувствительного репортера для мониторинга внутриклеточных процессов в клетках млекопитающих.

MLuc7 как белок-партнер в гибридных аналитических системах

Для применения люциферазы MLuc7 в качестве репортерного элемента специфической молекулы разработана схема получения бифункционального гибридного белка для биолюминесцентного анализа *in vitro*. В качестве биоспецифического домена было использовано миниантитело 14D5a, специфичное к капсидному гликопротеину Е вируса клещевого энцефалита (ВКЭ). В ходе работы были созданы различные варианты гибридного белка миниантитело–люцифераза для выбора оптимальной конфигурации. Генетические конструкции, кодирующие синтез вариантов рекомбинантных гибридных белков (см. Рис. 1Б), использовали для обеспечения бакуловирусной экспрессии и дальнейшей очистки препаратов биолюминесцентных меток по разработанной в данном исследовании схеме.

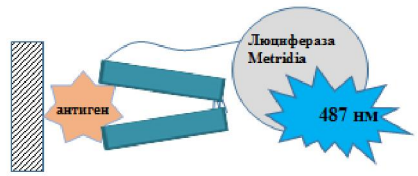
Таблица 4. Свойства гибридных биолюминесцентных белков

Белок	Удельная активность, rlu x 10^4/M	Tm, °C
MLuc7	1000	70,2±0,5
14D5a-MLuc7-H7	990	71,4±0,1
MLuc7-14D5a-H7	970	73,0±0,5

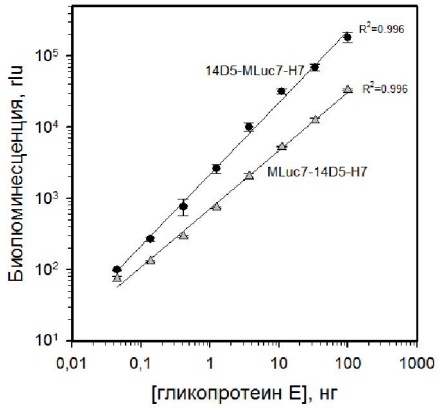
Полученные метки не отличались по биолюминесцентной активности от люциферазы MLuc7 (Табл. 4). Присоединение домена миниантитела к MLuc7 также не приводило к изменениям спектров биолюминесценции, спектров тирозиновой и триптофановой флуоресценции. Определенные значения Tm, показали, что гибридные белки проявляют не меньшую структурную жесткость, что и белок MLuc7.

Тестирование меток в модельном биолюминесцентном иммуноанализе

Полученные бифункциональные белки были протестированы как биолюминесцентные метки для модельного иммуноанализа по схеме, представленной на рисунке 11А. В качестве антигена был использован рекомбинантный гликопротеин Е.



А



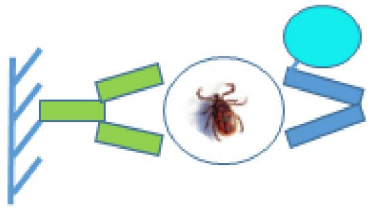
Б

Рисунок 11 – Модельный твердофазный биолюминесцентный анализ: А – схема анализа, реализованного в лунках иммунологического планшета; Б – биолюминесцентная активность, зарегистрированная при оценке чувствительности меток в анализе

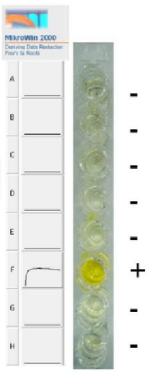
Для обеих сконструированных меток была характерна аффинность к белку-мишени. Предельные точки обнаружения антигена зафиксированы при концентрации до 0,45 нг/мл, что позволяет детектировать 45 пг гликопротеина Е (Рис. 11Б). Наименьшую предельную концентрацию при детекции антигена продемонстрировала биолюминесцентная метка 14D5-ML7-H7, которая в дальнейшем применялась в иммуноанализе с использованием биопрепаратов клещей.

Биолюминесцентный иммуноанализ препаратов клещей

Твердофазный анализ для определения ВКЭ в клещевых экстрактах с меткой 14D5-ML7-H7 проводился по «сэндвич»-схеме, которая предполагает использование дополнительных полноразмерных антител, специфичных к вирусным частицам. Эффективность метода оценивали с помощью стандартной методики определения ВКЭ. Определено, что результаты биолюминесцентного иммуноанализа были идентичны данным колориметрической детекции (Рис. 12).



А



Б

Рисунок 12 – Биолюминесцентный иммуноанализ для определения ВКЭ: схема «сэндвич»-анализа и результаты тестов, проведенных с использованием новой биолюминесцентной метки и с помощью стандартного колориметрического метода, используемого службами санитарного контроля

Таким образом, на примере гибридного белка, содержащего миниантитело к ВКЭ и MLuc7 в качестве специфической и репортерной частей, соответственно, показано, что новая изоформа MLuc7 люциферазы *Metridia longa* может служить партнером для конструирования бифункциональных гибридных белков для медицинской диагностики *in vitro*, так как присоединение специфического домена к N- или С-концу люциферазы не приводит к изменению биолюминесцентных и биохимических свойств люциферазы MLuc7.

