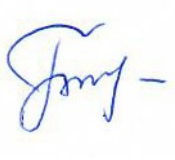
На правах рукописи



Буракова Людмила Петровна

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

03.01.02 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Красноярск - 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук » (ФИЦ КНЦ СО РАН) – обособленном подразделении «Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИБФ СО РАН) (г. Красноярск)

Научный руководитель:	**Высоцкий Евгений Степанович**, кандидат биологических наук
Официальные оппоненты:	**Гаевский Николай Александрович**, доктор биологических наук, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский федеральный университет» (СФУ), Институт фундаментальной биологии и биотехнологии, кафедра водных и наземных экосистем, профессор
	Лукьянов Константин Анатольевич доктор биологических наук, чл.-корр. РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН), Отдел геномики и постгеномных технологий, лаборатория биофотоники, заведующий
Ведущая организация:	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»

Защита диссертации состоится «21» сентября 2017 года в 14:00 часов на заседании Диссертационного совета Д 003.075.04 на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» по адресу: 660036, г. Красноярск, Академгородок, д. 50, стр. 50.
Тел.: 8 (391) 243-15-79, эл.почта: diss_sovet@ibp.ru

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

Автореферат разослан «___» _____ 2017 года

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат биологических наук  Есимбекова Е.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Ca^{2+}-регулируемые целентеразин-зависимые фотопротеины являются разновидностью биолюминесцентных белков, которые обеспечивают свечение морских беспозвоночных. Наиболее известные представители этого типа белков – Ca^{2+}-регулируемые фотопротеины, отвечающие за свечение морских гидромедуз. Все они представляют собой односубъединичные глобулярные белки и содержат в недоступной для растворителя гидрофобной полости прочно связанный «преактивированный» кислородом целентеразин, 2-гидропероксицелентеразин. Биолюминесцентная реакция инициируется в ответ на связывание Ca^{2+}.

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

Биолюминесценция ктенофор (гребневиков) также обусловлена Ca^{2+}-регулируемыми фотопротеинами. Несмотря на то, что фотопротеины ктенофор и гидромедуз функционально схожи и в биолюминесцентной реакции в качестве субстрата используют целентеразин, они отличаются рядом свойств. Максимум спектра поглощения фотопротеинов ктенофор находится при 437 нм, тогда как для фотопротеинов гидромедуз – при 460 нм. Это указывает на то, что аминокислотное окружение связанного пероксипроизводного целентеразина в их активных центрах 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 – фотопротеиновый комплекс теряет способность к биолюминесценции при облучении светом видимого диапазона. Таким образом, светочувствительные биолюминесцентные белки ктенофор представляют собой тип фотопротеинов, структурная организация, механизмы биолюминесценции и фотоинактивации которых остаются малоизученными.

Цель диссертационной работы – 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, 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); на 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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования являлись две особи гребневика *Beroe abyssicola*, пойманные в районе беломорской биостанции Картеш Зоологического института РАН, из биолюминесцентных тканей которых были сконструированы кДНК библиотеки.

При проведении функционального скрининга кДНК библиотек клетки *E. coli* XL1Blue, содержащие полноразмерные участки кДНК, выращивали на LB-агаре с ампициллином. С чашек снимали реплики при помощи стерильной ацетатцеллюлозной мембраны. Колонии с реплик смывали средой SOB с ампициллином. В смыв добавляли ИПТГ до 1 мМ и инкубировали 4 ч при 37°С. Осадок клеток ресуспендировали в буфере, разрушали, добавляли целентеразин и оставляли на 4 ч в темноте при 4°С, после чего измеряли биолюминесцентную активность. Из активных клонов выделяли плазмидную ДНК и определяли ее нуклеотидную последовательность, из которой выводили аминокислотную последовательность белка. Сравнительный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с помощью сетевого ресурса ClustalW.

Экспрессионную плазмиду получали амплификацией кодирующей области pTriplEx2-BA со специфическими праймерами с последующим переклонированием в вектор для экспрессии pET22b(+) (Novagen, США). Для получения рекомбинантного апо-беровина и его мутантов трансформированные экспрессионными плазмидами клетки *E. coli* (штамм BL-21 RIL) культивировали в LB-среде, содержащей ампициллин. Экспрессию белка индуцировали добавлением ИПТГ. Выделение и очистку апо-беровина проводили как для апо-обелина из *Obelia longissima* с некоторыми модификациями. Высокоочищенный активный беровин получали инкубацией апофотопротеина с целентеразином в щелочных условиях с последующей очисткой с помощью ионообменной хроматографии. Все процедуры с беровином проводили при освещении красным светом, чтобы избежать фотоинактивации. Чистоту белка оценивали с помощью электрофореза в 12,5% ПААГ в присутствии 0,1% ДСН по методу Лэммли. Концентрацию белка определяли с помощью набора «Protein assay kit» (Bio-Rad). Выход активного фотопротеина 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 апофотопротеину при хроматографии на Mono Q, соответственно.

Биолюминесценцию измеряли с помощью люминометра (СКТБ «Наука», Красноярск). Сигнал регистрировали до прекращения свечения. Люциферазная активность была оценена как суммарный биолюминесцентный сигнал за 10 минут.

Спектры поглощения получены с помощью двухлучевого спектрофотометра Uvikon 943 (Kontron Instruments, Италия). Спектры биолюминесценции и флуоресценции измерены на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, США). Спектры корректировали на спектральную чувствительность детектора с помощью программы, входящей в комплект программного обеспечения прибора.

Биолюминесценцию беровина при разных [Ca^{2+}] измеряли, впрыскивая свободный от ЭДТА фотопротеин в кювету с раствором, содержащим кальций в заданной концентрации. 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. Измерения проводили при 20°С с помощью люминометра, оборудованного кюветным блоком с термостабилизацией и нейтральными фильтрами с различными коэффициентами пропускания.

Кинетику биолюминесцентного сигнала определяли методом «остановленной струи» при 20°С с помощью спектрометра SX20 (Applied Photophysics, Великобритания). Измерения проводили со свободным от ЭДТА раствором беровина при [Ca^{2+}] 0,1 и 20 мМ.

Для оценки влияния физиологической [Mg^{2+}] на кинетику биолюминесценции фотопротеин перед измерениями инкубировали с 1 мМ Mg^{2+} в течение 1 ч.

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. 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, в присутствии и при насыщающей концентрации субстрата, соответственно. Для расчета кажущихся констант диссоциации использовали уравнение:

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

где C и L – концентрации апофотопротеина и целентеразина, 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.

Фотоинактивацию проводили при 0°C с помощью источника света видимого спектрального диапазона. Константу фотоинактивации (k_i) рассчитывали по формуле:

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

где I – интенсивность биолюминесценции, t – время фотоинактивации.

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

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

Поиск условий кристаллизации апо-беровина выполняли, используя 384 коммерческих раствора, при помощи робота Mosquito (TTPLabtech, Великобритания) в 96-луночных планшетах методом «сидячей капли»: 0,3 мкл раствора белка смешивали с 0,3 мкл раствора для кристаллизации. Оптимизацию условий кристаллизации проводили методом «висячей капли» с различными концентрациями апо-беровина. Дифракционные данные получали при облучении кристалла длиной волны 0,9792 Å с использованием рентгеновского излучения синхротрона (BL17U1, Shanghai Synchrotron Radiation Facility, Китай). Дифракционные данные обрабатывали программой HKL2000. Фазы определяли методом молекулярной замены с помощью программы PHASER с использованием в качестве модели структуры апо-беровина с кальцием (PDB 4MN0). Окончательные модели были уточнены с помощью программ PHENIX и REFMAC5. Модель корректировали программой COOT. Визуализацию и сравнение молекулярных структур проводили с использованием PyMOL. Атомные координаты и структурные факторы беровина депонированы в «Protein Data Bank» (PDB код 5BPJ).

