Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук » (ФИЦ КНЦ СО РАН) – обособленное подразделение «Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИБФ СО РАН)

На правах рукописи

Буракова Людмила Петровна

СВЕТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ ФОТОПРОТЕИН БЕРОВИН КТЕНОФОР *Beroe abyssicola*: КЛОНИРОВАНИЕ И СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА

03.01.02 – биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Высоцкий Евгений Степанович

Красноярск – 2017

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ

Термин «биолюминесценция» был введен для определения явления, связанного со способностью живых организмов излучать свет в видимом диапазоне. Биолюминесценция широко распространена в природе – организмы, способные излучать свет, встречаются во многих таксонах. Однако наибольшее количество светящихся организмов обнаружено среди обитателей морей и океанов [Haddock et al., 2010]. Способность к биолюминесценции обусловлена наличием в клетках как специфических ферментов, так и специфических субстратов [Kaskova et al., 2016], окисление которых с помощью кислорода приводит к образованию продукта в возбужденном состоянии, релаксирующего затем в основное состояние с излучением кванта света.

Биолюминесцентные белки условно можно разделить на две группы. Одна из них включает люциферазы, которые способны совершать несколько оборотов и, следовательно, функционировать как типичный фермент. К другой можно отнести фотопротеины – «предварительно заряженные» биолюминесцентные белки, содержащие в гидрофобной полости, недоступной растворителю, прочно связанный субстрат. Фактически фотопротеины представляют собой стабильный фермент-субстратный комплекс. В зависимости от типа фотопротеина реакция инициируется либо ионами, либо активными формами кислорода [Shimomura, 2006]. В фотопротеине окисляется одна молекула субстрата, а продукт остается связанным с активным центром, не позволяя белку делать несколько оборотов, как это происходит у обычных ферментов.

Наиболее известными представителями этого типа белков являются Ca^{2+}-регулируемые фотопротеины, отвечающие за свечение морских гидромедуз [Shimomura, 2006]. Все Ca^{2+}-регулируемые фотопротеины являются односубъединичными белками и содержат прочно, но нековалентно связанный «преактивированный» кислородом субстрат, 2-гидропероксицелентеразин. Биолюминесцентная реакция инициируется в ответ на связывание Ca^{2+} с молекулой фотопротеина. Для фотопротеинов акворина из *Aequorea victoria, A.*

coerulescens и *A. macrodactyla* [Inouye et al., 1985; Xia et al., 2002; Gurskaya et al., 2003], обелина из *Obelia longissima* и *O. geniculata* [Илларионов и др., 1992; Markova et al., 2002], митрокомина из *Mitrocoma cellularia* [Fagan et al., 1993; Burakova et al., 2016] и клитина из *Clytia gregaria* и *C. hemisphaerica* [Inouye et al., 1992; Markova et al., 2010; Fourrage et al., 2014] клонированы кДНК генов, кодирующих эти белки. Для акворина [Head et al., 2000], обелина [Liu et al., 2000], клитина [Titushin et al., 2010] и митрокомина [Burakova et al., 2016], а также ряда лиганд-зависимых конформационных состояний обелина и его мутантов [Liu et al., 2000; Liu et al., 2003; Vysotski et al., 2003; Deng et al., 2005; Liu et al., 2006; Natashin et al., 2014A, B] определены кристаллические пространственные структуры. Это позволило не только точно установить аминокислотные остатки, участвующие в формировании активного центра фотопротеинов, но и сделать предположение о функциональной роли отдельных аминокислот в каталитическом окислении субстрата и формировании эмиттера [Vysotski, Lee, 2007].

Интерес исследователей к Ca^{2+}-регулируемым фотопротеинам обусловлен не только стремлением понять механизм функционирования этих уникальных белков. Одним из главных факторов является их аналитический потенциал. В настоящее время фотопротеины широко используются в качестве индикаторов кальция, позволяющих отслеживать динамику этого универсального внутриклеточного мессенджера как в цитоплазме клеток, так и в отдельных органеллах клетки. Кроме того, фотопротеины хорошо себя проявили в качестве меток в различных методах диагностики *in vitro* таких, как, например, иммуноанализ. Использование фотопротеина в качестве репортера обеспечивает чувствительность на уровне радиоизотопной метки.

Биолюминесценция ктенофор также обусловлена Ca^{2+}-регулируемыми фотопротеинами [Ward, Seliger, 1974A, B]. Несмотря на то, что фотопротеины ктенофор и гидромедуз функционально схожи и в качестве субстрата биолюминесцентной реакции тоже используют целентеразин, они значительно отличаются рядом свойств. Максимум спектра поглощения фотопротеинов ктенофор находится при 437 нм [Ward, Seliger, 1974A, B], тогда как для фотопротеинов гидромедуз – при 460 нм [Shimomura, 2006]. Это указывает на то,

что аминокислотное окружение связанного 2-гидропероксицелентеразина в активном центре фотопротеинов ктенофор и гидромедуз отличается. Следовательно, могут различаться и аминокислотные остатки, вовлеченные в стабилизацию пероксипроизводного целентеразина, его каталитическое окисление и формирование эмиттера. Кроме того, в отличие от Ca^{2+}-регулируемых фотопротеинов гидромедуз, фотопротеины ктенофор подвержены фотоинактивации – при облучении светом видимого диапазона активный фотопротеиновый комплекс теряет способность к биолюминесценции в ответ на добавление ионов кальция [Ward, Seliger, 1976]. Таким образом, светочувствительные биолюминесцентные белки ктенофор представляют собой тип фотопротеинов, структурная организация и механизмы биолюминесценции и фотоинактивации которых остаются малозученными.

Целью работы являлось определение основных физико-химических свойств светочувствительного Ca^{2+}-регулируемого фотопротеина беровина ктенофор *Beroe abyssicola* и функциональной роли отдельных аминокислотных остатков его активного центра в биолюминесценции.

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

1. Клонировать кДНК генов, кодирующих фотопротеин беровин, используя функциональный скрининг.
2. Разработать метод получения рекомбинантного беровина и исследовать его основные физико-химические и биолюминесцентные свойства.
3. Сконструировать мутанты беровина с заменой отдельных аминокислотных остатков, расположенных в активном центре фотопротеина, и исследовать их свойства.

Научная новизна

Все результаты, представленные в данной работе, получены впервые и имеют фундаментальный характер, так как направлены на изучение малоисследованных светочувствительных Ca^{2+}-регулируемых фотопротеинов ктенофор. Несмотря на то, что в последнее время интерес к их изучению возрос [Aghamaali et al., 2011; Jafarian et al., 2011; Schnitzler et al., 2012; Mahdavi et al., 2013; Powers et al., 2013; Pashandi et al., 2016], остаются неизученными вопросы,

касающиеся функции аминокислот, формирующих субстрат-связывающую полость фотопротеина, формы связанного в ней субстрата и механизма фотоинактивации.

Теоретическая и практическая значимость

В дальнейшем полученные результаты найдут свое применение не только в фундаментальных, но и в прикладных исследованиях. Например, Ca^{2+}-регулируемые фотопротеины ктенофор могут быть использованы в качестве биолюминесцентных репортерных белков для мониторинга динамики кальция *in vivo* в различных типах клеток. Причем может использоваться уникальное свойство этих фотопротеинов – инактивация под действием света видимого диапазона, что позволит избирательно инактивировать индикатор в какой-либо группе клеток. Это может найти широкое применение при разработке новых биолюминесцентных технологий для клеточной биологии и экспериментальной медицины.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Светочувствительный фотопротеин беровин является новым типом Ca^{2+}-регулируемых фотопротеинов.
2. Конвертация *in vitro* рекомбинантного апо-беровина в активный фотопротеин при инкубации с целентеразином наиболее эффективно происходит в щелочных условиях и при высокой ионной силе.
3. Аминокислотные остатки Arg41, Lys90, Trp103, Asn107, Ser130, Tyr133, Met153, Met154, Trp192 и Tyr204 участвуют в формировании целентеразин-связывающей полости беровина.

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.

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, а также использованием при проведении научной работы современных методов исследования и статистического анализа.

Апробация работы

Основные материалы диссертации доложены на Международных симпозиумах по Биолюминесценции и Хемилюминесценции (Иокогама, Япония, 2004; Сан-Диего, США, 2006; Шанхай, КНР, 2008); на Международном фотобиологическом конгрессе (Кордова, Аргентина, 2014); VII съезде Российского фотобиологического общества (Шепси, Россия, 2014); на семинарах лаборатории фотобиологии Института биофизики СО РАН.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ, из них: 3 статьи в зарубежных журналах, 1 патент и 5 публикаций в сборниках докладов научных конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 142 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (объекты и методы исследования, результаты исследований и их обсуждение), заключения, выводов, списка принятых сокращений, списка литературы и приложения. Работа иллюстрирована 7 таблицами и 33 рисунками. Список литературы включает 210 источников, из них 197 иностранных. Работа выполнена при финансовой поддержке Программы РАН «Молекулярная и клеточная биология», грантов РФФИ №09-04-00172-а и №12-04-91153 ГФЕН_а, Программы Правительства РФ по привлечению ведущих ученых в образовательные учреждения №11.G34.31.0058 и ведущей научной школы НШ №3951.2012.4.

ГЛАВА 1 Разнообразие целентеразин-зависимых фотопротеинов и их свойства

1.1 Целентеразин-зависимые фотопротеины и их свойства

Биолюминесценция весьма широко распространена в природе [Hastings, 1983; Shimomura, 2006; Haddock et al., 2010]. Светящиеся организмы встречаются среди бактерий [Lee, Murphy, 1975], грибов [Airth, Foerster, 1960], простейших [Shimomura, 1985], кишечнополостных [Cormier et al., 1973; Cormier et al., 1974; Morin, 1974], червей [Petushkov et al., 2002], моллюсков [Tsuji, Leisman, 1981; Young, Bennett, 1988], насекомых [McElroy et al., 1969; Wood et al., 1989], ракообразных [Herring, 1985; Takenaka et al., 2012] и рыб [Herring, 1982, 1987]. Наибольшее распространение биолюминесценция получила среди морских организмов [Herring, 1990; Гительзон и др., 1992; Haddock, 2004; Haddock et al., 2010; Widder, 2010].

Биолюминесцентная реакция представляет собой окисление субстрата (люциферина) ферментом (люциферазой), где обычно в качестве окисляющего агента выступает кислород [Prendergast, 2000]. Биолюминесценция является разновидностью хемилюминесценции, катализируемой ферментами, с высоким энергетическим выходом реакции, в которой химическая энергия превращается в световую [Wilson, 1995; Wilson, Hastings, 1998]. Таким образом, в реакции субстанции A с субстанцией B один из реакционных продуктов переходит в электронно-возбужденное состояние (D*), а затем испускает фотоны ($h\nu$):

$$A + B \rightarrow C + D^*$$

$$D^* \rightarrow D + h\nu$$

Следует отметить высокое химическое разнообразие фотогенных субстратов, участвующих в этом процессе [Haddock et al., 2010; Kaskova et al., 2016]. Встречаемость одних и тех же химических соединений у филогенетически далеких организмов во многих случаях является результатом передачи люциферина по пищевым цепям [Cormier et al., 1967; Thompson et al., 1997; Haddock et al., 2001]. Наиболее распространенным люминесцентным субстратом

среди светящихся морских организмов является целентеразин [Shimomura, 1980]. Его используют рыбы, простейшие, кишечнополостные, моллюски и иглокожие [Campbell, Herring, 1990; Haddock, Case, 1999; Rees et al., 1990, 1992; Kaskova et al., 2016].

Молекула целентеразина представляет собой имидазолпиразинон [Hori et al., 1977] (рис. 1.1А). Он хорошо кристаллизуется из метанола в виде

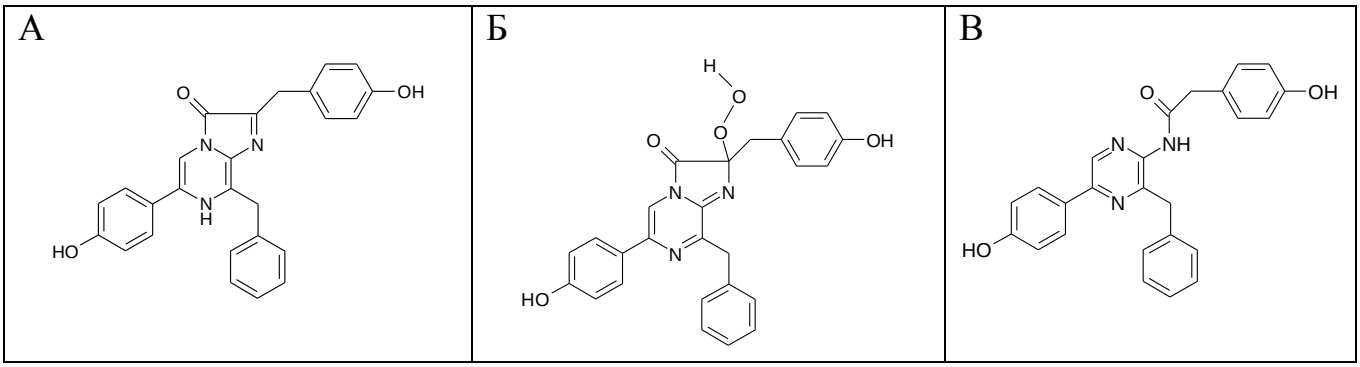


Рисунок 1.1 – Химическая структура целентеразина (А),
2-гидропероксицелентеразина (Б) и целентерамида (В).

желто-оранжевых кристаллов, температура плавления 175-178°С, его поглощение наблюдается в ультрафиолетовой и видимой областях спектра с максимумом при 435 нм [Shimomura, 2006]. В нейтральных водных буферных растворах целентеразин растворяется очень плохо, при этом его растворы крайне нестабильны в аэробных условиях. В щелочных условиях его растворимость выше, однако выше и скорость автоокисления. Растворенный в метаноле целентеразин более стабилен при низких температурах, особенно при добавлении следовых количеств HCl. Для защиты такого нестабильного соединения, как целентеразин, во многих биолюминесцентных системах используются различные производные субстрата. Так, люцифераза *Watasenia* работает с целентеразин-дисульфатом, при этом требуя присутствия АТФ и Mg^{2+} [Tsuji, 1985, 2005], а в фотопротеине симплектине работает дегидроцелентеразин [Takahashi, Isobe, 1994]. Активная форма целентеразина также может быть связана с помощью CBP (целентеразин-связывающего белка) [Charbonneau, Cormier, 1979; Inouye, Sahara, 2007; Titushin et al., 2008]. В этом случае Ca^{2+} является пусковым

механизмом для высвобождения люциферина, после чего он становится доступным для люцифераз [Hastings, Morin, 1969]. При этом оба белка находятся в непосредственной близости друг от друга, что способствует быстрой передаче субстрата практически без контакта с окружающей средой [Titushin et al., 2011].

Продуктом окисления целентеразина является целентерамид (рис. 1.1B), который растворим в метаноле, бутаноле, этилацетате и эфире и обладает яркой голубой флуоресценцией в этих растворах, при этом в водных растворах интенсивность флуоресценции значительно ниже. Максимум абсорбции целентерамида в метаноле находится в области 332 нм [Shimomura, 2006]. Амидная группа целентерамида имеет очень слабые кислотные свойства, поэтому она быстро протонируется в нейтральных условиях, переходя в нейтральную (неионизированную) форму. Кроме амид-аниона (максимум флуоресценции 386-423 нм) и нейтральной формы (максимум флуоресценции 435-458 нм) целентерамид может находиться в трех других состояниях: в виде фенолят-аниона, пиразин-N(4)-аниона и в ион-парном состоянии [Shimomura, Teranishi, 2000]. В присутствии щелочи он находится в ионизированном состоянии в виде фенолят-аниона (максимум флуоресценции 480-490 нм), пиразин-N(4)-аниона (максимум флуоресценции около 530-565 нм) или ион-парного состояния (максимум флуоресценции около 465-479 нм).

Фотопротеины представляют собой «предварительно заряженные» фермент-субстратные комплексы, находящиеся в неактивном состоянии [Shimomura, Shimomura, 1985]. Термин «фотопротеины» был предложен для обозначения данной группы биолюминесцентных белков [Shimomura, Johnson, 1966]. К ним относятся такие белки, как: акворин [Shimomura et al., 1962; Shimomura, Johnson, 1969], обелин [Campbell, 1974; Высоцкий и др., 1989], митрокомин [Shimomura, 1963] и клитин [Levine, Ward, 1982; Inouye, Sahara, 2007] из гидромедуз *Aquorea*, *Obelia*, *Halistaura* (*Mitrocoma*) и *Clytia* (*Phialidium*), соответственно; мнемиопсин [Ward, Seliger, 1974A, B; Aghamaali et al., 2011], батоцировин [Powers et al., 2013], беровин [Ward, Seliger, 1974A, B; Golz et al., 2005A; Markova et al., 2012] и болинопсин [Golz et al., 2005B] из ктенофор

Mnemiopsis, *Bathocyroe*, *Beroe* и *Bolinopsis*, соответственно; фолазин и симплектин из двустворчатого моллюска *Pholas* [Henry et al., 1975] и кальмара *Symplectoteuthis* [Takahashi, Isobe, 1993], соответственно. Наиболее изученными представителями группы являются фотопротеины гидромедуз, а наименее изученными остаются фотопротеины ктенофор и моллюсков. Фотопротеины гидромедуз и ктенофор относятся к Ca^{2+}-регулируемым. Они принадлежат к белкам EF-hand семейства и проявляют структурную гомологию с другими Ca^{2+}-связывающими белками в области Ca^{2+}-связывающих сайтов [Chalfie, Kain, 1997]. Фермент-субстратный комплекс Ca^{2+}-регулируемых фотопротеинов состоит из односубъединичного полипептида и «преактивированного» кислородом субстрата, 2-гидропероксицелентеразина (рис. 1.1Б), прочно, но нековалентно связанного с белком. Поэтому биолюминесценция фотопротеинов не зависит от кислорода, что является одним из основных отличий фотопротеиновой биолюминесцентной реакции от люциферазной [Высоцкий и др., 2006]. Биолюминесценция инициируется ионами кальция и возникает вследствие окислительного декарбоксилирования связанного с белком субстрата. Неотъемлемым промежуточным продуктом является циклический пероксид диоксиэтанон, который разрушается с образованием возбужденного эмиттера и молекулы CO_2. Возвращение эмиттера в исходное состояние сопровождается выделением энергии в виде кванта света [Ohmiya, Hirano, 1996].

К настоящему времени клонированы фотопротеины: гидромедуз – акворин из *Aequorea victoria* [Inouye et al., 1985; Prasher et al., 1985], клитин из *Clytia gregaria* [Inouye, Tsuji, 1992], митрокомин из *Mitrocoma cellularia* [Fagan et al., 1993], обелин из *Obelia longissima* [Илларионов и др., 1992; Illarionov et al., 2000] и *Obelia geniculata* [Markova et al., 2002]; гребневиков – мнемиопсин из *Mnemiopsis leidyi* [Aghamaali et al., 2011], батоцировин из *Bathocyroe fosteri* [Powers et al., 2013]; моллюсков – фолазин из *Pholas dactylus* [Dunstan et al., 2000] и симплектин из *Symplectoteuthis oualaniensis* [Isobe, Minoru, 2004]. Гены мнемиопсина и батоцировина были получены ПЦР-клонированием с использованием последовательностей уже полученных к тому времени генов

беровина [Golz et al., 2005A] и болинопсинов [Golz et al., 2005B; Golz et al., 2006]. Размер полипептидной цепи фотопротеинов гидромедуз составляет 195-198 аминокислотных остатков, гребневиков – 206-208, моллюсков – 225-501. Самый маленький молекулярный вес имеет обелин (22,3 кДа), самый большой – симплектин (60 кДа). Апобелки могут образовывать фотопротеиновый комплекс при инкубации с субстратом в присутствии кислорода *in vitro* [Shimomura, 1975].

Фотопротеин симплектин из кальмара *Symlectoteuthis ouralaniensis* представляет собой внутриклеточный ион-зависимый белок, содержащий 501 аминокислотный остаток и имеющий молекулярный вес 60 кДа. Его простетической группой является дегидроцелентеразин, ковалентно связанный с 11-м цистеиновым остатком (Cys390) тиоэфирной связью. Следовые количества моновалентных ионов, таких как K^+ или Na^+, запускают внутримолекулярное окисление хромофора с излучением света. Люминесценция природных симплектинов из *S. luminosa* и *S. ouralaniensis* также активируется активными формами кислорода. Симплектин нерастворим в воде, только в буфере с pH 5-9 (с оптимумом около 7,8), содержащем 0,6 M KCl. Его последовательность не имеет гомологии с другими целентеразин-связывающими белками, но содержит домен, гомологичный домену C-N гидролаз млекопитающих [Takahashi, Isobe, 1993].

Белок фолазин из моллюска *Pholas dactylus* представляет собой секретируемый гликопротеин из 225 аминокислотных остатков, включая сигнальный пептид из 20 остатков. В природе фолазин секретируется в сифон моллюска в виде гранул с кислой средой. Его простетической группой также является дегидроцелентеразин. Последовательность фолазина содержит 3 потенциальных N-сайта гликозилирования и один O-сайт. Из 7 цистеиновых остатков фолазина один используется для формирования ковалентной связи с дегидроцелентеразином. Эмиссия света в фотопротеине запускается активными формами кислорода [Dunstan et al., 2000]. Этот белок также имеет очень низкую гомологию (< 5%) с другими известными фотопротеинами.

Во многих светящихся организмах обнаруживается несколько изоформ биолюминесцентных белков. Так, для люциферазы из *Metridia longa* их найдено 3

[Markova et al., 2004; Takenaka et al., 2008; Borisova et al., 2008, 2012]. У фотопротеинов изоформы обнаружены для акворина [Shimomura, 1986; Prasher et al., 1987], обелина [Высоцкий и др., 1991], клитина [Markova et al., 2010], митрокомина [Burakova et al., 2016] и мнемиопсина [Ward, Seliger, 1974A; Aghamaali et al., 2011; Schnitzler et al., 2012]. Изоформы могут несколько различаться по размеру, активности, термостабильности, спектральным свойствам [Tsuji et al., 1995]. Биологический смысл присутствия нескольких вариантов белков со сходной функцией в одном организме пока остается непонятным. Предполагается, что источником изоформ также могут быть транскрипционные мутации [Burakova et al., 2016].

Первыми были охарактеризованы фотопротеины гидромедуз, поэтому такие их представители, как акворин и обелин являются наиболее изученными и используемыми. Их структуры и функции будут рассмотрены более подоробно в следующих разделах.

1.2 Пространственная структура Ca^{2+}-регулируемых фотопротеинов

В течение последних 20 лет были определены пространственные труктуры акворина [Head et al., 2000], обелина [Liu et al., 2000; Liu et al., 2003], клитина [Titushin et al., 2010] и митрокомина [Burakova et al., 2016] , в том числе и в их лиганд-зависимой конформации [Deng et al., 2004; Deng et al., 2005; Liu et al., 2006], структура апо-беровина с ионами кальция [Stepanyuk et al., 2013] и структура Ca^{2+}-регулируемого целентеразин-связывающего белка (CBP) из светящегося мягкого коралла *Renilla muelleri* [Titushin et al., 2008; Stepanyuk et al., 2008]. Третичная структура фотопротеинов формируется двумя наборами из четырех α-спиралей в N- и C-концевом доменах [Strynadka et al., 1989; Head et al., 2000; Liu et al., 2000]. Все исследованные к настоящему времени Ca^{2+}-регулируемые фотопротеины демонстрируют высокую степень гомологии пространственных структур, поэтому детали можно рассмотреть на примере отдельных их представителей.

По данным рентгеноструктурного анализа, молекула обелина представляет

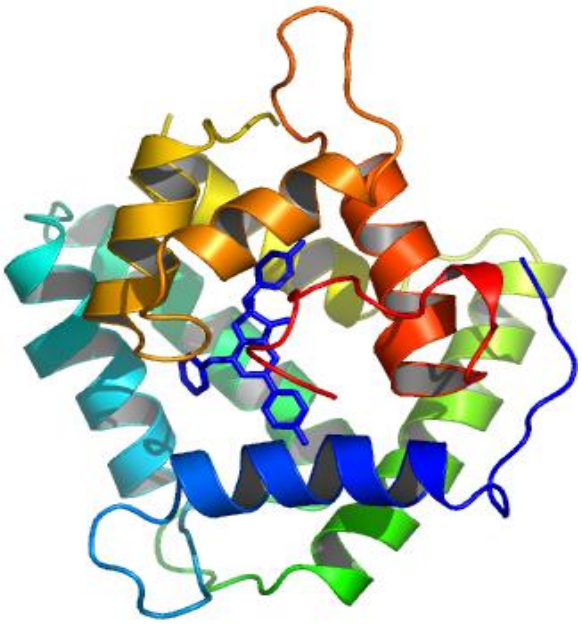


Рисунок 1.2 – Пространственная структура Ca^{2+}-регулируемого фотопротеина обелина из *Obelia longissima* (PDB код 1EL4). Целентеразин внутри белка обозначен синим цветом. [Liu et al., 2000].

собой компактную глобулу с радиусом около 25 Å, состоящую из двух доменов (рис. 1.2). Каждый домен содержит два EF-hand мотива и может быть представлен в форме «чашек» с внутренней полостью, сформированной боковыми цепями гидрофобных аминокислот. Эти «чашки», соединяясь краями, формируют внутри защищенную от растворителя гидрофобную полость, в которой находится 2-гидропероскицелентеразин. Вероятно, защищенность субстрата от растворителя обеспечивает необходимое окружение для эффективного образования продукта в возбужденном состоянии с последующим его переходом в основное состояние, сопровождающимся высвобождением энергии в виде кванта света.

Боковые цепи гидрофобных остатков, формирующие целентеразин-связывающую полость, локализованы во всех восьми α-спиралях [Liu et al., 2000]. Имеются только четыре гидрофильных остатка (His22, Tyr138, His175 и Tyr190), боковые цепи которых направлены внутрь полости. Практически все аминокислоты, формирующие внутреннюю субстрат-связывающую полость, являются консервативными [Vysotski, Lee, 2004]. Два остатка гистидина и один остаток триптофана находятся вблизи молекулы 2-гидропероксицелентеразина в

активных центрах как акворина, так и обелина. Например, в обелине His175 формирует водородную связь с OH-группой Tyr190 и карбонильной группой 2-гидропероксицелентеразина, а His22 и Trp92 образуют водородные связи с гидроксилом 6-(*n*-гидрокси)-фенильной группы. Водородные связи с атомами 2-гидропероксицелентеразина образуют Tyr138 и Tyr190: остаток Tyr138 образует водородную связь с N1-атомом, а Tyr190 – с C2-гидропероксигруппой. Предполагается, что водородная связь, формируемая Tyr190, стабилизирует 2-гидропероксицелентеразин в активном центре фотопротеинов [Vysotski, Lee, 2004, 2007].

Все фотопротеины гидромедуз содержат по шесть остатков триптофана. Четыре из них (Trp92, Trp114, Trp135 и Trp179 в обелине) расположены в целентеразин-связывающей полости, а Trp18 и Trp103 находятся за ее пределами, в первой и четвертой α-спиралях, соответственно. Боковые цепи остатков Trp92 и Trp179 располагаются по обе стороны от 6-(*n*-гидрокси)-фенильного кольца целентеразина; боковые цепи Trp114 и Trp135 локализованы вблизи 2-(*n*-гидрокси)-бензильной группы целентеразина. Кроме того, атомы азота индольных колец Trp92 и Trp179 образуют водородные связи с атомами кислорода 6-(*n*-гидрокси)-фенильной группы и C3-карбонилом целентеразина [Vysotski, Lee, 2004, 2007]. Пять остатков триптофана занимают одинаковое положение и в акворине, и в обелине, а Trp103 обелина и Trp78 акворина расположены на противоположных концах четвертой α-спирали. Пространственные структуры различных лиганд-зависимых конформационных состояний обелина показывают, что эти два остатка триптофана, в отличие от остальных, могут быть доступны растворителю [Liu et al., 2003; Deng et al., 2004; Deng et al., 2005; Liu et al., 2006].

Все фотопротеины гидромедуз, за исключением митрокомина, содержат на C-конце остаток пролина, который играет важную роль в стабилизации фотопротеинового комплекса [Nomura et al., 1991; Watkins et al., 1993; Eremeeva et al., 2014]. У митрокомина после остатка пролина находится тирозин, роль которого, однако, не совсем понятна, поскольку укороченный мутантный белок без тирозина имеет более высокую удельную активность, чем дикий вариант

[Burakova et al., 2016]. Во всех фотопротеинах гидромедуз присутствуют цистеиновые аминокислотные остатки: 3 – у акворина и клитина, 5 – у обелина и 6 – у митрокомина. С помощью сайт-направленного мутагенеза на акворине было показано, что остатки цистеина играют важную роль в стабилизации молекулы, но не участвуют в биолюминесценции [Tsuji et al., 1986; Kurose et al., 1989]. Консервативными во всех белках являются области с 7 по 24 и с 158 по 174 аминокислотных остатков [Fagan et al., 1993].

Сравнительный анализ структуры Ca^{2+}-связывающих участков в нагруженных кальцием апобелках и Ca^{2+}-разряженных фотопротеинах показал, что для эффективного окисления субстрата необходимо присутствие ионов кальция во всех трех Ca^{2+}-связывающих участках [Deng et al., 2005]. Несмотря на высокий уровень аминокислотной и структурной гомологии кальций-связывающих участков фотопротеинов, имеют место небольшие вариации, обеспечивающие различное сродство к Ca^{2+} [Nelson, Chazin, 1998]. Так, например, присутствие ионов магния в физиологических концентрациях влияет на чувствительность акворина к кальцию [Ohashi et al., 2005], чего не наблюдается для других фотопротеинов гидромедуз. Уровень чувствительности фотопротеинов к ионам кальция является важной характеристикой белка, особенно при его применении его в качестве индикатора кальция в биологических системах [Allen et al., 1977; Malikova et al., 2014].

1.3 Механизм биолюминесценции Ca^{2+}-регулируемых фотопротеинов гидромедуз

Фотопротеиновая реакция представляет собой окислительное декарбоксилирование перекисно-замещенного целентеразина с выделением углекислого газа и образованием связанного с белком продукта целентерамида в возбужденном состоянии [Shimomura, Johnson, 1972; Cormier et al., 1973]. Переход продукта в основное состояние сопровождается излучением света с максимумом в диапазоне 460-490 нм, в зависимости от типа фотопротеина [Vysotski, Lee, 2004].

В фотопротеинах остатки His и Tyr являются парными и тесно связаны с остатками Trp, образуя три триады Tyr-His-Trp. Важность каждой для биолюминесценции фотопротеинов гидромедуз была продемонстрирована методом сайт-направленного мутагенеза. Замена остатков, расположенных вблизи ОН-группы 6-(*p*-гидрокси)-фенила, влияет на спектр биолюминесценции и, следовательно, на формирование возбужденного состояния реакционного продукта, но практически не влияет на биолюминесцентную активность [Ohmiya et al., 1992; Vysotski et al., 2003; Malikova et al., 2003; Stepanyuk et al., 2005; Frank et al., 2008; Natashin et al., 2014 B]. Замены Trp173, His169 и Tyr184 в акворине, Trp179, His175 и Tyr190 в обелине ведут к существенному изменению Ca^{2+}-индуцированной биолюминесцентной активности этих фотопротеинов. На основе анализа пространственных структур фотопротеинов и изучения свойств мутантов было выдвинуто предположение, что Tyr-His-Trp участвует в стабилизации 2-гидропероксигруппы связанного целентеразина, инициируя реакцию биолюминесценции и образование активного фотопротеина из апобелка, целентеразина и O_2 [Head et al., 2000; Liu et al., 2006; Eremeeva et al., 2013]. Функциональная роль триады Tyr-His-Trp, расположенной вблизи атома N1 2-гидропероксицелентеразина, менее ясна. Тем не менее, было выдвинуто предположение, что эти остатки могут участвовать в реакции декарбоксилирования 2-гидропероксицелентеразина путем протонирования диоксиэтанон-аниона, обеспечивая перенос протона от растворителя [Liu et al., 2006; Eremeeva et al., 2013; Natashin et al., 2014 A].

На рисунке 1.3 показан механизм формирования эмиттера биолюминесценции в молекуле обелина. Связывание ионов кальция приводит к некоторому смещению α-спирали H и изменению положения His175, что уменьшает расстояние между His175 и Tyr190. В результате частичного протонирования His175 возникает пероксианион, который атакует C3-позицию в молекуле 2-гидропероксицелентеразина и ведет к образованию диоксиэтанового интермедиата, который, в свою очередь, распадается с образованием CO_2 и целентерамид-аниона в возбужденном состоянии [Высоцкий

и др., 2006; Vysotski et al., 2006]. При этом исследования с аналогами целентерамида показали, что наиболее вероятными кандидатами на роль эмиттера являются или фенолят-анион целентерамида, или его ион-парное состояние [Mori et al., 2006], т.е. формирование эмиттера в фотопротеинах проходит через образование нескольких короткоживущих интермедиатов, сопровождающееся переносом протонов [Shimomura, Johnson, 1972; Shimomura, Teranishi, 2000]. В формирование эмиттера фотопротеинов гидромедуз вовлечены также остатки триптофанов, которые образуют сэдвич-структуру с молекулой целентеразина [Ohmiya et al., 1992; Vysotski, Lee, 2004]. К ним относятся Trp92, Trp114, Trp135 и Trp179 в молекуле обелина. Замена W86A в акворине [Ohmiya et al., 1992] и W92F в обелине [Deng et al., 2001] ведет к увеличению доли излучения при 400 нм, что соответствует нейтральной форме целентерамида, имеющей более высокое энергетическое состояние. Было сделано предположение, что именно эта форма возбужденного состояния является первичной [Visotski et al., 2006]. Изучение свойств ряда мутантов обелина по этому положению привело к выводу о том, что при запуске биолюминесцентной реакции происходит перенос протонов с 6-(*p*-гидрокси)-фенильной группы целентеразина на His22, а аминокислотный остаток в положении 92 участвует в стабилизации этого состояния [Malikova et al., 2003]. Данная работа позволила получить мутант обелина W92R с максимумом эмиссии в фиолетовой области спектра. Ключевые аминокислотные остатки, участвующие в формировании эмиттера, во всех фотопротеинах гидромедуз являются консервативными. Попытки их замены на другие аминокислотные остатки обычно приводят к потере биолюминесцентной активности [Ohmiya, Tsuji, 1993; Dikici et al., 2009]. Особенно это касается остатков, относящихся к так называемой каталитической триаде (His175, Trp179 и Tyr190 в обелине и His169, Trp173 и Tyr184 в акворине) [Eremeeva et al., 2013].

Апобелки фотопротеинов не обладают поглощением в видимой области спектра и не флуоресцируют. Фотопротеиновый комплекс поглощает в видимой области спектра. Спектр поглощения отражает состояние молекулы

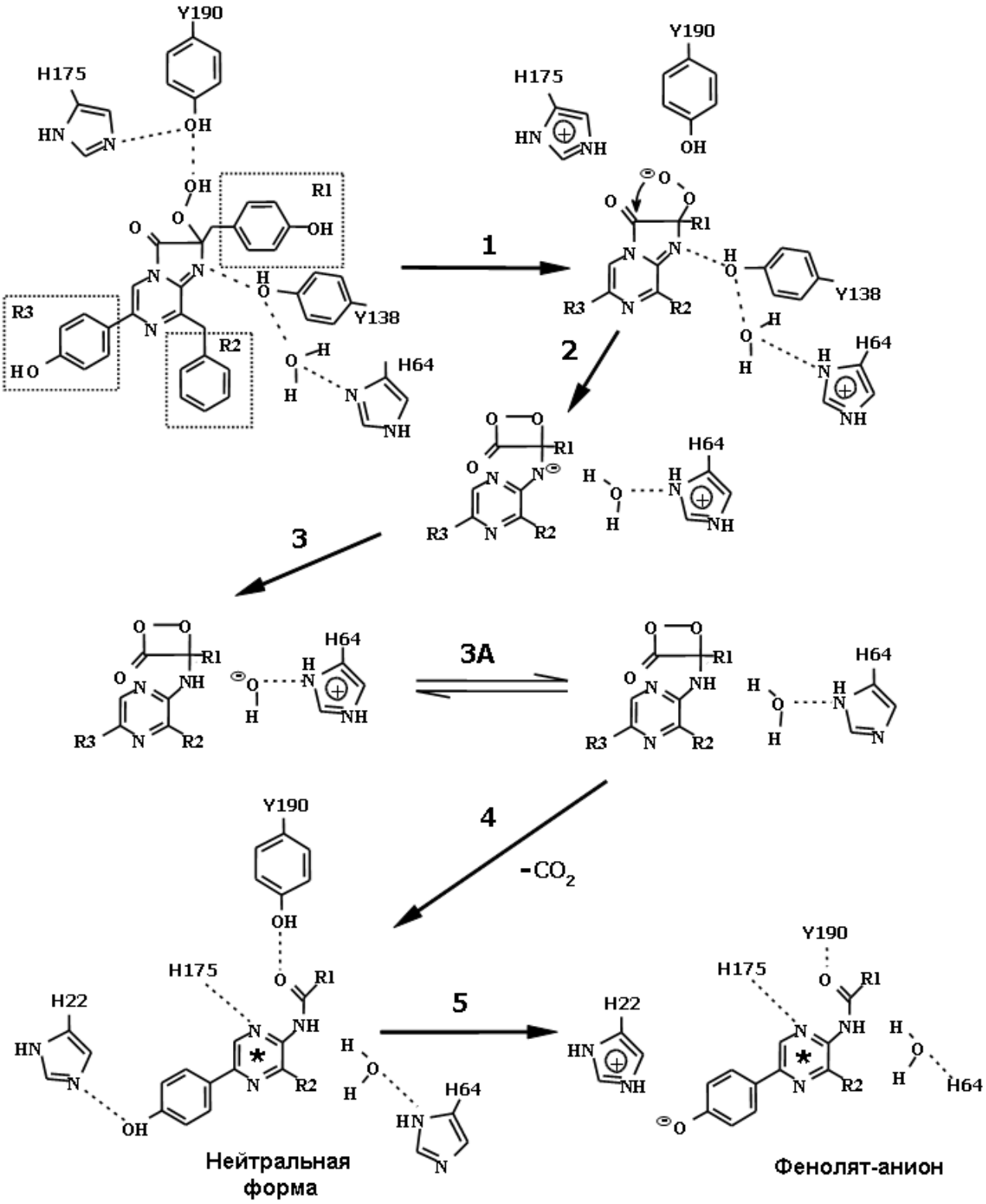


Рисунок 1.3 – Механизм биолюминесцентной реакции Ca^{2+}-регулируемых фотопротеинов [Vysotski and Lee, 2007].

целентеразина в белке, а эмиссионные спектры – состояние эмиттера в данных условиях в данный момент времени. Все известные фотопротеины гидромедуз имеют широкий спектр поглощения с максимумом при 460 нм, характерным для 2-гидропероксицелентеразина, связанного с белком [Markova et al., 2002].