ВЫВОДЫ

На основе полученных результатов были сформулированы следующие выводы:

1. Впервые разработана технология получения люцифераз копепод в нативной форме, включающая их экспрессию в клетках насекомых с помощью бакуловирусной системы и хроматографическую очистку из культуральной среды, обеспечивающая выход 6–7 мг/л высокоочищенных люцифераз. Показано, что свойства люцифераз, полученных в клетках насекомых, не отличаются от свойств люцифераз, секретируемых клетками млекопитающих.
2. Впервые исследованы биолюминесцентные и биохимические свойства новых изоформ MLuc7 и MLuc2 люциферазы *Metridia long*a, а также люциферазы копепод *Gaussia princeps*, полученных в нативной форме с помощью бакуловирусной системы экспрессии. Показано, что люциферазы обладают высокой удельной биолюминесцентной активностью, что позволяет детектировать их в аттомолярных количествах, а также экстремально высокой термостабильностью.
3. Показано, что температурный оптимум биолюминесцентной реакции, катализируемой новой изоформой MLuc2 люциферазы *M. longa*, находится при экстремально низкой температуре ~5ºC, что позволяет отнести эту изоформу к психрофильным ферментам. Установлено, что низкий температурный оптимум обусловлен более высокой пространственной гибкостью белка, возникающей вследствие отсутствия одной внутримолекулярной дисульфидной связи.
4. Методом сайт-направленного мутагенеза получены мутанты изоформы MLuc7 с заменой Tyr72 и Tyr80 на Phe. Показано, что мутации приводят к изменению температурного оптимума и кинетики биолюминесцентной реакции, удельной активности фермента, а также аффинности активного центра к субстрату. Это указывает на вовлеченность тирозинов в формирование активного центра люциферазы MLuc7 и в каталитическое окисление субстрата.
5. На примере транзиентной экспрессии клеток HEK293 продемонстрирована пригодность новой изоформы MLuc7 в качестве секретируемого репортера *in vivo* в клетках млекопитающих. Показано, что биолюминесцентная активность культуры клеток, экспрессирующих MLuc7, в 3 раза превышает активность среды клеток, экспрессирующих ранее описанную изоформу MLuc164 люциферазы *Metridia longa.*
6. На примере гибридного белка, содержащего одноцепочечное антитело 14D5a к вирусу клещевого энцефалита и MLuc7 в качестве специфической и репортерной частей, соответственно, показано, что новая изоформа MLuc7 может служить белком-партнером при конструировании бифункциональных гибридных белков для применения в диагностике *in vitro.*

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах

1. Markova, S.V. The smallest natural high-active luciferase: cloning and characterization of novel 16.5-kDa luciferase from copepod *Metridia longa* / S.V. Markova, **M.D. Larionova**, L.P. Burakova, E.S. Vysotski // BBRC. – 2015. – V. 457, N. 1. – P. 77-82.
2. **Larionova, M.D.** Tyr72 and Tyr80 are involved in the formation of an active site of a luciferase of copepod *Metridia longa* / M.D. Larionova, S.V. Markova, E.S. Vysotski // Photochem Photobiol. – 2017. – V. 93. – P. 503-510.
3. **Larionova, M.D.** The novel extremely psychrophilic luciferase from *Metridia longa*: properties of a high-purity protein produced in insect cells / M.D. Larionova, S.V. Markova, E.S. Vysotski // BBRC. – 2017. – V. 483. – P. 772-778.
4. **Larionova, M.D.** Bioluminescent and structural features of native folded Gaussia luciferase / M.D. Larionova, S.V. Markova, E.S. Vysotski // J Photochem Photobiol, B. – 2018. – V. 183. – P. 309-317.

Тезисы в материалах конференций

1. **Larionova, M.D.** The production of highly active recombinant 16.5-kDa isoform of *Metridia longa* luciferase, the smallest copepod luciferase / M.D. Larionova, S.V. Markova, L.P. Burakova, E.S. Vysotski // Luminescence. Abstracts of the 18th ISBC. – 2014. – V. 29, N. 1. – P. 79-80.
2. **Ларионова, М.Д.** Новая 16,5 кДа-изоформа люциферазы копепод *Metridia longa*: получение высокоактивного белка из клеток насекомых / М.Д. Ларионова, С.В. Маркова, Е.С. Высоцкий // Материалы VII съезда РФО. – 2014. – С. 108.
3. **Ларионова, М.Д.** Получение рекомбинантных люцифераз копепод в нативной форме при экспрессии в клетках насекомых / М.Д. Ларионова, С.В. Маркова, Е.С. Высоцкий // Материалы VII Съезда «Белки и пептиды». – 2015. – С. 266.
4. **Ларионова, М.Д.** Новая психрофильная изоформа люциферазы Metridia: получение высокоактивного белка / М.Д. Ларионова, С.В. Маркова, Е.С. Высоцкий // Материалы V съезда биохимиков России. – 2016. – С. 143.
5. **Ларионова, М.Д** Активируемая холодом люцифераза из *Metridia longa*: изучение структурных особенностей экстремофильного белка / М.Д. Ларионова, С.В. Маркова, Е.С. Высоцкий // Материалы VIII съезда РФО. – 2017. – с. 127.
6. **Ларионова, М.Д.** Изоформы люциферазы из копеподы: получение белков и исследование биолюминесцентных свойств насекомых / М.Д. Ларионова, С.В. Маркова, Е.С. Высоцкий // Материалы VIII Съезда «Белки и пептиды», ACTA Naturae. – 2017. – №1. – С. 18-19.