Структурные модели беровина построены с использованием пространственных структур обелина из *O. longissima* и *O. geniculata*, связанных с 2-гидропероксицелентеразином (PDB 1QV0 и 1JF0, соответственно), акворина, связанного с 2-гидропероксицелентеразином-*n* (PDB 1UHK), и Ca^{2+}-разряженного обелина, связанного с целентерамидом (PDB 2F8P), в качестве матриц посредством веб-серверов для моделирования белков Phyre2 и SWISS-Model. Матрицы для моделирования были автоматически выбраны веб-серверами. Объем внутренней полости рассчитан с помощью программы PocketFinder. Лиганд во внутреннюю полость молекулы апо-беровина встраивали методом молекулярного докинга с помощью DockingServer.

В качестве матрицы для сайт-направленного мутагенеза использовали экспрессионную плазмиду p22-BA, содержащую кодирующую часть гена беровина.

Мутагенез проводили с использованием набора «QuikChange kit» (Agilent, США) в соответствии с прилагаемым протоколом. Наличие мутаций подтверждали определением нуклеотидной последовательности ДНК результирующей плазмиды.

КОНСТРУИРОВАНИЕ И СКРИНИНГ кДНК БИБЛИОТЕК, АНАЛИЗ НУКЛЕОТИДНЫХ И АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ЭКСПРЕССИЯ, ОЧИСТКА И ПОЛУЧЕНИЕ АКТИВНОГО РЕКОМБИНАНТНОГО БЕРОВИНА

Получение и скрининг кДНК библиотек

Каждая кДНК библиотека из тканей особей ктенофор содержала ~2,4 × 10^5 независимых клона, при этом рекомбинантных клонов было более 90%. В результате скрининга обеих библиотек обнаружено 4 бактериальных клона с биолюминесцентной активностью.

Определение видовой принадлежности особей гребневика

Для точной идентификации вида ктенофор были определены нуклеотидные последовательности фрагментов генов 18S рРНК в кДНК (1-1227 пар нуклеотидов (п.н.)) обеих особей гребневиков. Сравнение последовательностей фрагментов 18S рРНК позволило отнести обе особи к виду *Beroe abyssicola*.

Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей беровина

В результате скрининга изолировано 4 кДНК генов, кодирующих рекомбинантный апо-беровин. Гены имели схожие размеры (1127-1131 п.н.), за исключением терминальной поли(А) последовательности. Каждый ген содержал 55 п.н. в 5'-некодирующей области перед первым стартовым кодоном, вариабельную 3'-некодирующую область (442-446 п.н.) и терминальную последовательность поли(А). Открытая рамка считывания, содержащая 624 п.н. с двойным стоп-кодоном, кодирует полипептид из 208 аминокислот с молекулярной массой 24,9 кДа. Максимальная идентичность аминокислотной последовательности беровина (25%) выявлена с обелином из *O. longissima* (рис. 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 1 – Сравнение аминокислотных последовательностей беровина (BA) и обелина (OL) из O. 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.

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

Выход рекомбинантного апо-беровина при экспрессии в клетках *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) RIL, трансформированных плазмидой p22-BA, составляет более 50% от всех белков клетки. Апо-беровин в основном накапливается в тельцах включения, откуда экстрагируется 6 М мочевиной и очищается с помощью ионообменной хроматографии. Выход высокоочищенного белка составляет 15-20 мг/л культуры.

Получение активного беровина

Апо-беровин может быть преобразован в активный фотопротеин инкубацией с целентеразином в присутствии O_2 в бескальциевых условиях при щелочных значениях pH в темноте. В отличие от фотопротеинов гидромедуз формирование активного беровина происходит без добавления восстанавливающих агентов. При молярном соотношении целентеразина и апобелка 1,1:1 эффективность зарядки апо-беровина без NaCl в 100 раз ниже, чем с 0,5 M NaCl (рис. 2А,Б). Концентрация активного беровина достигает максимума через 4 ч (рис. 2В). Однако в данных условиях только 50% апо-беровина переходит в активное состояние. Десятикратный молярный избыток целентеразина по отношению к апобелку увеличивает выход активного беровина в два раза (рис. 2Г).

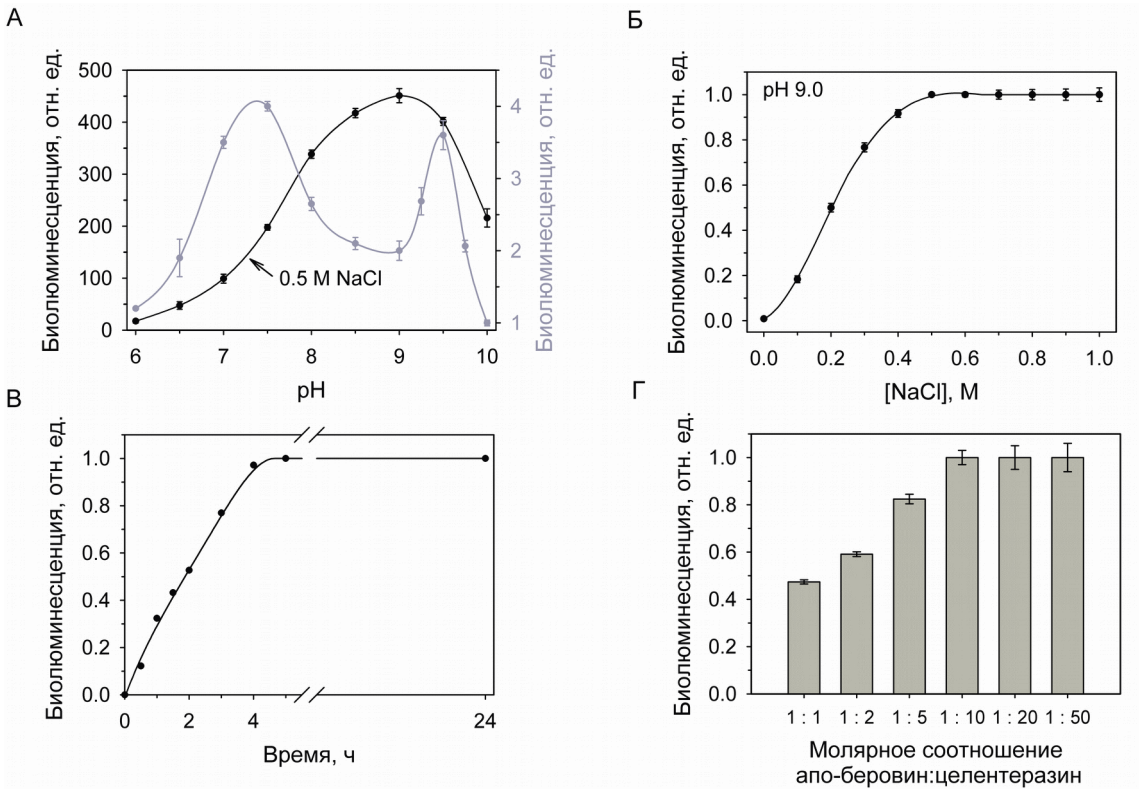


Рисунок 2 – Активация апо-беровина.
(А) Влияние pH на выход активного беровина с (–) и без (–) NaCl. (Б) Влияние NaCl на выход активного беровина при pH 9,0. (В) Кинетика активации апо-беровина целентеразином в присутствии 0,5 M NaCl при pH 9,0, контролируемая с помощью биолюминесценции. (Г) Влияние молярного соотношения апо-беровин:целентеразин на выход активного фотопротеина.
Концентрация апо-беровина – 3 мг/мл.

