

## Предсказание влияния замены отдельных аминокислотных остатков беровина, $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемого фотопротейна ктенофор, на условия его активации *in vitro*

Буракова Л.П.<sup>1, 2\*</sup>, Иванисенко Н.В.<sup>3, 1, 4</sup>, Рукосуева Н.В.<sup>1</sup>, Иванисенко В.А.<sup>3, 1</sup>,  
Высоцкий Е.С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биофизики СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия

<sup>2</sup> Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия

<sup>3</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

<sup>4</sup> AIRI, Москва, Россия

\* burakoval@mail.ru

**Ключевые слова:** биолюминесценция; фотопротейны; ктенофоры; беровин; молекулярное моделирование

**Мотивация и цель:** Биолюминесценцией, способностью излучать свет в видимом диапазоне спектра длин волн, обладают многочисленные наземные и морские живые организмы. Это явление наиболее распространено в морской среде. За свечение отвечают специальные белки, катализирующие окисление субстрата люциферина. Известно два основных их типа: люциферазы, работающие как классический фермент, и фотопротейны, образующие с субстратом устойчивый комплекс. Свечение гребневиков и гидромедуз обеспечивается  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемыми фотопротейнами, которые в бескальциевых условиях представляют собой комплекс апобелка с 2-гидропероксицелентеразином, а их свечение инициируется ионами кальция. Несмотря на схожие функции и пространственные структуры, фотопротейны гребневиков и гидромедуз различаются по ряду свойств. Рекомбинантные фотопротейны ктенофор и медуз имеют низкую гомологию аминокислотных последовательностей и разные условия образования активного фотопротейна *in vitro*. Наиболее изученным фотопротейном ктенофор на сегодняшний день является беровин из *Beroe abyssicola*. Наибольший выход активного белка наблюдается при инкубации с целентеразином в щелочных условиях (pH 9.0) и при высокой концентрации соли (0.5 M NaCl) [1], тогда как для фотопротейнов гидромедуз это происходит при условиях, близких к физиологическим. Фотопротейны ктенофор обладают фоточувствительностью и инактивируются при облучении светом широкого диапазона длин волн [2], а для фотопротейнов гидромедуз такого эффекта не наблюдается. Также беровин является довольно термолабильным белком и теряет свою активность уже при 37 °C, что не характерно для белков медуз. Такие особенности фотопротейнов ктенофор накладывают ряд ограничений на их использование в качестве маркерных молекул при работе с эукариотическими клеточными линиями. Поскольку аминокислотный состав активного центра беровина кардинально отличается от такового гидромедуз, а пространственная структура его комплекса с 2-гидропероксицелентеразином не определена, то целью данной работы было предсказать аминокислотные замены в беровине, которые могут привести к сдвигу условий активации в область физиологических значений pH и концентрации соли.

*Методы и алгоритмы:* Вероятное положение аминокислотных остатков относительно субстрата в активном центре определяли из сравнения модели пространственной структуры беровина, полученной с помощью программы AlphaFold [3], с кристаллической структурой обелина в связанном с субстратом состоянии. С помощью нее в беровине был идентифицирован находящийся в гидрофобном окружении кластер полярных остатков, включая Lys90, который может образовывать сеть водородных связей с боковой цепью Asn107 и карбонильным кислородом основной цепи. Учитывая, что Lys90 положительно заряжен при нейтральном pH и нейтрален при щелочных pH, было сделано предположение, что его замена на алифатические аминокислоты может привести к изменению pH активации апофотопротеина. Для подтверждения этого с помощью сайт-направленного мутагенеза было получено 15 вариантов различных комбинаций аминокислотных замен с участием вышеуказанных аминокислотных остатков. Только 8 из них, K90A, K90M, N107S, K90A/N107S, K90M/N107S, K90A/W103F/N107S, K90M/W103F/N107S и K90M/W103F/N107V, показали способность к образованию фотопротеинового комплекса. Для каждого были определены условия активации относительно pH и концентрации NaCl. Все белки получены в высокоочищенном состоянии после инкубации апобелка с целентеразином и последующим отделением несвязавшихся компонентов с помощью ионообменной хроматографии, а их биолуминесцентные и спектральные свойства проанализированы.