Спектр биолюминесценции обелина бимодальный, с максимумом излучения при 485 нм и небольшим плечом при 400 нм [Markova et al., 2002], которое соответствует излучению целентерамида в нейтральной форме [Shimomura, Teranishi, 2000]. В мутантах обелина (W92F) [Deng et al., 2001] и акворина (W86F) [Ohmiya et al., 1992] коротковолновая составляющая значительно усиливается, что свидетельствует о том, что бóльшая часть молекул целентерамида находится в нейтральной форме. За счет образования водородной связи с 6-(*p*-гирокси)-фенилом целентеразина Trp92 в обелине и Trp86 в акворине стабилизируют фенолят-анион, причем в акворине в этом процессе также участвует Tyr82, который отсутствует у обелина, образуя дополнительную водородную связь. Поэтому у акворина эффект замены триптофана не так выражен, как у обелина [Vysotski et al., 2003]. Мутация F88Y в обелине приводит к тому, что спектры его биолюминесценции и флуоресценции становятся такими же, как у акворина дикого типа [Stepanyuk et al., 2005]. И наоборот, замена Y82F в акворине приводит к появлению плеча в длинноволновой области, как у обелина, а спектр флуоресценции Ca^{2+}-разряженного белка сдвигается в длинноволновую область.

Спектры флуоресценции Ca^{2+}-разряженных акворина и клитина совпадают со спектрами их биолюминесценции и не зависят от pH. Это свидетельствует о том, что, во-первых, как до, так и после реакции гидрофобная полость остается недоступной для растворителя, а во-вторых, после реакции сохраняется ион-парное состояние молекулы целентерамида. У Ca^{2+}-разряженного обелина наблюдается сдвиг максимума флуоресценции в длинноволновую область спектра, что указывает на появление целентерамида в форме фенолят-аниона [Deng et al., 2004].

1.4 Биолюминесценция ктенофор

Ктенофоры (гребневики) представляют собой отдельный тип беспозвоночных, которые обнаружены фактически во всех морях и океанах от поверхности до глубин и от тропиков до полярных вод. Большинство видов свободно плавают, и только представители одного из порядков (*Platictenida*) медленно передвигаются по субстрату. Количество описанных видов гребневиков колеблется между 100 и 150 [Mills, 2001]. Гребневики являются непростыми объектами для изучения, поскольку они очень хрупкие, их трудно собирать и идентифицировать, они не сохраняются в искусственных условиях, а многие виды обитают в труднодоступных местах. Но некоторые виды достигают высокой плотности в прибрежной зоне.

Хотя гребневики морфологически довольно разнообразны, они имеют набор характерных признаков, к которым относятся: бирадиальная симметрия, восемь рядов гребных пластинок, контролируемых апикальным органом, два сократимых щупальца, специальные адгезивные клетки и характерные стадии развития [Серавин, 1998].

Согласно классификации по морфологическому принципу [Harbison, 1985], класс *Ctenophora* включает 7 порядков: *Beroida*, *Cydippida*, *Cestida*, *Thalassocalicida*, *Lobata*, *Ganeshida* и *Platyctenida*. В 2001 г. было предпринято филогенетическое исследование с определением последовательности 18S рибосомальной РНК (рРНК) 26 видов гребневиков [Podar et al., 2001]. В результате были получены данные, несколько расходящиеся с морфологической классификацией. Во-первых, порядок *Beroida* показал прямое родство по отношению к семейству *Haeckeliidae* (порядок *Cydippida*). Другое традиционно относящееся к *Cydippida* семейство *Pleurobrachiidae* показало тесное родство с группой *Beroida – Haeckeliidae*. Обнаружилось также прямое родство в кластере, включающем *Lobata*, *Cestida* и *Thalassocalycida*, а также *Beroida – Haeckeliidae* и *Pleurobrachiidae*. *Ocyropsidae* формирует отдельный клан от двух семейств *Lobata* (*Leucotheidae* и *Bolinopsidae*). Порядки *Cestida* и *Thalassocalicida* оказались близки

к *Lobata* (*Leucotheida* и *Bolinopsida*). Авторы предположили, что небольшие вариации последовательностей генов 18S рРНК, предполагающие таксономическую близость семейств класса *Ctenophora*, являются следствием относительно недавней дивергенции всего таксона от общего предка.

Практически все роды гребневиков, за исключением *Pleurobrachia,* способны к биолюминесценции [Лабас, 1980; Haddock, 2004]. Источником биолюминесценции живых представителей гребневиков являются скопления люминесцентных клеток (фотоцитов), выстилающих стенки меридиональных каналов и содержащих фотопротеины. Характерной особенностью свечения гребневиков является то, что оно угасает при внешнем освещении [Лабас, 1973; Гительзон и др., 1992]. Исследование биохимии фотопротеинов гребневиков началось в 1974 г., когда были выделены и очищены белки, относящиеся к этой группе, из *Mnemiopsis sp.* и *Beroe ovata* [Ward, Seliger, 1974A]. Названия мнемиопсин и беровин были даны этим белкам согласно принятой номенклатуре. В процессе выделения мнемиопсина и беровина на ДЭАЭ-целлюлозе в щелочных условиях были получены две изоформы: мнемиопсин-1 и мнемиопсин-2, а беровин – в единственной форме.

В своих экспериментах Вард и Селиджер установили, что при гель-фильтрации на сефадексе G-75 молекулярные веса составили 21 кДа для мнемиопсина-2, 19,5 кДа для беровина и 18,5 кДа для мнемиопсина-1 [Ward, Seliger, 1974 B]. А в результате разделения с помощью ДСН-ПААГ молекулярные веса для мнемиопсина-1 (м-1) и мнемиопсина-2 (м-2) составили 24 кДа и 27,5 кДа, соответственно, а для беровина – 25 кДа. При очистке мнемиопсина на волокнах холофайбера был получен белок с молекулярным весом 23 кДа [Girsch, Hastings, 1978]. В результате клонирования генов мнемиопсина был выведен молекулярный вес рекомбинантного мнемиопсина, который составил 24 кДа, согласно расчетным данным [Jafarian et al., 2011] и 27 кДа, согласно ДСН-ПААГ [Aghamaali et al., 2011], что в целом согласуется с данными для природного белка.

После того, как стали известны последовательности генов беровина и болинопсинов, с помощью ПЦР были клонированы два гена мнемиопсина из

каспийского гребневика *Mnemiopsis leidyi* [Aghamaali et al., 2011] и ген фотопротеина из *Bathocyroe fosteri* [Powers et al., 2013]. Кроме того, был проанализирован геном гребневика *Mnemiopsis leidyi*, в результате чего было обнаружено 10 генов фотопротеинов, кодирующих различные изоформы этого белка [Schnitzler et al., 2012]. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей всех известных фотопротеинов гребневиков приведен в Приложении А на рисунке 1.

Все фотопротеины гребневиков имеют довольно высокую гомологию аминокислотных последовательностей. Их гены кодируют белки, содержащие 206-208 аминокислотных остатков. Все они содержат три канонические EF-hand последовательности, включающие кальций-связывающие участки. Ключевые аминокислотные остатки, формирующие гидрофобную полость и участвующие в координации молекулы целентеразина, пока остаются неизвестными. Согласно Джафариану с коллегами, в мнемиопсине эту полость могут формировать Leu18, Arg21, Phe25, Ile38, Pro42, Met46, Phe68, Trp84, Asn88, Ile107, Leu110, Ser111, Tyr114, Tyr115, Leu131, Met134, Val168, Phe171, Trp175, Val140 и Tyr186 [Jafarian et al., 2011]. Однако это предположение было сделано только на основе сравнения аминокислотной последовательности мнемиопсина с таковыми акворина и обелина, с которыми фотопротеины гребневиков имеют очень низкую гомологию. Тем не менее, Мадави с коллегами для выяснения роли ряда гидрофобных аминокислотных остатков мнемиопсина провели замену одного остатка триптофана и двух остатков метионина на другие остатки, которые, согласно сравнению аминокислотных последовательностей мнемиопсина и обелина, находятся в молекулах фотопротеинов гидромедуз на этих позициях [Mahdavi et al., 2013]. В акворине и обелине эти остатки участвуют либо в координации субстрата, либо входят в каталитическую триаду, либо являются остатками «второго слоя». Все замены привели к падению биолюминесцентной активности, причем, в случае M77H – к почти полной ее потере. Был сделан вывод о стабилизирующей роли этого остатка в мнемиопсине. Также, согласно спектральным свойствам этих мутантов, авторами было сделано заключение, что

мутации W101Y, W101F и M151Y существенно не изменяют структуру белка, а падение активности свидетельствует об участии этих остатков в биолюминесценции.

Пауэрс с коллегами также теоретически предсказали аминокислотный состав гидрофобной полости фотопротеина из *Bathocyroe fosteri*, исходя из сравнительного анализа аминокислотных последовательностей его и обелина [Powers et al., 2013]. По их предположениям, вероятными кандидатами на эту роль являются Leu38, Arg41, Phe45, Ile58, Phe63, Met66, Phe88, Trp104, Asn108, Ile127, Leu130, Tyr134, Tyr135, Leu151, Met154, Val160, Phe191, Trp195 и Tyr207. В активном центре обелина в сходных позициях находятся другие аминокислотные остатки. Авторы рассчитали возможные замены в этих позициях. Наиболее частым кандидатом на замещение предлагался остаток тирозина.

В процессе исследования характеристик фотопротеинов гребневиков были определены спектры биолюминесценции для *Mnemiopsis sp.* и *Beroe ovata in vivo* и *in vitro* [Ward, Seliger., 1974B]. Максимум спектра биолюминесценции *in vivo* для *Mnemiopsis sp.* составил 488 нм, а его ширина полумаксимума (FWHM) – 90 нм. Спектр *B. ovata in vivo* получился более широким (FWHM = 102 нм) и сдвинутым в красную область спектра, с пиком ~ 494 нм. Хотя наблюдались значительные видовые различия между спектрами *in vivo*, для мнемиопсина-1, мнемиопсина-2 и беровина все спектры *in vitro* были идентичны. Общий спектр *in vitro* имел максимум при 485 нм (FWHM = 90 нм). Авторы отметили, что сдвиг в красную область *in vivo* у *Mnemiopsis* мог быть результатом абсорбции пигментами, которые сконцентрированы в ткани меридиональных каналов, но отсутствуют в очищенных образцах фотопротеина. Это также могло быть справедливым для красного сдвига в спектре *in vivo* для биолюминесценции *Beroe*.

Очищенный мнемиопсин в концентрации 0,4 мг/мл в буфере Трис-ЭДТА pH 8,0 не обнаруживает никакой флуоресценции, за исключением типичной флуоресценции Trp в белке. Никакой другой, кроме триптофановой, флуоресценции не найдено и для инактивированного светом мнемиопсина. Исследование спектров поглощения мнемиопсина-2 показало, что нативный

фотопротеин имел максимум при 277 нм и плечо при 290 нм, что типично для белков, содержащих триптофан. Широкая полоса поглощения с максимумом в области 435 нм обусловливалась хромофором, обнаруженным в фотопротеине. При добавлении кальция с последующей эмиссией света этот хромофор исчезал, и появлялась новая полоса поглощения в районе 335 нм [Ward, Seliger, 1974B].

В 1975 г. было установлено, что функциональная группа акворина AF-350 химически идентична этиолюциферину *Renilla*, а также, что спектры поглощения фотопротеинов биолюминесцентных систем целентерат очень схожи [Hori et al., 1973; Hori et al., 1975; Ward, Cormier, 1975]. Биолюминесцентные системы *Aequorea, Renilla* и *Mnemiopsis,* по данным этих авторов, имеют длинноволновые абсорбционные полосы 465, 433 и 435 нм, соответственно. В процессе биолюминесцентной реакции формируются продукты, которые поглощают в ультрафиолетовой области при 335 нм (продукт акворина), 333 нм (оксилюциферин *Renilla*) и 335 нм (продукт мнемиопсина). Также обнаружено, что спектр длин волн, при которых мнемиопсин фотоинактивируется, близок к спектру поглощения люциферина *Renilla*. Было показано, что хромофор фотопротеинов гребневиков идентичен люциферину *Renilla*, то есть является целентеразином, и что кислород в них связан не в виде гидропероксида, а, возможно, как гидропероксид аминокислоты. Люциферин, который был выделен из трех различных очищенных фотопротеинов, перекрестно реагировал с люциферазой *Renilla* со 100% квантовым выходом [Ward, Cormier, 1975].

Данные Варда и Селиджера по спектрам поглощения мнемиопсина подтверждают, что субстратом для фотопротеинов гребневиков является целентеразин, а продуктом биолюминесцентной реакции – целентерамид, однако вследствие разных абсорбционных максимумов для акворина и мнемиопсина возникает предположение, что формы связанного субстрата могут различаться. Если для фотопротеинов гидромедуз это 2-гидропероксицелентеразин, то для фотопротеинов гребневиков вопрос остается открытым. Было сделано предположение, что в них целентеразин может находиться в протонированной фоме [Hori et al., 1975].

Биолюминесцентная реакция фотопротеинов чувствительна к изменениям pH, температуры и ионной силы. Вард и Селиджер в своих исследованиях показали, что наибольшее квантовый выход у ктенофор наблюдался при pH: 8,4 для м-1, 8,3 – для м-2 и 8,0 – для беровина. Максимальная интенсивность биолюминесцентного сигнала была при pH: 9,3 для м-1, 9,1 – для м-2 и 8,5 – для беровина [Ward, Seliger, 1974B]. Позже в результате исследования свойств мнемиопсина наибольший квантовый выход был получен при pH 9,0, а максимальное значение биолюминесцентного сигнала – при pH 8,5 [Girsch, Hastings, 1978], что близко к данным Варда и Селиджера. Что касается ионной силы, то Вард и Селиджер нашли, что и квантовый выход, и максимальная интенсивность биолюминесценции как мнемиопсина, так и беровина возрастают с увеличением ионной силы раствора. Гирх и Гастингс же показали, что оптимум для максимальной интенсивности биолюминесценции мнемиопсина наблюдается при 0,2 M NaCl.

По данным Варда и Селиджера, фотопротеины гребневиков оказались более чувствительными к температуре, чем акворин. Их квантовый выход доходил до 50% от максимального при 20°C, тогда как акворина – при 34°C. Максимальный квантовый выход для всех трех фотопротеинов гребневиков был при 0°C. Для мнемиопсина-2 и беровина был характерен острый пик зависимости интенсивности биолюминесценции от температуры с максимумом при 30°C, тогда как для мнемиопсина-1 он наблюдался в области 35°C с несколько более широким распределением. Гирх и Гастингс в экспериментах с мнемиопсином показали, что скорость биолюминесцентной реакции возрастает с повышением температуры. Стабильность же мнемиопсина была обратно пропорциональна повышению температуры. Исследование термостабильности Вардом и Селиджером выявило то, что активность фотопротеинов гребневиков была стабильна в буфере с ЭДТА при температуре от 0°C до 25°C и снижалась менее чем на 5% при 40°C. Однако при повышении ионной силы термостабильность существенно уменьшалась. Инкубация при 35°C в 0,3 M NaCl в течение 30 минут вела к потере 30% первоначальной активности. Присутствие Mg^{2+}, конкурентных

ингибиторов кальциевой активации, приводило к более существенной потере термоустойчивости, чем присутствие ионов натрия при той же ионной силе.

В экспериментах Варда и Селиджера биолюминесценция *in vitro* всх трех очищенных фотопротеина различалась по кинетике. При постоянной температуре (22°C) и ионной силе (10^{-2} M $CaCl_2$ x 10^{-1} M Трис-HCl) все они имели различную скорость спада биолюминесценции. Константы спада первого порядка составили 2,4, 4,5 и 11 c^{-1} для м-1, м-2 и беровина, соответственно, и не зависели от концентрации белка. Большие различия среди данных констант спада наблюдались в широкой области температур и pH. Во всех случаях (за исключением pH 10,0) значения этих констант спада располагаются в следующем ранге: беровин > мнемиопсин-2 > мнемиопсин-1 [Ward, Seliger, 1974B].

Эксперименты Гирха и Гастингса показали, что мнемиопсин – чрезвычайно стабильный белок. Для полной потери его активности необходимо 7 молей мочевины на один моль белка. При исследовании влияния различных детергентов на активность мнемиопсина было выяснено, что только 0,02% ДСН вызывает значительную ее потерю. Такие же детергенты, как 2% дигитонин и 2% тритон X-100 практически не влияли на активность. Воздействие группоспецифичных реагентов, таких как N-этилмалемид, индолуксусная кислота, p-хлоромеркурийбензоат для сульфгидрильных групп белка и цианат и малеиновый ангидрид для аминогрупп вызывало потерю максимум 15% активности с p-хлор-меркурий-бензоатом и 5% активности с цианатом. Мнемиопсин также был устойчив к действию протеолитических ферментов – химопапаина, химотрипсина, термолизина, трипсина, бромелайна и протеазы К. Потери активности после 30-минутной инкубации в присутствии вышеуказанных ферментов составили не более 10% [Girsch, Hastings, 1978].

В экспериментах Варда и Селиджера было показано, что ионы многих двухвалентных металлов в низких концентрациях оказывают влияние на биолюминесценцию фотопротеинов гребневиков [Ward., Seliger, 1974B]. В концентрациях 10^{-5} ионы 17 двухвалентных металлов обеспечивали значительное повышение уровня свечения мнемиопсина-2. Шесть из них (лантан, меркурий,

стронций, кобальт, медь (II) и цинк) при вышеуказанных условиях давали, по крайней мере, 50% увеличения свечения от общей инициированной кальцием световой продукции. Но при высоких концентрациях ионов металлов такого эффекта не наблюдалось. Только 5 из 17 катионов (Ca^{2+}, Cd^{2+}, Cu^{2+}, Hg^{2+} и Sr^{2+}) активировали мнемиопсин-2 при концентрации 10^{-4} М. При более высокой концентрации (10^{-3} или 10^{-2} М) список активаторов уменьшился до кальция, стронция и кадмия – в порядке снижения эффективности. Эти результаты согласуются с данными Шимомуры 1962 г. по акворину [Shimomura et al., 1962]. Но никакие из протестированных катионов не обеспечивали скорость люминесцентной реакции, сравнимую с таковой при запуске реакции биолюминесценции мнемиопсина кальцием. Поэтому авторы сделали вывод, что 16 эффективных катионов активируют мнемиопсин не напрямую, а путем замещения кальция, связанного с ЭДТА. К этому же заключению пришли и Гирх с Гастингсом после экспериментов на мнемиопсине [Girsch, Hastings, 1978]. Высокие концентрации ионов этих металлов ингибировали кальциевую активацию мнемиопсина, конкурируя с кальцием за связывание с активными участками на мнемиопсине (как в случае с магнием и барием) или путем неконкурентного связывания с другими функциональными группами белка. Исходя из этих результатов, они сделали заключение, что активация мнемиопсина специфична для кальция, и что явная активация другими катионами, включая стронций, является артефактом метода исследования. В результате экспериментов с антагонистами кальция Гирх и Гастинг показали, что тербиум и верапамил незначительно снижают активность мнемиопсина, тогда как рутениум красный ингибирует 50% активности.

По аналогии с экспериментом Шимомуры в 1962 г., где он отмечал, что длинноцепочечные алифатические спирты почти на 30% увеличивают квантовый выход биолюминесценции акворина, Вард и Селиджер провели подобные исследования для фотопротеинов гребневиков [Ward, Seliger, 1974B]. Из более чем 50 спиртов и гидроксильных соединений обнаружены пять (2-метил-2-бутанол, 3-метил-2-бутанол, 1-бутен-3-ол, 2-бутен-3-ол (кротиловый спирт) и 1,3-

дихлоро-2-пропанол), увеличивающих квантовый выход мнемиопсина-2 на 25% и более. Наиболее сильными ингибиторами среди 50 спиртов являлись неразветвленные первичные спирты, имеющие 6-10 карбонильных атомов. Насыщенные растворы этих спиртов, а также цетиловый спирт (*n*-гексадеканол), снижали квантовый выход более чем на 15%. Поскольку самыми эффективными спиртами в отношении увеличения квантового выхода оказались относительно гидрофильные соединения с разветвленными углеродными цепями, то Вард и Селиджер сделали вывод, что наибольшее влияние оказывают те соединения, чья третичная химическая структура и кислородосвязывающие свойства в процессе реакции приводили бы к потере взаимодействия с активным участком белка. Такие взаимодействия могли стабилизировать электронно-возбужденное состояние, достаточное для того, чтобы вызывать небольшое увеличение квантового выхода биолюминесценции.

В одном из видов гребневиков *Haeckelia beehleri* кроме гена фотопротеина был обнаружен ген GFP [Haddock et al., 2010]. Анализ экспрессируемого белка показал, что в отличие от GFP из других видов, он является фотоактивируемым, то есть интенсивность его флуоресценции резко возрастает при облучении голубым светом. Наличие GFP – не редкость для морских биолюминесцентных систем, но для гребневиков это первая находка, что подтверждает их недостаточную изученность и открывает дальнейшие перспективы для получения новых данных с целью понимания механизмов свечения. При этом, однако, анализ генома *Mnemiopsis leiydi* не показал наличия в нем GFP-подобных генов [Schnitzler et al., 2012]. Для представителей родов *Beroe* и *Mnemiopsis* этот вопрос пока остается открытым.

Необычным свойством фотопротеинов ктенофор является их фоточувствительность. Воздействие света на ферменты может происходить как по типу инактивации, так и по типу активации. Ультрафиолетовый свет относительно редко стимулирует каталитическую активность ферментов. Такие воздействия можно разделить на обратимую активацию каталитической реакции, когда энергия используется для создания каталитически благоприятных

стерических деформаций в области активного центра, и на необратимую активацию, сопровождающуюся разрывом или образованием ковалентных связей. Чаще встречается фотоинактивация белков, особенно под воздействием ультрафиолетового излучения. В качестве причин фотоинактивации можно отметить потерю иона металла, разрыв S-S и C-S связей и, как следствие, нарушение конформации белка [Конев, Волотовский, 1979]. Инактивация ультрафиолетом известна для многих видов ферментов, в том числе для дегидрогеназ [Saha, 1997; Артюхов и др., 2001] и аминотрансфераз [Burridge, Churchich, 1970]. Одной из ведущих гипотез механизма действия света является гипотеза образования свободных радикалов в молекуле белка или окружающих ее молекулах воды [Saha et al., 1995].

Что касается биолюминесцентных белков, ингибирование светом было замечено для живых особей *Renilla*, однако в экспериментах *in vitro* не было обнаружено разницы между облученными и необлученными люциферином и люциферазой [Kreiss, Cormier, 1967]. Из этого был сделан вывод, что действие света на биолюминесценцию *Renilla* происходит на уровне фотоцитов. Затухание биолюминесценции на свету известно для динофлагеллят, что связано с наличием светопоглощающих пигментов в клетках [Sweeney et al., 1959]. Но только фотопротеины гребневиков проявляют светочувствительность как *in vivo*, так и *in vitro*.

Эксперименты с фотопротеинами гребневиков показали, что они обратимо инактивируются при облучении широким диапазоном длин волн (230-570 нм) [Harvey, 1925; Ward, Seliger, 1976]. Действие было протестировано на мнемиопсине-2. После 20 минут облучения при 253,7 нм мнемиопсин сохранял только 0,3% от его первоначальной активности. Такие образцы мнемиопсина содержали лишь 50% белка, связанного с люциферином. Заключение основывалось на получении биолюминесцентной реакции при добавлении люциферазы *Renilla* к обработанному мочевиной образцу. Результат эксперимента указывал на то, что УФ-фотоинактивация мнемиопсина не является результатом фотодеструкции связанного люциферина. Более того, фотоинактивированный

мнемиопсин не имел поглощения при 335 нм, что говорит об отсутствии связанного с белком оксилюциферина. При 435,8 нм, где поглощение люциферина максимально, а белка – незначительно, был измерен квантовый выход фотоинактивации мнемиопсина, который составил 0,2. Фотоинактивированный мнемиопсин-2 не имел поглощения в области 435 нм.

По мнению Варда и Селиджера, в случае с гребневиками поглощение в диапазоне 230-570 нм нарушает этап связывания ионов кальция с белком. Фоточувствительная мишень у мнемиопсина остается неизвестной. К этой фотохимической реакции у мнемиопсина могут быть чувствительны как ароматические аминокислотные остатки, так и связанный с белком субстрат. Авторы полагали, что фоточувствительной мишенью мнемиопсина может быть участок связывания кислорода. В подтверждение этого они обнаружили, что нативный мнемиопсин катализирует хемилюминесцентное окисление люминола (5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазинодиона) без добавления перекиси водорода. Но в тех же условиях люминол терял способность к продукции света при взаимодействии с фотоинактивированным мнемиопсином. Эксперимент с люминолом согласуется с гипотезой, что фотоинактивация мнемиопсина приводит к потере активного кислорода. В анаэробных условиях облученный образец мнемиопсина терял 91% первоначальной активности. Облученный контроль при тех же условиях, но в присутствии кислорода, терял 84% первоначальной активности. Подобные эксперименты с 10-кратной концентрацией фотопротеина дали 92 и 84% потери первоначального выхода фотонов при анаэробных и аэробных условиях, соответственно. Авторы заключили, что для фотоинактивации мнемиопсина кислород не требуется. Более того, данные показывают, что реакция ускоряется в отсутствие кислорода. Была проведена экстракция субстрата из фотоинактивированного мнемиопсина 0,01 М раствором меркаптоэтанола в 20 мМ Трис-HCl pH 8,0 с 8 М мочевиной. Экстракт реагировал с люциферазой *Renilla*, из чего был сделан вывод, что фотоинактивация не затрагивает субстрат мнемиопсина. Однако в 1984 г. этот эксперимент повторить не удалось [Anctil, Shimomura, 1984]. Экстракт из

фотоинактивированного мнемиопсина не реагировал с люциферазой *Oplophorus*. Также было выяснено, что фотоинактивированный мнемиопсин не восстанавливает свою активность при темновой инкубации, тогда как при добавлении свежей порции целентеразина в щелочных условиях активность фотопротеина восстанавливалась полностью. Эксперименты на частично инактивированном мнемиопсине показали, что за исключением 0,7 М 2-меркаптоэтанола, который снижал его активность до неопределяемого уровня, ни один из восстанавливающих агентов не оказывал сколько-нибудь значительного эффекта на квантовый выход этого фотопротеина.

При исследовании фотоинактивации фотопротеина из гребневика *Bathocyroe fosteri* было сделано предположение, что под действием света апобелок не претерпевает изменений, поскольку темновая инкубация со свежей порцией целентеразина восстанавливает его активность, а что, скорее всего, изменяется конформация самого субстрата [Powers et al., 2013]. Однако позднее при изучении действия света на мнемиопсин и акворин с помощью оптических методов и метода кругового дихроизма были обнаружены некоторые различия во вторичной структуре облученного и необлученного мнемиопсина [Pashandi et al., 2016]. Авторы сделали вывод, что свет может влиять на структуру апобелка независимо от наличия целентеразина и предположили, что за индуцированные светом изменения может быть ответственна структурная перестройка 5 α-спирали и С-концевой области. Было также отмечено, что облучение мнемиопсина незначительно влияет на его чувствительность к кальцию. Однако на данный момент нет никаких предположений о возможной роли отдельных аминокислотных остатков в фотоинактивации, не определена форма субстрата (или продукта) после фотоинактивации, и в целом механизм этого процесса остается невыясненным.

Таким образом, анализ литературных данных показывает, что на настоящий момент наиболее изученными являются Ca^{2+}-регулируемые фотопротеины гидромедуз, для которых не только клонированы гены, кодирующие эти белки, но и определены пространственные структуры для различных лиганд-зависимых

конформационных состояний этих белков. Это позволило понять молекулярный механизм биолюминесцентной реакции и функциональную роль аминокислот активного центра фотопротеинов в этом процессе. На основе данных о структуре белка и роли отдельных аминокилот в каталитическом окислении субстрата и формировании эмиттера, с помощью генноинженерных методов были сконструированы мутанты фотопротеинов с измененными характеристиками, что расширило аналитические возможности этого класса белков.

Хотя Ca^{2+}-регулируемые фотопротеины ктенофор функционально схожи с фотопротеинами гидромедуз (используют целентеразин в качестве субстрата и их биолюминесцентная реакция также инициируется ионами кальция), они представляют собой новый тип белков этого класса, так как идентичность аминокислотных последовательностей фотопротеинов ктенофор и гидромедуз (впервые показано в данной работе) составляет всего лишь 25%. Это указывает на то, что аминокислотные остатки, участвующие в биолюминесцентном окислении субстрата, формировании активного фотопротеиного комплекса и эмиттера, у фотопротеинов ктенофор и гидромедуз должны различаться. Кроме того, активные фотопротеины ктенофор теряют способность к биолюминесценции при облучении светом, чего не наблюдается для фотопротеинов гидромедуз. Поэтому целью данной работы являлось изучение Ca^{2+}-регулируемого фотопротеина беровина из гребневика *Beroe abyssicola*, включая клонирование гена, кодирующего этот фотопротеин, изучение физико-химических и биолюминесцентных свойств рекомбинантного белка, а также исследование функциональной роли отдельных аминокислотных остатков активного центра в биолюминесценции.

ГЛАВА 2 Объекты и методы исследования

2.1 Характеристика объектов исследования

Для получения образцов тканей, содержащих фотоциты, были отобраны две индивидуальные живые особи *Beroe abyssicola* (диаметром 6 и 20 см), пойманные в Белом море в районе биостанции Картеш Зоологического института РАН. Животных перед забором биолюминесцентной ткани адаптировали в емкостях с морской водой в условиях аэрации при температуре 4^{o}C в темноте.

2.2 Приборы и реактивы

Целентеразин был получен от NanoLight Technology Prolume Ltd. (США). Другие химические вещества, если не указано иное, были от компании Sigma-Aldrich (США) высокой степени чистоты.

В качестве клеток-хозяев использовали бактериальные штаммы *E. coli* XL1Blue (Stratagene, США) и *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus (RIL) и (RIPL) (Stratagene, США).

В работе использованы следующие векторы и ферменты: вектор pTriplEx2 (Clontech, США), вектор pET22b (Novagen, США), рестрикционные ферменты (NEB, Великобритания; СибЭнзим, Новосибирск, Россия), Т4 ДНК-лигаза, Pfu ДНК-полимераза и Taq ДНК-полимераза (СибЭнзим, Новосибирск, Россия). При скрининге использовались: изопропил β-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) (Sigma, США), агар и триптон (Difco, США). Цифровые изображения агарозных и ПААГ-гелей обрабатывали в пакете программ Alpha Ease v5.5 (Alpha Innotech Corp., США). Световую эмиссию измеряли с помощью биолюминометра БЛМ-8812 (СКТБ «Наука», Красноярск, Россия).

2.3 Получение кДНК библиотек

Матричная поли-А РНК была изолирована из двух образцов биолюминесцентной ткани меридиональных каналов предварительно

адаптированных в темноте особей рода *Beroe* (~100 мг) с помощью набора Straight A's mRNA Isolation Kit (Novagen, США). Около 1 мкг (~1/10 часть) мРНК использовали для синтеза кДНК. Синтез кДНК и создание кДНК библиотек осуществляли с использованием набора SMART cDNA library construction kit (Clontech, США) в соответствии с прилагаемым протоколом, с одной модификацией: для получения плазмидной кДНК библиотеки применяли экспрессионный вектор pTriplEx2. Каждая независимая библиотека в штамме *E. coli* XL1-Blue содержала ~2,5 x 10^5 независимых рекомбинантных клонов.

2.4 Определение видовой принадлежности особей рода *Beroe*

Для определения видовой принадлежности особей гребневиков были получены нуклеотидные последовательности наиболее вариабельных фрагментов генов 18S рРНК кДНК (1-1227 пар нуклеодидов (п.н.)). Эти фрагменты амплифицировали полимеразой PfuTurbo (Stratagene, США) в течение 20 циклов с помощью специфических праймеров, содержащих сайты для клонирования. В качестве прямого праймера был использован 5'-ATAGGTACCCAACCTGGTTGATCCTGCC-3' (1-17 п.н. 18S рРНК), а в качестве обратного – 5-TATGCGGCCGCCCTATGTCTGGACCTGGTGAG-3' (1207-1227 п.н. 18S рРНК). В качестве матрицы был взят общий образец кДНК. После вставки фрагментов ДНК в вектор pTriplEx2 (Clontech, США) были определены их нуклеотидные последовательности, для сравнения которых использовался сетевой ресурс ClustalW [https://npsa-prabi.ibcp.fr].

2.5 Скрининг кДНК библиотек

Для скрининга неамплифицированную кДНК библиотеку высевали при плотности ~1500 рекомбинантных колоний *E. coli* на чашку Петри с LB-агаром, содержащим 150 мг/л ампициллина. С чашек Петри снимали реплики при помощи стерильной ацетатцеллюлозной мембраны с размером пор 0,45 μмоль, помещали на свежие чашки с LB-агаром и ампициллином и подращивали 8-10 ч при 37°C. Колонии с реплики снимали стерильным стеклянным шпателем и смывали 3 мл

среды SOB с ампициллином (100 мг/л), в смыв добавляли ИПТГ до конечной концентрации 0,2 мМ для индукции экспрессии белка и инкубировали в течение 4 ч при 37°C. Затем клетки центрифугировали в течение 10 минут при 5000 g. Осадок клеток обрабатывали ультразвуком в буфере 0,5 М NaCl, 5 мМ EDTA, 50 мМ бис-Трис пропан-HCl, pH 9,0 на льду. К клеточному лизату добавляли целентеразин (конечная концентрация 10^{-7} М) при 0°C и инкубировали без доступа света в течение 4 ч, после чего измеряли биолюминесцентную активность при комнатной температуре.

Чашки, смывы с которых дали биолюминесцентный сигнал, делили на сектора. Анализ каждого сектора проводили аналогично целым репликам. Клоны с сектора, давшего положительный ответ, переносили на новую чашку Петри с LB-агаром и ампициллином, инкубировали 8-10 ч при 37°C и далее анализировали, как описано выше. Индивидуальный положительный клон изолировали. Для оценки размера вставки единичную колонию с чашки помещали в 3 мл среды LB с ампициллином (100 мг/л), растили при 37°C со встряхиванием до OD_{600} = 1,8, затем выделяли ДНК методом щелочного лизиса [Маниатис и др., 1984] и проводили рестрикцию с помощью рестриктазы SfiI. Размер вставки оценивали с помощью электрофореза в агарозном геле по сравнению с ДНК-маркером молекулярного веса 100 bp DNA Ladder (NEB, Великобритания). Нуклеотидную последовательность ДНК клонов, содержащих вставку соответствующего размера, определяли и анализировали. Сравнительный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с помощью сетевого ресурса ClustalW [https://npsa-prabi.ibcp.fr].

2.6 Экспрессия в *E. coli* и очистка рекомбинантных апобелков

Экспрессионную плазмиду (p22-BA) получали путем амплификации кодирующей области pTriplEx2-BA со специфическими праймерами с последующим переклонированием в вектор для экспрессии pET22b(+) (Novagen, США) по сайтам рестрикции NdeI/XhoI. Для получения рекомбинантного апоберовина трансформированные экспрессионной плазмидой *E. coli* растили при

37°C со встряхиванием в LB-среде, содержащей ампициллин в конечной концентрации 200 мкг/мл, до OD_{600} = 0,6-0,8. После добавления ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ культивировали еще 3 часа.

Очищенный апо-беровин получали как обелин из *O. longissima* [Illarionov et al., 2000] с некоторыми модификациями. Клеточный осадок ресуспендировали в 20 мМ Трис-HCl, pH 7,0 в объемном соотношении 1:5 и разрушали ультразвуком (6 раз по 20 с) при 0°C. Суспензию центрифугировали при 4°C (5000 g x 15 мин), супернатант удаляли. Осадок промывали последовательно 150 мМ NaCl, затем 0,1% Тритон X-100 и 20 мМ Трис-HCl, pH 7,0. Затем осадок ресуспендировали в 6 М растворе мочевины в 20 мМ Трис-HCl pH 7,0, инкубировали в течение 30 минут при 4°C и центрифугировали. Осветленный экстракт хроматографировали на колонке HiTrap DEAEFF (GE Healthcare, Швеция), уравновешенной 6 М раствором мочевины в 20 мМ Трис-HCl, pH 7,0, используя линейный градиент NaCl (0-0,5 М). Очищенный апо-беровин концентрировали ультрафильтрацией в ячейке Amicon с мембраной для белков более 10 кДа до конечного объема 1 мл с заменой буфера на 50 мМ бис-Трис-пропан-HCl pH 9,0, 0,5 М NaCl, 5 мМ ЭДТА. Активацию беровина целентеразином проводили при молярном соотношении целентеразина и апобелка 1,1:1 путем инкубирования в течение ночи при 4°C в том же буфере. Все процедуры с заряженным белком проводили в темноте или при освещении красным светом, чтобы избежать фотоинактивации. После активации беровин разводили в 20 раз буфером (20 мМ Трис-HCl pH 7,0, 5 мМ ЭДТА) и хроматографировали на колонке Mono Q (GE Healthcare, Швеция) в линейном градиенте NaCl (0-0,6 М) для отделения фотопротеинового комплекса от апобелка и несвязавшегося целентеразина.

Чистоту белковых препаратов на этапах выделения оценивали с помощью электофореза в 12,5% ПААГ в присутствии 0,1% ДСН по методу Лэммли [Остерман, 1981]. Набор белков для электрофореза (Pharmacia Biotech, США), включающий фосфорилазу Б – 94 кДа, бычий сывороточный альбумин – 67 кДа, яичный альбумин – 43 кДа, карбоангидразу – 30 кДа, ингибитор трипсина – 20,1 кДа и лактальбумин – 14,4 кДа, использовали в качестве стандартов.

Концентрацию белка определяли с помощью набора Protein assay kit (Bio-Rad, США) после удаления солей гель-фильтрацией. Концентрацию раствора целентеразина в метаноле определяли спектрофотометрически с использованием $\varepsilon_{435\ нм} = 9800\ M^{-1}\ см^{-1}$ [Shimomura, 2006].

Выход активного фотобелка оценивали с помощью уравнения:

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

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

2.7 Измерение удельной биолюминесцентной активности

При скрининге кДНК библиотек биолюминесценцию измеряли, впрыскивая 0,2 мл 0,1 М $CaCl_2$ в 0,1 М Трис-HCl pH 8,5 в кювету биолюминометра, содержащую неочищенный клеточный лизат в 0,5 мл буфера для анализа (0,1 М Трис-HCl pH 8,5, 10 мМ ЭДТА).

Биолюминесценцию беровина и его мутантов измеряли с помощью впрыска 10 мкл раствора фотопротеина в 20 мМ Трис-HCl, pH 7,0, 5 мМ ЭДТА в кювету люминометра, содержащую 490 мкл 2 мМ $CaCl_2$ в 50 мМ Трис-HCl pH 8,5, при 23°C. Биолюминесцентный сигнал измеряли до прекращения реакции.