Поскольку условия *in vitro*, при которых наблюдается максимальный выход активного беровина, вряд ли встречаются в клетках животных, с помощью Ca-ЭГТА буфера были смоделированы внутриклеточные условия по [Ca^{2+}], ионной силе и pH, наблюдаемые в цитоплазме «покоящихся» клеток млекопитающих. Активация апо-беровина была выполнена без Mg^{2+} и в присутствии физиологической концентрации магния (1 мМ). В экспериментах с Mg^{2+} в раствор апо-беровина и в Ca-ЭГТА буфер был предварительно добавлен 1 мМ Mg^{2+}. Хотя присутствие Mg^{2+} увеличивает выход активного беровина более чем на порядок (рис. 3), эффективность образования активного фотопротеина в буфере с 0,5 M NaCl значительно выше даже при нейтральных значениях pH. Можно предположить, что в клетках ктенофор в процесс преобразования апо-беровина

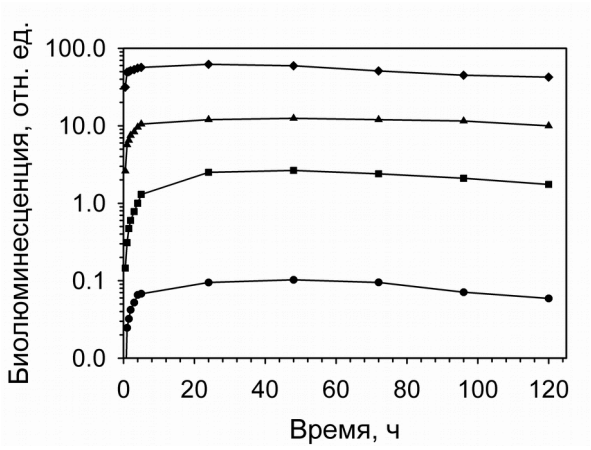


Рисунок 3 – Кинетика активации беровина: в Ca-ЭГТА буфере ([Ca^{2+}] = 1,0 × 10^{-8} М, 150 мМ KCl, 5 мМ PIPES, pH 7,2) без (●) и с (■) 1 мМ Mg^{2+}, в буфере 0,5 М NaCl, 5 мМ ЭДТА, 50 мМ Трис-HCl, pH 7,2 (▲) и pH 9,0 (♦). Зарядку апо-беровина проводили при 8°С в темноте. Концентрация апобелка – 0,9 μМ; молярное соотношение апо-беровин:целентеразин – 1:15.

в активный фотопротеин могут быть вовлечены дополнительные внутриклеточные факторы.

Таким образом, клонированы полноразмерные кДНК генов, кодирующих Ca^{2+}-регулируемый фотопротеин беровин из гребневика *B. abyssicola*. Беровин содержит 3 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%. 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. Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что фотопротеины ктенофор относятся к новому типу Ca^{2+}-регулируемых фотопротеинов.

ОСНОВНЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕРОВИНА

Биолюминесцентные свойства

Максимальная интенсивность биолюминесценции беровина наблюдается при pH 8,5 (рис. 4А) и 0,2 М NaCl (рис. 4Б). Оптимумы температур для максимальной интенсивности и квантового выхода биолюминесценции рекомбинантного беровина находятся при 15 и 9°С, соответственно (рис. 4В). Рекомбинантный беровин при 4°С полностью сохраняет свою активность, за 1 ч при 23°С теряет ~20% активности, при 30°С – ~55%, а при 37 и 40°С – почти всю активность (рис. 4Г). Вполне вероятно, что низкая термостабильность беровина обусловлена адаптацией к условиям обитания, поскольку кДНК его генов клонированы из гребневиков, живущих в холодных водах Белого моря.

Спектральные свойства

Апо-беровин имеет УФ спектр поглощения, типичный для белков без лиганда, с максимумом при 280 нм и плечом при 295 нм (рис. 5А). 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. Ca^{2+}-разряженный беровин в видимой области не поглощает, но также, как и Ca^{2+}-разряженные фотопротеины гидромедуз, имеет максимум поглощения при 335 нм.

Максимум спектра биолюминесценции беровина находится при 490 нм (рис. 5Б) и не зависит от pH в диапазоне 6,0-9,5. Ca^{2+}-разряженный беровин обладает яркой флуоресценцией (рис. 5Б), спектр которой зависит от pH. При нейтральных значениях pH максимум флуоресценции наблюдается при 420 нм, тогда как при щелочных значениях pH спектр становится бимодальным с максимумами при 410 и 485 нм. 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 для растворителя.

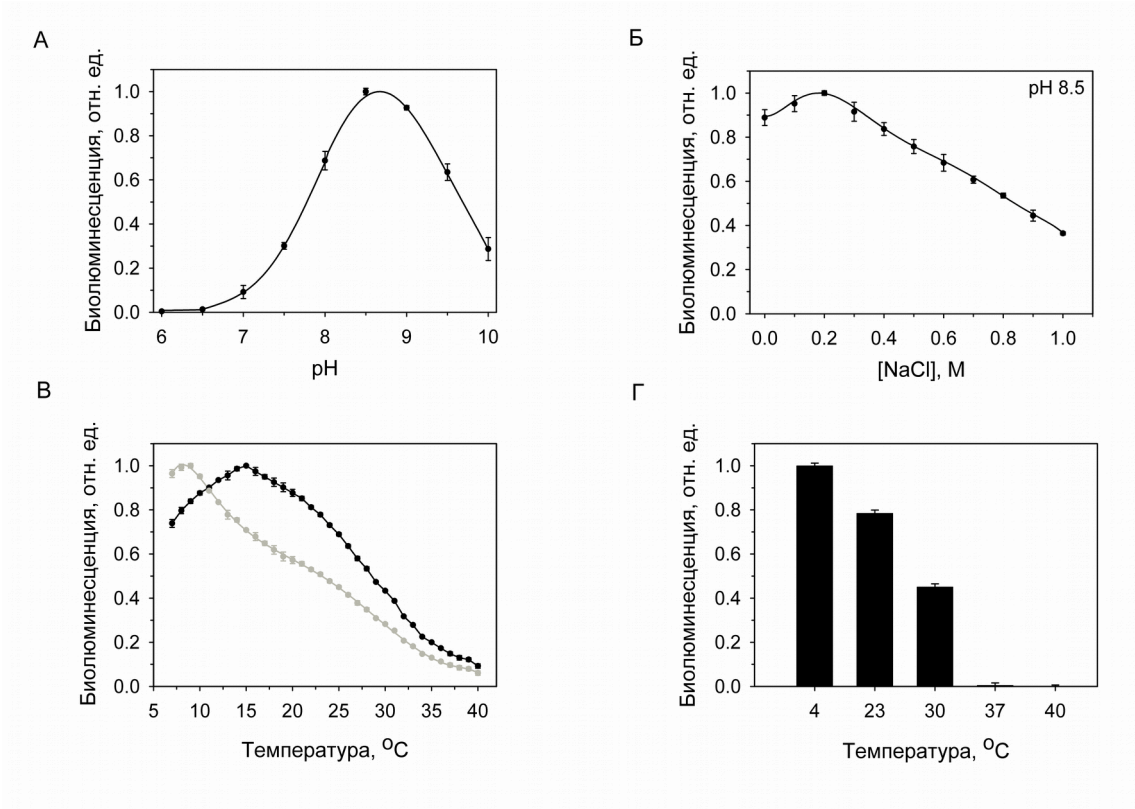


Рисунок 4 – Биолюминесцентные свойства беровина.
(А, Б) влияние pH и NaCl при pH 8,5 на максимальную интенсивность биолюминесценции, (В) влияние температуры на максимальную интенсивность (●) и квантовый выход (●) биолюминесценции, (Г) термостабильность фотопротеина при 4, 23, 37 и 40°C. Время инкубации – 1 ч.