*Результаты:* Для 6 мутантов беровина: K90A, K90M, K90A/N107S, K90M/N107S, K90A/W103F/N107S и K90M/W103F/N107S, были выявлены сдвиг условий активации в область физиологических значений pH и снижение зависимости от соли. Основной проблемой оказалось значительное снижение выхода активного белка при активации *in vitro* и удельной активности мутантов. Наибольший выход активного белка (~47 % от общего белка, полученного при хроматографии) в условиях активации при pH 6.0 и без NaCl показал K90M/W103F/N107S. При этом его удельная биолуминесцентная активность была почти в 3.5 раза ниже, чем у K90A, и составила 2.3 % от активности дикого беровина. Однако ее величина превышала таковую у K90M в 7.7 раза и практически совпадала с этим показателем для K90M/N107S. Но выход активного белка K90M/N107S был всего около 10 %. То есть добавление замены N107S к K90M увеличивает удельную активность, а добавление W103F повышает выход активного белка, как и было предсказано. Следует отметить, что подобного эффекта не наблюдалось для K90A, поскольку выход активного белка для K90A/N107S и K90A/W103F/N107S был одинаковым – около 10 %, а удельная активность только снижалась. Все 6 мутантов продемонстрировали снижение чувствительности к облучению светом по сравнению с диким беровином, а также некоторое повышение термостабильности. На спектр биолуминесценции в фотопротеинах влияют аминокислотные остатки, боковые радикалы которых находятся в непосредственной близости от 6-(p)-гидроксифенильной группы целентеразина. Согласно модели пространственной структуры беровина, Lys90 и Asn107 занимают как раз такую позицию. Максимумы спектров биолуминесценции всех 6 мутантов сдвинуты в фиолетовую область. Если спектр флуоресценции  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного беровина зависит от pH и показывает наличие разных ионных состояний целентерамида, то у всех исследованных белков этот показатель соответствовал только его нейтральной форме.

**Выводы:** Таким образом, экспериментальными данными подтверждена предсказанная с помощью методов молекулярного моделирования роль Lys90 и Asn107 в формировании условий активации беровина *in vitro* и получены мутанты с оптимальным активацией при физиологических условиях и с повышенной фотостабильностью.

**Финансирование:** Исследование поддержано грантом РНФ «Рациональный дизайн целентеразин-зависимых биолюминесцентных белков с новыми свойствами с использованием методов мутагенеза и молекулярного моделирования» (№ 22-14-00125).

## **Prediction for the substitution of individual amino acid residues of berovin, the ctenophore Ca<sup>2+</sup>-regulated photoprotein, to affect its activation conditions *in vitro***

Burakova L.P.<sup>1, 2\*</sup>, Ivanisenko N.V.<sup>3, 1, 4</sup>, Rukosueva N.V.<sup>2</sup>, Ivanisenko V.A.<sup>3, 1</sup>, Vysotski E.S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Biophysics, SB RAS, Krasnoyarsk, Russia

<sup>2</sup> Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia

<sup>3</sup> Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>4</sup> AIRI, Moscow, Russia

\* burakoval@mail.ru

**Key words:** bioluminescence; photoproteins; ctenophores; berovin; molecular modeling

**Motivation and Aim:** Bioluminescence, i. e. the ability to emit light in the visible wavelength range, is characteristic of numerous marine and a few land organisms. This feature is attributed to the specific proteins that catalyze the oxidation of the substrate called luciferin. The two main types of such proteins are: luciferases, which act as classical enzymes, and photoproteins, which form a stable complex with the substrate. The luminescence of ctenophores and hydromedusae is initiated by calcium ions and is provided by Ca<sup>2+</sup>-regulated photoproteins, which under calcium-free conditions are a complex of apoprotein with 2-hydroperoxycoelenterazine. Despite similar functions and spatial structures, the photoproteins of ctenophores and hydromedusae differ in a number of properties. The recombinant photoproteins of ctenophores and jellyfish have low amino acid sequence identity and different conditions for the formation of an active photoprotein *in vitro*. The now most-studied ctenophore photoprotein is berovin from *Beroë abyssicola*. Its highest yield is observed when it is incubated with coelenterazine under alkaline conditions (pH 9.0) and at high salt concentration (0.5 M NaCl) [1], while, e.g., for the hydromedusan photoproteins this occurs under conditions close to physiological ones. Ctenophore photoproteins are photosensitive and can be inactivated by irradiation with light of a wide range of wavelengths [2], whereas this effect is not observed in hydromedusan photoproteins. Berovin is also quite thermolabile and loses its activity already at 37 °C, which is not typical for jellyfish proteins. Such features of ctenophore photoproteins somewhat restrict their applicability as the marker molecules in eukaryotic cell lines. Since the amino acid composition of berovin active center is utterly different from that of hydromedusae, and the spatial structure of its complex with 2-hydroperoxycoelenterazine has not yet been determined, the goal of this work was to

predict the amino acid substitutions in berovin that can lead to a shift in activation conditions to the physiological pH values and salt concentration.