Люциферазную активность беровина и его мутантов измеряли путем впрыска 5 мкл раствора целентеразина в метаноле в кювету люминометра, содержащую 495 мкл раствора белка в 50 мМ Трис-HCl, pH 7,0, 5 мМ ЭДТА, при ~23°C. Молярное отношение белка к целентеразину составляло 1:5. Удельную люциферазную активность рассчитывали как суммарный биолюминесцентный сигнал, собранный в течение 10 минут, в пересчете на мг соответствующего апопротеина. Приведенные значения представляют собой среднее, как минимум, 3-х измерений.

2.8 Измерение спектров рекомбинантного беровина и его мутантных форм

Спектры поглощения получены с помощью двухлучевого спектрофотометра Uvikon 943 (Kontron Instruments, Италия). Спектры биолюминесценции и флуоресценци измерены на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, США). Спектры корректировали на спектральную чувствительность детектора с помощью программы, входящей в комплект программного обеспечения прибора. Спектры биолюминесценции измеряли в буфере, содержащем 50 мМ бис-Трис-пропан-HCl pH 8,5, инициируя реакцию инъекцией раствора $CaCl_2$ в том же буфере. Концентрация свободного кальция составила ~ 0,5 μM, что достаточно для обеспечения относительно постоянного уровня излучения при измерении спектров. При существенном изменении интенсивности биолюминесценции во время сканирования проводилась коррекция на скорость спада биолюминесцентной реакции. Для измерения спектров флуоресценции при различных значениях pH разряженный кальцием беровин переносили в буфер, содержащий 1 мМ $CaCl_2$, 50 мМ бис-Трис-пропан-HCl с соответствующим pH. Все измерения биолюминесценции и флуоресценции проводили при 23ºC.

2.9 Определение чувствительности беровина к ионам кальция

Биолюминесценцию беровина при разных [Ca^{2+}] измеряли, впрыскивая свободный от ЭДТА фотопротеин в кювету с раствором, содержащим кальций в заданной концентрации. Предварительно ЭДТА из фотопротеина удаляли гель-фильтрацией на пластиковой колонке Dsalt (Pierce, США), которую уравновешивали раствором 5 мМ PIPES pH 7,0, 150 мМ KCl, дважды пропущенным через колонку с сорбентом Chelex-100 из хелатообразующей смолы. Фракции, содержащие фотопротеин, определяли по их биолюминесцентной активности. Чтобы избежать возможного загрязнения ЭДТА, только первые несколько фракций белка использовались для определения зависимости от концентрации Ca^{2+}.

Кальциевые буферные растворы готовили пропорциональным смешиванием двух стоковых растворов, один из которых содержал эквимолярное количество

Ca^{2+} и ЭГТА, другой – точно такое же количество хелатора, но без Ca^{2+}. Для определения концентрации кальция в готовых растворах использовали online версию программы MAXICHELATOR (Ca-EGTA Calculator NIST v.1.2), учитывающую равновесную константу диссоциации хелатора при заданных ионной силе, температуре и pH. Следовые количества кальция удаляли пропусканием растворов через колонку с сорбентом Chelex-100 (Sigma, США). Растворы готовили с использованием деионизованной воды (18,2 МОм). В работе применяли только новую пластиковую посуду, предварительно обработанную, чтобы убрать загрязнение ионами кальция. Для концентраций Ca^{2+} ниже 10^{-5} М использовали Ca-ЭГТА, буферы (общая [ЭГТА] = 2 мМ), а для концентраций Ca^{2+} от 10^{-6} до 10^{-2} М – простые разведения $CaCl_2$ (в очищенном от следовых количеств Ca^{2+} растворе 5 мМ Pipes pH 7,0, 150 мМ KCl).

Для определения чувствительности беровина к Ca^{2+} в присутствии физиологической [Mg^{2+}] белок перед измерениями инкубировали с 1 мМ Mg^{2+} в течение 1 ч. При этих измерениях все растворы кальция также содержали 1 мМ Mg^{2+}.

Измерения проводили при 20°C с помощью биолюминометра, оборудованного термостабилизируемым кюветным блоком и нейтральными фильтрами с различными коэффициентами пропускания. Измерения для беровина проводили при освещении красным светом, чтобы избежать фотоинактивации. Ошибку вычисляли по стандартному отклонению. Обелин и акворин были получены с помощью разработанных ранее методик [Illarionov et al., 2000; Vysotski et al., 2001; Stepanyuk et al., 2005].

2.10 Кинетические измерения методом «остановленной струи»

Кинетику биолюминесцентного сигнала определяли методом «остановленной струи» при 20°C с помощью спектрометра SX20 (Applied Photophysics, Великобритания) (объем ячейки 20 мкл, «мертвое время» 1,1 мс). Кинетику исследовали в свободном от ЭДТА растворе беровина при [Ca^{2+}] 0,1 и 20 мМ. В шприце с Ca^{2+} содержалось 40 мМ Ca^{2+}, 30 мМ KCl, 5 мМ PIPES буфера,

pH 7,0 или 0,2 мМ Ca^{2+}, 150 мМ KCl, 5 мМ PIPES, pH 7,0 для концентрации кальция 20 мМ или 0,1 мМ, соответственно. Фотопротеин растворяли в очищенном от следовых количеств Ca^{2+} растворе 5 мМ PIPES pH 7,0, 150 мМ KCl. Оба шприца предварительно промывали раствором ЭГТА, а затем деионизированной водой. Растворы смешивали в равных объемах. Константы скорости подъема и спада биолюминесцентного сигнала беровина определяли, как описано ранее [Malikova et al., 2014]. Константы скоростей подъема и спада являются средними соответствующих констант, определяемых из десяти измерений, ошибка рассчитана по стандартному отклонению.

Для оценки влияния физиологической [Mg^{2+}] на кинетику биолюминесценции фотопротеин перед измерениями инкубировали с 1 мМ Mg^{2+} в течение 1 ч. Другие используемые в этих измерениях растворы (Ca^{2+}-ЭГТА буферы, разведения $CaCl_2$ и раствор Ca^{2+} в шприце для быстрого смешивания) также содержали 1 мМ Mg^{2+}. Измерения с беровином проводили при освещении красным светом во избежание его фотоинактивации.

2.11 Измерение кинетики формирования активного фотопротеинового комплекса из апофотопротеина, целентеразина и кислорода

Тушение Trp флуоресценции оценивали по изменению интенсивности излучения при 336 нм. Интенсивность флуоресценции корректировали на разведение образца за счет добавления раствора целентеразина и влияние метанола. Кажущиеся константы диссоциации (K_D) для комплекса апофотопротеин-целентеразин определяли из тушения флуоресценции апофотопротеина разными концентрациями целентеразина, как было описано ранее [Eremeeva et al., 2009]. Флуоресценцию измеряли с помощью спектрофлуориметра Varian Cary Eclipse (Agilent Technologies, США) в 20 мМ Трис-HCl pH 7,0, 5 мМ ЭДТА при 20°C. Все спектры флуоресценции получены с использованием кварцевой кюветы (1×1 см) при постоянном перемешивании в начальном объеме раствора апобелка 1 мл, к которому затем добавляли раствор целентеразина порциями от 1 до 5 мкл до насыщения. Коррекцию на

спектральную чувствительность ФЭУ проводили с помощью программного обеспечения прибора.

Для исключения влияния эффекта внутреннего фильтра, наблюдающегося при взаимодействии белка и лиганда, и проведения коррекции значений флуоресценции измерялось поглощение образца при длинах волн возбуждения и излучения, использованных при измерении флуоресценции. Значения флуоресценции корректировали, используя формулу:

$$F_{кор} = F_{набл} \cdot e^{\frac{A_{295}+A_{336}}{2}},$$

где A_{295} и A_{336} – суммарное поглощения белка в присутствии лиганда для волны возбуждения и волны излучения, соответственно.

Данные анализировали, исходя из предположения, что фракция связанного целентеразина соответствует отношению тушения флуоресценции ($Q = F_0 – F_q$) к максимальному тушению ($Q_{max} = F_0 – F_{qmax}$), где F_0, F_q и F_{qmax} – интенсивности флуоресценции при 336 нм без добавления субстрата, в присутствии субстрата и при насыщающей концентрации субстрата, соответственно. Для расчета кажущихся констант диссоциации использовали уравнение, приведенное ранее [Bollen, 2005] в несколько измененном виде:

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

где C, L и K_D – концентрации апофотопротеина и целентеразина, и константа диссоциации, соответственно.

Концентрации апо-беровина и его мутантов были определены по поглощению при 280 нм с использованием коэффициентов молярной экстинкции, рассчитанных с помощью сетевого ресурса ProtParam (http://us.expasy.org/tools/protparam-doc.html).

2.12 Фотоинактивация

Фотоинактивацию проводили в течение 1 ч при 0°C (на льду) с помощью источника света видимого спектрального диапазона, помещая 200 мкл образца в 20 мМ Трис-HCl pH 7,0, 5 мМ ЭДТА в микропробирке типа Эппендорф объемом 1,5 мл на расстоянии около 20 см от источника света. Через каждые 10 минут отбирали аликвоты для измерения активности. Биолюминесцентную активность измеряли в буфере 50 мМ бис-Трис-пропан-HCl pH 8,5, 2 мМ $CaCl_2$ при ~23°C.

Константу фотоинактивации (k_i) рассчитывали по формуле:

$$I = I_0 \cdot e^{-k_i t},$$

где I – интенсивность биолюминесценции, I_0 – значение интенсивности биолюминесценции при t_0, t – время фотоинактивации, k_i – константа спада биолюминесцентной реакции при фотоинактивации.

Время, за которое инактивируется 50% фотопротеина, рассчитывали по формуле:

$$t_{1/2} = \frac{ln2}{k_i},$$

где t – время фотоинактивации, k_i – константа фотоинактивации.

2.13 Кристаллизация апо-беровина с ионами магния

Первоначальный поиск условий кристаллизации апо-беровина выполняли с использованием 384 коммерческих растворов из наборов Index, Wizard, PEG-ION, Crystall Screen и Structure Screen (Hampton Research, США) при помощи робота Mosquito (TTPLabtech, Великобритания) в 96-луночных планшетах Greiner CrystalQuick (Германия) методом «сидячей капли»: 0,3 мкл раствора белка смешивали с 0,3 мкл раствора для кристаллизации. После этого планшеты герметизировали пленкой и оставляли при 4°C. Оптимизацию условий кристаллизации проводили в растворе, содержащем 0,2 М формиат магния, 20% ПЭГ 3350, pH 6,5 (PEG ION, Hampton Research, США) методом «висячей капли» при 16°C с различными концентрациями апо-беровина. Кристалл замораживали в жидком азоте с 20% раствором глицерина в качестве криопротектора. Для

предварительного анализа рентгеновскую дифракцию кристалла записывали с помощью CCD камеры Mar 300 (расстояние от кристалла до камеры 50 мм, время экспозиции 15 секунд, вращение кристалла 360° с шагом 1°).

Дифракционные данные были получены при облучении кристаллов длиной волны 0,9792 Å с использованием рентгеновского излучения синхротрона (BL17U1, Shanghai Synchrotron Radiation Facility, Китай). Рентгеновскую дифракцию кристалла записывали с помощью Quantum 315r CCD камеры (расстояние от кристалла до камеры 200-250 мм, время экспозиции 1 секунда, вращение кристалла 360° с шагом 1°). Дифракционные данные обрабатывали с помощью программы HKL2000 [Otwinowski, Minor, 1997]. Фазы определяли методом молекулярной замены с помощью программы PHASER [McCoy et al., 2007] с использованием структуры апо-беровина с кальцием (PDB код 4MN0) [Stepanyuk et al., 2013] в качестве модели. Окончательные модели были уточнены с помощью программ PHENIX [Adams et al., 2010] и REFMAC5 [Murshudov et al., 2011]. Модель корректировалась программой Coot [Emsley, Cowtan, 2004]. Визуализацию и сравнение молекулярных структур проводили с использованием PyMOL (DELANO Scientific LLC). Атомные координаты и структурные факторы были депонированы в базе данных PDB под регистрационным кодом 5BPJ.

2.14 Молекулярное моделирование

Структурные модели беровина были построены с использованием пространственных структур обелина из *Obelia longissima* и *Obelia geniculata*, связанных с 2-гидропероксицелентеразином (PDB коды 1QV0 и 1JF0, соответственно), акворина, связанного с 2-гидропероксицелентеразином-n (PDB код 1UHK), и Ca^{2+}-разряженного обелина, связанного с целентерамидом (PDB код 2F8P), в качестве матриц посредством веб-серверов для моделирования белков Phyre2 (http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/) и SWISS-Model (https://swissmodel.expasy.org/). Матрицы для моделирования были автоматически выбраны веб-серверами в Protein Data Bank (PDB). Объем внутренней гидрофобной полости рассчитан с помощью программы PocketFinder

(http://www.bioinformatics.leeds.ac.uk/pocketfinder/). Встраивание лиганда во внутреннюю полость молекулы апо-беровина было выполнено методом молекулярного докинга с помощью DockingServer (http://www.dockingserver.com).

2.15 Сайт-направленный мутагенез

В качестве матрицы для сайт-направленного мутагенеза использовали экспрессионную плазмиду p22-BA, содержащую кодирующую часть гена беровина дикого типа из гребневика *B. abyssicola*. Мутагенез, приводящий к точечным заменам аминокислотных остатков, проводили с использованием набора QuikChange kit (Agilent, США) в соответствии с прилагаемым протоколом. Наличие мутаций подтверждали определением нуклеотидной последовательности ДНК результирующей плазмиды.

2.16 Статистическая обработка результатов

Данные статистически обрабатывали по стандартным методикам [Плохинский, 1980] с использованием программного пакета Microsoft Excel для Windows XP. Для полученных данных рассчитывали среднее, среднее квадратичное отклонение и доверительный интервал. При расчетах учитывался уровень значимости $\alpha = 0,05$.

ГЛАВА 3 Конструирование и скрининг кДНК библиотек, анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, экспрессия, очистка и получение активного рекомбинантного беровина

3.1 Получение и скрининг кДНК библиотек

Образцы гребневиков были собраны в Чупинской губе Белого моря в районе биологической морской станции "Картеш" Зоологического института Российской академии наук в октябре 2002 г. В данном районе обитают 6 видов гребневиков: *Bolinopsis infundibulum, Mnemiopsis leidyi, Beroe cucumis, Beroe abyssicola, Mertensia ovum* и *Dryodora glandiformis* [Серавин, 1998]. Известно, что все они способны к биолюминесценции. Первый экземпляр гребневика (длиной ~ 6 см) был определен как *B. abyssicola* согласно классификации [Серавин, 1998]. Второй (~ 20 см) темно-вишневого цвета был пойман с помощью планктонной сети во время отбора проб с глубины ~100 м. Фенотипически была подтверждена принадлежность этого образца к роду *Beroe* без видовой идентификации.

Для точной идентификации вида были определены нуклеотидные последовательности фрагментов генов 18S рРНК в кДНК (1-1227 НБА) обоих гребневиков. Сравнение последовательностей фрагментов 18S рРНК позволило отнести обе особи к виду *Beroe abyssicola*. Как и ожидалось, сравнение последовательностей фрагментов генов 18S рРНК кДНК с таковыми других видов гребневиков (Приложение А, рис. 1) показало, что последовательность *B. abyssicola* имела минимальные отличия от таксономически близких видов *B. cucumis* и *B. forskalei* (99,3% идентичности). Тем не менее, некоторые позиции в последовательности 18S рРНК *B. abyssicola* соответствовали только последовательности таксономически удаленных *Mertensia ovum* и/или *M. leidyi* (96,7% идентичности), а не последовательности других видов рода *Beroe* [Berman et al., 2000].

Чтобы изолировать гены, кодирующие беровин, из кДНК библиотек, использовали функциональный скрининг, успешно примененный ранее для поиска кДНК генов, кодирующих другие биолюминесцентные белки [Illarionov et al., 1992; Markova et al., 2002; Markova et al., 2004; Markova et al., 2010].

Каждая кДНК библиотека состояла из ~ 2,4 x 10^5 независимых клонов, при этом рекомбинантных клонов было более 90%. В результате скрининга обеих кДНК библиотек найдены 4 бактериальных клона (BA1, BA2, BA3 и BA4, по два клона из каждой библиотеки), имеющих биолюминесцентную активность.

3.2 Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей беровина

В результате скрининга кДНК библиотек изолировано четыре кДНК генов, кодирующих рекомбинантный апо-беровин. Все они имели примерно одинаковую длину (1127-1131 пар нуклеотидов (п.н.)), за исключением терминальной поли(А) последовательности. Различия составили всего несколько нуклеотидов (до 21 в случае BA4 кДНК), учитывая делеции (Приложение А, рис. 2). Каждый ген содержал 55 п.н. в 5’-некодирующей области перед первым стартовым кодоном, достаточно вариабельную 3’-некодирующую область (442-446 п.н.), а затем терминальную последовательность поли(А). Открытая рамка считывания, содержащая 624 п.н. с двойным стоп-кодоном, кодирует полипептид из 208 аминокислот с рассчитанной молекулярной массой 24,9 кДа. Примечательно, что из природного источника (*B. ovata*) была выделена только одна изоформа беровина с молекулярной массой 25 кДа, в отличие от двух изоформ мнемиопсина из *Mnemiopsis sp*. [Ward, Seliger, 1974A, B; Aghamaali et al., 2011]. Следует отметить, что хотя все полноразмерные кДНК генов беровина содержат стоп-кодоны в рамке считывания на 5’-некодирующем участке, а последовательность Шайн-Дальгарно перед старт-кодоном отсутствует (Приложение А, рис. 2), их удалось обнаружить с помощью функционального скрининга. Это означает, что присутствие стоп-кодонов и отсутствие последовательности Шайн-Дальгарно не полностью подавляет трансляцию этих генов в клетках *E. coli*. Это также свидетельствует о высокой чувствительности и специфичности функционального

скрининга, так как этот метод позволяет обнаружить даже следовые количества биолюминесцентных молекул.

Анализ аминокислотной последовательности (рис. 3.1) показал, что фотопротеин беровин содержит три канонические EF-hand Ca^{2+}-связывающие последовательности, похожие на таковые Ca^{2+}-регулируемого фотопротеина обелина [Vysotski, Lee, 2004]. Это позволяет отнести беровин к одному из наиболее многочисленных и широко изученых семейств – семейству кальций-связывающих EF-hand белков [Kawasaki et al., 1998].

Как было показано, природные фотопротеины гребневиков используют целентеразин в качестве субстрата, а их функциональные свойства аналогичны фотопротеинам медуз [Ward, Seliger, 1974A, B]. Однако с помощью системы поиска BLAST было обнаружено, беровин не выявляет заметной идентичности аминокислотной последовательности с таковой обелина, как и других Ca^{2+}-регулируемых фотопротеинов гидромедуз. Максимальная идентичность (25%) выявлена с обелином из *Obelia longissima* (рис. 3.1), причем наибольший вклад вносят последовательности, формирующие Ca^{2+}-связывающие сайты.

```
BA    1 MTERLNEQNNESYRYLRSVGNQWQFNVEDLHPKMLSRLYKRFDTFDLDSDGKMEMDEVLYWP-DRMRQLVNATDE
OL    1 ----------MSSKYAVKLKTDFDN------PRWIKRHKHMFDFLDINGNGKITLDEIVSKASDDICAKLEATPE

BA   75 QVEKMRDAVRVFFLHKGVEPVNGLLREDWVEANRVFAEAERERERRGEPSLIALLSNSYYDVLDDDGDGTVDVDE
OL   60 QTKRHQVCVEAFFRGCGMEYGKEIAFPQFLDGWKQLATSELKKWARNEPTLIREWGDAVFDIFDKDGSGTITLDE

                                                                        Identity
BA  150 LKTMMKAFDVP--QEAAYTFFEKADTDKSGKLERTELVHLFRKFWMEPYDPQWDGVYAYKY-       25%
OL  134 WKAYGKISGISPSQEDCEATFRHCDLDNSGDLDVDEMTRQHLGFWYT-LDPEADGLYGNGVP      100%
```

Рисунок 3.1 – Сравнение аминокислотных последовательностей беровина (BA) и обелина (OL) из *Obelia longissima* (Q27709). Красные и зеленые буквы – идентичные и синонимичные аминокислотные остатки, соответственно, черные буквы – неидентичные аминокислотные остатки. Аминокислоты, образующие Ca^{2+}-связывающие сайты подчеркнуты. Аминокислоты, формирующие субстрат-связывающую полость обелина, выделены голубым, образующие каталитические триады – серым, находящиеся в тех же позициях в беровине – желтым.

При сравнении только этих последовательностей степень идентичности возрастает до 52,8%, так что последовательность беровина значительно отличается от таковых Ca^{2+}-регулируемых фотобелков гидромедуз.

Интересной особенностью является то, что беровин в первом и третьем Ca^{2+}-связывающих сайтах содержит глутамат в положении 9 (рис. 3.1). Это говорит о том, что, как и в I Ca^{2+}-связывающем сайте парвальбумина [Kretsinger, Nockolds, 1973], кислород боковой цепи этого остатка Glu может непосредственно координировать Ca^{2+}, а молекула воды не принимает участия в этом процессе, как это имеет место в большинстве подобных случаев, в том числе у Ca^{2+}-регулируемых фотопротеинов медуз [Deng et al., 2005; Liu et al., 2006], где в положении 9 находятся Ser, Thr, Asp или Asn, боковые цепи которых слишком коротки, чтобы координировать Ca^{2+} напрямую. На основе исследований EF-hand Ca^{2+} связывающих белков из разных источников было обнаружено, что их Ca^{2+}-связывающие участки либо содержат только одну молекулу воды в качестве лиганда, либо не содержат ее вообще [Strynadka, James, 1989]. Таким образом, по крайней мере, два Ca^{2+}-связывающих участка беровина могут иметь высокое сродство к кальцию. Состав первичных аминокислотных последовательностей Ca^{2+}-регулируемых фотопротеинов медуз отличается тем, что богат триптофаном, цистеином и гистидином (например, обелин из *O. geniculata* содержит шесть остатков триптофана, по пять – цистеина и гистидина) [Markova et al., 2002], которые обычно не встречаются в кальций-связывающих белках [Moncrief et al., 1990; Kawasaki et al., 1998]. Несмотря на низкую степень идентичности, беровин содержит пять остатков триптофана и три остатка гистидина, т.е. почти столько же, сколько и обелин (рис. 3.1). Интересным фактом является полное отсутствие остатков цистеина в беровине, что характерно и для 9 из 12 известных изоформ мнемиопсина (Приложение А, рис. 3).

Анализ кристаллических структур Ca^{2+}-регулируемых фотопротеинов акворина [Head et al., 2000], обелина [Liu et al., 2000; Liu et al., 2003], клитина [Titushin et al., 2010] и митрокомина [Burakova et al., 2016] показал, что все они являются глобулярными белками, имеющими полость для связывания 2-

гидропероксицелентеразина, образованную в основном боковыми цепями гидрофобных аминокислотных остатков, но несколько боковых цепей гидрофильных остатков (His22, Tyr138, His175 и Tyr190) также направлены внутрь полости. Почти все остатки, формирующие субстрат-связывающую полость, являются консервативными [Vysotski, Lee, 2004]. В последовательности беровина, однако, эти позиции в основном заняты другими остатками; только 10 из 21 остатков в беровине идентичны или подобны тем, которые формируют целентеразин-связывающую полость обелина (рис. 3.1). Еще одним важным остатком для биолюминесценции фотопротеинов медуз является С-концевой остаток Pro, удаление или замена которого ведет к снижению биолюминесцентной активности белка [Nomura et al., 1991; Watkins, Campbell, 1993; Eremeeva et al., 2014]. Было высказано предположение, что С-концевой Pro, взаимодействующий через водородную связь с остатком N-концевого участка, участвует в формировании закрытой полости в молекуле фотопротеина, что изолирует 2-гидропероксицелентеразин от растворителя и способствует высокому квантовому выходу биолюминесценции [Liu et al., 2000]. В беровине, как и в других фотопротеинах гребневиков, С-концевая последовательность богата остатками тирозина и не содержит остатков пролина (рис. 3.1). При этом С-концевой остаток тирозина, скорее всего, выполняет ту же функцию, что и С-концевой остаток пролина в фотопротеинах гидромедуз. Замена Y208F в беровине не вызывает изменений свойств белка, тогда как делеция этого остатка тирозина катастрофически снижает удельную активность и выход активного белка.

Для биолюминесценции фотопротеинов медуз His175, Trp179 и Tyr190 (в соответствии с последовательностью обелина) являются ключевыми. Роль триады Tyr190-His175-Trp179 заключается в стабилизации гидропероксида в положении С2 целентеразина [Head et al., 2000; Liu et al., 2003], а роль His175 заключается в запуске биолюминесцентной реакции в ответ на связывание кальция [Vysotski, Lee, 2004; Liu et al., 2006]. Среди этих остатков только Tyr и Trp найдены в соответствующих позициях в беровине. Положение, соответствующее His175 в обелине, в беровине занято фенилаланином (рис. 3.2). Однако близость His186

позволяет предположить, что данный остаток может осуществлять эту функцию в беровине.

3.3 Экспрессия рекомбинантного беровина в *E. coli* и очистка апобелка

Согласно результатам электрофореза клеточных лизатов в ДСН-ПААГ (рис. 3.2), выход рекомбинантного апо-беровина при экспрессии в клетках *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) RIL, трансформированных плазмидой p22-BA, высок. Общее количество апо-беровина составило более 50% от всех белков клетки (рис. 3.2, дорожка 3). Апо-беровин в основном накапливается в тельцах включения, откуда экстрагируется 6 М мочевиной и очищается с помощью ионообменной хроматографии по аналогии с апо-обелином [Illarionov et al., 2000].

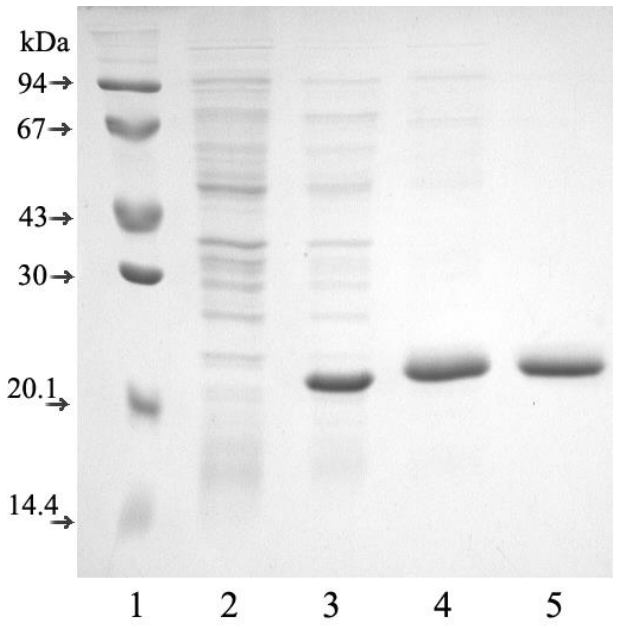


Рисунок 3.2 – ДСН-ПААГ анализ экспрессии апо-беровина в клетках *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) RIL. Дорожки: 1, маркер молекулярного веса; 2 и 3, клеточные лизаты до и после добавления индуктора ИПТГ, соответственно; 4, экстракт телец включения в 6 М мочевине; 5, апо-беровин после очистки;
(12,5% полиакриламидный гель, окрашенный кумасси ярко-голубым).

Уже после отмывки телец включения белок был практически гомогенным (рис. 3.2, дорожка 4). Оставшиеся примеси удаляются очисткой на колонке с

ДЭАЭ-сефарозой (рис. 3.2, дорожка 5). Выход высокоочищенного белка составляет 15-20 мг с 1 л культуры. Как и в случае фотопротеинов гидромедуз [Rudolf, Lilie, 1996], апо-беровин из телец включения может быть преобразован в активный фотопротеин. Следует отметить, что в буфере для рефолдинга, содержащем 0,5 М NaCl, 5 мМ ЭДТА, 100 мМ Трис-HCl, pH 9,0, апо-беровин, в отличие от апо-акворина и апо-обелина [Eremeeva et al., 2009], находится в мономерном состоянии, что было показано гель-фильтрацией на колонке с биогелем Р 100.

3.4 Получение активного беровина

Апо-беровин может быть преобразован в активный фотопротеин путем инкубации с целентеразином бескальциевых условиях в присутствии кислорода при щелочных значениях pH (рис. 3.3А), т.е. при pH, оптимальном для реактивации фотоинактивированного природного мнемиопсина [Anctil, Shimomura, 1984]. Тем не менее, в отличие от мнемиопсина, наибольший выход активного беровина достигается в буфере с высокой ионной силой. Эффективность активации апо-беровина без NaCl в 100 раз ниже, чем с 0,5 М NaCl (рис. 3.3А,Б). Следует отметить, что в буфере с низкой ионной силой зависимость от pH имеет два максимума: один при pH 7,5, другой – при pH 9,5 (рис. 3.3А). Хотя активация апо-беровина без NaCl в нейтральных условиях менее эффективна, чем в щелочных в присутствии соли, в фотоцитах, вероятно, все же должны наблюдаться условия, близкие к нейтральным. На рисунке 3.3В показана кинетика активации апо-беровина в буфере, содержащем 0,5 М NaCl при pH 9,0 и 8°С. Концентрация активного беровина достигает максимума через 4 ч. Инкубация апо-беровина в буфере для активации более 24 ч уменьшает концентрацию активного беровина (от ~5% после 48 ч до ~30% после 72 ч), скорее всего, из-за его низкой стабильности при pH 9,0, поскольку он не теряет активности после недели хранения при 8°С в буфере при pH 7,0.

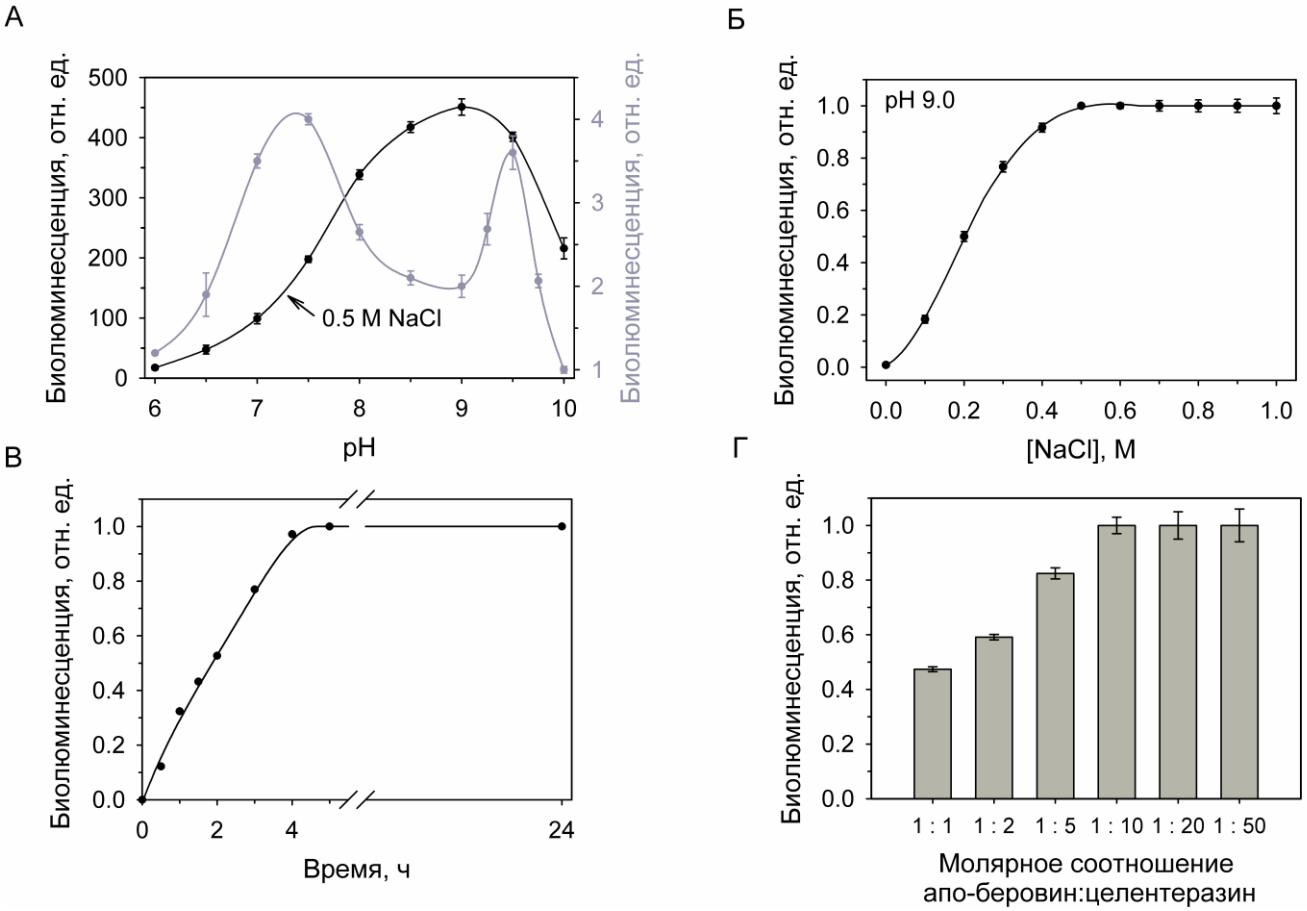


Рисунок 3.3 –Активация апо-беровина. (А) Влияние pH на выход активного беровина с (–) и без (–) NaCl. (Б) Влияние NaCl на выход активного беровина при pH 9,0. (В) Кинетика активации апо-беровина целентеразином в присутствии 0,5 M NaCl при pH 9,0, контролируемая с помощью биолюминесценции. (Г) Влияние молярного соотношения апо-беровин:целентеразин на выход активного фотопротеина. Концентрация апо-беровина при активации – 3 мг/мл.Точки на графиках показаны как среднее трех независимых экспериментов.

Следует отметить, что преобразование апо-беровина в активный фотопротеин не требует восстанавливающих агентов, тогда как в случае фотопротеинов гидромедуз их добавление значительно увеличивает выход активного белка [Shimomura, 2006]. Для апофотопротеинов гидромедуз выход активного фотопротеина и скорость активации зависят от концентрации белка, молярного соотношения апофотопротеин:целентеразин, температуры, pH, восстанавливающих агентов и т.п. [Shimomura, 2006; Shimomura, Shimomura,

1981; Shimomura et al., 1993; Vysotski et al., 2001; Titushin et al., 2008]. В отличие от этих апофотопротеинов только 50% апо-беровина переходит в активное состояние в данных условиях. Эффективность активации оценивалась путем отделения заряженного беровина от апобелка на колонке Mono Q с последующим измерением концентрации белка в отдельных пиках.

Низкий выход, возможно, вызван еще и тем, что данное молярное соотношение апофотопротеин:целентеразин неоптимально, поскольку целентеразин окисляется в щелочных условиях [Shimomura, 2006]. Щелочная среда может привести к снижению концентрации целентеразина, формируя продукты автоокисления, которые также могут конкурировать с целентеразином за связывание с апобелком. Для оценки влияния концентрации целентеразина на выход активного фотопротеина исследована эффективность активации беровина при различном молярном соотношении апо-беровин:целентеразин (рис. 3.3Г). При десятикратном избытке целентеразина выход активного беровина был в два раза выше, чем при молярном соотношении целентеразина и апобелка 1,1:1, то есть почти весь апо-беровин может быть преобразован в активный фотопротеин при соответствующей концентрации целентеразина. Дальнейшее повышение концентрации целентеразина не увеличивает выход активного белка.

Возможно также, что одной из причин этого является высокая концентрация апобелка, так как концентрация апо-беровина в экспериментах была ~3,0 мг/мл, что вполне достаточно для эффективной активации, если бы зависимость выхода активного белка от концентрации апобелка была похожа на таковую фотопротеинов медуз [Shimomura, Shimomura, 1981; Titushin et al., 2008]. Однако для беровина снижение концентрации апобелка при зарядке до 0,065 мг/мл повышает выход активного фотопротеина до 80% (рис. 3.4).

Условия для активации беровина *in vitro* отличаются от стандартных физиологических условий, обычно наблюдаемых в клетках животных. В отличие от клитина, последовательность которого имеет сигнальный пептид для

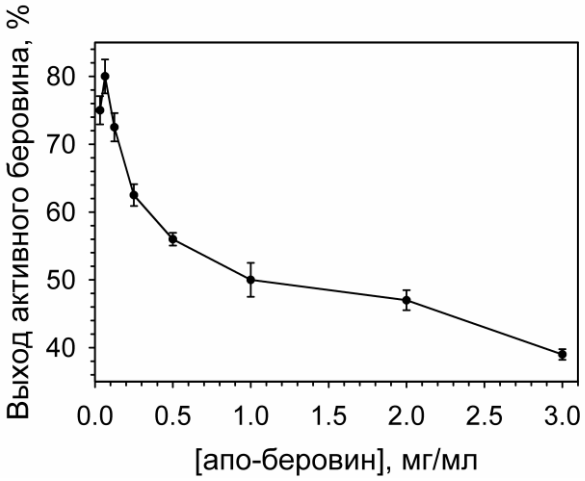


Рисунок 3.4 – Зависимость выхода активного беровина от концентрации апо-беровина при активации. Данные представлены в % от общего белка.

транспорта фотопротеина в митохондрии [Fourrage et al., 2014], где наблюдается более щелочная среда, чем в цитоплазме клеток [Casey et al., 2010], беровин не содержит никакой последовательности, которая может направить фотопротеин в какие-либо клеточные компартменты, где могли бы поддерживаться щелочные условия. Таким образом, вероятно, в природе формирование активного беровина должно происходить в цитоплазме клеток, где среда близка к нейтральной.

Для имитации внутриклеточных условий при преобразовании апо-беровина в активный фотопротеин был использован Ca-ЭГТА буфер, обеспечивающий $[Ca^{2+}]$ около $1{,}0\times10^{-8}$ М, который моделирует $[Ca^{2+}]$ в цитоплазме «покоящихся» клеток млекопитающих, и свободный от хелаторов апо-беровин в 150 мМ KCl, 5 мМ PIPES, pH 7,2, чтобы не нарушать $[Ca^{2+}]$, ионную силу и pH. Активация апо-беровина была выполнена без Mg^{2+} и в присутствии физиологической концентрации магния (1 мМ). В экспериментах с магнием в раствор апо-беровина и в Ca-ЭГТА буфер был предварительно добавлен 1мМ Mg^{2+} за 1 ч перед добавлением целентеразина, поскольку сродство к ионам кальция Ca^{2+}-связывающих участков белка с EF-hand выше, чем к Mg^{2+}. На рисунке 3.5 показана кинетика активации беровина в условиях, имитирующих физиологические (150 мМ KCl, 5 мМ PIPES, pH 7,2, $1{,}0\times10^{-8}$ М Ca^{2+}, 1 мМ Mg^{2+}), и в буфере с высокой ионной силой при pH 9,0 и 7,2, содержащем 5 мМ ЭДТА.