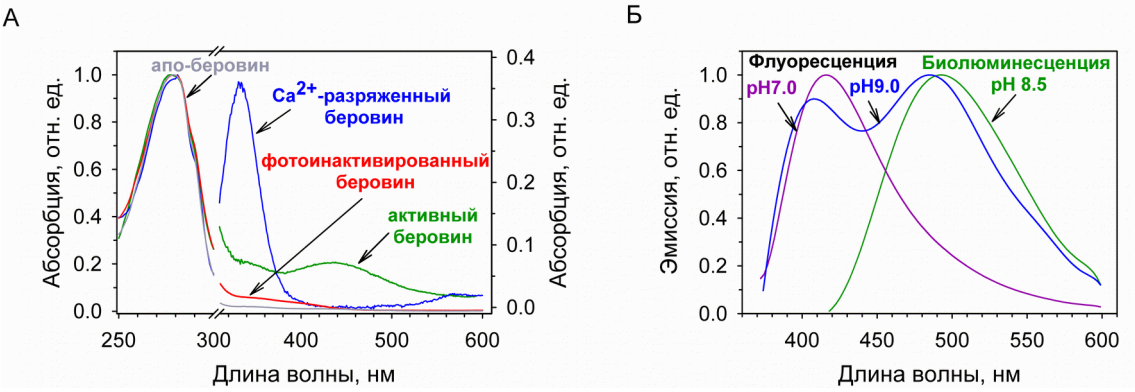


Рисунок 5 – Спектральные свойства беровина.
(А) Спектры поглощения активного беровина (–), Ca^{2+}-разряженного беровина (–), фотоинактивированного беровина (–) и апо-беровина (–). (Б) Спектр биолюминесценции беровина (–) и спектры флуоресценции Ca^{2+}-разряженного беровина (λ_{ex} = 350 нм) при pH 7,0 (–) и 9,0 (–).

Фотоинактивация

Беровин теряет практически всю активность (остаточная активность 0,001 и 0,003%) после 1 ч облучения светом видимого диапазона при 0°C. Процесс фотоинактивации хорошо описывается кинетикой реакции первого порядка с k_i = 0,038 ± 0,0017 $мин^{-1}$ (рис. 6). Время, за которое беровин теряет половину своей активности, –

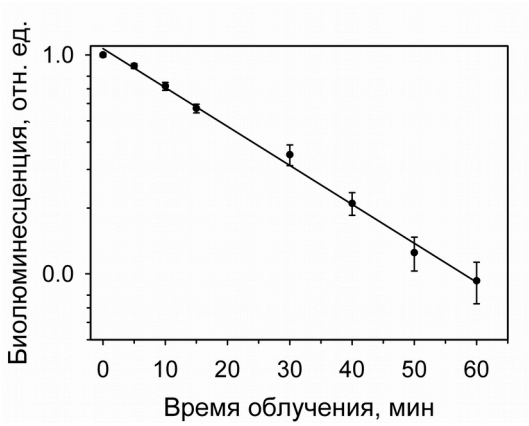


Рисунок 6 – Фотоинактивация беровина под воздействием света видимого диапазона.

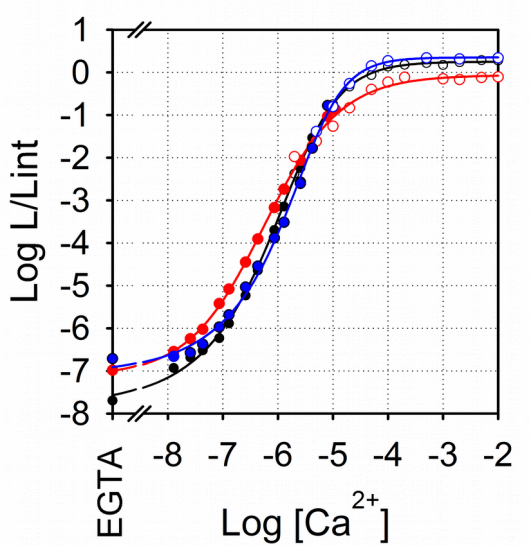


Рисунок 7 – Зависимость интенсивности биолюминесценции от $[Ca^{2+}]$ для рекомбинантных беровина (● и ○), акворина (● и ○) и обелина из O. longissima (● и ○) при 20°C. Заполненные символы – Ca-ЭГТА буферы; открытые символы – разведения $CaCl_2$. L – максимальная интенсивность биолюминесценции при данной $[Ca^{2+}]$, L_{int} – весь свет, полученный от идентичного образца при смешивании с насыщающей $[Ca^{2+}]$ в тех же условиях.

8,2 ± 0,81 мин. Фотоинактивированный беровин не поглощает ни в видимой, ни в ближней УФ областях (рис. 5А), что указывает на отсутствие целентеразина или его производных, связанных с белком.

Таким образом, под действием света молекула 2-гидропероксицелентеразина 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.

Чувствительность беровина к ионам кальция

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

Кажущаяся константа диссоциации (K_d), характеризующая чувствительность беровина к кальцию, определенная с помощью модели 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). Ca^{2+}-независимая люминесценция беровина почти на порядок ниже, чем у обелина и акворина (рис. 7).

Люциферазная активность апо-беровина

Апо-беровин катализирует биолюминесцентное окисление целентеразина без участия кальция. Наибольшая люциферазная активность наблюдается при нейтральных значениях pH в присутствии 0,2 М NaCl (рис. 8А). Однако люциферазная активность апо-беровина составляет не более ~1% активности люциферазы из *Renilla muelleri*. Максимум спектра биолюминесценции люциферазной реакции апо-беровина находится при λ_{max} = 505 нм и не зависит от pH (рис. 8Б). Температурный оптимум люциферазной реакции – 13°C (рис. 8В). 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. Так как облучение светом не влияет на люциферазную активность апо-беровина, скорее всего, в ходе реакции чувствительный к действию света интермедиат не образуется.