**Methods and Algorithms:** The probable position of amino acid residues relative to the substrate in the active site was determined by superimposing the model of the spatial structure of berovin, obtained by using the AlphaFold [3], onto the crystal structure of obelin in the substrate-bound conformation state. Using it, a cluster of polar residues, located in a hydrophobic environment, was identified in berovin, including Lys90, which can form a hydrogen network bonds with a side chain of Asn107 and the carbonyl oxygen of the main chain. Given that Lys90 is positively charged at neutral pH and is neutral at alkaline pH, it was hypothesized that its replacement with aliphatic amino acids could lead to a change in the pH of apophotoprotein activation. To confirm this, the 15 variants of various combinations of amino acid substitutions involving the above amino acid residues were obtained using site-directed mutagenesis. Only the 8 ones, K90A, K90M, N107S, K90A/N107S, K90M/N107S, K90A/W103F/N107S, K90M/W103F/N107S, K90M/W103F/N107V, showed the ability to form a photoprotein complex. For each of them, activation conditions were determined regarding pH and NaCl concentration. All proteins were obtained in a highly purified state after incubation of the apoprotein with coelenterazine and subsequent separation of the unbound components by using ion exchange chromatography; their bioluminescent and spectral properties were analyzed.

**Results:** For the 6 berovin mutants: K90A, K90M, K90A/N107S, K90M/N107S, K90A/W103F/N107S, and K90M/W103F/N107S a shift in activation conditions to the physiological pH values and a decrease in salt dependence were found. The main problem turned out to be a significant decrease in the yield of active protein upon activation *in vitro* and in the specific activity of the mutants. The highest yield of active protein (~47 % of its total amount obtained by chromatography) under activation conditions at pH 6.0 and without NaCl was shown for the K90M/W103F/N107S. Moreover, its specific bioluminescent activity was almost 3.5 times lower than that of K90A and amounted to 2.3 % of the activity of the wild berovin. However, its value exceeded that of K90M 7.7 times and practically coincided with the one of K90M/N107S. However the yield of the active K90M/N107S protein was only about 10 %. That is, adding the N107S to K90M increases the specific activity, and adding W103F increases the yield of the active protein, as was predicted. It should be noted that a similar effect was not observed for K90A, since the yield of the active protein for K90A/N107S and K90A/W103F/N107S was the same – about 10 %, and the specific activity only decreased. All the 6 mutants showed a decrease in sensitivity to light irradiation compared to the wild berovin, as well as a slight increase in thermostability. The bioluminescence spectra of photoproteins are influenced by amino acid residues whose side radicals are closed to the 6-(p)-hydroxyphenyl group of coelenterazine. According to the model of the spatial structure of berovin, Lys90 and Asn107 occupy exactly this position. The maxima of the bioluminescence spectra of the mutants were shifted to the violet region. Whereas the fluorescence spectrum of Ca<sup>2+</sup>-discharged berovin depends on pH and shows the presence of different ionic states of coelenteramide, this indicator corresponded only to its neutral form in all the proteins studied.

**Conclusion:** Thus, the role of Lys90 and Asn107 in the formation of conditions for the activation of berovin *in vitro* was experimentally predicted by molecular modeling

methods and the mutants with optimal activation under physiological conditions and with increased photostability were obtained.

*Funding:* The study was supported by RSF “Rational design of coelenterazine-dependent bioluminescent proteins with novel properties using mutagenesis and molecular modeling” (No. 22-14-00125).

#### *Список литературы/References*

1. 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 *Beroë abyssicola*: a novel type of  $\text{Ca}(2+)$  – regulated photoprotein. *FEBS J.* 2012;279(5):856-870
2. Burakova L.P., Lyakhovich M.S., Mineev K.S., Petushkov V.N., Zagitova R.I., Tsarkova A.S., Kovalchuk S.I., Yampolsky I.V., Vysotski E.S., Kaskova Z.M. Unexpected Coelenterazine Degradation Products of *Beroë abyssicola* Photoprotein Photoinactivation. *Org Lett.* 2021;23(17):6846-6849
3. Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature.* 2021;596(7873):583-589