Хотя присутствие Mg^{2+} увеличивает выход активного беровина почти в десять раз, эффективность преобразования апо-беровина в активный фотопротеин в буфере с 0,5 М NaCl значительно выше даже при нейтральных значениях pH (рис. 3.5). Поскольку такая высокая ионная сила вряд ли возможна даже в

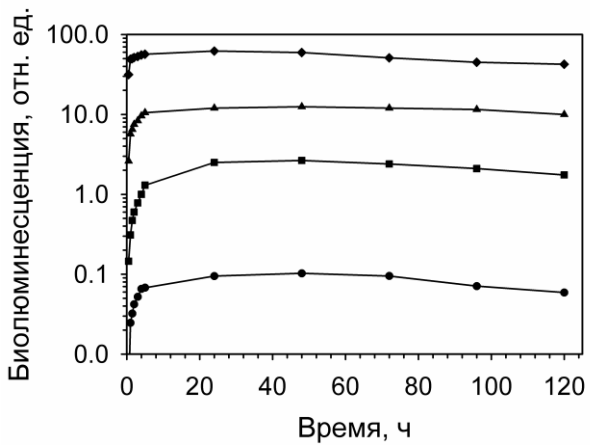


Рисунок 3.5 – Кинетика активации апо-беровина в: Ca-ЭГТА буфере ($[Ca^{2+}] = 1{,}0\times10^{-8}$ М, 150 мМ KCl, 5 мМ PIPES, pH 7,2) без (●) и с (■) 1 мМ Mg^{2+}, в буфере 0,5 М NaCl, 5 мМ ЭДТА, 50 мМ Трис-HCl pH 7,2 (▲) и pH 9,0 (♦). Активацию проводили при 8°C в темноте. Концентрация апо-беровина – 0,9 μM; молярное соотношение апо-беровин:целентеразин – 1:15.

цитоплазме клеток морских животных, можно предположить, что в естественных условиях кроме низкой концентрации Ca^{2+}, Mg^{2+}, целентеразина и кислорода в процесс преобразования апо-беровина в активный фотопротеин для обеспечения его высокого выхода и, как следствие, яркой биолюминесценции, могут быть вовлечены дополнительные внутриклеточные факторы.

Таким образом, клонированы полноразмерные кДНК генов, кодирующих Ca^{2+}-регулируемый фотопротеин беровин из гребневика *B. abyssicola*. Исследования показали, что рекомбинантный апо-беровин может быть экспрессирован в клетках *E. coli* с высоким выходом и получен в высокоочищенном состоянии. Наиболее эффективно активация апо-беровина

происходит при инкубации с целентеразином в растворе, содержащем 0,5 М NaCl, при pH 9,0 и температуре 8°С.

Беровин содержит три Ca^{2+}-связывающих сайта EF-hand типа, что позволяет отнести его, аналогично фотопротеинам гидромедуз, к обширному семейству EF-hand Ca^{2+}-связывающих белков. При этом идентичность аминокислотных последовательностей беровина и фотопротеинов гидромедуз составляет не более 25%. Хотя *B. abyssicola* и *M. leidyi* принадлежат к разным отрядам, *Beroida* и *Lobata*, соответственно, идентичность между аминокислотными последовательностями беровина и изоформ мнемиопсина составляет 89,7-93,1%. Интересно, что этот показатель несколько выше, чем для Ca^{2+}-регулируемых фотопротеинов медуз одного и того же рода. Степень идентичности между аминокислотными последовательностями обелина из *O. geniculata* и *O. longissima*, например, 86% [Markova et al., 2002], а между последовательностями акворина из *A. victoria* (AAA27716 и AAA27720), *A. coerulescens* (AAO91813.1), *A. parva* (AAK02061.1) и *A. macrodactyla* (AAK02061.1) составляет 84,5-86,1%. Низкая генетическая изменчивость фотопротеинов гребневиков хорошо согласуется с данными филогенетического анализа этого таксона [Podar et al., 2001]. Не очень большие различия между последовательностями генов 18S рибосомальной РНК гребневиков позволяют предположить, что все существующие гребневики относительно недавно по эволюционным меркам произошли от общего предка.

Таким образом, исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что фотопротеины ктенофор относятся к новому типу Ca^{2+}-регулируемых фотопротеинов.

ГЛАВА 4 Основные физико-химические свойства беровина

4.1 Биолюминесцентные свойства

Биолюминесцентные свойства рекомбинантного беровина были исследованы после отделения активного фотопротеина от апобелка с помощью ионообменной хроматографии на колонке Mono Q.

Зависимость максимальной интенсивности биолюминесценции от pH для рекомбинантного беровина из *B. abyssicola* очень похожа на таковую природного беровина из *B. ovata* (рис. 4.1А), с острым профилем и шириной полумаксимума менее 2 единиц pH [Ward, Seliger, 1974B]. Максимальная интенсивность биолюминесценции наблюдается при pH 8,5. Ее зависимость от ионной силы определена в диапазоне 0-1,0 M NaCl при pH 8,5. В отличие от условий для активации беровина, эффективная [NaCl] для биолюминесцентной реакции составила 0,2 M. Увеличение концентрации соли до 1,0 M вело к снижению интенсивности биолюминесценции до ~30% от ее максимального значения (рис. 4.1Б).

Биолюминесценция при разных значениях температуры определена путем добавления 10 мкл раствора беровина с концентрацией 1 x 10^{-6} M в кювету биолюминометра с 490 мкл буфера (2 мМ $CaCl_2$ в 50 мМ бис-Трис-пропан-HCl, pH 8,5), которая была выдержана при заданной температуре. Температуру регулировали с помощью водного термостата путем циркуляции воды через рубашку фотометра. Оптимумы температур для максимальной интенсивности и квантового выхода биолюминесценции рекомбинантного беровина находятся при 15 и 9°C, соответственно (рис. 4.1В), тогда как природный беровин из *B. ovata* имеет температурные оптимумы при 30 и 0°C [Ward, Seliger, 1974A]. Вполне вероятно, что что низкие температурные оптимумы для биолюминесценции беровина обусловлены адаптацией к условиям обитания, поскольку кДНК генов клонированы из гребневиков, живущих в холодных водах Белого моря.

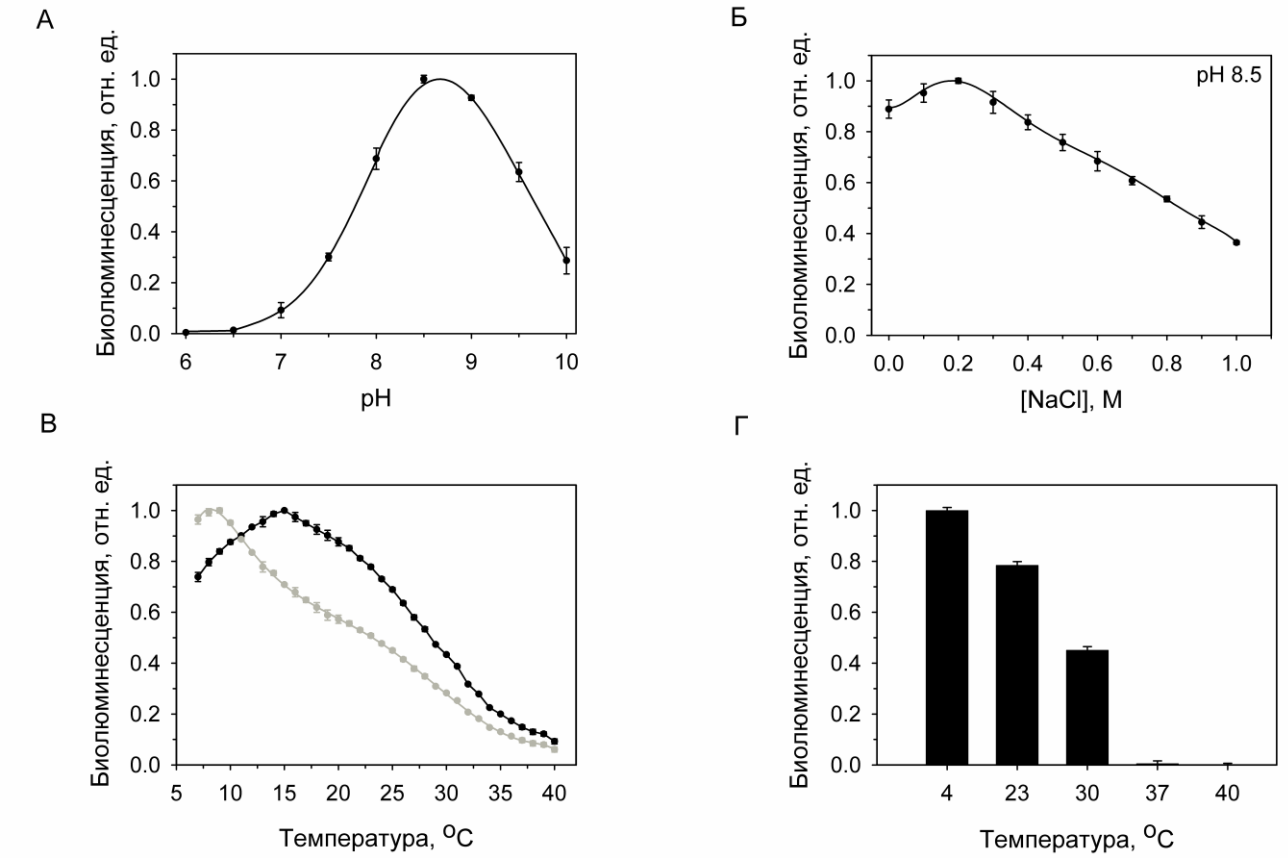


Рисунок 4.1 – Биолюминесцентные свойства беровина.
(А, Б) влияние pH и [NaCl] при pH 8,5 на максимальную интенсивность биолюминесценции. (В) влияние температуры на максимальную интенсивность (●) и квантовый выход (●) биолюминесценции. (Г) термостабильность фотопротеина при 4, 23, 37 и 40°C, время инкубации – 1 ч. Точки на графике показаны как среднее трех независимых экспериментов.

Термостабильность рекомбинантного беровина определяли инкубированием образца беровина в буфере (0,2 М NaCl, 5 мМ ЭДТА, 20 мМ Трис-HCl, pH 7,0), предварительно уравновешенном при заданной температуре. После 1 ч инкубации при постоянной температуре пробирку с образцом быстро охлаждали на ледяной бане и измеряли остаточную активность. Рекомбинантный беровин при 4°C полностью сохраняет свою активность, при 23°C теряет ~20% активности, при 30°C – ~55%, а при 37 и 40°C – почти всю активность (рис. 4.1Г). То есть фотопротеиновый комплекс беровина также наиболее стабилен при низких температурах.

4.2 Спектральные свойства

Апо-беровин имеет УФ спектр поглощения, типичный для белков без лиганда с максимумом при 280 нм и плечом при 295 нм (рис. 4.2А).

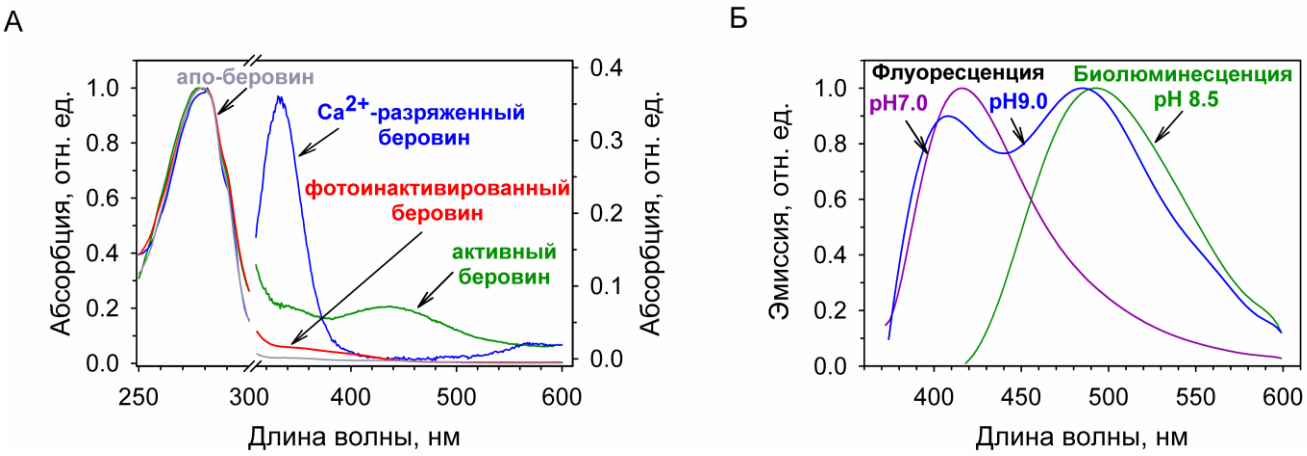


Рисунок 4.2 – (А) Спектры поглощения активного беровина (–), Ca^{2+}-разряженного беровина (–), фотоинактивированного беровина (–) и апо-беровина (–). (Б) Спектр биолюминесценции беровина (–) и спектры флуоресценции Ca^{2+}-разряженного беровина (λ_{ex} = 350 нм) при pH 7,0 (–) и 9,0 (–).

Активный беровин, связанный с 2-гидропероксицелентеразином, в видимой области спектра, в отличие от фотопротеинов гидромедуз (λ_{max} = 460 нм), имеет максимум поглощения при 437 нм., что соответствует пику поглощения (λ_{max} = 435 нм) целентеразина в метаноле [Shimomura, 2006]. Ca^{2+}-разряженный беровин в видимой области не поглощает, но также, как и Ca^{2+}-разряженные фотопротеины гидромедуз [Markova et al., 2002], имеет максимум поглощения при 335 нм. Таким образом, спектры поглощения активного и Ca^{2+}-разряженного рекомбинантного беровина практически идентичны таковым природного мнемиопсина [Ward, Seliger, 1974].

Максимум спектра биолюминесценции рекомбинантного беровина (рис. 4.2Б) находится при 490 нм с шириной около 100 нм в области полумаксимума. Спектр биолюминесценции рекомбинантного беровина из

B. abyssicola и спектр биолюминесценции ктенофор *B. ovata* (λ_{max} = 490 нм, ширина полумаксимума = 88 нм) [Haddock, Case, 1999] практически идентичны. Следует отметить, что pH в диапазоне 6,0-9,5 не влияет на спектр излучения беровина. Фотопротеины гидромедуз практически не флуоресцируют, но после реакции биолюминесценции связанный с белком продукт целентерамид обладает яркой флуоресценцией [Shimomura, 2006]. У акворина, например, спектр флуоресценции Ca^{2+}-разряженного белка совпадает со спектром биолюминесценции, в то время как в случае обелина спектр флуоресценции сдвигается на 25 нм в длинноволновую область спектра по сравнению со спектром биолюминесценции [Vysotski, Lee, 2004]. Как акворин и обелин, Ca^{2+}-разряженный беровин также обладает яркой флуоресценцией (рис. 4.2Б), которая, однако, зависит от pH. При нейтральных значениях pH максимум флуоресценции наблюдается при 420 нм, что на 70 нм смещено в коротковолновую область спектра относительно максимума биолюминесценции. При щелочных значениях pH флуоресценция имеет бимодальный спектр с максимумами при 410 и 485 нм, последний из которых почти соответствует спектру биолюминесценции. Чувствительность спектра флуоресценции к изменению pH означает, что субстрат-связывающая полость Ca^{2+}-разряженного беровина в отличие от Ca^{2+}-разряженных фотопротеинов гидромедуз может быть доступна растворителю, в отличие от фотопротеинов гидромедуз. Следует отметить, однако, что природный Ca^{2+}-разряженный мнемиопсин не флуоресцирует, несмотря на то, что пик, соответствующий связанному целентерамиду, присутствует в спектре поглощения [Ward, Seliger, 1974B].

4.3 Фотоинактивация

Как и в случае природных фотопротеинов гребневиков, активность рекомбинантного беровина снижается под действием света. Беровин теряет практически всю активность после 1 ч экспозиции на свету при 0°C. Так, раствор беровина с концентрацией 0,01 и 2 мг/мл в 0,3 M NaCl, 5 мМ EDTA, 20 мМ Трис-HCl, pH 7,0 сохранял только 0,001 и 0,003% его первоначальной активности,

соответственно. Процесс фотоинактивации хорошо описывается кинетикой реакции первого порядка с k_i = 0,038 ± 0,0017 мин$^{-1}$ (рис. 4.3), как и для нативного мнемиопсина [Ward, Seliger, 1976]. Время, за которое интенсивность биолюминесценции снижается в два раза, составило 18,2 ± 0,81 мин.

Фотоинактивированный беровин не поглощает ни в видимой, ни в ближней ультрафиолетовой областях (рис. 4.2А), что указывает на отсутствие целентеразина и его производных, связанных с белком. Наиболее вероятно, что поглощение света вызывает диссоциацию 2-гидропероксицелентеразина из фотопротеина, подобно той, которая была обнаружена для природного мнемиопсина [Anctil, Shimomura, 1984].

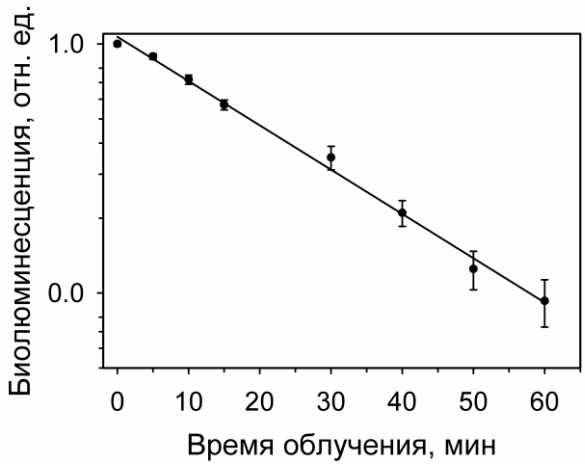


Рисунок 4.3 – Фотоинактивация беровина под воздействием света видимого диапазона длин волн. Данные представлены в полулогарифмических координатах в виде среднего значения трех независимых экспериментов.

Таким образом, под действием света молекула 2-гидропероксицелентеразин или диссоциирует из фотопротеина, или вначале разрушается, а затем образовавшиеся продукты диссоциируют из субстрат-связывающей полости белка. Фотоинактивированный беровин может быть снова конвертирован в активный фотопротеин при инкубации с целентеразином.

4.4 Чувствительность к ионам кальция

Поскольку Ca^{2+}-регулируемые фотопротеины очень чувствительны к кальцию и безопасны для живых клеток, они нашли широкое применение в качестве индикаторов внутриклеточного Ca^{2+} как для оценки концентрации внутриклеточного Ca^{2+} в стационарных условиях [Blinks et al., 1976], так и при исследовании его динамики в ответ на стимуляцию клеток [Blinks et al., 1982; Campbell et al., 1985; Blinks, 1986, 1989]. Успешное клонирование генов, кодирующих апофотопротеины, открыло новые возможности использования фотопротеинов в качестве внутриклеточных индикаторов кальция. Апофотопротеин экспрессируется в клетке, затем снаружи добавляется целнтеразин, который свободно проникает через мембрану внутрь клетки, где происходит образование активного фотопротеина [Knight et al., 1991; Rizzuto et al., 1992; Alvarez, Montero, 2002]. Такие клетки имеют, по существу, «встроенный» индикатор кальция. Этот подход ценен тем, что не требует таких трудоемких процедур, как микроинъекция фотопротеина в клетку или «загрузка» фотопротеина в клетку с помощью липосом. Такой подход опробован для акворина, обелина, клитина и митрокомина [Malikova et al., 2014]. Тем не менее, широко используется только акворин, отчасти потому, что был первым открытым фотопротеином, а также из-за его большей доступности. Но акворин имеет ряд недостатков, ограничивающих его использование. Он слишком медленно реагирует на повышение концентрации кальция, что не позволяет исследовать быстрые внутриклеточные изменеия кальция без искажений, а физиологические концентрации магния еще сильнее замедляют кинетику [Blinks et al., 1982]. Хотя диапазон чувствительности акворина к кальцию подходит для большинства внутриклеточных исследований, существуют процессы, для изучения которых полезно иметь фотопротеины с более высокой или более низкой чувствительностью к кальцию. Другие Ca^{2+}-регулируемые фотопротеины могут отличаться от акворина в этом отношении. К примеру, обелин значительно быстрее реагирует на добавление кальция и относительно нечувствителен к

физиологической концентрации магния [Illarionov et al., 2000; Markova et al., 2002].

Как и для фотопротеинов гидромедуз, зависимость биолюминесценции беровина от концентрации кальция является сигмоидной (рис. 4.4) с максимальным наклоном 2,5, т.е., как и для фотопротеинов гидромедуз, для свечения беровина необходимо связывание трех ионов кальция [Illarionov et al., 2000; Markova et.al., 2002]. Беровин реагирует на изменения $[Ca^{2+}]$ в диапазоне от 10^{-8} М до 10^{-4} М. В этом диапазоне интенсивность биолюминесценции в ответ на изменения концентрации кальция изменяется более чем на 7 порядков.

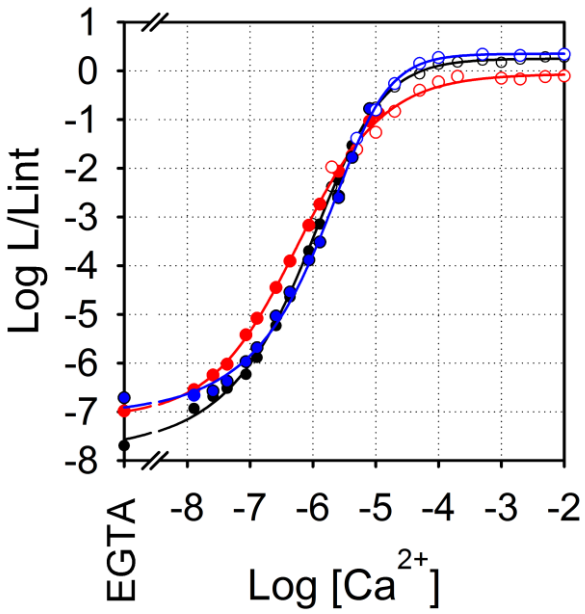


Рисунок 4.4 – Зависимость интенсивности биолюминесценции от $[Ca^{2+}]$ для рекомбинантных беровина (● и ○), акворина (● и ○) и обелина из *O. longissima* (● и ○) при 20°C. Заполненные символы – Ca-ЭГТА буферы; открытые символы – разведения $CaCl_2$. L – максимальная интенсивность биолюминесценции при данной $[Ca^{2+}]$, L_{int} – весь свет, полученный от идентичного образца при смешивании с насыщающей $[Ca^{2+}]$ в тех же условиях. Данные представлены в двойных логарифмических координатах.

Хотя зависимость биолюминесценции беровина от концентрации Ca^{2+} похожа на таковую обелина и акворина, есть некоторые заметные различия. Беровин

демонстрирует более высокую чувствительность к кальцию, чем обелин, так как реагирует на изменение кальция при более низких концентрациях (рис. 4.4). Это может быть обусловлено более высокой аффинностью к кальцию I и III Ca^{2+}-связывающих сайтов. Кроме того, Ca^{2+}-независимая люминесценция беровина почти на порядок ниже, чем у обелина и акворина.

Кажущаяся константа диссоциации (K_d), характеризующая чувствительность беровина к кальцию, определенная с помощью модели [Allen et al., 1977; Malikova et al., 2014] из зависимости интенсивности биолюминесценции от [Ca^{2+}], составила 40 ± 3 нМ, т.е. чувствительность беровина к Ca^{2+} почти такая же, как у акворина (45 ± 5 нМ), но выше, чем у обелина (91 ± 10 нМ).

4.5 Люциферазная активность апо-беровина

Способность апофотопротеинов гидромедуз катализировать биолюминесцентное окисление целентеразина в присутствии ионов кальция была описана ранее [Shimomura, Shimomura, 1981; Shimomura, 2006]. Однако в отличие от этих апобелков, апо-беровин катализирует биолюминесцентное окисление целентеразина даже без кальция.

Наибольшая люциферазная активность наблюдается при нейтральных значениях pH (рис. 4.5А). Увеличение ионной силы до 0,2 М NaCl при pH 6,5 повышает активность до ~30%, но более высокие концентрации NaCl ингибируют люциферазную активность апо-беровина. Однако люциферазная активность апо-беровина низка по сравнению с активностью известных целентеразин-зависимых люцифераз и составляет не более ~1% активности люциферазы из *Renilla muelleri* [Titushin et al., 2008] при тех же условиях. Спектр люциферазной биолюминесценции апо-беровина не зависит от pH, а его максимум сдвигается на 15 нм в длинноволновую область (λ_{max} = 505 нм) по сравнению со спектром биолюминесценции, индуцированной кальцием (λ_{max} = 490 нм), (рис. 4.5Б). Различие спектров Ca^{2+}-зависимой и люциферазной биолюминесценции беровина предполагает структурные отличия в окружении целентеразина, поскольку смещение спектра излучения в красную область свидетельствует о более

полярном окружении эмиттера [Imai et al., 2001; Mori et al., 2006]. Температурный оптимум люциферазной реакции беровина наблюдается при 13°C, т.е. примерно при такой же температуре, как и Ca^{2+}-зависимая биолюминесценция (рис. 4.5В).

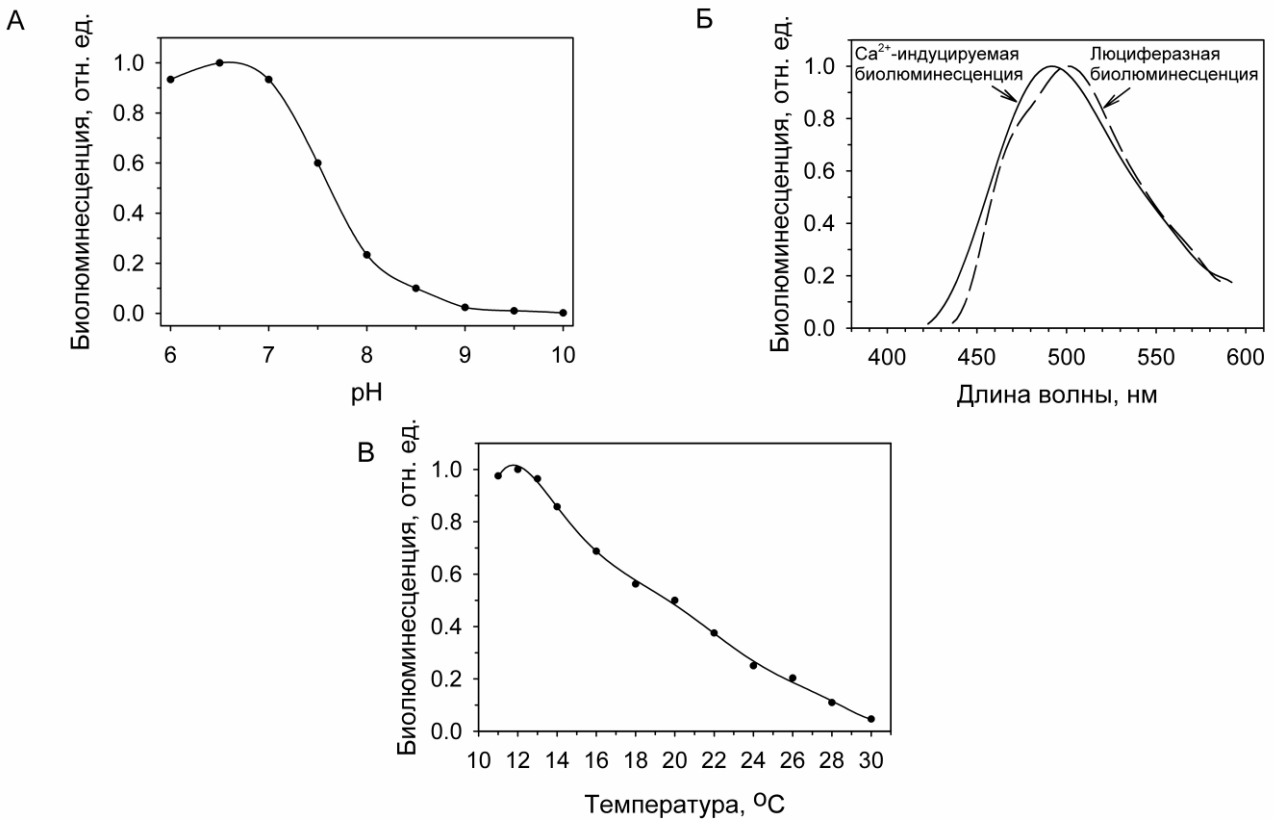


Рисунок 4.5 – Люциферазная активность апо-беровина. (А) Влияние pH. Измерения проводились при комнатной температуре путем впрыска 10 мкл апо-беровина с концентрацией $3x10^{-5}$ М в ячейку люминометра, содержащую 490 мкл 50 мМ бис-Трис-пропан-HCl с pH 6,0-10,0, 5 мМ ЭДТА и 6 х 10^{-7} М целентеразина. (Б) Спектры Ca^{2+}-индуцируемой (–) и люциферазной (--) биолюминесценции при pH 7,0. (В) Зависимость максимальной интенсивности от температуры. Точки на графике показаны как среднее трех независимых экспериментов.

В отличие от фотопротеинового комплекса беровина, облучение светом видимого диапазона длин волн не влияет на люциферазную активность апо-беровина. Исследования реакции хемилюминесценции имидазолпиразинонов с O_2 в неполярных растворителях позволили предложить механизм формирования

перекисных дериватов целентеразина [Goto, 1968; Goto et al., 1968; Kondo et al., 2005]. Первым этапом является депротонирование N7 целентеразина с образованием целентеразин- аниона. Одноэлектронный перенос от целентеразин-аниона к триплетному кислороду приводит к образованию радикала целентеразина и супероксид-аниона кислорода. Взаимодействие радикала целентеразина и супероксид-аниона приводит к образованию пероксид-аниона целентеразина. В случае биолюминесцентной реакции, катализируемой люциферазой, происходит циклизация пероксид-аниона целентеразина, приводящая к образованию диоксиэтанона, который разлагается с потерей CO_2 и генерацией синглетного возбужденного состояния целентерамида [Kondo et al., 2005]. Скорее всего, в ходе люциферазной реакции беровина чувствительный к действию света интермедиат не образуется, поэтому она не чувствительна к облучению.

Таким образом, хотя степень идентичности аминокислотной последовательности беровина с аминокислотными последовательностями фотопротеинов гидромедуз не превышает 25%, физико-химические свойства рекомбинантного беровина во многом схожи со свойствами рекомбинантных фотопротеинов гидромедуз. К отличительным свойствам беровина можно отнести: максимум поглощения при 437 нм, более высокую чувствительность к Ca^{2+} и фотоинактивацию фотопротеина под действие света видимого диапазона.

ГЛАВА 5 Влияние физиологической концентрации ионов магния на биолюминесценцию беровина

5.1 Влияние Mg^{2+} на чувствительность беровина к Ca^2

Аналогично другим Ca^{2+}-связывающим белкам, Ca^{2+}-регулируемые фотопротеины функционируют в клетках в присутствии 10^2-10^4-кратного избытка Mg^{2+} по отношению к Ca^{2+}. На рисунке 5.1 показана зависимость интенсивности биолюминесценции рекомбинантного беровина и двух фотопротеинов гидромедуз, акворина и обелина от концентрации Ca^{2+} с 1 мМ Mg^{2+} и без него.

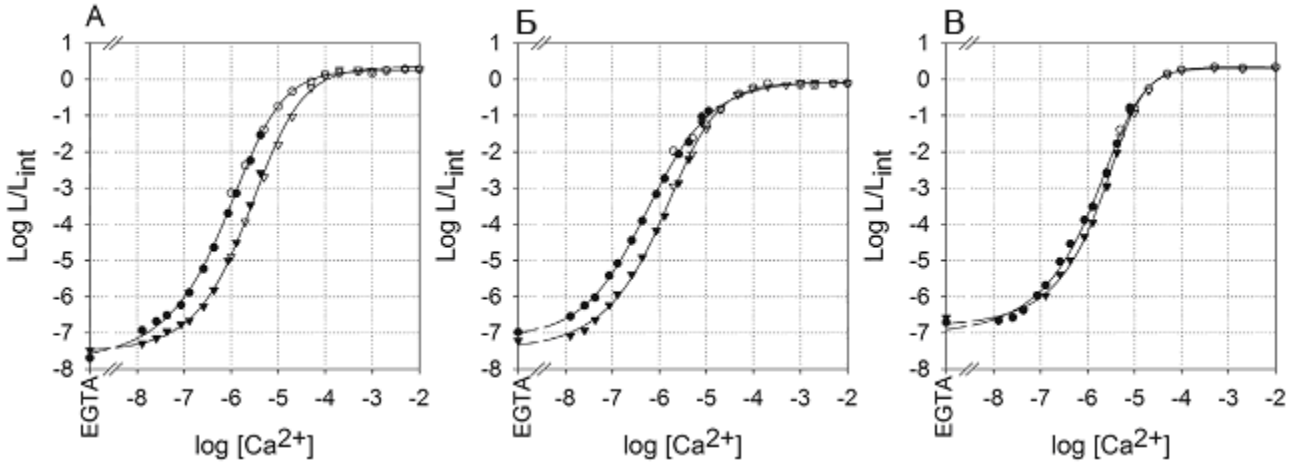


Рисунок 5.1 – Зависимость интенсивности биолюминесценции от концентрации Ca^{2+} для рекомбинантных беровина (А), акворина (Б) и обелина из *O. longissima* (В) без (●) и с (▼) 1 мМ Mg^{2+}. Заполненные символы – Ca-ЭГТА, буферы; открытые символы – разведения $CaCl_2$. L – максимальная биолюминесцентная активность при данной $[Ca^{2+}]$, L_{int} – общий свет, полученный от идентичного образца при смешивании с насыщающей $[Ca^{2+}]$ в тех же условиях. Данные представлены в двойных логарифмических координатах. Перед измерениями образцы фотопротеинов были предварительно уравновешены 1 мМ Mg^{2+} в течение 1 ч. Измерения проводились при 20°С.

Как видно из представленных зависимостей, Mg^{2+} заметно влияет только на беровин и акворин, но не влияет на обелин. Несмотря на то, что 1 мМ Mg^{2+}

сдвигает кривую зависимости интенсивности биолюминесценции беровина от Ca^{2+} вправо, как и у акворина, эффект для беровина, тем не менее, другой. Если для акворина зависимости с Mg^{2+} и без него становятся идентичными при концентрации Ca^{2+}, близкой к насыщающей (рис. 5.1Б), то в случае беровина присутствие 1 мМ Mg^{2+} сдвигает зависимость как в области насыщающих, так и низких концентраций Ca^{2+} (рис. 5.1А). Как и в случае акворина (K_d = 83 ± 5 нМ) и обелина (K_d = 132 ± 11 нМ), ионы магния в физиологической концентрации снижают чувствительность беровина к Ca^{2+} (K_d = 125 ± 22 нМ). Эффект более выражен для беровина, чем для акворина и обелина, что, по-видимому, вызвано отличием сродства Ca^{2+}-связывающих сайтов этих фотопротеинов к Mg^{2+}.

В бескальциевых условиях фотопротеины показывают очень низкий уровень эмиссии света (так называемая Ca^{2+}-независимая люминесценция [Allen et al., 1977]), что является результатом спонтанной реакции декарбоксилирования связанного 2-гидропероксицелентеразина за счет структурных флуктуаций в молекуле белка. Влияние Mg^{2+} на уровень Ca^{2+}-независимой люминесценции также отличается для беровина, акворина и обелина. В случае акворина 1 мМ Mg^{2+} снижает уровень Ca^{2+}-независимой люминесценции, в то время как Ca^{2+}-независимымая люминесценция беровина и обелина незначительно повышается в присутствии Mg^{2+} (рис. 5.1).

5.2 Влияние Mg^{2+} на кинетику биолюминесцентной реакции

Кинетику биолюминесценции беровина исследовали методом «остановленной струи» при 0,1 и 20 мМ кальция без и в присутствии физиологической концентрации Mg^{2+} (рис. 5.2, таблица 5.1). Среди Ca^{2+}-регулируемых фотопротеинов, кинетика которых исследована методом «остановленной струи», константа скорости подъема биолюминесцентного сигнала беровина самая медленная. Даже у акворина, наиболее «медленного» из фотопротеинов гидромедуз (k_{rise} = 123 ± 1 c^{-1}) [Malikova et al., 2014], значение k_{rise} в 6 раз выше, чем у беровина. Присутствие Mg^{2+} не влияет

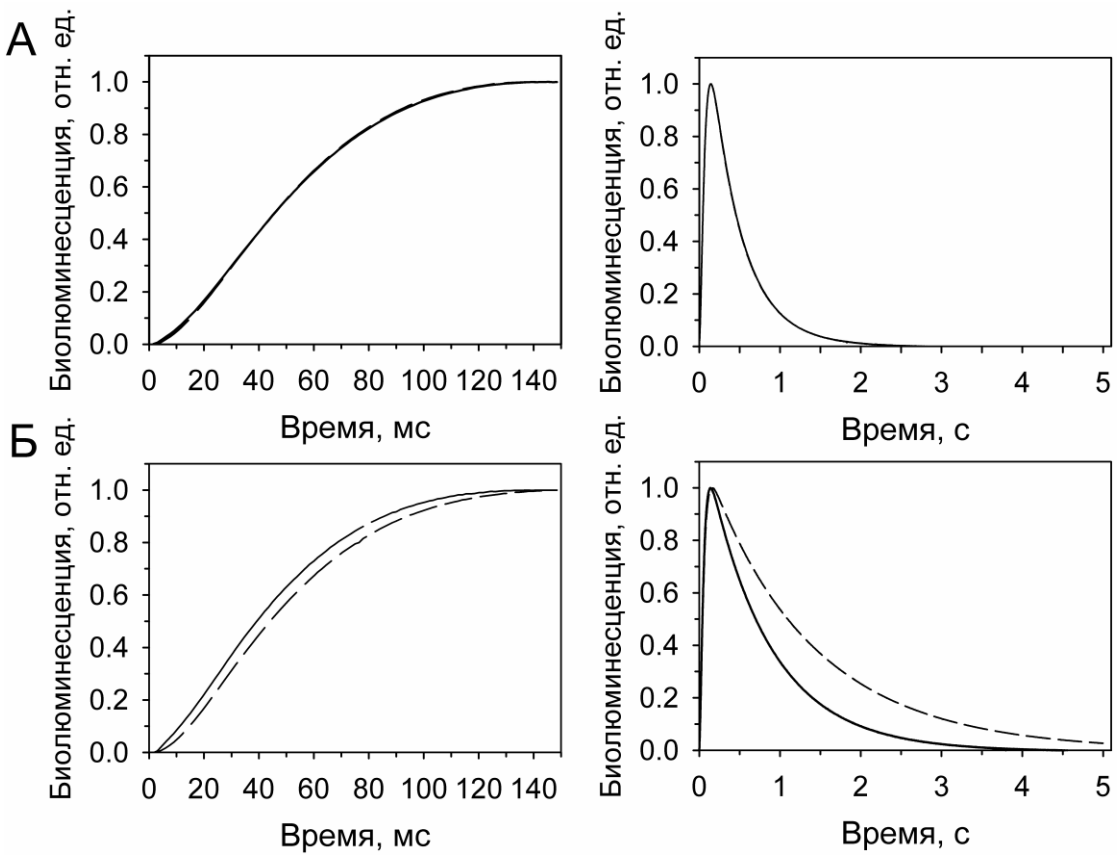


Рисунок 5.2 – Фаза подъема светового сигнала (слева) и полный биолюминесцентный сигнал (справа) беровина с 20 мМ Ca^{2+} (А) и 0,1 мМ Ca^{2+} (Б) без (–) и с (--) 1 мМ Mg^{2+}. Запись начинается с момента остановки потока, каждая кривая нормирована на свой собственный максимум. Беровин был уравновешен 1 мМ Mg^{2+} в течение 1 ч до измерения. Измерения проводили при 20°С.