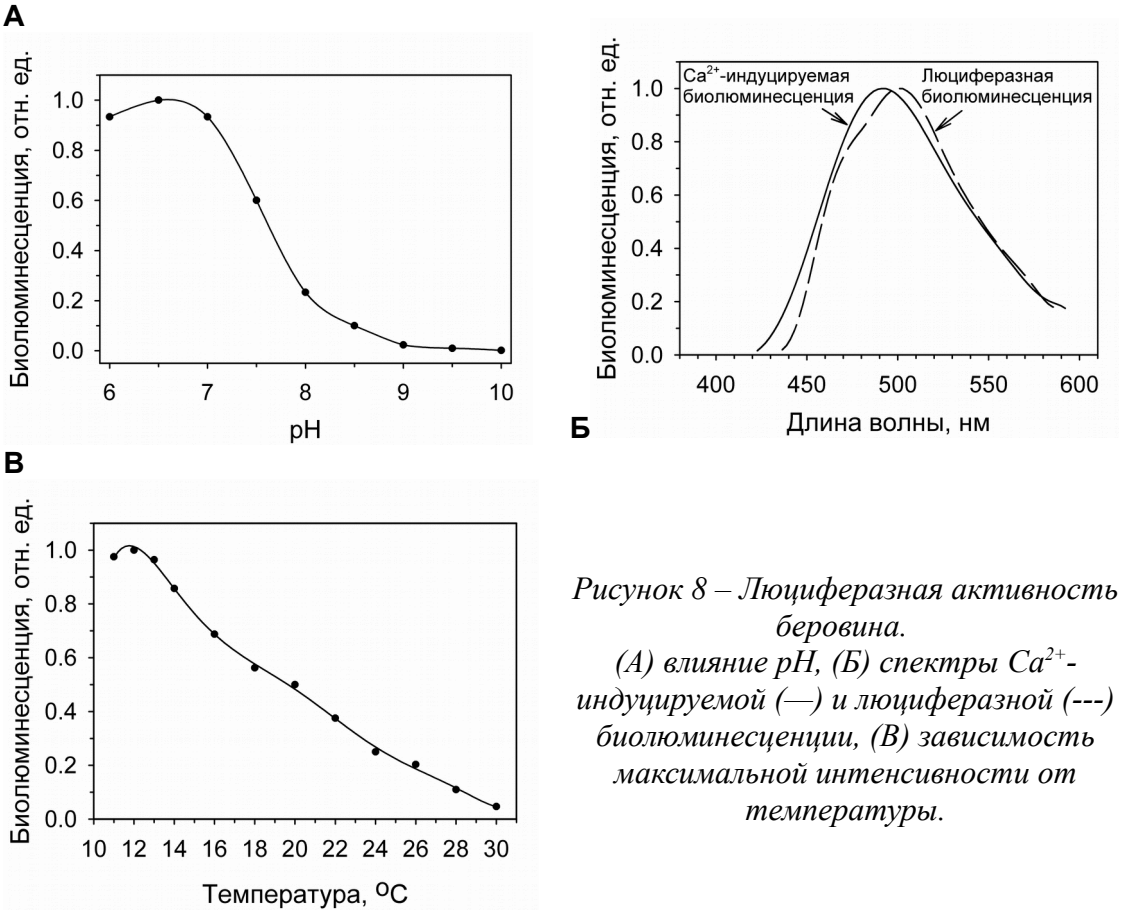


Рисунок 8 – Люциферазная активность беровина.
(А) влияние pH, (Б) спектры Ca^{2+}-индуцируемой (—) и люциферазной (---) биолюминесценции, (В) зависимость максимальной интенсивности от температуры.

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 действием света видимого диапазона.

ВЛИЯНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ИОНОВ МАГНИЯ НА БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ БЕРОВИНА

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

Аналогично другим Ca^{2+}-связывающим белкам, фотопротеины функционируют в клетках при 10^2-10^4-кратном избытке Mg^{2+} по отношению к Ca^{2+}. Присутствие Mg^{2+} в физиологической концентрации заметно влияет на зависимости интенсивности биолюминесценции от $[Ca^{2+}]$ для беровина и акворина (рис. 9А,Б), но не для обелина (рис. 9В). Однако характер воздействия для этих фотопротеинов отличается; если для акворина зависимости с Mg^{2+} и без него становятся идентичными при $[Ca^{2+}]$, близкой к насыщающей (рис. 9Б), то в случае беровина 1 мМ Mg^{2+} сдвигает зависимость как в области насыщающих, так и низких концентраций Ca^{2+} (рис. 9А). 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).

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. 10, таблица 1). Среди Ca^{2+}-регулируемых фотопротеинов, кинетика которых

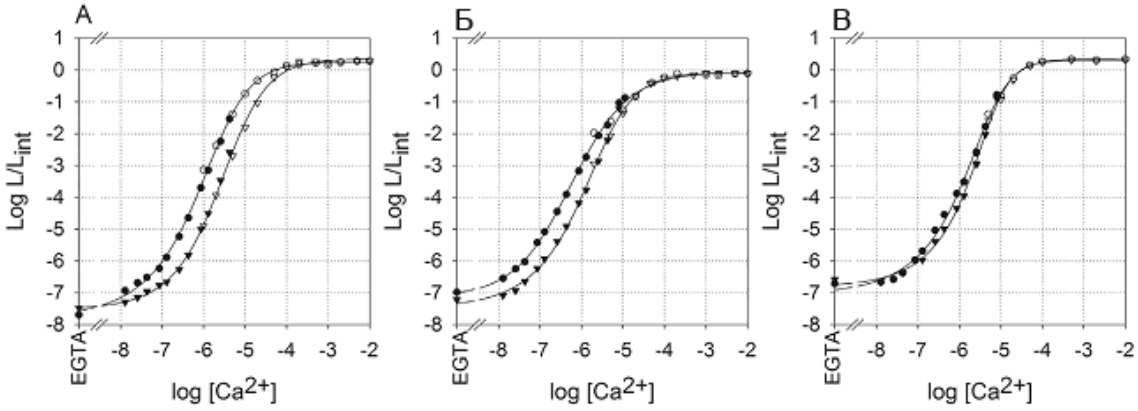


Рисунок 9 – Зависимость интенсивности биолюминесценции от [Ca^{2+}] для рекомбинантных беровина (А), акворина (Б) и обелина (В) из O. longissima без (●) и с (▼) 1 мМ Mg^{2+}. Заполненные символы – Ca-ЭГТА буферы; открытые символы – разведения $CaCl_2$. L – максимальная интенсивность биолюминесценции 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.

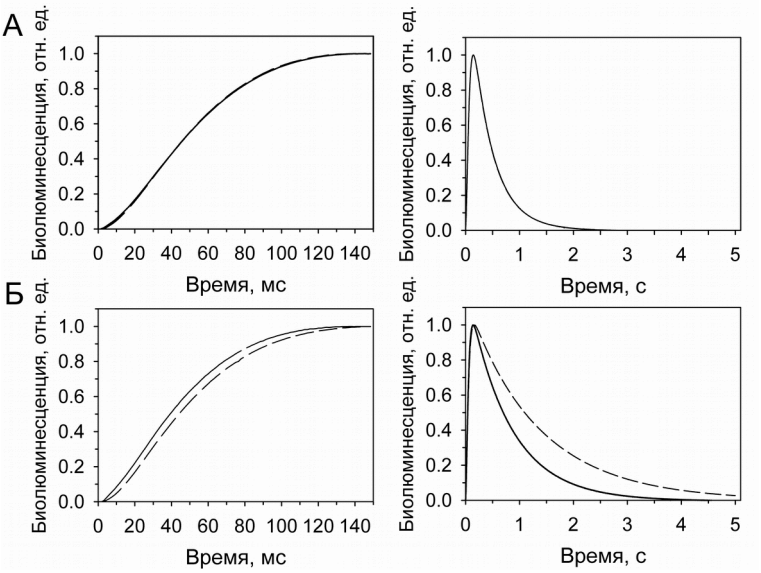


Рисунок 10 – Фаза подъема светового сигнала (слева) и полный биолюминесцентный сигнал (справа) беровина с 20 мМ Ca^{2+} (А) и 0,1 мМ Ca^{2+} (Б) без (—) и с (---) 1 мМ Mg^{2+}. Запись начинается с момента остановки потока. Каждая кривая нормирована на свой собственный максимум. Измерения выполнены при 20°С.

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}), значение k_{rise} в 6 раз выше, чем у беровина. Присутствие магния не влияет на k_{rise} при 20 мМ Ca^{2+}, но слегка замедляет скорость подъема светового сигнала беровина при 0,1 мМ (рис. 10Б, слева).

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 его биолюминесценции выше по сравнению с акворином (k_{decay} = 0,81 ± 0,01 c^{-1}), клитином (k_{decay} = 0,88 ± 0,01 c^{-1}) и митрокомином (k_{decay} = 1,10 ± 0,01 c^{-1}), но существенно ниже, чем для обелина (k_{1decay} = 40,00 ± 1,75 c^{-1}, k_{2decay} = 4,80 ± 0,05 c^{-1}). При 0,1 мМ Ca^{2+} в присутствии Mg^{2+} величина k_{decay} уменьшается в 1,7 раза (рис. 10Б, справа), а при 20 мМ Ca^{2+}не изменяется (рис. 10А, справа), тогда как в случае акворина влияние Mg^{2+} наблюдается даже при насыщающих концентрациях Ca^{2+}. 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+}.

Таблица 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

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА АПО-БЕРОВИНА С ИОНАМИ МАГНИЯ

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

Кластер из кристаллов апо-беровина с Mg^{2+} был выращен при 16°C в течение недели при следующих условиях: 20% PEG 3350, 0,2 М формиат магния, 0,1 М бис-Трис-пропан-HCl pH 6,5, концентрация апо-беровина 20 мг/мл. Размер единичного кристалла – 0,05 × 0,1 × 0,2 мм.

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

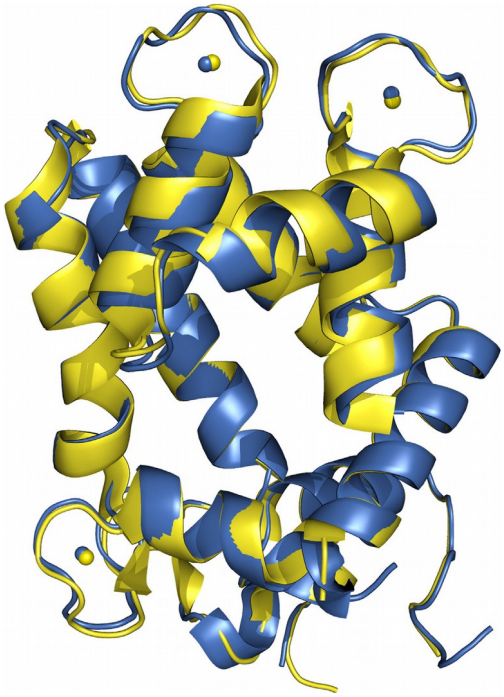


Рисунок 11 – Наложение структур апоберовина, связанного с Mg^{2+} (синий) и Ca^{2+} (желтый). Mg^{2+} и Ca^{2+} показаны в виде синих и желтых сфер, соответственно.

Пространственная структура апо-беровина с Mg^{2+} определена с разрешением 1,75 Å. Структура представляет собой глобулу, состоящую из двух доменов, 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. Хотя структуры апо-беровина, связанного с Mg^{2+} и Ca^{2+} (рис. 11), похожи (RMSD для атомов основной и боковых цепей составляет только 0,65 и 1,54 Å, соответственно), между ними есть локальные различия (таблица 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 2).

Структура Ca^{2+}-связывающих сайтов беровина

Ионы магния обнаружены в каждой из функциональных EF-hand петель I, III и IV апо-беровина (рис. 12). В отличие от Ca^{2+}, для координации которого требуется семь атомов кислорода (рис. 12, 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. Боковая цепь Glu, расположенного в 12-й позиции каждой Ca^{2+}-связывающей петли, формирует монодентатный лиганд в случае координации Mg^{2+} (рис. 12, слева) и бидентатный – в случае координации Ca^{2+} (рис. 12, справа). В петлях I и III шестым лигандом является атом кислорода молекулы воды. Среднее расстояние между

Таблица 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 CCP4

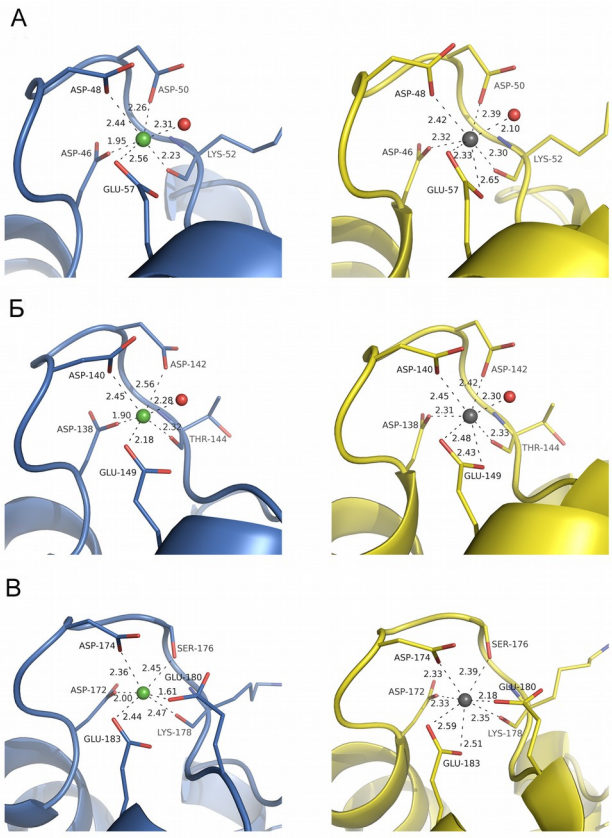


Рисунок 12 – Ca^{2+}-связывающие петли I (А), III (Б) и IV (В) апо-беровина с Mg^{2+} (слева, синий) и Ca^{2+} (справа, желтый, PDB код 4MN0). Mg^{2+} и Ca^{2+} показаны как зеленые и серые сферы, соответственно. Молекулы воды показаны в виде красных сфер. Расстояния указаны в Å.

Mg^{2+} и кислородом составляет 2,29, 2,28 и 2,22 Å для петель I, III и IV, соответственно. 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.

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+}. 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. 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+}. Вероятнее всего, все Ca^{2+}-связывающие петли беровина 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, по-видимому, обусловлено разной аффинностью Ca^{2+}-связывающих сайтов этих фотопротеинов к Mg^{2+}.

РОЛЬ ОТДЕЛЬНЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ В БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ БЕРОВИНА

Модель пространственной структуры беровина, связанного с 2-гидропероксицелентеразином

В отличие от фотопротеинов гидромедуз, пространственные структуры беровина с субстратом или продуктом реакции пока не определены. Поэтому с помощью компьютерного моделирования была получена пространственная структура беровина со связанной во внутренней полости белка молекулой 2-гидропероксицелентеразина (рис. 13А). Это позволило идентифицировать 13 аминокислот (рис. 13Б), боковые цепи которых, предположительно, участвуют в формировании внутренней полости беровина и координации субстрата. Для проверки модели эти остатки методом 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 (таблица 3).