на k_{rise} при 20 мМ Ca^{2+} (рис. 5.2А, слева), но слегка замедляет скорость подъема светового сигнала беровина при 0,1 мМ Ca^{2+} (рис. 5.2Б, слева). Эффект Mg^{2+} на k_{rise} при 0,1 мМ Ca^{2+} очень похож на влияние 1 мМ Mg^{2+} на подъем биолюминесцентного сигнала в случае обелина, клитина и митрокомина [Malikova et al., 2014]. Тем не менее, в отличие от беровина, эффект Mg^{2+} для этих фотопротеинов проявляется даже при насыщающих [Ca^{2+}] около 20 мМ. Наиболее сильное влияние Mg^{2+} на фазу подъема наблюдается для акворина, где в присутствии 1 мМ Mg^{2+} k_{rise} снижается почти в два раза.

Кинетика спада биолюминесцентного сигнала беровина может быть описана с помощью одной константы (таблица 5.1), аналогично акворину

[Malikova et al., 2014]. Среди Ca^{2+}-регулируемых фотопротеинов, кинетика которых исследована с помощью метода «остановленной струи», константа скорости подъема биолюминесцентного сигнала беровина самая медленная. Даже у акворина, самого «медленного» (k_{rise} = 123 ± 1 c^{-1}) из фотопротеинов гидромедуз, скорость подъема светового сигнала в 6 раз больше, чем у беровина. Присутствие физиологической концентрации Mg^{2+} не влияет на значение k_{rise} при 20 мМ Ca^{2+}, но слегка замедляет скорость подъема биолюминесцентного сигнала беровина при 0,1 мМ (рис. 5.2Б, слева).

Таблица 5.1 – Кажущиеся константы скорости подъема и спада биолюминесцентного сигнала рекомбинантного беровина без и в присутствии 1 мМ Mg^{2+}

[Ca^{2+}], мМ	k_{rise} (c^{-1})		k_{decay} (c^{-1})	
	без Mg^{2+}	с 1 мМ Mg^{2+}	без Mg^{2+}	с 1 мМ Mg^{2+}
20	16,3 ± 0,08	16,1 ± 0,1	2,50 ± 0,01	2,52 ± 0,01
0,1	20,3 ± 0,07	17,4 ± 0,1	1,29 ± 0,01	0,76 ± 0,01

Аналогично фотопротеинам гидромедуз акворину и митрокомину, кинетика спада биолюминесцентного сигнала беровина может быть охарактеризована одной константой скорости. Однако тогда как скорость подъема светового сигнала беровина значительно меньше, чем для фотопротеинов гидромедуз, скорость спада биолюминесцентного сигнала беровина выше, чем в случае акворина (k_{decay} = 0,81 ± 0,01 c^{-1}), клитина (k_{decay} = 0,88 ± 0,01 c^{-1}) и митрокомина (k_{decay} = 1,10 ± 0,01 c^{-1}), но существенно ниже, чем для обелина ($k1_{decay}$ = 40,00 ± 1,75 c^{-1}, $k2_{decay}$ = 4,80 ± 0,05 c^{-1}) [Malikova et al., 2014]. Аналогично, Mg^{2+} влияет на скорость спада биолюминесценции беровина только при 0,1 мМ Ca^{2+} (рис. 5.2Б, справа) (1 мМ Mg^{2+} уменьшает величину k_{decay} более, чем в 1,5 раза) и не имеет эффекта при насыщающих концентрациях Ca^{2+} (рис. 5.2А, справа). Следует отметить, что в случае фотопротеинов гидромедуз 1 мМ Mg^{2+} снижает скорость спада биолюминесцентной реакции даже при насыщающих концентрациях Ca^{2+}

[Malikova et al., 2014]. Отличающийся эффект ионов магния на чувствительность к кальцию и кинетику биолюминесценции беровина, акворина и обелина, по-видимому, обусловлен разной аффинностью Ca^{2+}-связывающих сайтов этих фотопротеинов к Mg^{2+}.

Хотя все известные на сегодняшний день Ca^{2+}-регулируемые фотопротеины содержат три Ca^{2+}-связывающих петли типа EF-hand, состоящие из 12 аминокислотных остатков, их аминокислотные последовательности отличаются в беровине, акворине и обелине (рис. 5.3). Этими различиями, особенно в остатках,

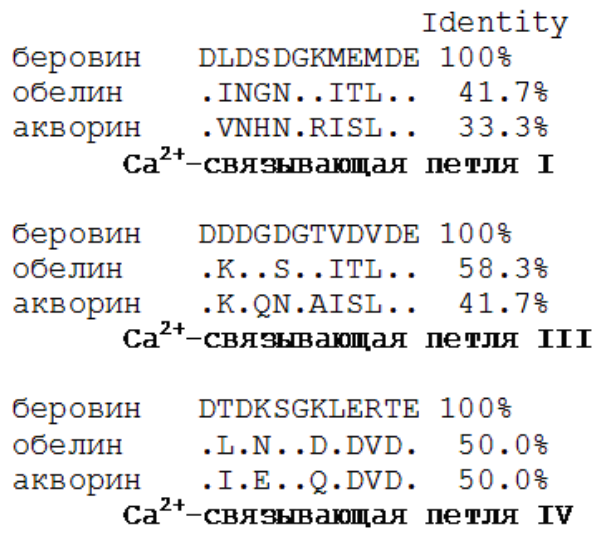


Рисунок 5.3 – Сравнение аминокислотных последовательностей Ca^{2+}-связывающих петель беровина с таковыми обелина и акворина. Точками обозначены позиции с идентичными аминокислотными остатками.

являющихся донорами кислорода для координации катионов (позиции 1, 3, 5, 7, 9 и 12), вероятно, можно объяснить различное сродство Ca^{2+}-связывающих петель к Mg^{2+}, что может быть причиной его его различного влияния на чувствительность фотопротеинов к Ca^{2+}, и то, почему в акворине только два его Ca^{2+}-связывающихсайта могут связывать магний. Хотя предпринято много попыток выявить ключевые остатки, определяющие принадлежность петель Ca^{2+}-связывающих белков либо к Ca^{2+}-специфическому, либо к смешанному Ca^{2+}/Mg^{2+}-типу, механизм такой селективности по-прежнему неясен.

Константы k_{rise} и k_{decay} используются для описания стадии окислительного декарбоксилирования связанного 2-гидропероксицелентеразина и конформационных изменений в белке в ответ на связывание Ca^{2+} в кинетической модели биолюминесцентной реакции фотопротеина акворина [Hastings et al., 1969]. Рядом с атомом N1 2-гидропероксицелентеразина в полости фотопротеина находится молекула воды, которая, как предполагается, участвует в реакции декарбоксилирования субстрата, протонируя анион диоксиэтанона [Vysotski, Lee, 2004; Liu et al., 2006]. Кристаллическая структура мутанта обелина Y138F выявила отсутствие у него во внутренней полости этой молекулы воды [Natashin et al., 2014 A]. Этот мутант демонстрирует гораздо более медленную кинетику подъема светового сигнала по сравнению с обелином дикого типа [Natashin et al., 2014 A], что является дополнительным подтверждением предлагаемой гипотезы. Структура связанного с субстратом беровина пока не определена, но, принимая во внимание то, что механизм биолюминесценции ктенофор, скорее всего, такой же, как у фотопротиеинов гидромедуз, а значение k_{rise} для беровина намного меньше, чем даже для медленного акворина, можно предположить, что соответствующая молекула воды во внутренней полости беровина также может отсутствовать. Это и может быть причиной медленной кинетики подъема биолюминесцентного сигнала по сравнению с фотопротеинами гидромедуз.

5.3 Влияние Mg^{2+} на стабильность беровина

Показано, что магний имеет стабилизирующее воздействие на акворин [Ohashi et al., 2005]. Протестировано влияние физиологической концентрации Mg^{2+} на такие свойства беровина, как термостабильность и светочувствительность (рис. 5.4). Эти эксперименты проводились со свободным от ЭДТА беровином в буфере 150 мМ KCl, 5 мМ PIPES, pH 7,0, который имитирует свободную от Ca^{2+} внутриклеточную среду. В противоположность акворину, для которого добавление ионов магния усиливает его термостабильность [Ohashi et al., 2005], наличие 1 мМ Mg^{2+} лишь немного повышает термостабильность беровина при

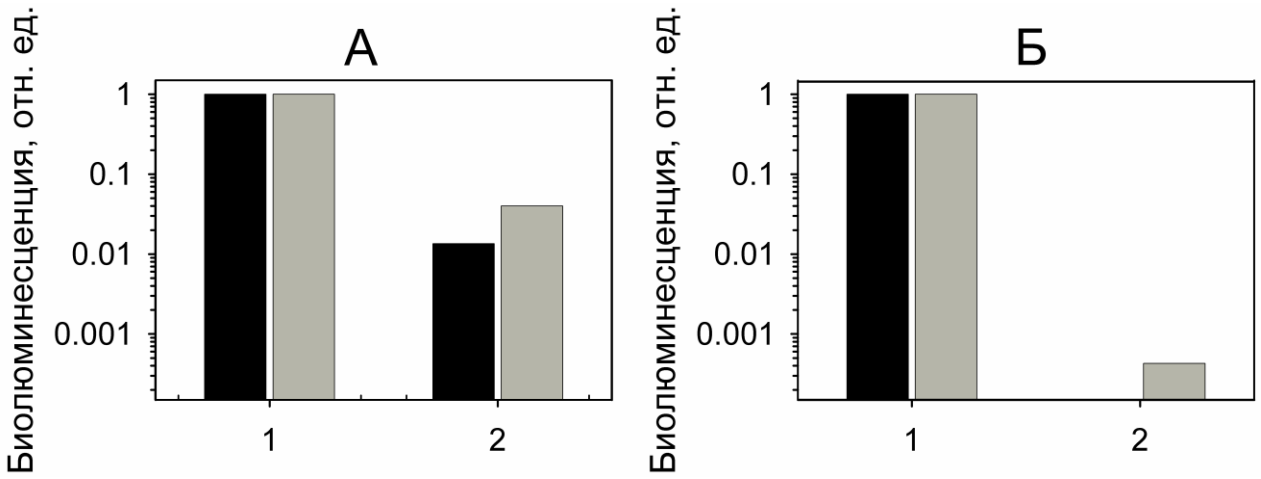


Рисунок 5.4 – Биолюминесцентная активность до (1) и после (2): (А) инкубации беровина в течение 6 ч при 23ºС в темноте и (Б) при облучении видимым светом в течение 1 ч, без Mg^{2+} (■) и с 1 мМ Mg^{2+} (■).

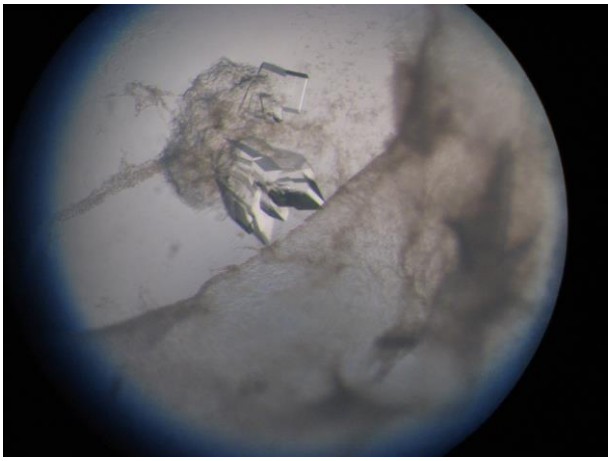
23ºС, а после 6 ч инкубации беровин сохраняет 4 и 1,3% исходной активности с Mg^{2+}и без него, соответственно (рис. 5.4А). Добавление Mg^{2+}несущественно влияет на устойчивость беровина к облучению светом видимого диапазона. Так, после 1 ч облучения беровин сохраняет только 0,043 и 0,002% исходной активности в присутствии и в отсутствие 1 мМ Mg^{2+}, соответственно (рис. 5.4Б). То есть, присутствие ионов магния лишь незначительно повышает термо- и фотостабильность беровина.

Таким образом, отличия в воздействии ионов магния на чувствительность к кальцию и кинетику биолюминесценции беровина, акворина и обелина, по-видимому, обусловлены разной аффинностью Ca^{2+}-связывающих сайтов этих фотопротеинов к Mg^{2+}. Низкая скорость подъема светового сигнала беровина может объясняться отсутствием каталитической молекулы воды вблизи N1 атома 2-гидропероксицелентеразина в субстрат-связывающей полости беровина.

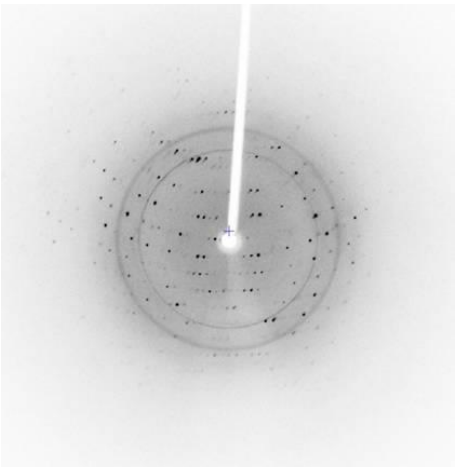
ГЛАВА 6 Пространственная структура апо-беровина с ионами магния

6.1 Получение кристаллов апо-беровина с Mg^{2+}

Для кристаллизации апо-беровин после хроматографической очистки был переведен в буфер, содержащий 2 мМ ЭДТА, 10 мМ Трис-HCl pH 9,0, и сконцентрирован до 14,5 мг/мл. Мелкие кристаллы были обнаружены на 28-й день в лунке планшета B8 PEG-ION при следующих условиях: 20% PEG 3350, 0,1 М бис-Трис-пропан-HCl pH 6,5, 0,2 М формиат магния. Эти условия использованы для оптимизации кристаллизации апо-беровина методом «висячей капли» при 4°C и 16°C. Концентрация вносимого белка в разных лунках была в диапазоне 10-28 мг/мл. Кластер из кристаллов апо-беровина (рис. 6.1А) был



А



Б

Рисунок 6.1 – (А) Кластер из кристаллов апо-беровина, выращенный методом «висячей капли», (Б) Развертка изображения кристалла апо-беровина, полученного с помощью рентгеновского дифракционного анализа.

выращен на 8-й день при 16°C при использовании концентрации апобелка 20 мг/мл. Разрешение единичного кристалла размером 0,05 х 0,1х 0,2 мм при предварительном анализе составило 2,5 Å (рис. 6.1Б). Дифракционные данные,

которые позволили определить пространственную структуру апо-беровина с Mg^{2+}, получены с использованием рентгеновского излучения синхротрона.

В таблице 6.1 приведена кристаллографическая статистика после обработки дифракционных данных и построения пространственной модели апо-беровина с Mg^{2+}, которая помещена в базу данных кристаллических структур белков [Berman et al., 2000] с PDB кодом 5BPJ.

Таблица 6.1 – Данные кристаллографии

Предел разрешения, Å	50,00–1,75 (1,81–1,75)
Длина волны, Å	0,9792
Обработка данных	
Пространственная группа	C2
Размеры элементарной ячейки, Å	a = 94,82, b = 33,16, c = 72,07
Углы элементарной ячейки	α = 90, β = 126,7, γ = 90
Уникальные отражения (свободные)	15170 (576)
Завершенность (%)	83,01 (32,16)
I/σ (I)	20,62 (2,01)
Сокращение	3,20 (1,90)
Усовершенствование модели	
Предел разрешения, Å	24,59–1,75
R_{work} (R_{free}), %	22,19 (40,35); 24,34 (31,50)
Средний B фактор, Å	50,80
Атомы белка (растворителя)	1515 (97)
RMSD длин связи, Å	0,014
RMSD углов связи, °	1,4

6.2 Пространственная структура апо-беровина с Mg^{2+}

Пространственная структура апо-беровина с Mg^{2+} определена с разрешением 1,75 Å. Структура представляет собой состоящую из двух доменов глобулу, как и у других Ca^{2+}-регулируемых фотопротеинов [Vysotski, Lee, 2004; Liu et al., 2006] и Ca^{2+}-зависимого целентеразин-связывающего белка из мягкого

коралла *Renilla muelleri* [Stepanyuk et al., 2008; Stepanyuk et al., 2009] (рис. 6.2).

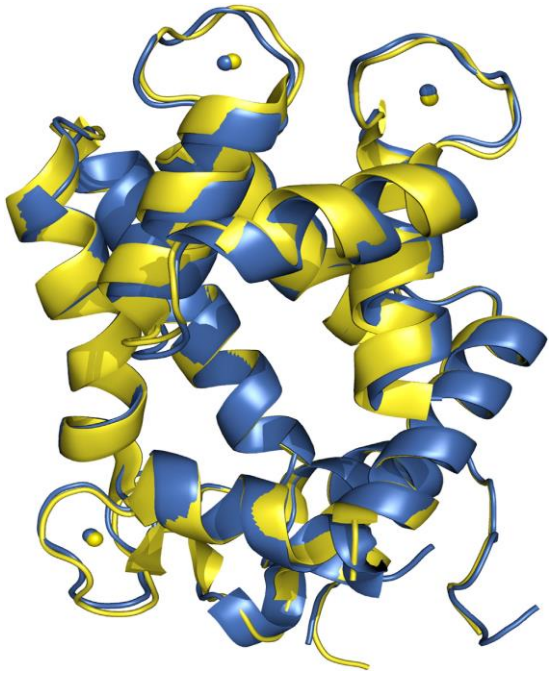


Рисунок 6.2 – Наложение структур апо-беровина, связанного с Mg^{2+} (синий) и Ca^{2+} (желтый). Ионы магния и кальция показаны в виде голубых и желтых сфер, соответственно.

Пространственная структура апо-беровина с Mg^{2+} включает 180 из 208 аминокислот (1515 атомов) и 97 молекул растворителя. Остатки 1-3, 27-36, 59 и 195-208 не видны на картах электронной плотности, что часто наблюдается в других структурах Ca^{2+}-регулируемых фотопротеинов. Хотя в целом структуры апо-беровина, связанного с Mg^{2+} и Ca^{2+}, очень похожи (RMSD для атомов основной и боковых цепей составляет только 0,65 и 1,54 Å, соответственно), между ними есть некоторые различия (таблица 6.2), которые, скорее всего, обусловлены связыванием различных ионов. Например, структурные различия между атомами главной и боковых цепей в EF-hand I и IV больше, чем те, что в EF-hand II и III, а отличия в атомах боковых цепей в Ca^{2+}-связывающих петлях III и IV больше, чем те, что в Ca^{2+}-связывающих петлях I, также способной связывать ионы, и II, не имеющей консенсусной последовательности для координации ионов (таблица 6.2).

Таблица 6.2 – Сравнение пространственных структур апо-беровина, связанного с ионами магния и кальция

Структурные участки	*RMSD атомов главной/боковой цепей, Å
Общая структура (10-193)	0,65/1,19
N-концевой домен (10-122)	0,51/1,13
C- концевой домен (123-193)	0,48/1,16
EF-hand I (36-69)	0,61/1,36
EF-hand II (72-120)	0,29/0,91
EF-hand II (124-158)	0,39/0,77
EF-hand IV(161-193)	0,48/1,39
Петля I (46-57)	0,23/0,64
Петля II (91-102)	0,24/0,68
Петля III (138-149)	0,27/0,59
Петля IV (172-183)	0,25/0,82

*RMSD – среднеквадратичное отклонение, рассчитанное с помощью “Superpose” из CCP4 [Winn et al., 2011].

6.3 Структура Ca^{2+}-связывающих сайтов беровина

Ионы магния обнаружены в каждой из функциональных EF-hand петель I, III и IV апо-беровина (рис. 6.2). В отличие от иона кальция, для координации которого в пределах EF-hand петли требуется семь атомов кислорода (рис. 6.3, справа), Mg^{2+} координируется шестью атомами кислорода, расположенными в плоскости октаэдра. Кислородные лиганды обеспечиваются атомами кислорода карбоновых групп боковых цепей Asp, карбонильных групп пептидной цепи и OH-группы Ser (рис. 6.3, слева). Боковая цепь Glu, расположенная в 12-й позиции каждой Ca^{2+}-связывающей петли, формирует монодентатный лиганд в случае координации Mg^{2+} (рис. 6.3, слева), и бидентатный лиганд – в случае координации Ca^{2+} (рис. 6.3, справа). Интересно отметить, что в апо-беровине не видно

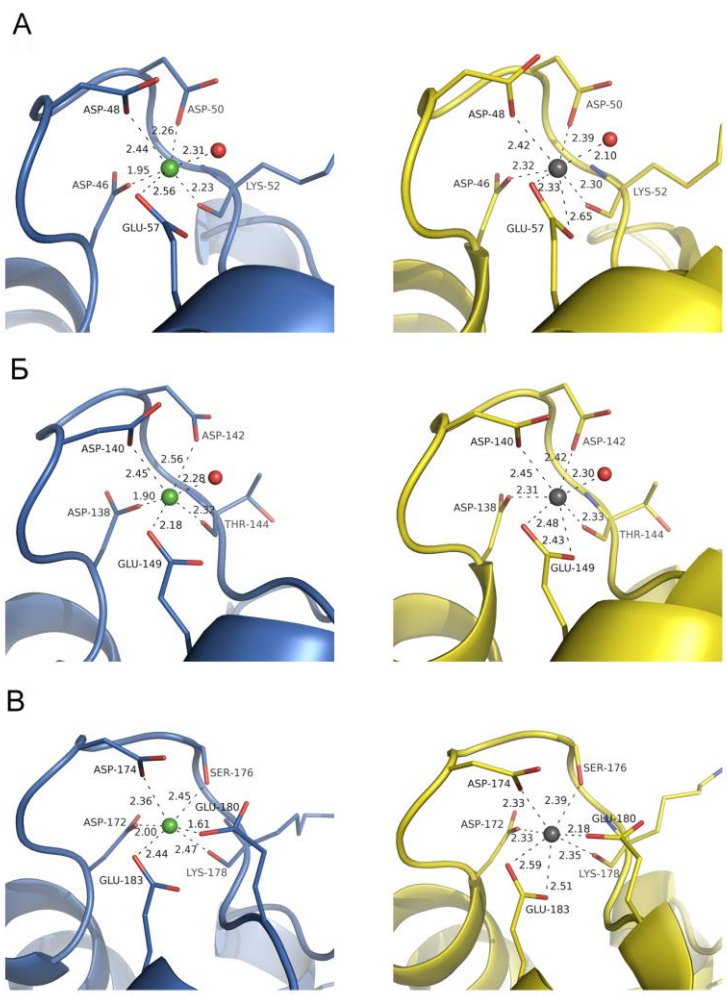


Рисунок 6.3 – Ca^{2+}-связывающие петли I (А), III (Б) и IV (В) апо-беровина, связанные с Mg^{2+} (слева, синий) и Ca^{2+} (справа, желтый, PDB код 4MN0). Ионы магния и кальция показаны в виде зеленых и серых сфер, соответственно. Молекулы воды показаны в виде красных сфер. Расстояния указаны в Å.

вращения связи C_α-C_β Glu, как это, например, имеет место в случае парвальбумина (рис. 6.4В) и которое, как предполагается, играет ключевую роль в адаптации ряда координационных лигандов EF-hand петли к различным катионам [Declercq et al., 1991; Allouche et al., 1999]. Наблюдается только небольшое смещение боковых цепей Glu в позиции 12 EF-hand петель по сравнению со структурой Ca^{2+}-нагруженного апо-беровина. В петелях I и III шестым лигандом является атом кислорода молекулы воды. Среднее расстояние между Mg^{2+} и кислородом составляет 2,29, 2,28 и 2,22 Å для петель I, III и IV,

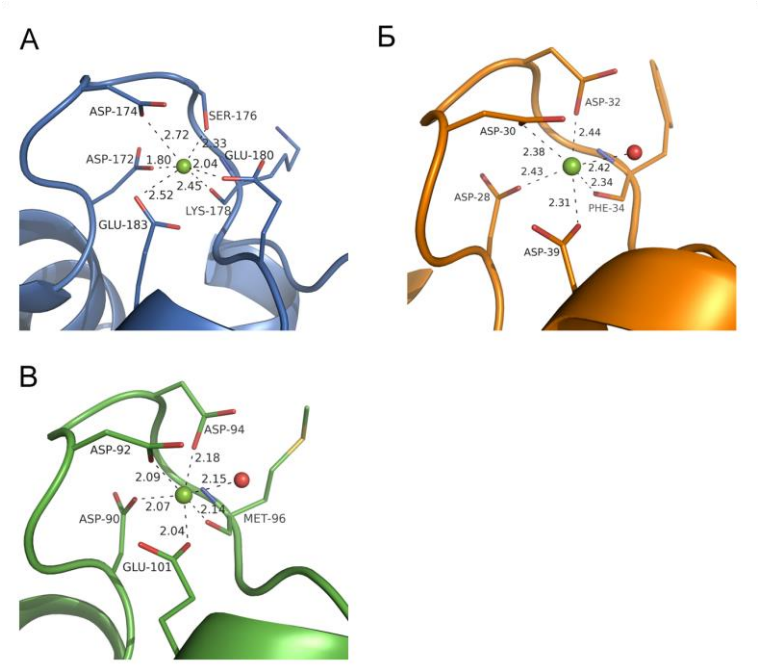


Рисунок 6.4 – Ca^{2+}-связывающие петли: (А) апо-беровина (петля IV), (Б) RLC миозина (PDB код 1WDC) и (В) парвальбумина (PDB код 4PAL), связанные с Mg^{2+}. Ионы магния и молекулы воды показаны в виде зеленых и красных сфер, соответственно. Расстояния указаны в Å.

соответственно (таблица 6.3). Меньшее расстояние по сравнению с расстояниями между Ca^{2+} и кислородным лигандом в EF-hand петлях (в апо-беровине 2,36, 2,39 и 2,38 Å для петель I, III и IV, соответственно) является характерным для координации ионов магния [Strynadka, James, 1989; Gifford et al., 2007]. Следует отметить, что среднее расстояние между Mg^{2+} и лигандами кислорода в апо-беровине несколько больше (таблица 6.3), чем это наблюдалось в петлях EF-hand других Ca^{2+}-связывающих белков (~ 2,1 Å) [Strynadka, James, 1989; Gifford et al., 2007]. Тем не менее, апо-беровин не является исключением в этом отношении; в некоторых EF-hand петлях других Ca^{2+}-связывающих белков, например, в пространственной структуре Mg^{2+}-связанного RLC (регуляторной легкой цепи) миозина [Houdusse, Cohen, 1996] расстояние между магнием и лигандами кислорода также превышает среднее значение (рис. 6.4Б).

Таблица 6.3 – Расстояния между лигандами кислорода и катионами в пространственных структурах апо-беровина

Лиганды кислорода	Апо-беровин, связанный с Ca^{2+}	Апо-беровин, связанный с Mg^{2+}
Ca^{2+}-связывающая петля I (Å)		
Asp46	2,32	1,95
Asp48	2,42	2,44
Asp50	2,39	2,26
Lys52	2,30	2,23
Glu57-OE1	2,65	-
Glu57-OE2	2,33	2,56
Молекула воды	2,10	2,31
Средняя величина	2,36	2,29
Ca^{2+}-связывающая петля III (Å)		
Asp138	2,31	1,90
Asp140	2,45	2,45
Asp142	2,42	2,56
Thr144	2,33	2,32
Glu149-OE1	2,43	-
Glu149-OE2	2,48	2,18
Молекула воды	2,30	2,28
Средняя величина	2,39	2,28
Ca^{2+}-связывающая петля IV (Å)		
Asp172	2,33	2,00
Asp174	2,33	2,36
Asp176	2,39	2,45
Lys178	2,35	2,47
Glu180	2,18	2,61
Glu183-OE1	2,51	-
Glu183-OE2	2,59	2,44
Средняя величина	2,38	2,22

В зависимости от селективности к катионам Ca^{2+}-связывающие сайты EF-hand Ca^{2+}-связывающих белков относят или к смешанным Ca^{2+}/Mg^{2+}, или Ca^{2+}-специфическим. Сродство к Mg^{2+} смешанных Ca^{2+}/Mg^{2+} сайтов значительно выше, чем специфичных к Ca^{2+} [Gifford et al., 2007]. Хотя Ca^{2+}-специфические сайты обладают высокой селективностью к Ca^{2+} в «покоящихся» клетках при низкой $[Ca^{2+}]$, эти сайты могут связывать и Mg^{2+}. Однако в координации катиона участвуют только остатки, расположенные в N-терминальной части Ca^{2+}-связывающей петли в позициях 1, 3, 5 и 7, а две молекулы воды дают еще два дополнительных кислородных лиганда, как, например, это было показано для кальбиндина D_{9K} [Andersson et al., 1997]. Координация Mg^{2+} в Ca^{2+}/Mg^{2+} петлях аналогична координации Ca^{2+} с одним отличием – боковая цепь Glu в 12 позиции обеспечивает два кислородных лиганда при координации Ca^{2+} и один лиганд кислорода – при координации Mg^{2+} (рис. 6.3). Вероятнее всего, все Ca^{2+}-связывающие петли беровина (рис. 6.3, слева) относятся к смешанному Ca^{2+}/Mg^{2+} типу.

Таким образом, пространственная структура апо-беровина с Mg^{2+} поддерживает вывод о том, что влияние физиологической концентрации магния на чувствительность беровина к Ca^{2+} и кинетику его биолюминесцентной реакции прежде всего обусловлено связыванием магния с Ca^{2+}-связывающими сайтами фотопротеина. Отличающееся воздействие Mg^{2+} на фотопротеины из разных организмов, вероятнее всего, обусловлено разной аффинностью Ca^{2+}-связывающих сайтов этих фотопротеинов к Mg^{2+}.

ГЛАВА 7 Роль отдельных аминокислотных остатков в биолюминесценции беровина

7.1 Модель пространственной структуры беровина связанного с 2-гидропероксицелентеразином

Одним из современных подходов к анализу белков с неизвестными структурами является молекулярное моделирование с использованием известных структур аналогичных белков в качестве матриц. Поскольку в настоящее время пространственные структуры беровина с субстратом или продуктом реакции пока не определены, с помощью компьютерного моделирования была получена пространственная структура беровина со связанной во внутренней полости белка молекулой 2-гидропероксицелентеразина. Форма внутренней полости апо-беровина напоминает целентеразин-связывающую полость известных фотопротеинов гидромедуз [Stepanyuk et al., 2013]. Тем не менее, размер целентеразин-связывающей полости таких фотопротеинов гидромедуз, как обелин и акворин, со связанным 2-гидропероксицелентеразином (PDB коды 1QV0 и 1EJ3) составляет 630 и 642 Å [Head et al., 2000; Liu et al., 2003], соответственно, в то время как внутренняя полость апо-беровина, связанного с Ca^{2+}, заметно меньше (554 Å). Этого недостаточно для размещения в ней молекулы целентеразина. Аналогичное уменьшение размера целентеразин-связывающей полости происходит в апо-обелине (486 Å) и апо-акворине (530 Å) с Ca^{2+} [Deng et al., 2005]. Попытка размещения молекулы 2-гидропероксицелентеразина приводит к столкновению между атомами его боковой цепи и атомами соседних аминокислотных остатков. Поэтому молекулу 2-гидропероксицелентеразина невозможно поместить в полости Ca^{2+}-нагруженных апобелков как гидромедуз, так и гребневиков. Для моделирования структуры беровина с увеличенным размером внутренней полости, способной вместить молекулу 2-гидропероксицелентеразина, было взято несколько моделей структуры беровина,

построенных с использованием в качестве матрицы пространственных структур обелина со связанными целентеразином и целентерамидом. Это позволило отобрать наиболее приемлемые варианты, и учесть все возможные способы стыковки белка с лигандом. Модели были построены с помощью веб-серверов Phyre2 и Swiss-Model. Все структурные модели беровина сохраняют ту же архитектуру, что и связанный с Ca^{2+} апо-беровин (RMSD 1,97-2,04 Å), но имеют увеличенный размер гидрофобных полостей (~672 Å). Было показано, что в альфа-спиралях A, B, F и G фотопротеинов гидромедуз происходят самые большие конформационные изменения в ответ на связывание Ca^{2+} [Deng et al., 2005; Liu et al., 2006]. За счет этих альфа-спиралей возможно расширение гидрофобной полости в модельных структурах беровина в свободном от Ca^{2+} состоянии (рис. 7.1).

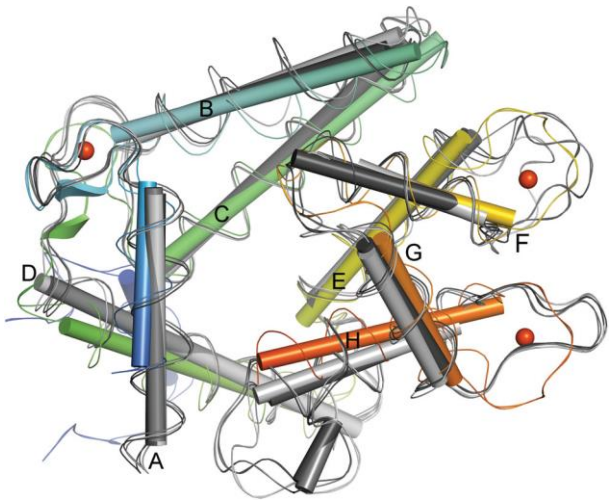


Рисунок 7.1 –-Структура по-беровина, связанного с Ca^{2+} (PDB код 4MN0) и выбранные структурные модели, построенные на основе 1QV0, 1UHK и 1JF0, показаны в разных цветах радуги и в оттенках серого, соответственно. Ионы кальция в структуре апо-беровина показаны в виде красных шаров.

Во внутренних полостях различных Ca^{2+}-регулируемых целентеразин-связывающих белков ориентация субстрата может отличаться от таковой в фотопротеинах гидромедуз. Например, в обелине и акворине, целентеразин ориентирован от N- к С-концевой части полости, в то время как в их близком

структурном гомологе, CBP, молекула целентеразина имеет перпендикулярную ориентацию [Stepanyuk et al., 2008]. В бескальциевой модели беровина во внутренней полости были обнаружены остатки Ser130 (соответствует Ser128 в мнемиопсине) и Tyr134, которые могут взаимодействовать с 2-гидропероксицелентеразином. Было высказано предположение о возможности формирования в мнемиопсине двух водородных связей между основной и боковой цепями остатка Ser128 и основной и боковой цепями остатков Leu182 и Val183, соответственно [Hakiminia et al., 2016].

Из всех полученных моделей пространственной структуры беровина было выбрано три наиболее подходящих с позиции внутримолекулярной энергии связей (рис. 7.2A-B). В первой модели (рис. 7.2A) близость Arg41 и Tyr204 к пероксигруппе 2-гидропероксицелентеразина предполагает, что оба эти остатка могут участвовать в ее стабилизации. Боковые цепи Arg и Lys имеют положительный заряд и часто взаимодействуют с отрицательно заряженными соединениями, связанными с белком – такими, как фосфатные группы или ATP [Schug, Lindner, 2005]. Поэтому можно предположить, что длинная гибкая боковая цепь Arg41 стабилизирует активированный целентеразин, взаимодействуя с отрицательно заряженным пероксианионом. Поскольку беровин наиболее эффективно образует фотопротеиновый комплекс при pH 9,0, в щелочных условиях может происходить ионизация групп боковых цепей аминокислот, например, OH-группы Tyr204. Хотя pK гидроксигруппы тирозина составляет 10,2, эта величина в белке может быть существенно меньше [Harris., Turner, 2002] из-за присутствия положительно заряженной гуанидиновой группы Arg (рис. 7.2A). Остатки Tyr133 и Trp192 находятся в непосредственной близости от атомов N1 и C3 целентеразина, соответственно, что предполагает возможность образования водородных связей между атомами азота и кислорода в 2-гидропероксицелентеразине и боковыми цепями этих остатков, как это происходит в случае фотопротеинов гидромедуз (рис. 7.3). Хотя в связанном с Ca^{2+} апо-беровине (PDB код 4MN0) OH-группа Tyr133 связана с молекулой воды,

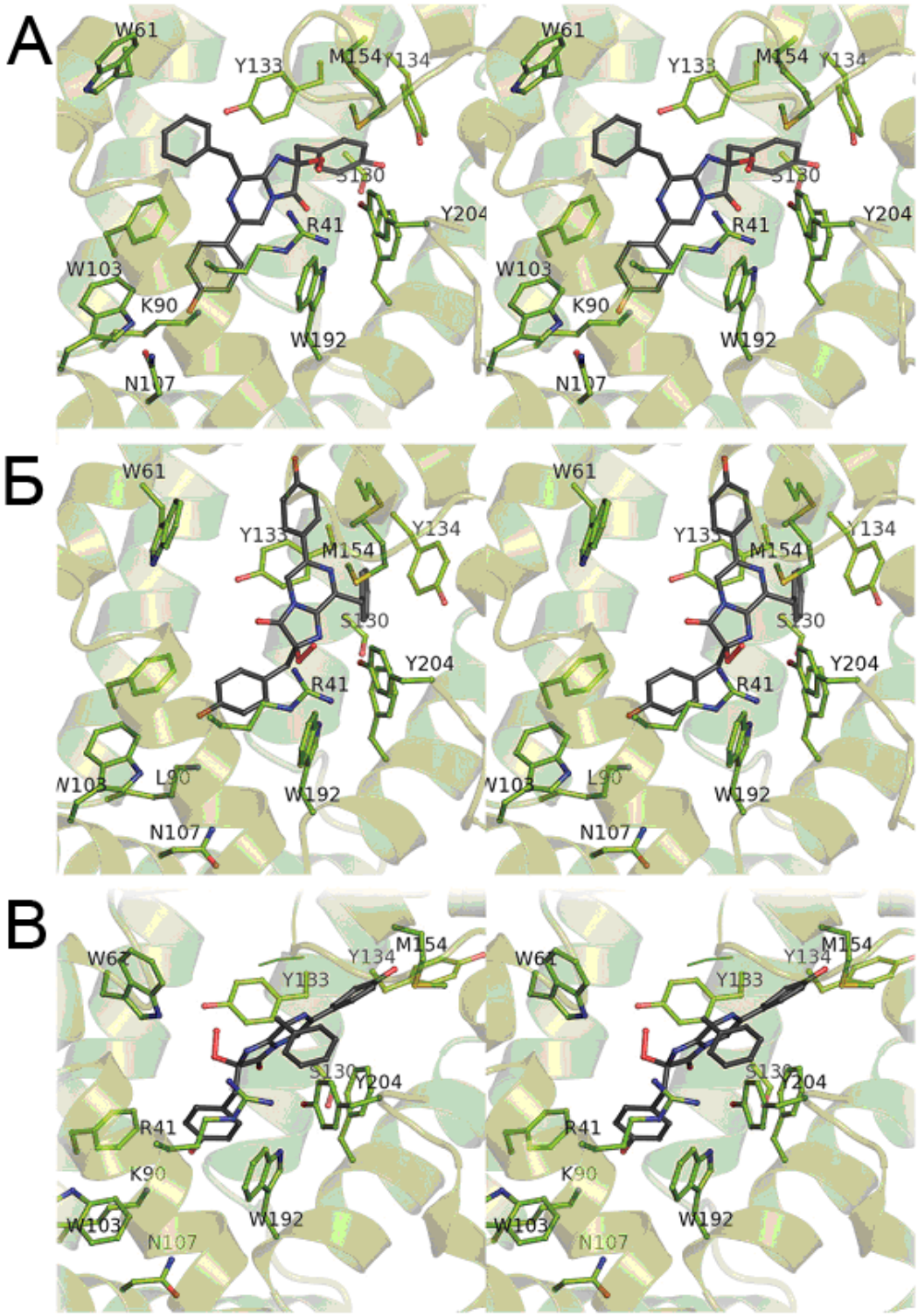


Рисунок 7.2 – (А–В) Стереоизображение предсказанных внутренних полостей в моделях структуры беровина с различной ориентацией встроенного 2-гидропероксицелентеразина. Аминокислоты и 2-гидропероксицелентеразин показаны в виде зеленых и серых стержней, соответственно.

не имеется достоверных данных о том, есть ли в субстрат-связывающей полости активного беровина молекула воды, как в фотопротеинах гидромедуз (рис. 7.3), так как вода не была включена в расчеты. Но поскольку среди Ca^{2+}-регулируемых фотопротеинов [Malikova et al., 2014] беровин, как было показано выше, имеет самую медленную кинетику подъема светового сигнала, которая соответствует стадии окислительного декарбоксилирования связанного субстрата, эта молекула воды, скорее всего, в субстрат-связывающей полости беровина отсутствует.

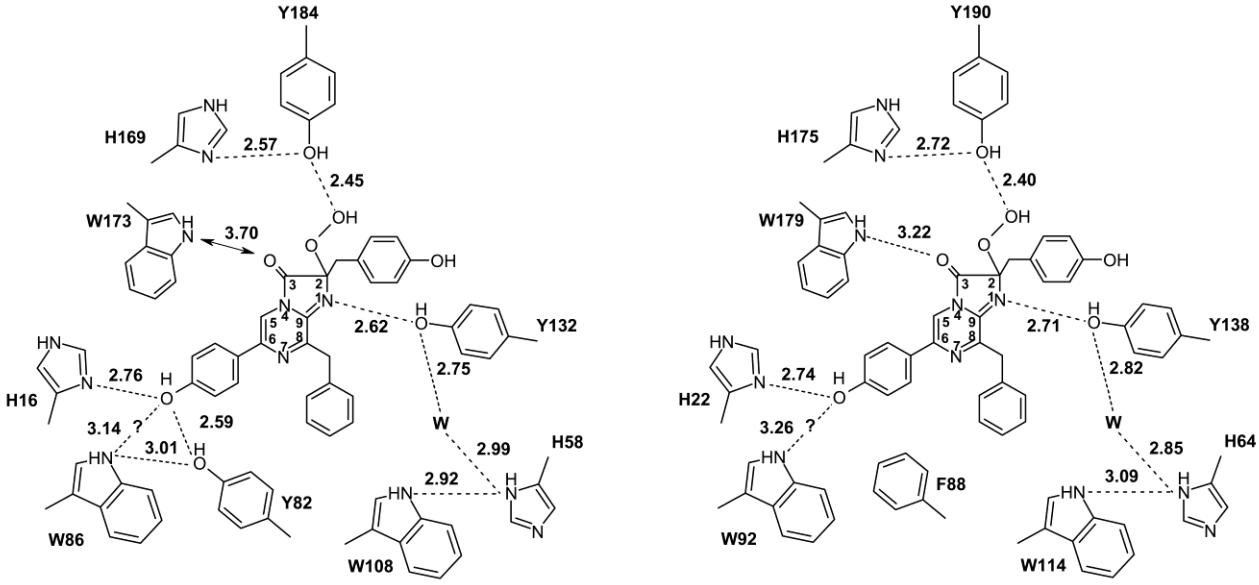


Рисунок 7.3 –Субстрат-связывающие полости акворина (слева) (PDB код 1EJ311) и обелина (PDB код 1QV012) (справа), представляющие собой связанный 2-гидропероксицелентеразин, окруженный триадой His-Trp-Tyr. Водородные связи показаны пунктиром; длины связей указаны в Å; молекулы воды обозначены как W.

Во второй модели (рис. 7.2Б) молекула субстрата развернута на 180°. В этом варианте боковые цепи Arg41 и Tyr204 также могут стабилизировать пероксигруппу целентеразина, но так как молекула субстрата развернута, боковые цепи Trp103, Asn107 и Lys90 находятся в непосредственной близости от 2-гидроксибензильной группы целентеразина, окружение которой не влияет на спектр биолюминесценции фотопротеина.

В третьей модели (рис. 7.2B) пероксид ориентирован в противоположном направлении по сравнению с моделью, представленной на рисунке 7.2A. Такая ориентация увеличивает расстояние между пероксигруппой и гуанидиновой группой Arg41, уменьшая вероятность их кулоновского взаимодействия.

На основе анализа пространственных структур фотопротеинов гидромедуз и изучения свойств мутантов было выдвинуто предположение, что в стабилизации 2-гидропероксогруппы связанного целентеразина участвует триада Tyr-His-Trp [Head et al., 2000; Liu et al., 2006; Eremeeva et al., 2013]. Функциональная роль другой триады Tyr-His-Trp, расположенной вблизи атома N1 2-гидропероксицелентеразина (рис. 7.3), менее ясна. Тем не менее, существует мнение, что эти остатки могут участвовать в реакции декарбоксилирования 2-гидропероксицелентеразина путем протонирования диоксиэтанон-аниона, обеспечивая перенос протона от растворителя [Liu et al., 2006; Eremeeva et al., 2013; Natashin et al., 2014 A]. Также было показано, что замена остатков, расположенных вблизи OH-группы 6-*p*-гидроксифенила, влияет на спектр биолюминесценции и, следовательно, на формирование возбужденного состояния продукта реакции, но практически не влияет на биолюминесцентную активность [Ohmiya et al., 1992; Vysotski et al., 2003; Malikova et al., 2003; Frank et al., 2008; Natashin et al., 2014 B]. Замена Trp173, His169 и Tyr184 в акворине, Trp179, His175 и Tyr190 в обелине приводит к существенному изменению Ca^{2+}-индуцированной биолюминесцентной активности фотопротеинов.

Хотя аминокислотная последовательность беровина включает в себя 7 остатков Tyr, 5 остатков Trp и 3 остатка His, в пространственной структуре апо-беровина и в структурных моделях со «встроенным» 2-гидропероксицелентеразином не было найдено никаких остатков, которые бы образовывали триаду. N-концевая часть внутренней полости беровина весьма полярна: боковые цепи Lys90, Trp103, Asn107 и Arg41 образуют сложную сеть водородных связей с участием 4-х молекул воды [Stepanyuk et al., 2013]. Центральный и C-концевой участки внутренней полости беровина являются более гидрофобными и в основном формируются Tyr133, Tyr134, Tyr204, Trp192,

Met153, Met154, Ser130, двумя остатками Phe и содержат только одну молекулу воды, которая образует водородную связь с OH-группой Tyr133. Фотопротеины гидромедуз содержат шесть остатков триптофана, четыре из которых расположены во внутренней субстрат-связывающей полости [Vysotski et al., 2006]. Беровин же, как и другие фотопротеины ктенофор [Aghamaali et al., 2011; Schnitzler et al., 2012; Powers et al., 2013], содержит пять остатков триптофана, три из которых могут быть расположены в целентеразин-связывающей полости в соответствии с модельными структурами и пространственной структурой апо-беровина [Stepanyuk G.A. et al., 2013]. Остаток Trp192 в беровине соответствует консервативным Trp179 и Trp173 в обелине и акворине, соответственно, и является консервативным во всех фотопротеинах гребневиков.

Таким образом, среди моделей беровина наиболее вероятной представляется первая модель (рис. 7.2A). Но, несмотря на значительные достижения в области построения моделей и широкое применение методов молекулярного докинга, проблему, в частности, представляет подвижность участков белка, которая затрудняет достижение оптимального результата [Sousa et al., 2006]. Поэтому достоверность полученных моделей была оценена с помощью сайт-направленного мутагенеза. Для этого было выбрано 13 аминокислотных остатков (рис. 7.4), боковые цепи которых предположительно

```
  1 MTERLNEQNNESYRYLRSVGNQWQFNVEDLHPKMLSRLYKRFDT
 45 FDLDSDGKMEMDEVLYWPDRMRQLVNATDEQVEKMRDAVRVFFL
 89 HKGVEPVNGLLREDWVEANRVFAEAERERERRGEPSLIALLSNS
133 YYDVLDDDGDGTVDVDELKTMMKAFDVPQEAAYTFFEKADTDKS
177 GKLERTELVHLFRKFWMEPYDPQWDGVYAYKY
```

Рисунок 7.4 – Аминокислотная последовательность беровина (AFE88612). Аминокислотные остатки в беровине, выбранные для мутагенеза, обозначены жирным шрифтом с подчеркиванием и выделены желтым.

участвуют в формировании внутренней полости беровина и координации субстрата: Arg41, Trp61, Lys90, Trp103, Asn107, Ser130, Tyr133, Tyr134, Met153,

Met154, Phe188, Trp192 и Tyr204. Для проверки модели эти остатки, используя метод сайт-направленного мутагенеза, были замены на аминокислотные остатки с различной полярностью и донорно-акцепторными свойствами боковых цепей. Всего был получен и исследован 21 мутант беровина с единичными заменами аминокислотных остатков по 13 позициям.

7.2 Биолюминесцентная активность мутантов беровина

Биолюминесцентная активность является основным показателем, характеризующим способность светящихся белков преобразовывать энергию химических связей в кванты света. Помимо удельной биолюминесцентной активности для всех мутантов были также определены выход активного белка, показывающий способность апобелков образовывать фотопротеиновый комплекс с целентеразином, и люциферазная активность апобелков. Введение гидрофобного Trp в положении 107 вместо Asn (N107W) привело к значительному снижению как удельной биолюминесцентной активности, так и выхода активного фотопротеина (таблица 6.1). Замена Lys90 на Glu (K90E) с отрицательно заряженным боковым радикалом или Met (K90M), боковой радикал которого является гидрофобным, также снижает удельную активность и выход активного фотопротеина. В результате замены Arg41 на Met (R41M) получается мутант с самой низкой удельной активностью (0,0017% от активности беровина дикого типа), в то время как выход активного фотопротеина остается сравнимым с другими мутантами беровина (таблица 7.1). Хотя замена Arg41 на Lys (R41K) также снижает удельную активность, в этом случае снижение активности значительно меньше, чем для мутанта R41M. Это свидетельствует о том, что положительно заряженная основная группа Arg важна для эффективной биолюминесценции беровина. Бóльшая часть мутантов беровина с заменами остатков Tyr демонстрирует низкий уровень удельной активности, за исключением Y204F. Активность этого мутанта такая же, как и у беровина дикого типа (таблица 7.1). Несмотря на то, что эта замена не влияет

Таблица 7.1 – Биолюминесцентные свойства мутантов беровина

Мутант	Удельная биолюминес-центная активность, отн. ед/мг	Относительная удельная биолюминес-центная активность, %	Выход активного белка, %	Удельная люциферазная активность апобелка в бескальциевых условиях, отн. ед/мг
WT	$3{,}0x10^5$	100	50,0	4,0
R41M	5,1	0,0017	5,0	8,0
R41K	$3{,}3 \times 10^3$	1,1	8,0	5,0
W61F	$1{,}1 \times 10^4$	3,7	6,0	$3{,}0 \times 10^2$
K90M	$8{,}1 \times 10^2$	0,27	4,0	$3{,}0 \times 10^3$
K90E	$1{,}8 \times 10^2$	0,06	1,0	$3{,}0 \times 10^3$
W103F	$3{,}0 \times 10^4$	10,0	7,0	$1{,}6 \times 10^2$
W103Y	54,0	0,018	1,0	30,0
N107W	51,0	0,017	5,0	$3{,}0 \times 10^3$
S130A	$3{,}6 \times 10^3$	1,2	0,3	5,0
Y133F	42,0	0,014	0,2	2,0
Y133H	21,0	0,007	1,0	1,0
Y134F	$2{,}2 \times 10^3$	0,73	3,0	90,0
Y134H	$1{,}7 \times 10^5$	56,7	50,0	7,0
M153Y	$1{,}8x10^2$	0,06	1,0	30,0
M154Y	$3{,}0 \times 10^2$	0,1	3,0	20,0
M154Q	$1{,}3 \times 10^3$	0,43	4,5	5,0
F188H	$3{,}0x10^2$	0,1	4	11,8
W192F	39,0	0,013	3,0	90,0
Y204F	$3{,}0 \times 10^5$	100	24,0	6,0
Y204K	7,5	0,0025	1,0	6,0
Y204E	3,0	0,001	4,0	6,0

на удельную активность беровина, появление Phe вместо Tyr уменьшает выход активного белка в 2 раза. Замена того же остатка Tyr на остаток Glu с кислыми

свойствами (Y204E) или на остаток Lys с основными свойствами (Y204K) приводит к почти полной потере биолюминесцентной активности и существенно снижает выход активного белка (таблица 7.1). Замена Tyr133 на Phe (Y133F) или His (Y133H) снижает удельную активность и выход активного белка, но при замене Tyr134 на такие же остатки (Y134F и Y134H) только мутантный Y134F теряет активность и способность формировать активный фотопротеин. В отличие от Y133H, мутант Y134H сохраняет 56,7% от активности беровина дикого типа и тот же выход активного фотопротеина (таблица 7.1). Замена Met153 и Met154 на остатки с более полярными группами боковых цепей (M153Y, M154Y и M154Q) ведет к значительной потере активности и способности образовывать активный фотопротеиновый комплекс. Похожий результат наблюдается и при замене гидрофобного Phe188 на полярный His (F188H) (таблица 7.1). Предполагается, что эти остатки также могут иметь существенное значение для связывания целентеразина. Обращает на себя внимание то, что влияние замещения Tyr133 в беровине гораздо сильнее по сравнению с заменой предположительно соответствующего ему Tyr138 в обелине (рис. 7.3). В то время как мутант обелина Y138F сохраняет 60% от активности обелина дикого типа [Eremeeva et.al., 2013], мутант беровина Y133F сохраняет только 0,014%. Кроме того, мутация Tyr133 значительно снижает выход активного фотопротеина и увеличивает люциферазную активность апобелка (таблица 7.1), что указывает на важность этого остатка Tyr в формировании стабильного фотопротеинового комплекса. Замена Trp192 на Phe значительно снижает активность беровина, а также выход активного белка (таблица 7.1), то есть влияние замещения остатка Trp вблизи C3 карбонильного кислорода на биолюминесценцию аналогично таковому в акворине [Eremeeva et.al., 2013]. Согласно модели пространственной структуры беровина Trp103, Asn107 и Lys90 расположены в N-концевой части субстрат-связывающей полости в непосредственной близости к 6-*p*-гидроксифенильной группе целентеразина (рис. 7.2A). В фотопротеинах гидромедуз аминокислотное окружение 6-*p*-гидроксифенильной группы влияет на ионное состояние эмиттера посредством водородных связей, образованных боковыми группами аминокислот

с ее OH-группой (рис. 6.3) [Natashin et al., 2014 A]. Замены Trp103, Asn107 и Lys90 не только снижают удельную активность и выход активного белка, но и увеличивает люциферазную активность на 2-3 порядка. Апобелки с заменами K90M, K90E и N107W имеют самую высокую люциферазную активность среди всех мутантов беровина (таблица 7.1).

Целентеразин-связывающая полость фотопротеинов гидромедуз содержит четыре консервативные остатка Trp, два из которых образуют сэндвич-структуру с 6-р-гидроксифенильным кольцом целентеразина, а боковые цепи двух других триптофанов локализованы вблизи 2-р-гидроксибензильной группы целентеразина [Head et al., 2000]. Эти остатки Trp имеют важное значение для биолюминесценции фотопротеинов гидромедуз, поскольку их замена на Phe или некоторые другие остатки влияет на биолюминесцентную активность, образование активного фотопротеинового комплекса и спектр излучения [Ohmiya et al., 1992; Vysotski et al., 2003; Malikova et al., 2003; Stepanyuk et al., 2005; Frank et al., 2008; Natashin et al., 2014 B]. Во внутренней полости беровина же, напротив, обнаруживаются только три остатка Trp (Trp61, Trp103 и Trp192). Мутанты с заменами Trp61 (W61F) и Trp103 (W103F) на Phe сохраняют только 3,7 и 10,0% биолюминесцентной активности, соответственно. Выход активного фотобелка для этих мутантов также падает до 6-7% по сравнению с беровином дикого типа (таблица 7.1). Тем не менее, замена Trp103 на Tyr приводит к почти полной потере биолюминесцентной активности (0,013% от активности беровина дикого типа), что по-видимому, может быть обусловлено нарушением сети водородных связей в N-концевой части субстрат-связывающей полости из-за появления OH-группы Tyr. Следует отметить, что мутант мнемиопсина с заменой того же Trp на Tyr (W101Y) сохранил 15% от биолюминесцентной активности мнемиопсина дикого типа [Mahdavi et al., 2013], что выше по сравнению с активностью мутанта беровина приблизительно на 3 порядка. В то же время мутант мнемиопсина W101F показал уровень активности 6% от активности мнемиопсина дикого типа, что сравнимо с активностью подобного мутанта беровина (таблица 7.1). Интересно, что различное влияние одних и тех же мутаций на

биолюминесцентные свойства также были найдены для фотопротеинов гидромедуз [Eremeeva et al., 2013]. Мутант беровина W192F сохраняет 0,013% от активности беровина дикого типа, тогда как аналогичные мутанты обелина и акворина с заменой Trp179 и Trp173, положение которых соответствует Trp192 в беровине, сохраняют 67,0% и 3,5% от активности фотопротеинов дикого типа [Eremeeva et al., 2013]. Кроме того, замены остатков Trp на Phe в беровине приводят к увеличению люциферазной активности апо-беровина (таблица 7.1).

Поскольку главной особенностью, отличающей фотопротеины гребневиков от фотопротеинов гидромедуз, является потеря способности к биолюминесценции при воздействии света, все мутанты, сохраняющие около 1% активности беровина дикого типа (таблица 7.1), были проверены на предмет их фотостабильности. В результате не обнаружено ни одного мутанта, который который был бы устойчив к фотоинактивации.

7.3 Тушение триптофановой флуоресценции апо-беровина и его Trp мутантов целентеразином

Поскольку во внутренней полости беровина, предположительно, находится три остатка триптофана, то с помощью триптофановой флуоресценции мутантов с заменой этих остатков можно проанализировать вклад каждого из них в общую собственную флуоресценцию белка и исследовать взаимодействия между ними. Рисунок 7.5 демонстрирует собственную флуоресценцию апо-беровина, активного беровина и его мутантов с заменой остатков Trp.

Собственная флуоресценция апо-беровина значительно выше по сравнению с таковой заряженного беровина, т.е. образование активного беровина из апобелка, целентеразина и молекулярного кислорода приводит к тушению Trp флуоресценции аналогично процессу, который имеет место в фотопротеинах гидромедуз [Eremeeva et al., 2009]. Следует отметить, что остаточная собственная флуоресценция фотопротеинового комплекса беровина (~30% флуоресценции апо-беровина), превышающая таковую и обелина, и акворина

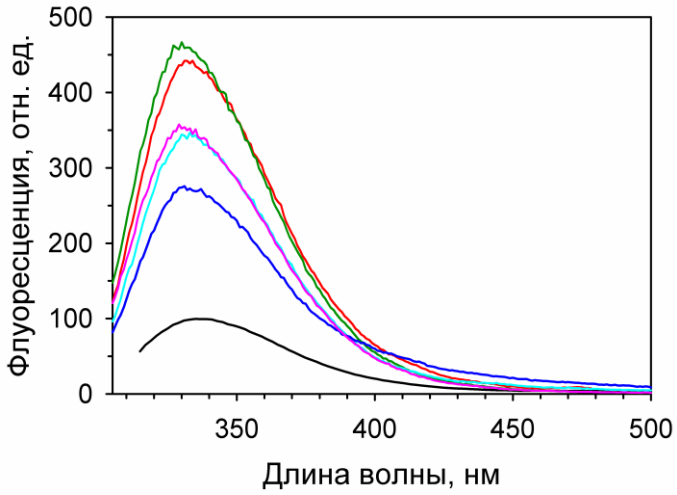


Рисунок 7.5 – Спектры флуоресценции апо-беровина дикого типа (–), беровина, связанного с целентеразином (–), апо-W61F (–), апо-W103F (–), апо-W103Y (–) и апо-W192F (–) мутантов беровина. Длина волны возбуждения – 295 нм. Концентрация белка – 1,22 μM. Все белки были в мономерной форме в соответствии с данными гель-фильтрации.

(~5-6% от флуоресценции апофотопротеинов) [Eremeeva et al., 2009], указывает на то, что связывание целентеразина с апо-беровином тушит флуоресценцию меньшего числа остатков Trp, чем в случае обелина или акворина. Замена Trp103 и Trp192 на Phe приводит к снижению общей флуоресценции апо-беровина почти на 20%. В то же время замена Trp61 даже усиливает флуоресценцию. Возможным объяснением увеличения флуоресценции апо-W61F может быть тушение флуоресценции некоторых остатков Trp в беровине дикого типа боковыми цепями окружающих остатков, но которые могут отсутствовать в мутанте из-за конформационных изменений, вызванных заменой. Тушение Trp флуоресценции апобелка в результате связывания целентеразина было использовано для определения кажущейся константы диссоциации (K_D) комплекса апо-беровина с целентеразином и влияния замены остатков Trp на связывание субстрата (рис. 7.6А,Б; таблица 7.2). Значения K_D для мутантов W61F (2,60 ± 0,30 μM) и

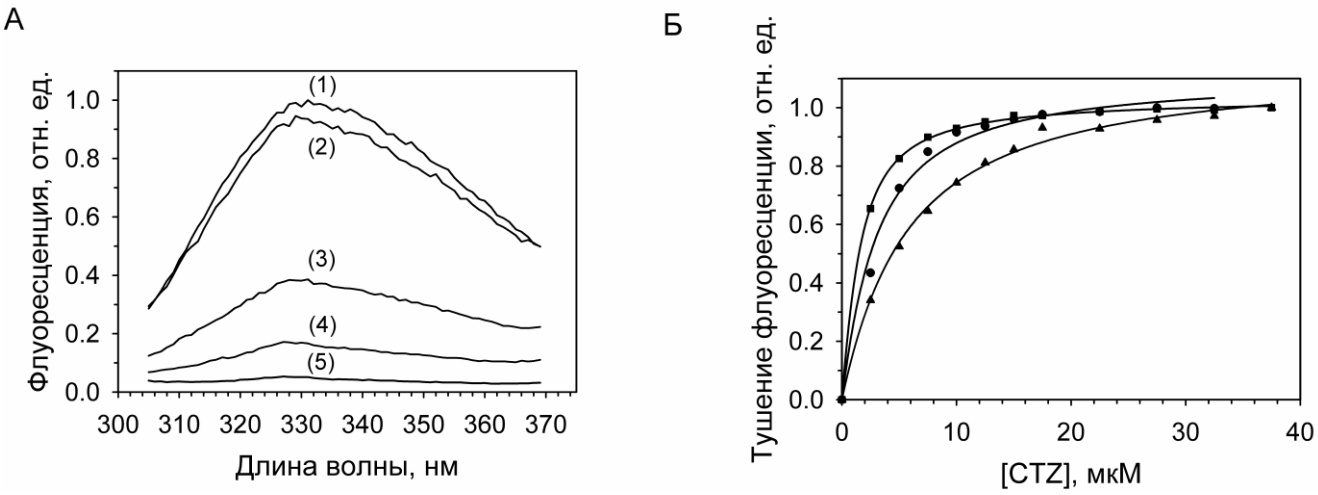


Рисунок 7.6 – Тушение собственной флуоресценции апо-беровина и его триптофановых мутантов при связывании с целентеразином. (А) Влияние целентеразина на собственную флуоресценцию апо-беровина: (1) при отсутствии целентеразина; (2), (3), (4) и (5) с 2,5; 5,0; 10,0 и 32,5 μM целентеразина, соответственно. (Б) Определение кажущихся констант диссоциации комплексов апо-беровин- (●), апо-W192F- (▲) и апо-W103Y (■) – целентеразин с использованием тушения собственной флуоресценции апофотопротеинов при связывании с целентеразином. Данные интенсивности флуоресценции рассчитаны по формуле, приведенной в разделе 2.11. Концентрация апо-беровина и его мутантов – 1,22 μM. Все измерения проводили в трех повторностях.

W103F (2,10 ± 0,23 μM) оказались почти такими же, как для апо-беровина дикого типа (2,40 ± 0,30 μM). Замена Trp103 на Tyr привела к увеличению (1,00 ± 0,03 μM), а замена Trp192 на Phe – к снижению (5,10 ± 0,30 μM) сродства к целентеразину. Хотя аффинность апо-W103Y к субстрату выше, чем у апо-беровина дикого типа (таблица 7.2), его активность и выход активного фотопротеина одни из самых низких. Поскольку остаточная Trp флуоресценция приблизительно одинакова для апо-беровина дикого типа и его Trp мутантов, можно сделать вывод, что в свободном от Ca^{2+} апо-беровине Trp61, 103 и 192 расположены в целентеразин-связывающей полости, как и было предсказано с помощью пространственных моделей (рис. 7.2).

Таблица 7.2 – Кажущиеся константы диссоциации комплекса апофотопротеин-целентеразин

Апофотопротеин	K_D, μM
WT	2,40 ± 0,30
W61F	2,60 ± 0,30
W103F	2,10 ± 0,23
W103Y	1,00 ± 0,03
W192F	5,10 ± 0,30

7.4 Спектральные свойства мутантов беровина

Спектры биолюминесценции были получены только для мутантов беровина с относительно высокой удельной активностью. Большинство спектров биолюминесценции мутантов соответствует спектру биолюминесценции беровина дикого типа. Мутация только двух остатков, Asn107 и Tyr134, приводит к изменению спектра биолюминесценции. Замена Tyr134 на Phe сдвигает максимум излучения в сторону более коротких длин волн (λ_{max} = 482 нм), в то время как замена Asn107 на Trp приводит к смещению спектра биолюминесценции в длинноволновую область (λ_{max} = 535 нм) (рис. 7.7, таблица 7.3). Примечательно, что спектры биолюминесценции N107W и мутанта люциферазы *Renilla*, спектр которого смещен в длинноволновую область и который также использует целентеразин в качестве субстрата для биолюминесценции, совпадают [Loening et al., 2007; Stepanyuk et al., 2010].

Ca^{2+}-регулируемые фотопротеины флуоресцируют в видимом диапазоне длин волн после того, как реакция биолюминесценции прекращается, и когда продукт реакции целентерамид еще связан с белком [Shimomura, 2006]. Тогда как мутации в активном центре беровина незначительно влияют на спектры биолюминесценции, спектры флуоресценции почти всех мутантов отличаются от таковых Ca^{2+}-разряженного беровина дикого типа (таблица 7.3, рис. 7.7).

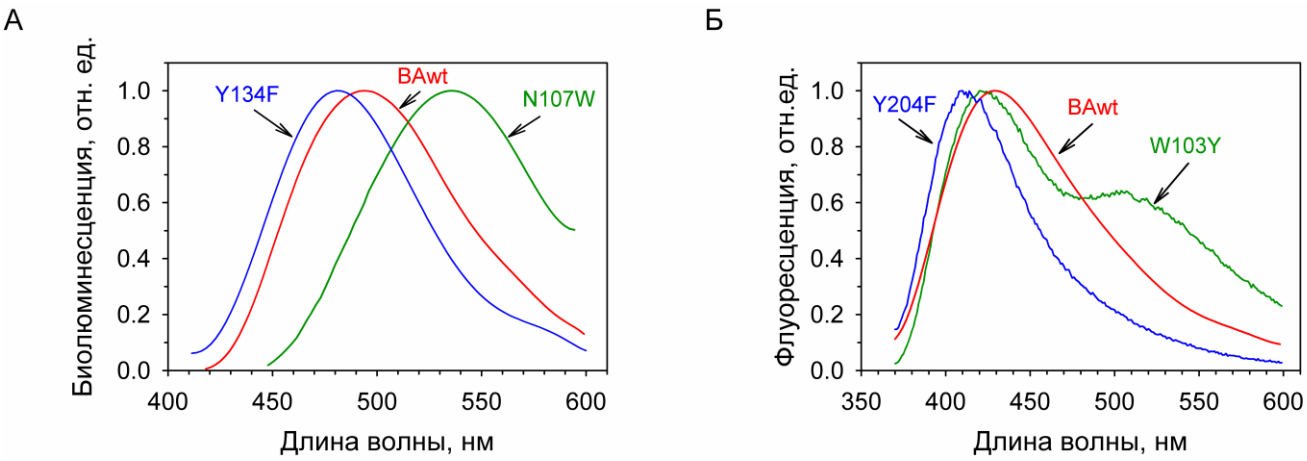


Рисунок 7.7 – Биолюминесценция и флуоресценция беровина дикого типа и некоторых его мутантов. (А) Спектры биолюминесценции беровина дикого типа (–) и мутантов N107W (–) и Y134F (–). (Б) Спектры флуоресценции Ca^{2+}-разряженных беровина дикого типа (–) и мутантов W103Y (–) и Y204F (–). Длина волны возбуждения равна 350 нм.

По своим флуоресцентным свойствам мутанты беровина могут быть разделены на три группы: мутанты с флуоресценцией в фиолетовой (λ_{max} <425 нм) и синей (λ_{max} = 434-480 нм) областях спектра, а также мутанты, имеющие бимодальный спектр флуоресценции. Вариации в спектрах флуоресценции могут быть обусловлены изменением как доступности субстрат-связывающей полости для растворителя, так и аминокислотного окружения целентерамида, так как эти параметры существенно влияют на спектр флуоресценции целентерамида [Mori et al., 2006].

Среди многочисленных мутантов акворина и обелина только мутанты с заменами остатков, расположенных в непосредственной близости от ОН-группы 6-*p*-гидроксифенильного кольца демонстрируют значительные вариации спектров биолюминесценции [Ohmiya et al., 1992; Vysotski et al., 2003; Malikova et al., 2003; Stepanyuk et al., 2005; Frank et al., 2008]. В беровине же только замена Asn107 существенно влияет на изменение спектра биолюминесценции, смещая его в длинноволновую область на 45 нм (таблица 7.3).

Таблица 7.3 – Максимумы спектров биолюминесценции и флуоресценции беровина и его мутантов

Мутант	Биолюминесценция, λ_{max} (нм)	Флуоресценция, λ_{max} (нм)
WT	490	430
R41M	-	418
R41K	490	420
W61F	-	438
K90M	490	464
K90E	490	465
W103F	490	435
W103Y	-	420/510
N107W	535	423
S130A	-	410
Y133F	-	444
Y133H	490	418
Y134F	482	440
Y134H	487	415
M153Y	490	432
M154Y	-	441
M154Q	-	431
F188H	490	425
W192F	-	415
Y204F	490	410
Y204E	493	477
Y204K	493	417

По аналогии с фотопротеинами гидромедуз, спектральный сдвиг может быть результатом либо увеличения полярности окружения излучателя [Mori et al., 2006], либо изменением эффективности диссоциации протона ОН-группы 6-*p*-гидроксифенильного кольца возбужденного целентерамида [Tomilin et al., 2008].

7.5 Функциональная роль отдельных аминокислотных остатков в формировании активного фотопротеинового комплекса

Согласно пространственной модели беровина в субстрат-связывающей-полости около пероксигруппы целентеразина расположены положительно заряженная гуанидиновая группа боковой цепи Arg41 и боковая цепь Tyr204 (рис. 7.2A). В белках положительно заряженная гуанидиновая группа Arg41 часто взаимодействует с отрицательно заряженными группами различных кофакторов и субстратов. Поэтому вполне обоснованно можно предположить, что при конвертации апо-беровина в активный фотопротеин при активации целентеразина кислородом положительно заряженная гуанидиновая группа Arg41 может стабилизировать образующийся пероксид-анион целентеразина через кулоновское взаимодействие (рис. 7.8). В отличие от фотопротеинов гидромедуз, активный беровин образуется при щелочных pH, при которых может происходить ионизация боковых групп аминокислот, в частности OH-группы Tyr204, который также расположен рядом с пероксигруппой целентеразина и гуанидиновой группой Arg41. Хотя pK OH-группы тирозина 10,2, в аминокислотном окружении внутри белковой молекулы значение pK может быть меньше, в частности за счет взаимодействия с гуанидиновой группой Arg41. Таким образом, положительно заряженная гуанидиновая группа Arg41 может взаимодействовать как с пероксид-анионом, так с ионизированным Tyr204. Действительно, замена Arg41 приводит к практически полной потере биолюминесцентной активности беровине (таблица 7.1). Нельзя также исключить катион-π взаимодействие между положительно заряженной гуанидиновой группой боковой цепи Arg41 и кольцом Tyr204, которое может обеспечивать правильное позиционирование гибкой боковой цепи Arg41 относительно пероксид-аниона. Факт, что мутант с заменой Tyr204 на фенилаланин сохраняет ту же активность, что и беровин дикого типа (таблица 7.1), подтверждает это предположение, так как катион-π взаимодействие должно сохраниться. Однако, несмотря на различные типы взаимодействий, все они должны способствовать правильному позиционированию гибкой боковой цепи

Arg41 и, следовательно, стабилизации активированного целентеразина.

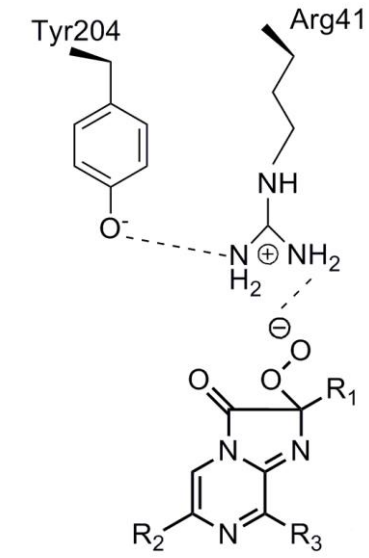


Рисунок 7.8 – Предполагаемый механизм стабилизации пероксид-аниона целентеразина во внутренней полости беровина.

Хемилюминесценция целентеразина происходит в апротонных растворителях в присутствии кислорода и следовых количеств щелочи [Hirano et al., 2008]. Было высказано предположение, что этот процесс инициируется депротонированием N7, приводящим к образованию C2 аниона целентеразина. Затем, единичный перенос электрона (SET) от C2 аниона к O2 приводит к образованию радикала целентеразина и радикала супероксид-аниона кислорода, результате аннигиляции которых образуется пероксид-анион. В случае хемилюминесцентных или биолюминесцентных реакций, катализируемых люциферазой, пероксид-анион циклизуется с образованием диоксиэтанона, который мгновенно разлагается с выделением CO_2 и продукта амида в возбужденном состоянии [Shimomura, 2006]. В Ca^{2+}-регулируемых фотопротеинах процесс циклизации пероксид-аниона блокируется на стадии его протонирования. Было высказано предположение о том, что в фотопротеинах гидромедуз протонирование пероксид-аниона происходит с помощью гистидина (His169 в акворине и His175 в обелине), который выполняет двойную функцию [Vysotski, Lee, 2004, 2007]. Гистидин может выполнять функцию основания, забирая протон

от N7 положения, и переносить его на пероксид-анион [Eremeeva et al., 2013], а гидропероксигруппа стабилизируется сетью водородных связей, образованных остатками His и Tyr (рис. 7.9). В фотопротеинах гребневиков депротонирование

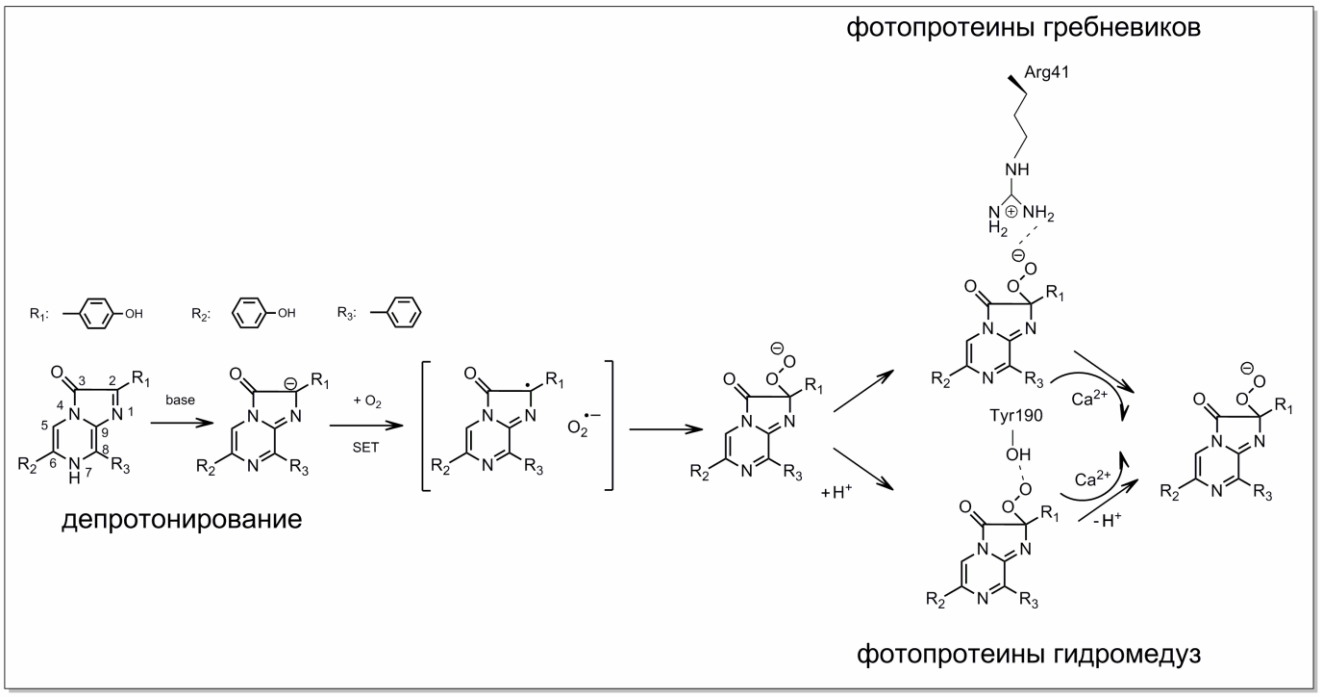


Рисунок 7.9 – Предполагаемые механизмы образования активных фотопротеинов ктенофор и гидромедуз.