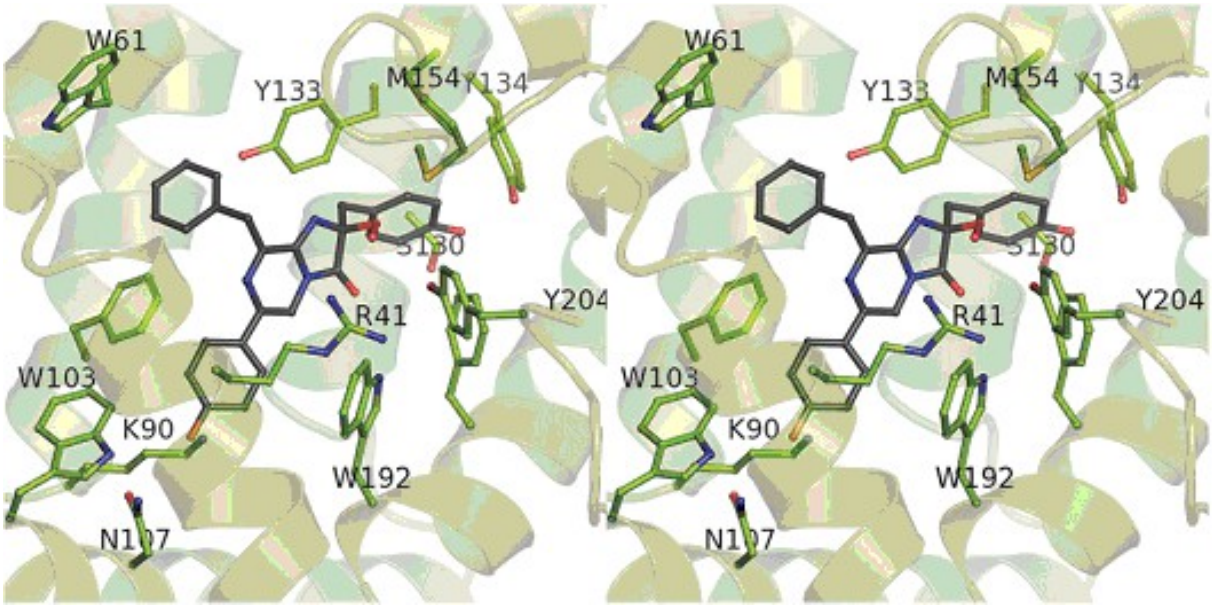


Рисунок 13 – Стереоизображение внутренней полости в модели структуры беровина со встроенным 2-гидропероксицелентеразином. Аминокислоты и 2-гидропероксицелентеразин показаны в виде зеленых и серых стержней, соответственно.

Биолюминесцентная активность мутантов беровина

Для всех мутантов беровина были определены: выход активного белка, удельная активность и уровень люциферазной биолюминесценции (таблица 3). Наибольшее падение биолюминесцентной активности вызывает замена Arg41 на Met (R41M). Хотя его замена на Lys (R41K) также снижает удельную активность, это снижение значительно меньше, чем для мутанта R41M. Это свидетельствует о том, что положительно заряженная гуанидиновая группа Arg важна для эффективной биолюминесценции беровина.

Бóльшая часть мутантов беровина с заменами остатков Tyr демонстрирует низкий уровень удельной активности, за исключением мутанта Y204F. Активность этого мутанта такая же, как и у беровина дикого типа, но выход активного белка ниже в 2 раза (таблица 3). Замена того же остатка Tyr на Glu (Y204E) или Lys (Y204K) приводит к почти полной

Таблица 3 – Биолюминесцентные свойства мутантов беровина

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

потере биолюминесцентной активности и существенно влияет на выход активного белка. 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 фотопротеиновый комплекс, а его люциферазная активность увеличивается более чем на порядок. В отличие от Y133H, мутант Y134H сохраняет 56,7% от активности беровина дикого типа и тот же выход активного белка. Замена Met153 и Met154 на остатки с более полярной боковой цепью (M153Y, M154Y и M154Q) ведет к значительной потере активности и способности образовывать активный фотопротеиновый комплекс. Согласно модели пространственной структуры беровина, Trp103, Asn107 и Lys90 расположены в N-концевой части субстрат-связывающей полости в непосредственной близости от 6-*p*-гидроксифенильной группы целентеразина. 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. Замена Trp103, Asn107 и Lys90 не только снижает удельную активность и выход активного белка, но и увеличивает люциферазную активность на 2-3 порядка (таблица 3).

Во внутренней полости беровина локализованы три остатка Trp (Trp61, Trp103 и Trp192) (рис. 13A). Мутанты с заменой Trp61 (W61F) и Trp103 (W103F) на Phe сохраняют только 3,7 и 10% активности, соответственно. Выход активного белка падает до 6-7% (таблица 3). Замена Trp103 на Tyr приводит к почти полной потере активности, что, по-видимому, может обуславливаться нарушением водородных связей в N-концевой части

субстрат-связывающей полости из-за появления ОН-группы Tyr. 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 (рис. 1), сохраняют 67,0% и 3,5% от активности фотопротеинов дикого типа. Кроме того, замены остатков Trp на Phe в беровине приводят к увеличению люциферазной активности апо-беровина более чем в 10 раз (таблица 3).

Не было обнаружено ни одного мутанта беровина с активностью более 1% от активности беровина дикого типа, который был бы устойчив к фотоинактивации.

Тушение триптофановой флуоресценции апо-беровина и его Trp мутантов целентеразином

Образование активного беровина из апобелка, целентеразина и молекулярного кислорода приводит к тушению Trp флуоресценции. Остаточная флуоресценция беровина (~30% флуоресценции апо-беровина), превышающая таковую и обелина, и акворина (~5-6% от флуоресценции апобелков), указывает на то, что связывание целентеразина с апо-беровином тушит флуоресценцию меньшего числа Trp остатков, чем в случае обелина или акворина. Замены Trp103 и Trp192 на Phe приводят к снижению общей флуоресценции апо-беровина почти на 20%, а замена Trp61 даже усиливает ее (рис. 14). 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.

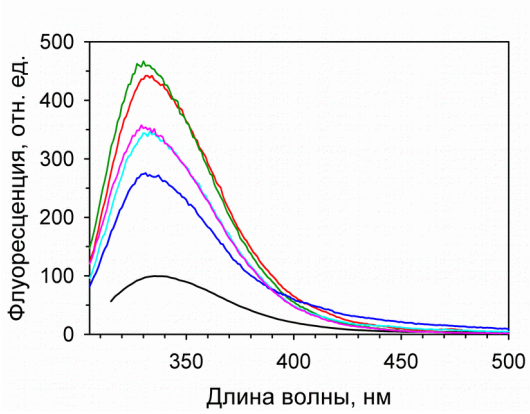


Рисунок 14 – Спектры флуоресценции апо-беровина дикого типа (–), беровина, связанного с целентеразином (–), апо-W61F (–), апо-W103F (–), апо-W103Y (–) и апо-W192F (–) мутантов беровина.

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. Значения K_D для мутантов W61F (2,60 ± 0,30 μM) и 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, 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.

Спектральные свойства мутантов беровина

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 вызывает смещение спектра биолюминесценции в длинноволновую область (λ_{max} = 535 нм) (рис. 15А). По аналогии с фотопротеинами гидромедуз, спектральный сдвиг может быть результатом либо увеличения полярности окружения

излучателя, либо изменением эффективности диссоциации протона ОН-группы 6-*p*-гидроксифенильного кольца возбужденного целентерамида.