N7 атома целентеразина может быть обусловлено действием щелочных условий при конверсии апобелка в активный фотопротеин и, скорее всего, блокирование циклизации пероксид-аниона включает в себя кулоновское взаимодействие между отрицательно заряженным пероксид-анионом и положительно заряженной гуанидиновой группой Arg (рис. 7.8). Правильное позиционирование боковой цепи Arg может обеспечиваться или кулоновским взаимодействием, или катион-π взаимодействием с остатком Tyr. В обоих случаях биолюминесценция фотопротеинов запускается конформационными изменениями в ответ на связывание кальция с Ca^{2+}-связывающими участками. Тем не менее, в то время как у фотопротеинов гидромедуз образование пероксид-аниона включает перенос протона с участием остатков His/Tyr [Vysotski, Lee, 2004, 2007], в фотопротеинах гребневиков пероксид-анион возникает в результате только конформационных

изменений. В пространственной структуре апо-беровина, связанного с ионами кальция (PDB код 4MN0), боковая цепь Arg41 расположена вдали от центра полости. Таким образом, предполагается, что связывание кальция может изменить положение боковой цепи Arg, разрушая тем самым взаимодействие между зарядами пероксид-аниона и гуанидиновой группы (рис. 7.9), и, следовательно, инициируя окислительное декарбоксилирование пероксицелентеразина [Shimomura, Johnson, 1972; Cormier et al., 1973]. Следует подчеркнуть, что хотя предложенный механизм (рис. 7.9) и пространственная модель (рис. 7.2А) хорошо объясняют влияние мутаций на биолюминесценцию беровина, только определение пространственной структуры фотопротеинов ктенофор со связанным субстратом сможет дать реальное представление о роли отдельных аминокислотных остатков в биолюминесценции.

Таким образом, впервые получена пространственная модель беровина, связанного с субстратом, позволившая выявить аминокислотные остатки, образующие субстрат-связывающую полость, и проведено исследование их функциональной роли в биолюминесценции путем замены на аминокислоты с различными донорно-акцепторными свойствами боковых цепей. Высказано предположение, что субстрат во внутренней полости фотопротеинов гребневиков связан в виде 2-гидропероксианиона целентеразина, у которого отрицательно заряженный пероксид-анион стабилизируется за счет кулоновского взаимодействия с положительно заряженной гуанидиновой группой Arg41 в паре с Tyr204. Так как в других фотопротеинах ктенофор эти остатки находятся в тех же позициях, можно допустить, что предложенный механизм является общим для фотопротеинов этого типа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целентеразин-зависимые биолюминесцентные фотопротеины представляют собой обширный класс белков из разнообразных морских организмов, утилизирующих целентеразин как субстрат биолюминесцентной реакции. Их можно разделить на две группы – одна из них включает люциферазы, которые способны совершать несколько оборотов и, следовательно, функционируют как типичные ферменты, к другой относятся фотопротеины – белки, содержащие в гидрофобной полости прочно связанный субстрат реакции.

Представленная работа посвящена изучению светочувствительного Ca^{2+}-регулируемого фотопротеина беровина из ктенофор *Beroe abyssicola*. В результате проведенных экспериментальных исследований впервые клонированы полноразмерные кДНК генов, кодирующих фотопротеин беровин из гребневика *B. abyssicola*, согласно которым определены аминокислотные последовательности белка. Анализ последовательностей фотопротеинов показал, что беровин состоит из 208 аминокислотных остатков и, аналогично Ca^{2+}-регулируемым фотопротеинам гидромедуз, содержит 3 Ca^{2+}-связывающих сайта EF-hand типа. Однако как было впервые показано, идентичность аминокислотных последовательностей фотопротеинов ктенофор и гидромедуз, составляет всего 25%, несмотря на их функциональную схожесть. Поэтому фотопротеины гребневиков следует отнести к новому типу Ca^{2+}-регулируемых фотопротеинов.

Рекомбинантный апо-беровин был экспрессирован в клетках *E. coli*, получен в высокоочищенном виде, конвертирован в активный фотопротеин инкубацией с синтетическим целентеразином, его физико-химические и биолюминесцентные свойства были изучены. Исследования показали, что образование активного беровина наиболее эффективно происходит при щелочных pH и высокой концентрации NaCl и не требует, в отличие от апобелков гидромедуз, восстанавливающих агентов, таких как ДТТ или 2-меркаптоэтанол. Хотя ионы магния увеличивают выход активного фотопротеина при активации

апо-беровина в условиях, имитирующих внутриклеточную среду, выход активного фотопротеина меньше, чем в буфере с высокой ионной силой и щелочными условиями, что предполагает участие дополнительных внутриклеточных факторов в этом процессе в фотоцитах гребневиков. Оптимумы pH, температуры и ионной силы раствора для биолюминесцентной реакции, а также спектр излучения и спектр флуоресценции Ca^{2+}-разряженного рекомбинантного беровина оказались очень похожи на свойства природных фотопротеинов из *Beroe ovata* и *Mnemiopsis sp.*

Впервые для фотопротеинов ктенофор на примере рекомбинантного беровина исследованы зависимость интенсивности биолюминесценции от концентрации кальция и, с помощью метода «остановленной струи», кинетика биолюминесцентного сигнала при насыщающих концентрациях кальция без и в присутствии физиологических концентраций Mg^{2+}. Аналогично Ca^{2+}-регулируемым фотопротеинам гидромедуз зависимость от $[Ca^{2+}]$ является сигмоидной с углом наклона 2,5, однако Ca^{2+}-независимая биолюминесценция беровина почти на порядок ниже, чем у фотопротеинов гидромедуз. Присутствие физиологических концентраций Mg^{2+} снижает чувствительность беровина к кальцию, сдвигая кривую зависимости интенсивности биолюминесценции от концентрации кальция вправо на всем ее протяжении. Константа скорости подъема биолюминесцентного сигнала рекомбинантного беровина при насыщающей $[Ca^{2+}]$ меньше, чем для фотопротеинов гидромедуз, а константа скорости спада биолюминесценции выше, чем для акворина, клитина и митрокомина, но ниже, чем для обелина. При насыщающих $[Ca^{2+}]$ ионы магния в физиологической концентрации не влияют на скорость подъема и спада светового сигнала беровина.

Впервые получены кристаллы апо-беровина с Mg^{2+} и определена его пространственная структура. Магний найден во всех Ca^{2+}-связывающих петлях апо-беровина. Ион магния координируется шестью атомами кислорода с характерной для него длиной координационных связей. Высказано предположение, что Ca^{2+}-связывающие петли беровина принадлежат к

смешанному Ca^{2+}/Mg^{2+}, а не к Ca^{2+}-специфическому, типу.

В соответствии с моделью беровина с 2-гидропероксипроизводным целентеразина локализованы аминокислотные остатки, предположительно участвующие в формировании субстрат-связывающей полости беровина. С помощью сайт-направленного мутагенеза получены мутанты беровина с заменой этих аминокислот на остатки с различными донорно-акцепторными свойствами боковых цепей и исследованы их биолюминесцентные и физико-химические свойства. Замена Arg41, Trp61, Lys90, Asn107, Trp103, Ser130, Tyr133, Tyr134, Met153, Met154, Trp192, Phe188 и Tyr204, которые, согласно пространственной модели беровина, участвуют в формировании субстрат-связывающей полости, привела к значительному снижению биолюминесцентной активности фотопротеина и нарушению способности апобелка связывать целентеразин. Это указавает на адекватность предложенной структурной модели беровина. Кроме того, анализ взаимодействия пероксигруппы целентеразина с боковыми цепями аминокислотных остатков, находящихся на расстоянии водродной связи, и влияния замещения этих остатков на биолюминесцентные свойства беровина позволил сформулировать гипотезу о структуре «преактивированного» кислородом целентеразина во внутренней полости фотопротеинов ктенофор. Было сделано предположение, что, в отличие от фотопротеинов гидромедуз, где преактивированный субстрат связан в виде 2-гидропероксицелентеразина, во внутренней полости фотопротеинов ктенофор субстрат находится в виде 2-перокси-аниона, отрицательный заряд которого стабилизируется вследствие кулоновского взаимодействия с положительно заряженной гуанидиновой группой Arg41 в паре с Tyr204. Биолюминесцентная реакция инициируется конформационными изменениями, вызванными связыванием ионов кальция с Ca^{2+}-связывающими сайтами фотопротеина, что приводит к нарушению кулоновского взаимодействия, дестабилизации перокси-аниона и запуску реакции.

Таким образом, результаты исследований, представленные в данной работе, описывают клонирование и свойства рекомбинантного фотопротеина беровина

ктенофор *Beroe abyssicola*, который может быть отнесен к новому типу Ca^{2+}-регулируемых фотопротеинов, а также вносят вклад в понимание роли отдельных аминокислот субстрат-связывающей полости в функционирование этих фотопротеинов. В дальнейшем полученные результаты могут найти применение в фундаментальных и прикладных исследованиях.

В заключение хочу выразить благодарность своему научному руководителю к.б.н. Е.С. Высоцкому и всем моим коллегам из лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН за помощь в проведении экспериментов и обсуждении полученных результатов.

ВЫВОДЫ

1. Впервые из тканей ктенофор *Beroe abyssicola* сконструированы кДНК библиотеки, из которых с помощью функционального скрининга изолировано 4 кДНК генов, кодирующих фотопротеин беровин. Несмотря на отличия в нуклеотидных последовательностях, все гены кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность, состоящую из 208 остатков и содержащую, аналогично фотопротеинам гидромедуз, 3 Ca^{2+}-связывающих сайта EF-hand типа. Впервые показано, что степень идентичности аминокислотной последовательности беровина с последовательностями фотопротеинов гидромедуз составляет не более 25%. Это позволяет выделить фотопротеины ктенофор в новый тип Ca^{2+}-регулируемых фотопротеинов.

2. Образование активного беровина из апо-беровина, целентеразина и кислорода наиболее эффективно происходит при pH 9,0, концентрации NaCl 0,5 М и не требует присутствия восстанавливающих агентов. Рекомбинантный беровин, аналогично природному фотопротеину, теряет активность под действием света видимого диапазона.

3. Наибольший квантовый выход биолюминесцентной реакции наблюдается при pH 8,5 в присутствии 0,2 М NaCl и температуре 9^{o}C. Спектр излучения беровина не зависит от pH и имеет максимум при 490 нм, а спектр флуоресценции Ca^{2+}-разряженного белка при нейтральных значениях pH имеет максимум при 420 нм, а при щелочных – при 410 и 485 нм.

4. Впервые с помощью метода «остановленной струи» определены константы скорости подъема (k_{rise} = 16,3 ± 0,08 c^{-1}) и спада (k_{decay} = 2,50 ± 0,01 c^{-1}) биолюминесцентного сигнала беровина. Показано, что присутствие физиологической концентрации Mg^{2+} не влияет на константы скорости подъема и спада светового сигнала беровина при [Ca^{2+}] 20 мМ, но снижает k_{rise} и k_{decay} при 0,1 мМ [Ca^{2+}].

5. Впервые определена зависимость интенсивности свечения рекомбинантного беровина от [Ca^{2+}]. Рекомбинантный беровин имеет самый низкий уровень Ca^{2+}-независимой биолюминесценции среди фотопротеинов и реагирует на изменение [Ca^{2+}] в диапазоне ~10^{-8}-10^{-4} М. Физиологическая концентрация Mg^{2+} сдвигает кривую зависимости вправо на всем ее протяжении.

6. Впервые получены кристаллы апо-беровина с Mg^{2+} и с разрешением 1,75 Å определена его пространственная структура. Установлено, что все три Ca^{2+}-связывающих сайта апо-беровина связывают ионы магния. Характер координации Mg^{2+} свидетельствует о том, что все Ca^{2+}-связывающие сайты беровина относятся к смешанному Ca^{2+}/Mg^{2+} типу, который имеет более высокое сродство к Ca^{2+}, чем к Mg^{2+}.

7. Впервые построена модель пространственной структуры беровина с 2-гидропероксипроизводным целентеразина, позволившая локализовать аминокислоты субстрат-связывающей полости. Методом сайт-направленного мутагенеза получен 21 мутант беровина с заменой этих аминокислотных остатков на аминокислоты с различными свойствами боковых радикалов и исследованы их биолюминесцентные свойства. Показано, что замена Arg41, Lys90, Asn107, Trp103, Ser130, Tyr133, Met153, Met154 и Trp192 в беровине приводит к резкому снижению биолюминесцентной активности и нарушению способности связывать целентеразин. Исходя из пространственной модели и свойств мутантов с заменой Arg41 и Tyr204, выдвинуто предположение, что субстрат во внутренней полости беровина может быть связан как 2-пероксианион целентеразина, стабилизация которого происходит за счет кулоновского взаимодействия с гуанидиновой группой Arg41.

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК – рибонуклеиновая кислота

мРНК – матричная РНК

рРНК – рибосомальная РНК

кДНК –ДНК, комплиментарная мРНК

МКС – множественный клонирующий сайт

ДСН – додецилсульфат натрия

ДТТ – дитиотрейтол

ДЭАЭ – диэтиламиноэтил

ИПТГ – изопропилβ-D-тиогалактопиранозид

ПААГ – полиакриламидный гель

п.н. – пара нуклеотидов

ЭГТА – этиленгликольтетрауксусная кислота

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

BLAST – «Basic Local Alignment Seach Tool»

CBP – целентеразин-связывающий белок

FWHM – полная ширина пика на уровне его полумаксимума

GFP – зеленый флуоресцентный белок

PCR, ПЦР – полимеразная цепная реакция

PDB – Protein Data Bank

RMSD – среднеквадратичное отклонение

SOB – «Super Optimal Broth»

SOC – «Super Optimal Broth for Catabolic repression»

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Артюхов, В.Г., Агишева, М.Г., Наквасина, М.А. О механизмах фотопротекторного действия биогенных аминов по отношению к молекулам лактатдегидрогеназы // Вестник ВГУ. – 2001. – 1. – С. 26–33.
2. Высоцкий, Е.С., Бондарь, В.С., Гительзон, И.И. Выделение и свойства различных молекулярных форм Ca^{2+} -активируемого фотопротеина обелина // Доклады АН СССР. – 1991. – 321. – С. 214-217.
3. Высоцкий, Е.С., Бондарь, В.С., Летунов, В.Н. Выделение и очистка Са-зависимого фотопротеина обелина из гидроидных полипов *Obelia longissima* // Биохимия. – 1989. – 54. – С. 965–973.
4. Высоцкий, Е.С., Маркова, С.В., Франк, Л.А. Кальций-регулируемые фотопротеины морских кишечнополостных // Молекулярная биология. – 2006. – 40. – С. 1–14.
5. Гительзон, И.И. Биолюминесценция в океане / И.И. Гительзон, Л.А. Левин, Р.Н. Утюшев, О.А. Черепанов, Ю.В. Чугунов. – С-Пб: Гидрометеоиздат, 1992. – 284 с.
6. Илларионов, Б.А., Маркова, С.В., Бондарь, В.С., Высоцкий, Е.С., Гительзон, И.И. Клонирование и экспрессия кДНК кальций-активируемого фотопротеина из гидроидного полипа *Obelia longissima* // Докл. АН СССР. –1992. – 326. – С. 911–913.
7. Конев, С.В. Фотобиология / С.В. Конев, И.Д. Волотовский. – Минск: Изд-во БГУ им. Ленина, 1979. – 385 с.
8. Лабас, Ю.А. Исследование светочувствительной биолюминесцентной системы гребневика. Механизмы работы рецепторных элементов органов чувств / Ю.А. Лабас. – Л.: Наука, 1973. – С. 69–72.
9. Лабас Ю.А. О световой сигнализации у гребневиков. Теоретическое и практическое значение кишечнополостных / Ю.А. Лабас. – Л.: Наука, 1980. – С. 41–49.

10. Маниатис, Т., Фрич, Э., Сэмбрук, Дж. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
11. Остерман, Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). / Л.А. Остерман. – М.: Наука, 1981. – 288 с.
12. Плохинский, Н.А. Алгоритмы биометрии / Н.А. Плохинский. – М.: МГУ, 1980. – 150 с.
13. Серавин, Л.Н. *Ctenophora* – гребневики (методическое пособие) / Л.Н. Серавин. – С-Пб. – Омск, 1998. – 84 с.
14. Adams, P.D., Afonine, P.V., Bunkóczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Head, J.J., Hung, L.W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., et al. PHENIX: a comprehensive Python based system for macromolecular structure solution // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. – 2010. – 66. – P. 213–22.
15. Aghamaali, M.R., Jafarian, V., Sariri, R., Molakarimi, M., Rasti, B., Taghdir, M., Sajedi, R.H., Hosseinkhani, S. Cloning, sequencing, expression and structural investigation of mnemiopsin from *Mnemiopsis leidyi*: an attempt toward understanding Ca^{2+}-regulated photoproteins // Protein J. – 2011. – 30. – P. 566-574.
16. Airth, R.L., Foerster, G.E. Some aspects of fungal bioluminescence // J. Cell Comp. Physiol. – 1960. – 56. – P. 173–82.
17. Allen, D.G., Blinks, J.R., Prendergast, F.G. Aequorin luminescence: relation of light emission to calcium concentration - a calcium-independent component // Science. – 1977. – 195. – P. 996–998.
18. Allouche, D., Parello, J., Sanejouand, Y.H. Ca^{2+}/Mg^{2+} exchange in parvalbumin and other EF-hand proteins. A theoretical study // J. Mol. Biol. – 1999. – 285. – P. 857–873.
19. Alvarez, J., Montero, M. Measuring [Ca^{2+}] in the endoplasmic reticulum with aequorin // Cell Calcium. – 2002. – 32. – P. 251–260.
20. Anctil, M., Shimomura, O. Mechanism of photoinactivation and re-activation in the bioluminescence system of the ctenophore *Mnemiopsis* // Biochemistry. – 221. – 1984. – P. 269-272.

21. Andersson, M., Malmendal, A., Linse, S., Ivarsson, I., Forsen, S., Svensson, L.A. Structural basis for the negative allostery between Ca^{2+}- andMg^{2+}-binding in the intracellular Ca^{2+}-receptor calbindin D9k // Protein Sci. – 1997. – 6. – P. 1139–1147.
22. Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., Bourne, P.E. The Protein Data Bank // Nucleic Acids Res. – 2000. – 28. – P. 235–242.
23. Blinks, J.R. Sarcoplasmic reticulum function in intact cells: information from intracellular Ca^{2+} indicators / Eds. M.L. Entman,W.B. VanWinkle // The Sacoplasmic Reticulum in Physiology, Muscle, vol. II, CRC Press, Boca Raton, FL. – 1986. – P. 73–107.
24. Blinks, J.R. Use of calcium-regulated photoproteins as inlracellular Ca^{2+} indicators // Methods in Enzimology. – 1989. – 174. – P. 164–203.
25. Blinks, J.R., Prendergast, F.G., Allen, D.G. Photoproteins as biological calcium indicators // Pharmacol. Rev. – 1976. – 28. – P. 1–93.
26. Blinks, J.R., Wier, W. G. Hess, P., Prendergast, F.G. Measurement of Ca^{2+} concentrations in living cells // Prog. Biophys. Mol. Biol. – 1982. – 40. – P. 1-114.
27. Bollen, Y.J.M., Nabuurs, S.M., van Berkel, W.J.H., van Mierlo, C.P.M. Last in, first out: the role of cofactor binding in flavodoxin folding // J. Biol. Chem. – 2005. – 280. – P. 7836–7844.
28. Borisova, V.V., Frank, L.A., Markova, S.V., Burakova, L.P., Vysotski, E.S. Recombinant *Metridia* luciferase isoforms: expression, refolding and applicability for *in vitro* assay // Photochem. Photobiol. Sci. – 2008. – **7**. – P. 1025–1031.
29. Burakova, L.P., Natashin, P.V., Malikova, N.P., Niu, F., Pu, M., Vysotski, E.S., Liu, Z.J. All Ca^{2+}-binding loops of light-sensitive ctenophore photoprotein berovin bind magnesium ions: The spatial structure of Mg^{2+}-loaded apo-berovin // J. Photochem. Photobiol. B. – 2016. – 154. – P. 57–66.
30. Burakova, L. P., Natashin, P.V., Markova, S.V., Eremeeva, E.V., Malikova, N.P., Cheng, C., Liu, Z.J., Vysotski, E.S. Mitrocomin from the jellyfish *Mitrocoma cellularia* with deleted C-terminal tyrosine reveals a higher bioluminescence activity

compared to wild type photoprotein // J. Photochem. Photobiol. B. – 2016. – 162. – 286–297.

31. Burakova, L.P., Stepanyuk, G.A., Eremeeva, E.V., Vysotski, E.S. Role of certain amino acid residues of the coelenterazine-binding cavity in bioluminescence of light-sensitive Ca^{2+}-regulated photoprotein berovin // Photochem. Photobiol. Sci. – 2016. – 15. – P. 691–704.
32. Burridge, N., Churchich, J.E. Photoinactivation of Aspartate Aminotransferase // The Journal of biological chemistry. – 1970. – 245. – P. 6258–6263.
33. Campbell, A.K. Extraction, partial purification and properties of obelin, the calcium-activated luminescent protein from the hydroid *Obelia geniculata* // Biochem. J. – 1974. – 43. – P. 411–508.
34. Campbell, A.K., Dormer, R.L., Hallett, M.B. Coelenterate photoproteins as indicators of cytoplasmic free Ca^{2+} in small cells // Cell Calcium. – 1985. – 6. – P. 69–82.
35. Campbell, A.K., Herring, P.J. Imidazolopyrazine bioluminescence in copepods and other marine organisms // Mar. Biol. – 1990. – 104 – P. 219–225.
36. Casey, J.R., Grinstein, S., Orlowski, J. Sensors and regulators of intracellular pH // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2010. – 11. – P. 50–61.
37. Chalfie, M., Kain, S. GFP: Green Fluorescent Protein Strategies and Applications / Eds. M. Chalfie, S. Kain. – John Willey & Sons, New York. – 1997.
38. Charbonneau, H., Cormier, M.J. Ca^{2+}-induced bioluminescence in *Renilla reniformis*. Purification and characterization of a calcium-triggered luciferin-binding protein // J. Biol. Chem. – 1979. – 254. – P. 769–780.
39. Cormier, M.J., Crane, J.M. and Nakano, Y. Evidence for the identity of the luminescent systems of *Porichthys porosissimus* (fish) and *Cypridina hilgendorfii* (crustacean) // BBRC. – 1967. – 29. – P. 747–752.
40. Cormier, M.J., Hori, K., Karkhanis, Y.D., Anderson, J.M., Wampler, J.E., Morin, J.G., Hastings, J.W. Evidence for similar biochemical requirements for bioluminescence among the coelenterates // J. Cell. Physiol. – 1973. – 81. – P. 291–297.

41. Cormier, M.J., Hori, K., Anderson, J.M. Bioluminescence in coelenterates // Biochimica et Biophysica Acta. – 1974. – 346. – P. 137–164.
42. Declercq, J.P., Tinant, B., Parello, J., Rambaud, J., Ionic interactions with parvalbumins. Crystal structure determination of pike 4.10 parvalbumin in four different ionic environments. // J. Mol. Biol. – 1991. – 220. – P. 1017–1039.
43. Deng, L., Markova, S.V., Vysotski, E.S., Liu, Z.J., Lee, J., Rose, J., Wang, B.C. Crystal structure of a Ca^{2+}-discharged photoprotein: implications for mechanisms of the calcium trigger and bioluminescence // J. Biol. Chem. – 2004. – 279. – P. 33647–33652.
44. Deng, L., Vysotski, E.S., Liu, Z.J., Markova, S.V., Malikova, N.P.,Lee, J., Rose, J., Wang, B.C. Structural basis for the emission of violet bioluminescence from a W92F obelin mutant // FEBS Letters. – 2001. – 506. – P. 281–285.
45. Deng, L., Vysotski E.S., Markova, S.V., Liu, Z.J., Lee, J., Rose, J., Wang, B.C. All three Ca^{2+}-binding loops of photoproteins bind calcium ions: the crystal structures of calcium-loaded apo-aequorin and apo-obelin // Protein Sci. – 2005. – 14. – P. 663–675.
46. Dikici, E., Qu, X., Rowe, L., Millner, L., Logue, C., Deo, S. K., Ensor, M. and Daunert, S. Aequorin variants with improved bioluminescence properties // Protein Eng., Des. Sel. – 2009. – 22. – P. 243–248.
47. Dunstan, S.L., Sala-Newby, G.B., Fajardo, A.B., Taylor, K.M., Campbell, A.K. Cloning and expression of the bioluminescent photoprotein pholasin from the bivalve mollusc *Pholas* dactylus // J. Biol. Chem. – 2000. – 275. – P. 9403–9409.
48. Emsley, P., Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. – 2004. – 60. – P. 2126–2132.
49. Eremeeva, E.V., Burakova, L.P., Krasitskaya, V.V., Kudryavtsev, A.N., Shimomura, O. and Frank, L.A. Hydrogen-bond networks between the C-terminus and Arg from the first α-helix stabilize photoprotein molecules // Photochem. Photobiol. Sci. – 2014. – 13. – P. 541–547.

50. Eremeeva, E.V., Markova, S.V., van Berkel, W.J. and Vysotski, E.S. Role of key residues of obelin in coelenterazine binding and conversion into 2–hydroperoxy adduct // J. Photochem. Photobiol. B. – 2013. – 127. – P. 133–139.
51. Eremeeva, E.V., Markova, S.V., Frank, L.A., Visser, A.J., van Berkel, W.J., Vysotski, E.S. Bioluminescent and spectroscopic properties of His-Trp-Tyr triad mutants of obelin and aequorin // Photochem. Photobiol. Sci. – 2013. – 12. – P. 1016–1024.
52. Eremeeva, E.V., Markova, S.V., Westphal, A.H., Visser, A.J., van Berkel, W.J., Vysotski, E.S. The intrinsic fluorescence of apo-obelin and apo-aequorin and use of its quenching to characterize coelenterazine binding // FEBS Lett. – 2009. – 583. – P. 1939–1944.
53. Eremeeva, E.V., Natashin, P.V., Song, L., Zhou, Y., van Berkel, W.J., Liu, Z.J., Vysotski, E.S. Oxygen activation of apo-obelin-coelenterazine complex // Chem. BioChem. – 2013. – 14. – P. 739–745.
54. Fagan, T.F., Ohmia, Y., Blinks, J.R., Inouye, S., Tsuji, F.I. Cloning and sequence analysis of cDNA for the Ca^{2+}-activated photoprotein, mitrocomin // FEBS. – 1993 – 333. – P. 301–305.
55. Fourrage, C., Swann, K., Gonzalez, Garcia, J.R., Campbell, A.K., Houliston, E. An endogenous green fluorescent protein – photoprotein pair in *Clytia hemisphaerica* eggs shows co-targeting to mitochondria and efficient bioluminescence energy transfer // Open Biol. – 2014. – 4. – P. 13020–13026.
56. Frank, L.A., Borisova, V.V., Markova, S.V., Malikova, N.P., Stepanyuk, G.A. and Vysotski, E.S. Violet and greenish photoprotein obelin mutants for reporter applications in dual-color assay // Anal. Bioanal. Chem. – 2008. – 391. – P. 2891–2896.
57. Gifford, J.L., Walsh, M.P., Vogel, H.J. Structures and metal-ion-binding properties of the Ca^{2+}-binding helix–loop–helix EF-hand motifs // Biochem. J. – 2007. – 405. – P. 199–221.

58. Girsch, S.J., Hastings, J.W. The properties of mnemiopsin, a bioluminescent and light sensitive protein purified by hollow fiber techniques // Mol. Cell. Biochem. – 1978. – 19. P. 113–124.
59. Golz, S., Markova, S., Burakova, L., Frank, L., Vysotski, E. Isolated berovin photoprotein and use thereof, WO 2005021591-A1 (Patent). – 2005A.
60. Golz, S., Markova, S., Burakova, L., Frank, L., Vysotski, E. Isolated photoprotein bolinopsin, and the use thereof, WO/2005/000885 (Patent). – 2005B.
61. Golz, S., Vysotski, E., Markova, S., Burakova, L., Frank, L., Isolated Photoprotein gr-bolinopsin and use thereof, WO/2006/108518 (Patent). – 2006.
62. Goto, T. Chemistry of bioluminescence // Pure appl. Chem. – 1968. – 17. – P. 421–441.
63. Goto, T., Inoue, S., Sugiura, S. Cypridina bioluminescence IV. Synthesis and chemiluminescence of 3,7-dihydroimidazo[1,2-a]pyrazin-3-one and its 2-methyl derivative // Tetrahedron Lett. – 1968. – 9. – P. 3873–3876.
64. Gurskaya, N.G., Fradkov, A.F., Pounkova, N.I., Staroverov, D.B., Bulina, M.E., Yanushevich, Y.G., Labas Y.A., Lukyanov, S., Lukyanov, K.A. A colourless green fluorescent protein homologue from the non-fluorescent hydromedusa *Aequorea coerulescens* and its fluorescent mutants // Biochem. J. – 2003. – 373. – P. 403-408.
65. Haddock, S.H.D. The Diversity of Light-Producing marine organisms [Электронный ресурс] / Haddock S.H.D. – [14 января 2004]. – URL: http://bioluminescence.info. – Загл. с экрана.
66. Haddock, S.H.D., Case, J.F. Not all Ctenophores are bioluminescent: *Pleurobrachia* // Biol. Bull. – 1995. – 189. – P. 356–362.
67. Haddock, S.H.D., Case, J.F. Bioluminescence spectra of shallow and deep-sea gelatinous zooplankton: ctenophores, medusae and siphonophores // Mar. Biol. – 1999. – 133. – P. 571–582.
68. Haddock, S.H.D., Mastroianni, N., Christianson, L.M. A photoactivatable green-fluorescent protein from the phylum *Ctenophora* // Proc. Biol. Sci.– 2010. – 277. – P. 1155–1160.

69. Haddock, S.H., Moline, V.A., Case, J.F. Bioluminescence in the sea. //Ann. Rev. Mar. Sci. – 2010. – 2. – P. 443–493.
70. Haddock, S.H.D., Rivers, T.J., Robison, B.H. Can coelenterates make coelenterazine? Dietary requirement for luciferin in cnidarian bioluminescence // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2001. – 98. – P. 11148–11151.
71. Hakiminia, F., Khalifeh, K., Sajedi, R.H., Ranjbar, B. Determination of structural elements on the folding reaction of mnemiopsin by spectroscopic techniques // Spectrochimica Acta Part A. – 2016. – 158. – P. 49–55.
72. Harbison, G.R. On the classification and evolution of the Ctenophora In «The origins and relationships of lower invertebrates» / Eds. S.C. Morris, J.D. George, R. Gibson, and H.M. Platt. – Clarendon, Oxford, 1985. – P. 78–100.
73. Harris, T.K., Turner, G.J. Structural basis of perturbed pKa values of catalytic groups in enzyme active sites // UBMB Life. – 2002. – 53. – P. 85–98.
74. Harvey, E.N. Fluorescence and inhibition of luminescence in ctenophores by ultra-violet light // The Journal of General Physiology. – 1925. – P. 331-339.
75. Hastings, J.W. Biological diversity, chemical mechanisms and evolutionary origins of bioluminescent systems // J. Mol. Evol. – 1983. – 19. – P. 309–321.
76. Hastings, J.W., Mitchell, G., Mattingly, P.H., Blinks, J.R., Van Leeuwen, M. Response of aequorin bioluminescence to rapid changes in calcium concentration // Nature. – 1969. – 222. – P. 1047–1050.
77. Hastings, J.W., Morin, J.G. Calcium-triggered light emission in *Renilla*. A unitary biochemical scheme for coelenterate bioluminescence // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1969. – 37. – P. 493–498.
78. Head, J.F., Inouye, S., Teranishi, K., Shimomura, O. The crystal structure of the photoprotein aequorin at 2.3 A resolution // Nature. – 2000. – 18. – P. 372–376.
79. Henry, J.P., Monny, C., Michelson, A.M. Characterization and properties of *Pholas* luciferase as a metalloglycoprotein // Biochemistry. – 1975. – 14. – P. 3458–3466.
80. Herring, P.J. Aspects of bioluminescence in fishes // *Oceanogr*. Mar. Biol. Annu. Rev. – 1982. – 20. – P. 415-470.

81. Herring, P.J. Bioluminescence in the crustacea // J. Crustacean Biol. – 1985. – 5. – P. 557–573.
82. Herring, P.J. Systematic distribution of bioluminescence in living organisms // J. Biolumin. Chemilumin. – 1987. – 1. – P. 147–163.
83. Herring, P.J. Bioluminescent communication in the sea // In Light and Life in the Sea / eds. P.J. Herring, A.K. Campbell, M. Whitfield, L. Maddock. – Cambrige University Press, London/New York – 1990. – P. 245–264.
84. Hirano, T., Takahashi, Y., Kondo, H., Maki, S., Kojima, S., Ikeda, H., Niwa, H. The reaction mechanism for the high quantum yield of *Cypridina* (*Vargula*) bioluminescence supported by the chemiluminescence of 6-aryl-2-methylimidazo[1,2-a]pyrazin-3(7H)-ones (*Cypridina* luciferin analogues) // Photochem. Photobiol. Sci. – 2008. – 7. – P. 197–207.
85. Hori, K., Anderson, J.M., Ward, W.W., Cormier, M.J. *Renilla* luciferin as the substrate for calcium induced photoprotein bioluminescence. Assignment of luciferin tautomers in aequorin and mnemiopsin // Biochemistry. – 1975. – 14. – P. 2371–2376.
86. Hori, K., Charbonneau, H., Hart, R. C., Cormier, M.J. Structure of native *Renilla reinformis* luciferin // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1977. – 74. – P. 4285–4287.
87. Hori, K., Wampler, J.E., Matthews, J.C., Cormier, M.J. Identification of the product exited states during the chemiluminescent and bioluminescent oxidation of *Renilla* (sea pansy) luciferin and certain of its analogs // Biochemistry. – 1973. – 12. – P. 4463–4468.
88. Houdusse, A., Cohen, C. Structure of the regulatory domain of scallop myosin 2 A resolution: implication for regulation // Structure. – 1996. – 4. – P. 21–32.
89. Illarionov, B.A., Bondar, V.S., Illarionova, V.A., Vysotski, E.S. Sequence of the cDNA encoding the Ca^{2+} – activated photoprotein obelin from the hydroid polyp *Obelia longissima* // Gene. – 1995. – 153. – P. 273–274.
90. Illarionov, B.A., Frank, L.A., Illarionova, V.A., Bondar, V.S., Vysotski, E.S., Blinks J.R. Recombinant obelin: cloning and expression of cDNA purification, and

characterization as a calcium indicator / Methods Enzymol. – 2000. – 305. – P. 223-249.

91. Imai, Y., Shibata, T., Maki, S., Niwa, H., Ohashi, M., Hirano, T. Fluorescence properties of phenolate anions of coelenteramide analogues: the light-emitter structure in aequorin bioluminescence // J Photochem Photobiol. – 2001. – A 146. – P. 95–107.
92. Inouye, S. Expression, purification and characterization of calcium-triggered luciferin-binding protein of *Renilla reniformis* // Protein Expr. Purif. – 2007. – 52. P. 66–73.
93. Inouye, S., Noguchi, M., Sakaki, Y., Takagi, Y., Miyata, T., Iwanaga, S., Miyata, T., Tsuji, F.I. Cloning and sequence analysis of cDNA for the luminescent protein aequorin // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1985. – 82. – P. 3154–3158.
94. Inouye, S., Sahara, Y. Expression, purification and characterization of a photoprotein, clytin, from *Clytia gregarium* // Protein Expression and Purification. – 2007. – 53. P. 384–389.
95. Inouye, S., Tsuji, F.I. Cloning and sequence analysis of cDNA for the Ca^{2+}-activated photoprotein, clitin // FEBS – 1992. – 315. – P. 343–346.
96. Isobe, M., Minoru, A., Matsuda, H., Tsukasa, N. Photoprotein derived from okinawan squid and gene encoding the photoprotein, 7268215 (Patent). – 2004.
97. Jafarian, V., Sariri, R., Hosseinkhani, S., Aghamaali, M-R., Sajedi, R.H., Taghdir, M., Hassannia, S. A unique EF-hand motif in mnemiopsin photoprotein from *Mnemiopsis leidyi*: Implication for its low calcium sensitivity // BBRC – 2011. – 413. – P. 164–170.
98. Kaskova, Z.M., Tsarkova, A.S. and Yampolsky, I.V. 1001 lights: luciferins, luciferases, their mechanisms of action and applications in chemical analysis, biology and medicine // Chem. Soc. Rev. – 2016. – 45. – P. 6048–6077.
99. Kawasaki, H., Nakayama, S., Kretsinger, R.H. Classification and evolution of EF-hand proteins // Biometals. – 1998. – 11. – P. 277–295.

100. Knight, M.R., Campbell, A.K., Smith, S.M., Trewavas, A.J. Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium // Nature. – 1991. – 352. – P. 524–526.

101. Kondo, H., Igarashi, T., Maki, S., Niwa, H., Ikeda, H., Hirano, T. Substituent effects on the kinetics for the chemiluminescence reaction of 6-arylimidazo[1,2-a]pyrazin-3(7H)-ones (*Cypridina* luciferin analogues): support for the single electron transfer (SET)-oxygenation mechanism with triplet molecular oxygen // Tetrahedron Lett. – 2005. – 46. – P. 7701–7704.

102. Kreiss, P., Cormier, M. J. Inhibition of *Renilla reniformis* bioluminescence by light: Effects on luciferase and its substrates // Biochim. Biophys, Acta. – 1967. – 141. – P. 181–183.

103. Kretsinger, R.H., Nockolds, C.E. Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description // J. Biol. Chem. – 1973. – 248. – P. 3313–3326.

104. Kurose, K., Inouye, S., Sakaki, Y., Tsuji, F. Bioluminescence of the Ca^{2+}-binding photoprotein aequorin after cysteine modification // Proc. Nadl. Acad. Sci. USA. – 1989. – 86. – P. 80–84.

105. Lee, J., Murphy, C.L. Bacterial bioluminescence: equilibrium association measurements, quantum yields, reaction kinetics, and overall reaction scheme // Biochemistry. – 1975. – 14. – P. 2259–68.

106. Levine, L.D., Ward, W.W. Isolation and characterization of a photoprotein, "phialidin", and a spectrally unique green-fluorescent protein from the bioluminescent jellyfish *Phialidmm gregarium* // Comp. Biochem. Physiol. – 1982. – 72. – P. 77–85.