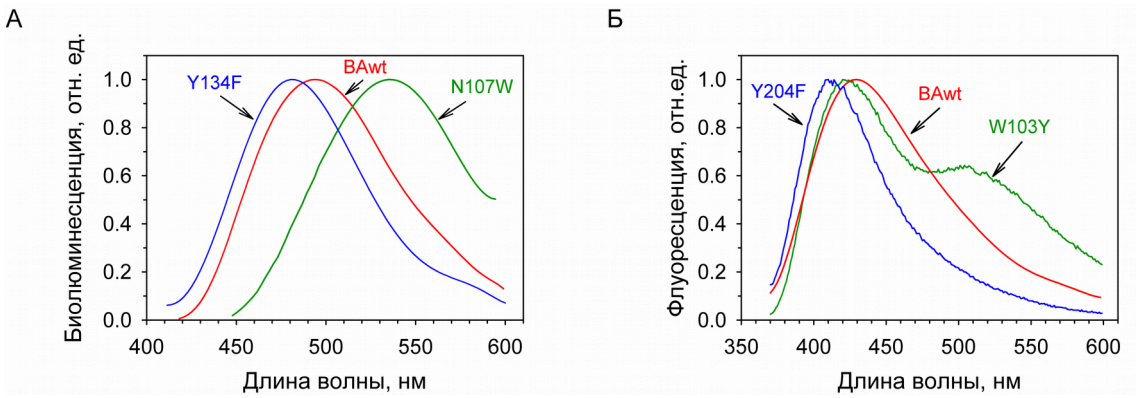


Рисунок 15 – (А) спектры биолюминесценции беровина дикого типа (–) и мутантов N107W (–) и Y134F (–); (Б) спектры флуоресценции Ca^{2+}-разряженных беровина дикого типа (–) и мутантов W103Y (–) и Y204F (–). Длина волны возбуждения равна 350 нм.

Спектры флуоресценции почти всех Ca^{2+}-разряженных мутантов отличаются от спектров Ca^{2+}-разряженного беровина дикого типа (рис. 15Б). По своим флуоресцентным свойствам мутанты могут быть поделены 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.

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. 13). 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. В отличие от фотопротеинов гидромедуз, активный беровин образуется при щелочных pH, при которых может происходить ионизация боковых групп аминокислот, в частности ОН-группы Tyr204, который также расположен рядом с пероксигруппой целентеразина и гуанидиновой группой Arg41. Хотя pK ОН-группы тирозина 10,2, в аминокислотном окружении внутри белковой молекулы его значение 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 (рис. 16). Действительно, замена Arg41 приводит к практически полной потере биолюминесцентной активности беровина. 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, поддерживает это предположение, так как катион-π взаимодействие должно сохраниться.

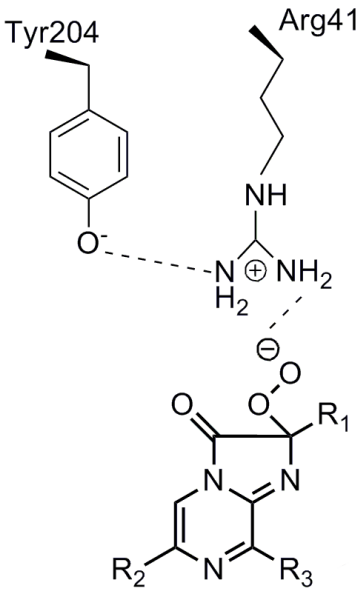


Рисунок 16 – Предполагаемый механизм стабилизации пероксид-аниона целентеразина во внутренней полости беровина.

Биолюминесцентная реакция, вероятнее всего, инициируется конформационными изменениями в ответ на связывание кальция, которые приводят к смещению боковой цепи Arg41 и, следовательно, нарушению взаимодействия между зарядами пероксид-аниона и гуанидиновой группы. Следует подчеркнуть, что хотя предложенный механизм и пространственная модель 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.

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 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 M и не требует присутствия восстанавливающих агентов.
3. Наибольший квантовый выход биолюминесцентной реакции наблюдается при pH 8,5 в присутствии 0,2 M NaCl и температуре 9°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. Рекомбинантный беровин, аналогично природному фотопротеину, теряет активность под действием света видимого диапазона.
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 ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах

1. Markova, S.V. The light-sensitive photoprotein berovin from the bioluminescent ctenophore *Beroe abyssicola*: a novel type of Ca^{2+}-regulated photoprotein / S.V. Markova, **L.P. Burakova**, S. Golz., N.P. Malikova, L.A. Frank, E.S. Vysotski // FEBS Journal. – 2012. – V.279. – P. 856–870.
2. **Burakova, L.P.** All Ca^{2+}-binding loops of light-sensitive ctenophore photoprotein berovin bind magnesium ions: The spatial structure of Mg^{2+}-loaded apo-berovin / **L.P**. **Burakova,** P.V. Natashin, N.P. Malikova, F. Niu, M. Pu, E.S. Vysotski, Z.J. Liu // J Photochem Photobiol B. – 2016. – V.154. – P. 57–66.
3. **Burakova, L.P.** Role of certain amino acid residues of the coelenterazine-binding cavity in bioluminescence of light-sensitive Ca^{2+}-regulated photoprotein berovin / **L.P. Burakova**, G.A. Stepanyuk, E.V. Eremeeva, E.S. Vysotski // Photochem Photobiol Sci. – 2016. – V.15. - P. 691–704.

Тезисы в материалах конференций

1. Markova, S.V. Ca^{2+}-regulated photoproteins of the bioluminescent ctenophores: cloning, expression and some properties / S.V. Markova, **L.P. Burakova**, S. Golz, L.A. Frank , E.S. Vysotski // Luminescence. – 2004. – V.19. – P. 160–161**.**
2. **Burakova, L.P.** The recombinant Ca^{2+}-regulated photoprotein berovin from *Beroe abyssicola* displays *in vitro* both luciferase and photoprotein activities / **L.P. Burakova**, S.V. Markova, S. Golz, L.A. Frank, E.S. Vysotski // Luminescence. – 2006. – V.21. – P. 272.
3. **Burakova, L.P.** Testing of crucial amino acids for light inactivation of Ca^{2+}-regulated photoprotein berovin from ctenophore *Beroe abyssicola* with site-directed mutagenesis / **L.P. Burakova**, S.V. Markova, G.A. Stepanyuk, E.S. Vysotski // Luminescence. – 2008. V.23. – P 60.
4. **Burakova, L**. Light-Sensitive Photoproteins of Ctenophores: a Novel Type of Ca^{2+}-regulated Photoproteins / **L. Burakova**, S. Markova, G. Stepanyuk, N. Malikova and E. Vysotski // 16th International Congress on Photobiology, 12th Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. – 2014. – P. 391.
5. **Буракова, Л.** Роль остатков триптофана в функционировании светочувствительного фотопротеина беровина / **Л. Буракова**, Г. Степанюк, Е. Еремеева, Е. Высоцкий // VII Съезд Российского фотобиологического общества. - 2014. – с. 99.

Патенты

1. Golz S., Markova S., **Burakova L.**, Frank L., Vysotski E. Isolated berovin photoprotein and use thereof. Patent: WO 2005021591-A 1 10-MAR-2005.