107. Liu, Z.J., Stepanyuk, G.A., Vysotski, E.S., Lee, J., Markova, S.V., Malikova, N.P., Wang, B.C. Crystal structure of obelin after Ca^{2+}-triggered bioluminescence suggests neutral coelenteramide as the primary excited state // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2006. – 103. – P. 2570–2575.

108. Liu, Z.J., Vysotski, E.S., Chen, C.J., Rose, J.P., Lee, J., Wang, B.C. Structure of the Ca^{2+}-regulated photoprotein obelin at 1.7 A resolution determined directly from its sulfur substructure // Protein Sci. – 2000. – 9. – P. 2085–2093.

109. Liu, Z.J., Vysotski, E.S., Deng, L., Lee, J., Rose, J., Wang, B.C. Atomic resolution structure of obelin: soaking with calcium enhances electron density of the second oxygen atom substituted at the C2-position of coelenterazine // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2003. – 311. – P. 433–439.

110. Loening, A.M., Wu, A.M., Gambhir, S.S. Red-shifted *Renilla reniformis* luciferase variants for imaging in living subjects. // Nature Methods. – 2007. – 4. – P. 641–643.

111. Mahdavi, A., Sajedi, R.H., Hosseinkhani, S., Taghdir, M., Sariri, R. Site-directed mutagenesis of photoprotein mnemiopsin: implication of some conserved residues in bioluminescence properties // Photochem. Photobiol. Sci. – 2013. – 12. –P. 467–478.

112. Malikova, N.P., Burakova, L.P., Markova, S.V., Vysotski, E.S. Characterization of hydromedusan Ca^{2+}-regulated photoproteins as a tool for measurement of Ca^{2+} concentration // Anal. Bioanal. Chem. – 2014. – 406. – P. 5715–5726.

113. Malikova, N.P., Stepanyuk, G.A., Frank, L.A., Markova, S.V., Vysotski, E.S., Lee, J. Spectral tuning of obelin bioluminescence by mutations of Trp92 // FEBS Lett. – 2003. – 554. – P. 184–188.

114. Markova, S.V., Burakova, L.P., Frank, L.A., Golz, S., Korostileva, K.A., Vysotski, E.S. Green-fluorescent protein from the bioluminescent jellyfish *Clytia gregaria*: cDNA cloning, expression, and characterization of novel recombinant protein // Photochem. Photobiol. Sci. – 2010. – 9. – P. 757–765.

115. Markova, S.V., Burakova, L.P., Golz, S., Malikova, N. P., Frank, L.A., Vysotski, E.S., The light-sensitive photoprotein berovin from the bioluminescent ctenophore *Beroe abyssicola*: a novel type of Ca^{2+}-regulated photoprotein //FEBS Journal. – 2012. – 279. – 856–870.

116. Markova, S.V., Burakova, L.P., Vysotski, E.S. High-active truncated luciferase of copepod *Metridia longa* // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2012. – 417. – P. 98–103.

117. Markova, S.V., Golz, S., Frank, L.A., Kalthof, B., Vysotski, E.S. Cloning and expression of cDNA for a luciferase from the marine copepod *Metridia longa*: a novel secreted bioluminescent reporter enzyme // J. Biol. Chem. – 2004. – 279. – P. 3212–3217.

118. Markova, S.V., Vysotski, E.S., Blinks, J.R., Burakova, L.P., Wang, B.C., Lee, J. Obelin from the bioluminescent marine hydroid *Obelia geniculata*: cloning, expression, and comparison of some properties with those of other Ca^{2+}-regulated photoproteins // Biochemistry. – 2002. – 19. – P. 2227-2236.

119. Matveev, S.V., Lewis, J.C., Daunert, S. Genetically engineered obelin as a bioluminescent label in an assay for a peptide // Anal Biochem. – 1999. – 270. – P. 69–74.

120. McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C. Read, R.J. Phaser crystallographic software // J. Appl. Crystallogr. – 2007. – 40. – P. 658–674.

121. McElroy, W.D., Seliger, H.H., White, E.H. Mechanism of bioluminescence, chemiluminescence and enzyme function in the oxidation of firefly luciferin // Photochem Photobiol. – 1969. – 10. – P. 153–70.

122. Methods in Molecular Biology, Vol. 192: PCR Cloning Protocols / Eds. B.Y. Chen, H.W. Janes. – Humana Press Inc. – 2002. – P. 1-421.

123. Michelson, A.M. Purification and properties of *Pholas dactylus* luciferin and luciferase // Meth. Enzymol. - 1978. – 57. – P. 385–406.

124. Mills, C. Phylum *Ctenophora*: list of all valid species [Электронный ресурс] / Mills C. – [2001]. – URL: http://faculty.washington.edu/cemills/ctenolist.html. – Загл. с экрана.

125. Moncrief, N.D., Kretsinger, R.H., Goodman, M. Evolution of EF-hand calcium-modulated proteins. I. Relationships based on amino acid sequences // J. Mol. Evol. – 1990. – 30. – P. 522–562.

126. Mori, K., Maki, S., Niwa, H., Ikeda, H., Hirano, T. Real light emitter in the bioluminescence of the calcium-activated photoproteins aequorin and obelin: light emission from the singlet-excited state of coelenteramide phenolate anion in a contact ion pair // Tetrahedron. – 62. – 2006. – P. 6272–6288.

127. Morin, J.G. Coelenterate bioluminescence / Eds L. Muscatine, H.M. Lenhoff. – Coelenterate Biology: Reviews and New Perspectives, Academic Press, New York. – 1974. – P. 397–438.

128. Murshudov, G.N., Skubak, P., Lebedev, A.A., Pannu, N.S., Steiner, R.A., Nicholls, R.A., Winn, M.D., Long, F., Vagin, A.A. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. – 2011. – 67. – P. 355–367.

129. Natashin, P.V., Ding, W., Eremeeva, E.V., Markova, S.V., Lee, J., Vysotski, E.S. and Liu, Z.J. Structures of the Ca^{2+}-regulated photoprotein obelin Y138F mutant before and after bioluminescence support the catalytic function of a water molecule in the reaction // Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr. – 2014A. – 70. – P. 720–732.

130. Natashin, P.V., Markova, S.V., Lee, J., Vysotski, E.S., Liu, Z.J. Crystal structures of the F88Y obelin mutant before and after bioluminescence provide molecular insight into spectral tuning among hydromedusan photoproteins // FEBS J. – 2014B. – 281. – P. 1432–1445.

131. Nelson, M.R., Chazin, W.J. Structures of EF-hand Ca^{2+}-binding proteins: diversity in the organization, packing and response to Ca^{2+} binding // Biometals. – 1998. – 11. – P. 297–318.

132. Nomura, M., Inouye, S., Ohmiya, Y., Tsuji, F.I. A C-terminal proline is required for bioluminescence of the Ca^{2+}-binding photoprotein, aequorin // FEBS. – 1991. – 295. – P. 63-66.

133. NSP@Web server [Электронный ресурс] – Режим доступа: https://npsa-prabi.ibcp.fr/. – Загл. с экрана.

134. Ohashi, W., Inouye, S., Yamazaki, T., Hirota, H. NMR Analysis of the Mg^{2+}-Binding Properties of Aequorin, a Ca^{2+}-Binding Photoprotein // J. Biochem. – 2005. – 138. – P. 613–620.

135. Ohmiya, Y.; Hirano, T. Shining the light: the mechanism of the bioluminescence reaction of calcium-binding proteins // Chem. Biol. – 1996. – 3. – P. 337-347.

136. Ohmiya, Y., Ohashi, M., Tsuji, F.I. Two excited states in aequorin bioluminescence induced by tryptophan modification // FEBS Lett. – 1992. – 301. – P. 197–201.

137. Ohmiya, Y., Tsuji, F.I. Bioluminescence of the Ca^{2+}-binding photoprotein, aequorin, after histidine modification // FEBS Lett. – 1993. – 320. – P. 267–270.

138. Otwinowski, Z., Minor, W. Processing of X–ray diffraction data collected in oscillation mode // Methods Enzymol. – 1997. – 276. – P. 307–326.

139. Pashandi, Z., Molakarimi, M., Sajedi, R.H., Taghdir, M., Naderi-Manesh, H. Light induced structural changes of the photoprotein mnemiopsin: Characterization and contribution in photoinactivation // J. Photochem. Photobiol. B. – 2016. – 165. – P. 133–140.

140. Petushkov V.N., Rodionova, N.S., Purtov, K.V., Bondar, V.S. The luminescence system of soil enchytraeids, *Henlea sp.*, (*Annelida*: *Clitellata*: *Oligochaeta*: *Enchytraeidae*) // Dokl. Biol. Sci. – 2002. – 385. – P. 310–312.

141. Podar, M., Haddock, S.H.D., Sogin, M.L., Harbison, R.G. A molecular phylogenetic framework for the phylum *Ctenophora* using 18S rRNA genes // Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2001. – 21. – P. 218–230.

142. Powers, M.L.; McDermott, A.G.; Shaner, N.; Haddock, S.H. Expression and characterization of the calcium-activated photoprotein from the ctenophore *Bathocyroe fosteri*: Insights into light-sensitive photoproteins // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2013. – 431. – P. 360–366.

143. Prasher, D.C., McCann, R.O., Cormier, M.J. Cloning and expression of the cDNA coding for aequorin, a bioluminescent calcium-binding protein // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1985. – 15. P. 1259–1268.

144. Prasher, D.C., Mc Cann, R.O., Longiaru, M., Cormier, M.J. Sequence comparisons of complementary DNAs encoding aequorin isotypes // Biochemistry. – 1987. – 26. – P. 1326–1332.

145. Prendergast, F.G. Bioluminescence illuminated // Nature. – 2000. – 405. – P. 291–293.

146. Rees, J.F., Thompson, E.M., Baguet, F., Tsuji, F.I. Detection of coelenterazine and related luciferase activity in the tissues of the luminous fish, *Vinciguerria attenuata* // Comp. Biochem. Physiol. – 1990. – 96A. – P. 425–430.

147. Rees, J.F., Thompson, E.M., Baguet, F., Tsuji, F.I. Evidence for the utilization of coelenterazine as the luminescent substrate in *Argyropelecus* photophores // Mar. Molec. Biol. Biotech. – 1992. – 1. – P. 219–225.

148. Rizzuto, R., Simpson, A.W.M., Brini, M., Pozzan, T. Rapid changes of mitochondrial Ca^{2+} revealed by specifically targeted recombinant aequorin // Nature. – 1992. – 358. – P. 325–327.

149. Rudolf, R., Lilie, H. *In vitro* folding of inclusion body proteins // FASEB J. - 1996. – 10. – P .49–56.

150. Saha, A. Photo-induced inactivation of dihydroorotate dehydrogenase in dilute aqueous solution // Int. J. Radiat. Biol. – 1997. – 72. – P. 55–61.

151. Saha, A., Mandal, P.S., Bhattacharyya, S.N. Radiation-induced inactivation of enzymes – a review // Radiat. Phys. Chem. – 1995. – 46. – P. 123–145.

152. Sambrook, J. Molecular Cloning. A laboratory manual / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. – Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. – V. 2.

153. Shimomura, O. Bioluminescence in the sea: Photoprotein systems // Soc. Exp. Biolo. Symp. – 1985. – 39. – P.351–372.

154. Shimomura, O. Isolation and properties of various molecular forms of aequorin // Biochem. J. – 1986. – 234. – P. 271–277.

155. Shimomura, O. Bioluminescence: Chemical Principles and Methods // World Scientific. Singapore. – 2006.

156. Shimomura, O., Inoue, S., Johnson, F.H., Haneda, Y. Widespread occurrence of coelenterazine in marine bioluminescence // Comp. Biochem. Physiol. – 1980. – 65B. – P. 435–437.

157. Shimomura, O., Johnson, F.H. In: bioluminescence in progress. / eds F.H. Johnson and Y. Haneda. – Princeton University Press, Princeton. – 1966. – P. 496.

158. Shimomura, O., Johnson, F.H. Properties of the bioluminescent protein aequorin // Biochemistry. –1969. – 8. – P. 3991–3997.

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

160. Shimomura, O., Johnson, F.H. Regeneration of the photoprotein aequorin // Nature. – 1975. – 256. – P. 236–238.

161. Shimomura, O., Johnson, F.H., Saiga, Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea* // J. Cell. Comp. Physiol. – 1962. – 59. – P. 223–239.

162. Shimomura, O., Johnson, F.H., Saiga, Y. Extraction and properties of halistaurin, a bioluminescent protein from the hydromedusan, *Halistaura* // J. Cell. Comp. Physiol. – 1963. – 62. – P. 9–15.

163. Shimomura, O., Shimomura, A. Resistivity to denaturation of the apoprotein of aequorin and reconstitution of the luminescent photoprotein from the partially denatured apoprotein // Biochem. J. – 1981. – 199. – P. 825–828.

164. Shimomura, O., Shimomura, A. Halistaurin, phialidin and modified forms of aequorin as Ca^{2+} indicator in biological systems // Biochem J. – 1985. – 228. – P. 745–749.

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

166. Schnitzler, C.E., Pang, K., Powers, M.L., Reitzel, A.M., Ryan, J.F., Simmons, D., Tada, T., Park, M., Gupta, J., Brooks, S.Y., Blakesley, R.W., Yokoyama, S., Haddock, S.H., Martindale, M.Q., Baxevanis, A.D. Genomic organization, evolution, and expression of photoprotein and opsin genes in *Mnemiopsis leidyi*: a new view of ctenophore photocytes // BMC Biol. – 2012. – 10. – P. 107.

167. Schug, K.A., Lindner, W. Noncovalent binding between guanidinium and anionic groups: focus on biological- and synthetic-based arginine/guanidinium interactions with phosph[on]ate and sulf[on]ate residues // Chem. Rev. – 2005. – 105. – P. 67–114.

168. Sousa, S.F., Fernandes, P.A., Ramos, M.J. Protein-ligand docking: current status and future challenges // Proteins. – 2006. – 65. – P. 15–26.

169. Stepanyuk, G.A., Golz, S., Markova, S.V., Frank, L.A., Lee, J., Vysotski, E.S. Interchange of aequorin and obelin bioluminescence color is determined by substitution of one active site residue of each photoprotein // FEBS Lett. – 2005. – 579. – P. 1008–1014.

170. Stepanyuk, G.A., Liu, Z.J., Burakova, L.P., Lee, J., Rose, J., Vysotski, E.S., Wang, B.C. Spatial structure of the novel light-sensitive photoprotein berovin from the ctenophore *Beroe abyssicola* in the Ca^{2+}-loaded apoprotein conformation state // Biochimica et Biophysica Acta. – 2013. – 1834. – P. 2139–2146.

171. Stepanyuk, G.A., Liu, Z.J., Markova, S.V., Frank, L.A., Lee, J., Vysotski, E.S., Wang, B.C. Crystal structure of coelenterazine-binding protein from *Renilla muelleri* at 1.7 A: why it is not a calcium-regulated photoprotein // Photochem. Photobiol. Sci. – 2008. – 7. – P. 442–447.

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

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

174. Strynadka, N.C., James, M.N. Crystal structures of the helix–loop–helix calcium-binding proteins // Annu. Rev. Biochem. – 1989. – 58. – P. 951–998.

175. Sweeney, B.M., Haxo, F.T., Hastings, J.W. Action spectra for two effects of light on luminescence in *Gonyaulax polyedra* // The Journal of General Physiology. – 1959. – 43. – P. 285–299.

176. Takahashi, H., Isobe, M. *Symplectoteuthis* bioluminescence (1) Structure and binding form of chromophore in photoprotein of a luminous squid // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 1993. – 3. – P. 2647–2652.

177. Takahashi, H., Isobe, M. Photoprotein of luminous squid, *Symplectoteuthis oualaniensis* and reconstruction of the luminous system // Chem. Lett. – 1994. – 23. – P. 843–846.

178. Takenaka, Y., Masuda, H., Yamaguchi, A., Nishikawa, S., Shigeri, Y., Yasukazu, Y., Mizuno, H. Two forms of secreted and thermostable luciferases from the marine copepod crustacean, *Metridia pacifica* // Gene. – 2008. – 425. – P. 28–35.

179. Takenaka, Y., Yamaguchi, A., Tsuruoka, N., Torimura, M., Gojobori, T., Shigeri, Y. Evolution of Bioluminescence in Marine Planktonic Copepods // Mol. Biol. Evol. – 2012. – 29. – P. 1669–1681.

180. Thompson, C.M., Herring, P.J., Campbell, A.K. The widespread occurrence and tissue distribution of the imidazolopyrazine luciferins // J. Biolumin. Chemilumin. – 1997. – 12. – P. 87–91.

181. Titushin, M.S., Feng, Y., Lee, J., Vysotski, E.S., Liu, Z.J. Protein-protein complexation in bioluminescence // Protein Cell. – 2011. – 2. – P. 957–972.

182. Titushin, M.S., Feng, Y., Stepanyuk, G.A., Li, Y., Markova, S.V., Golz, S., Wang, B.C., Lee, J., Wang, J., Vysotski, E.S., Liu, Z.J. NMR-derived topology of a GFP-photoprotein energy transfer complex // J. Biol. Chem. – 2010. – 285. – P. 40891–40900.

183. Titushin, M.S., Markova, S.V., Frank, L.A., Malikova, N.P., Stepanyuk, G.A., Lee, J., Vysotski, E.S. Coelenterazine-binding protein of *Renilla muelleri*: cDNA cloning, overexpression, and characterization as a substrate of luciferase // Photochem. Photobiol. Sci. – 2008. – 7. – P. 189–196.

184. Tomilin, F.N., Antipina, L.Yu., Vysotski, E.S., Ovchinnikov, S.G., Gitelzon, I.I. Fluorescence of calcium-discharged obelin: The structure and molecular mechanism of emitter formation // Biochem. Biophys. Mol. Biol. – 2008. – 422. – P. 279–284.

185. Tsuji, F.I. ATP-dependent bioluminescence in the firefly squid, *Watasenia scintillans* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1985. – 82. – P. 4629–4632.

186. Tsuji, F.I. Role of molecular oxygen in the bioluminescence of the firefly squid, *Watasenia scintillans* // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2005. – 338. – P. 250–253.

187. Tsuji, F.I., Inoyue, S., Goto, T., Sakaki, Y. Site-specific mutagenesis of the calcium-binding photoprotein aequorin // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1986. – 83. P. 8107–8111.

188. Tsuji, F.I., Leisman, G.B. K/Na-triggered bioluminescence in the oceanic squid *Symplectoteuthis oualaniensis* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1981. – 78. – P. 6719–6723.

189. Tsuji, F.I., Ohmiya, Y., Fagan, T.F., Toh, H., Inouye, S. Molecular evolution of the Ca^{2+}-binding photoproteins of the *Hydrozoa* // Photochem. Photobiol. – 1995. – 62. – P. 657–661.

190. Varshavsky, A. The N-end rule: Function, mysteries, uses / Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1996. – 93. – P. 12142–12149.

191. Vysotski, E.S., Frank, L.A., Bondar, V.S. Efficiency of apophotoprotein charging depends strongly on protein concentration // In Bioluminescence and Chemiluminescence / eds Case J.F., Herring P.J., Robinson B.H., Haddock S.H.D., Kricka L.J. and Stanley P.E. – World Scientific, Singapore. – 2001. – P. 139–142.

192. Vysotski, E.S., Lee, J. Ca^{2+}-regulated photoproteins: structural insight into the bioluminescence mechanism // Acc. Chem. Res. – 2004. – 37. – P. 405–415.

193. Vysotski, E.S., Lee, J. Bioluminescent mechanism of Ca^{2+}-regulated photoproteins from three-dimensional structures / eds. V.R. Viviani, Y. Ohmiya. Luciferases and Fluorescent Proteins: Principles and Advances in Biotechnology and Bioimaging. – Transworld Research Network, Kerala, India. – 2007. – P. 19–41.

194. Vysotski, E.S., Liu, Z.J., Markova, S.V., Blinks, J.R., Deng, L., Frank, L.A., Herko, M., Malikova, N.P., Rose, J.P., Wang, B.C., Lee, J. Violet bioluminescence and fast kinetics from W92F obelin: structure-based proposals for the bioluminescence triggering and the identification of the emitting species // Biochemistry. – 2003. – 42. – P. 6013–6024.

195. Vysotski, E.S., Liu, Z.J., Rose, J., Wang, B.C., Lee, J., Preparation and X-ray crystallographic analysis of recombinant obelin crystals diffracting to beyond 1.1 A // Acta Crystallogr. – 2001. D 57. – P. 1919–1921.

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

197. Vysotski, E.S., Frank, L.A., Bondar, V.S. Efficiency of apophotoprotein charging depends strongly on protein concentration. In Bioluminescence and Chemiluminescence. / eds Case J.F., Herring P.J., Robinson B.H., Haddock S.H.D., Kricka L.J., Stanley P.E. – World Scientific, Singapore. – 2001 – P. 139–142.

198. Ward, W.W., Cormier, M.J. Extraction of *Renilla*-type luciferin from the calcium-activated photoproteins aequorin, mnemiopsin, and berovin // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1975. – 72. – P. 2530–2534.

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

200. Ward, W.W., Seliger, H.H. Properties of mnemiopsin and berovin, calcium-activated photoproteins from the ctenophores *Mnemiopsis* sp. and *Beroe ovata* // Biochemistry. – 1974B. – 13. – P. 1500–1509.

201. Ward, W.W., Seliger, H.H. Action spectrum and quantum yield for the photoinactivation of mnemiopsin, a bioluminescent photoprotein from the ctenophores *Mnemiopsis* sp. // Photochemistry and Photobiology. – 1976. – 23. – P. 351–363.

202. Watkins, N.J., Campbell, A.K. Requirement of the C-terminal proline residue for stability of the Ca^{2+}-activated photoprotein aequorin // Biochem. J. – 1993. – 293. – P. 181–185.

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

204. Wilson, T. Comments of mechanisms of chemi- and bioluminescence // Photochem. Photobiol. – 1995. – 62. – P 601–606.

205. Wilson, T., Hastings, J.W. Bioluminescence // Annu. Rev. Cell Devel. Bio. – 1998. – 14. – P. 197–230.

206. Winn, M.D., Ballard, C.C., Cowtan, K.D., Dodson, E.J., Emsley, P., Evans, P.R., Keegan, R.M., Krissinel, E.B., Leslie, A.G., McCoy, A., McNicholas, S.J., Murshudov, G.N., Pannu, N.S., Potterton, E.A., Powell, H.R., Read, R.J., Vagin, A., Wilson, K.S. Overview of the CCP4 suite and current developments // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. – 2011. – 67. – P. 235–242.

207. Wood, K.V., Lam, Y.A., McElroy, W.D.J. Introduction to beetle luciferases and their applications // Biolum. Chemilum. – 1989. – 4. – P. 289–301.

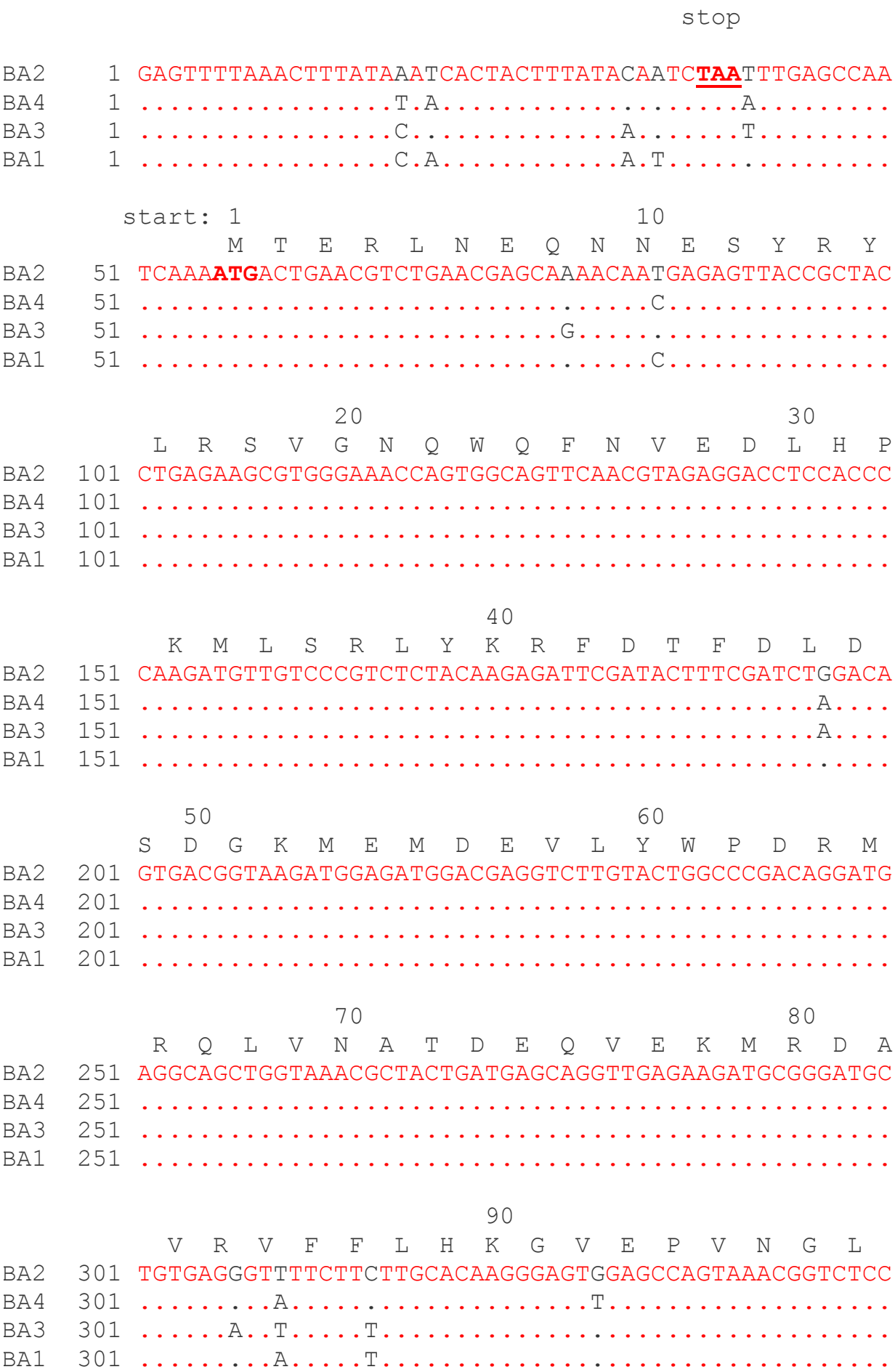
208. Xia, N.S., Luo, W.X., Zhang, J., Xie, X.Y., Yang, H.J., Li, S.W., Chen, M., Ng, M.H. Bioluminescence of *Aequorea macrodactyla*, a common jellyfish species in the East China Sea // Mar. Biotechnol. (NY) – 2002. – 4. – P. 155–162.

209. Young, R.E., Bennett, T.M. Cephalopod luminescence / In «The Mollusca» / Eds. M.R.Clarke, E.R. Trueman. – Academic Press, New York – 1988. – 12. – P. 241–251.

210. SMART™ cDNA Library Construction Kit. User Manual. PT3000-1 (PR8X944). – 1998. – CLONTECH Laboratories.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Рисунок 1 – Сравнение нуклеотидной последовательности гена 18S рРНК беломорского гребневика *Beroe abyssicola* (выделено жирным шрифтом) с последовательностями генов 18S рРНК других видов гребневиков: *B.gracilis* (фрагмент AF293696); *B.ovata* (фрагмент AF293694); *B.forskalii* (фрагмент AF293698); *B.cucumis* (фрагмент AF293695); *Mnemiopsis leidyi* (фрагмент AF29370010); *Mertensia ovum* (фрагмент AF293679 или J668937). Красным шрифтом показаны совпадающие нуклеотиды, черным - отличающиеся. Точками обозначены нуклеотиды, совпадающие с находящимися в данных позициях нуклеотидами *B.forskalii*. Минимальные различия в последовательностях генов 18S рРНК у *B. abyssicola* наблюдаются с таксономически близким *B. cucumis* (6 несовпадений и 1 пробел), максимальные - с *Mertensia ovum* (38 несовпадений и 2 пробела). Однако некоторые позиции в последовательности гена 18S рРНК *B. abyssicola* (отмечены зеленым цветом) совпадают с таксономически далекими *Mertensia ovum* и/или *Mnemiopsis leidyi*.


stop
BA2 1 GAGTTTTAAACTTTATAAATCACTACTTTATACAATCTAATTTGAGCCAA
BA4 1 .....T.A.....A.....
BA3 1 .....C.....A.....T.....
BA1 1 .....C.A.....A.T.....
start: 1
10
M T E R L N E Q N N E S Y R Y
BA2 51 TCAAAATGACTGAACGTCTGAACGAGCAAAACAATGAGAGTTACCGCTAC
BA4 51 .....C.....
BA3 51 .....G.....
BA1 51 .....C.....
20
30
L R S V G N Q W Q F N V E D L H P
BA2 101 CTGAGAAGCGTGGGAAACCAGTGGCAGTTCAACGTAGAGGACCTCCACCC
BA4 101 .....
BA3 101 .....
BA1 101 .....
40
K M L S R L Y K R F D T F D L D
BA2 151 CAAGATGTTGTCCCGTCTCTACAAGAGATTCGATACTTTCGATCTGGACA
BA4 151 .....A....
BA3 151 .....A....
BA1 151 .....
50
60
S D G K M E M D E V L Y W P D R M
BA2 201 GTGACGGTAAGATGGAGATGGACGAGGTCTTGTACTGGCCCGACAGGATG
BA4 201 .....
BA3 201 .....
BA1 201 .....
70
80
R Q L V N A T D E Q V E K M R D A
BA2 251 AGGCAGCTGGTAAACGCTACTGATGAGCAGGTTGAGAAGATGCGGGATGC
BA4 251 .....
BA3 251 .....
BA1 251 .....
90
V R V F F L H K G V E P V N G L
BA2 301 TGTGAGGGTTTTCTTCTTGCACAAGGGAGTGGAGCCAGTAAACGGTCTCC
BA4 301 .....A.....T.....
BA3 301 .....A..T.....T.....
BA1 301 .....A.....T.....

```
                100                             110
             L  R  E  D  W  V  E  A  N  R  V  F  A  E  A  E  R
BA2  351 TCAGAGAGGACTGGGTGGAAGCTAACAGAGTCTTCGCTGAGGCTGAGAGA
BA4  351 ..............................................
BA3  351 ..............................................
BA1  351 ..............................................

                    120                             130
             E  R  E  R  R  G  E  P  S  L  I  A  L  L  S  N  S
BA2  401 GAAAGAGAGCGACGAGGTGAACCTTCTCTTATCGCACTTCTCTCCAACTC
BA4  401 ................A.............................
BA3  401 ................A.............................
BA1  401 .................-.............................

                        140
             Y  Y  D  V  L  D  D  D  G  D  G  T  V  D  V  D
BA2  451 TTACTACGATGTACTGGATGATGACGGTGATGGTACTGTTGACGTCGATG
BA4  451 ..............................................
BA3  451 ..............................................
BA1  451 ..............................................

                150                             160
             E  L  K  T  M  M  K  A  F  D  V  P  Q  E  A  A  Y
BA2  501 AATTAAAGACCATGATGAAAGCATTTGATGTGCCCCAGGAAGCTGCCTAC
BA4  501 ....G.........................................
BA3  501 .....-........................................
BA1  501 ....G.........................................

                    170                             180
             T  F  F  E  K  A  D  T  D  K  S  G  K  L  E  R  T
BA2  551 ACCTTCTTCGAGAAGGCAGACACTGACAAAAGTGGAAAGTTGGAGAGAAC
BA4  551 ............................G.....................
BA3  551 ............................G.....................
BA1  551 ............................G.....................

                        190
             E  L  V  H  L  F  R  K  F  W  M  E  P  Y  D  P
BA2  601 AGAACTAGTTCATCTCTTTAGAAAGTTTTGGATGGAGCCTTACGATCCAC
BA4  601 ..............................................
BA3  601 ..............................................
BA1  601 ..............................................

                200                     208
             Q  W  D  G  V  Y  A  Y  K  Y stops
BA2  651 AGTGGGACGGAGTCTACGCTTATAAGTACTAATAAATTATCGGATCCAGA
BA4  651 ..............................................
BA3  651 ..............................................
BA1  651 ..............................................
```

```
BA2  701 ACAAACGGCAAGAACTATTTTACACTCCACTTCAATTATGAACGATGATT
BA4  701 ..................................................
BA3  701 ..........................................A.......
BA1  701 ..........................................A.......
BA2  751 TCATCATTTCATGAAAACAAATTGTGGCATAAAACAATAAACATTTTCGA
BA4  751 .T.........A...C......T.A.A.....................
BA3  751 .....G................T.A.......................
BA1  751 ............G.........T.A.A...................T..

BA2  801 CTACTGAAATTACAGTCAACATAAAAATTTTAAA-GTGTGTGATAAATTT
BA4  801 ........................TT.......-..............
BA3  801 .....A.........................-..............
BA1  801 ...T.A.........................A......T......GC

BA2  850 TTCTGA-TGTCTCCTAACTTCGATTATAATCTTCAAACTTTTAGTCAATA
BA4  850 ......A................A.......................G
BA3  850 ......A................A.......................A
BA1  851 ......A...T............A.......................A

BA2  899 TATGGAAATAAAAATATTTTGGTTTGATGAGATGATAAAACTTTTGTTTT
BA4  900 ................C.................................
BA3  900 ..................................................
BA1  901 ..............G..A............C...............

BA2  949 AAATTTTAGTTGGAGTAATTCATTGAATATGAAATGGACTTCGGACAATT
BA4  950 ..................................................
BA3  950 ..................................................
BA1  951 ..................................................

BA2  999 ACCCTGGCCTTCTGTATATTTAAAGCATGCTTTCCGTCAATAATTTGTTG
BA4 1000 ..................................................
BA3 1000 ..................................................
BA1 1001 ....C.............................................

BA2 1049 TATCTATGTATTTATTTGTACATTAATTTAACCATATA-AATTATCTGTA
BA4 1050 ........................---.T......G...........
BA3 1050 ..................................G...........
BA1 1051 ..................................G...........

BA2 1098 TAATCCCCGTTATATTTATACACTGCATTACAGAAAAAAAAAAAAAAAA
BA4 1097 ........T.....................A................
BA3 1100 .......T.....................A................
BA1 1101 .......T.....................GG.A..............

BA2 1148 AAAAAAAAAAAA-
BA4 1147 ............A
BA3 1150 ..........--
BA1 1151 .........----
```

Рисунок 2 – Сравнение 4-х полноразмерных нуклеотидных последовательностей кДНК генов беровина, полученных из двух образцов биолюминесцентного гребневика *Beroe abyssicola*: гены BA1 и BA2 – из большой окрашенной особи, гены BA3 и BA4 – из маленькой неокрашенной особи. Стартовые кодоны (ATG) выделены жирным шрифтом, стоп-кодоны – выделены жирным шрифтом с подчеркиванием. Точками обозначены нуклеотиды, совпадающие с находящимися в данных позициях нуклеотидами гена BA2.

В рамке считывания в 5'-нетранслируемой области присутствуют стоп-кодоны, а перед стартовым кодоном во всех генах кДНК беровина нет ни одной последовательности Шайн-Дальгарно, что должно препятствовать трансляции любого полноразмерного гена в клетках *E. coli*. В этих последовательностях отсутствует сигнал полиаденилирования PAS (AAATAA).

Все кДНК генов беровина кодируют один и тот же белок.

```
M9        1 MPG-LDETNNESYRYLRSVGNNWQFNIEDLHPKMISRLYKRFDTFDLDCDGRMDMDEILY
M10       1 ...-.......................................................
M8        1 ...-.......................................................
M1        1 ..--.................T.K..V..V....LE.............T..K.T....M.
ML2       1 ..--.................T.K..V..V....LE.............T..K.T....M.
M6        1 ..--.................T.K..V..V....LE.............T..K.N....M.
M4        1 ..--.................T.K..V..V....LE.............T..K.N....M.
M2        1 ...-.................D....V.......L.............S.EK.E......
M5        1 ...-.....................V.......L.............S.EK.E......
ML1       1 .S.-.................D....V.......L.............S.EK.E......
M3        1 ...-.................D....V.......L.............S.EK.E......
M7        1 ...-.....................V.......L.............S.EK.E......
B.fos     1 ..--I.QSV....K.......T.E.DV.K.....L.....................K.M.E.V..

M9       60 WPDRMRQLVNATDEQVEKMRAAVYKFFLNKGVDPVNGLTRENWVESNRVFAEAERERERR
M10      60 ............................................................
M8       60 ............................................................
M1       59 ........................HT..FH.........K..D...A.............
ML2      59 ........................HT..FH.........K..D...A.............
M6       59 .........................T..F.........K..D...A.............
M4       59 ....................E..RV..F.......H..K..D...A.............
M2       60 ....................E..RV..F.........K..D...A.............
M5       60 ....................E..RV..F.......H..K..D...A.............
ML1      60 ....................E..RV..F.........K..D...A..A...........
M3       60 ....................E..RV..F.........K..D...A.............
M7       60 ....................E..RV..F.......H..K..D...A.............
B.fos    59 ....................E..RI.........EE..K..D...A.............

M9      120 REESLIAMLSNAYYDVLDDDGDGTVSVDELKTMMKAFDVPQEAAYTFFEKADTDKSGALE
M10     120 -...........................................................
M8      120 G...........................................................
M1      120 G.P....L.....................D.E.....................Q.....T.K..
ML2     120 G.P....L.....................D.E.....................K.....T.K..
M6      120 G.P....L.....................D.E.....................Q.....T.K..
M4      120 G.G....L.....................D.E.....................Q.....T.K..
M2      120 G.P.M..L.....................D.........................V....K..
M5      120 G.P.M..L.....................D.........................V....K..
ML1     120 G.P.M..L.....................D.........................V....K..
M3      120 G.P....L.....................D.E.....................Q.....T.K..
M7      120 G.P.M..L.....................D.E.....................Q.....T.K..
B.fos   119 G.S....L.....................D.........................R..

M9      180 RPELVHLFRKFWMEPYDPQWDGVYAYKY
M10     179 ............................
M8      180 ............................
M1      180 ............................
ML2     180 ............................
M6      180 ............................
M4      180 ............................
M2      180 ........................F...
M5      180 ........................F...
ML1     180 ..........L.................
M3      180 ............................
M7      180 ............................
B.fos   179 .....N........S..........F..
```

Рисунок 3 – Сравнение аминокислотных последовательностей генов фотопротеинов: изоформ мнемиопсина из каспийского гребневика *Mnemiopsis leyidi* (ML), изоформ мнемиопсина из тихоокеанского гребневика *Mnemiopsis leyidi* (M) и фотопротеина из тихоокеанского гребневика *Bathocyroe fosteri* (B.fos). Красным отмечены идентичные аминокислотные остатки, зеленым – синонимичные аминокислотные остатки, черным – неидентичные аминокислотные остатки. Точками обозначены аминокислоты, совпадающие с находящимися в данных позициях аминокислотами мнемиопсина M9. Ca^{2+}-связывающие участки выделены подчеркиванием.