

Совершенствование репортерных свойств люциферазы *Renilla* с использованием методов молекулярного моделирования

Ларионова М.Д.^{1*}, Иванисенко Н.В.^{1, 2, 3}, Иванисенко В.А.^{1, 2}, Буракова Л.П.¹, Наташин П.В.¹, Еремеева Е.В.¹, Высоцкий Е.С.¹

¹ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН»,
Институт биофизики СО РАН, Красноярск, Россия

² Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

³ AIRI, Москва, Россия

* Larionova.marina@inbox.ru

Ключевые слова: биолюминесценция; мутагенез; ProteinMPNN; AlfaFold2; целентеразин; рациональный дизайн белков; биолюминесцентный репортер

Люцифераза *Renilla* представляет собой односубъединичный белок семейства α/β -гидролаз, ответственный за биолюминесценцию морского мягкого коралла *Renilla*. Люцифераза дикого типа катализирует окислительное декарбоксилирование субстрата целентеразина с излучением голубого света ($\lambda_{\text{max}} = 480$ нм) [1]. Ранее многократно предпринимались попытки совершенствования люциферазы *Renilla*, которые включали мутагенез на основе консенсусных последовательностей α/β -гидролаз [2], случайный мутагенез [3, 4], а также внедрение дисульфидных связей [5]. Одним из самых перспективных и высокоактивных вариантов люциферазы *Renilla* является «желтый» мутант люциферазы (RmY), излучающий с максимумом 535 нм с нативным целентеразином (CTZ) и 574 нм в реакции с синтетическим аналогом CTZ-v [6]. «Желтый» мутант люциферазы зарекомендовал себя как удобный внутриклеточный сенсор для биолюминесцентного имиджинга.

Цель: Современные биоинформатические подходы позволяют не только модернизировать ферментативные функции белков, но и *de novo* предсказывать белки с заданными свойствами [7]. Поэтому рациональный дизайн с целью улучшения ферментативных характеристик и спектральных свойств RmY представляет большой интерес с точки зрения совершенствования RmY как репортерного биолюминесцентного белка.

Методы: Для предсказания аминокислотных замен, способных изменять физико-химические свойства люциферазы *Renilla* (RmY) использовались современные методы молекулярного моделирования и глубокого машинного обучения, включая модели обратного фолдинга (ProteinMPNN). Для этого были реконструированы модели *Renilla* в комплексе с CTZ/CTZ-v, на основе которых предсказаны мутации, способные изменять полярное окружение субстрата, увеличивать термостабильность фермента и влиять на кинетику биолюминесценции.

Результаты: Предсказанные точечные и множественные замены были внесены в последовательность RmY для получения мутантных вариантов люциферазы посредством экспрессии в *E. coli*. В результате первичного скрининга на бактериальных лизатах были идентифицированы мутанты, в большей степени влияющие на ферментативные и спектральные характеристики люциферазы.

В дальнейшем удачные мутанты более тщательно были охарактеризованы в виде чистых белковых препаратов. В ходе работы был оптимизирован протокол получения препаратов люциферазы из бактериальной цитоплазмы с сохранением до 80 % биолуминесцентной активности и продукцией до 30 мг/л. В результате рационального мутагенеза идентифицированы мутанты RmY, демонстрирующие ожидаемые эффекты – повышение термостабильности и изменение спектров биолуминесценции. Были выявлены мутанты, которые характеризовались сдвигом температурного оптимума фермента от 26 до 37 °C; показано, что за эти изменения ответственна одиночная замена K189Q. Кроме того, анализ мутантов позволил выявить аминокислотные остатки, выполняющие критическую роль в образовании эмиттера и, соответственно, в изменении спектральных характеристик мутантных люцифераз.

Выводы: Таким образом, нам удалось продемонстрировать высокий потенциал методов предсказания последовательности белков на основе ProteinMPNN и AlphaFold2, позволивших провести рациональный дизайн люциферазы Renilla. В результате работы были получены термостабильные мутанты люциферазы Renilla с оптимумом работы при условиях культивирования клеток млекопитающих (37 °C). Кроме этого, идентифицированы новые мутанты, расширяющие ряд целентеразин-зависимых люцифераз с эмиссией в области от 400 нм (фиолетовой) до 575 нм (желтой). Проведенные компьютерное моделирование и экспериментальная работа позволили выявить новых мутантов люциферазы Renilla, имеющих преимущества для их использования в качестве биолуминесцентных репортеров для различных аналитических задач.

Финансирование: Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-14-00125.

Improving the reporter properties of Renilla luciferase by using molecular modeling methods

Larionova M.D.^{1*}, Ivanisenko N.V.^{1, 2, 3}, Ivanisenko V.A.^{1, 2}, Burakova L.P.¹,
Natashin P.V.¹, Ereemeeva E.V.¹, Vysotski E.S.¹

¹ Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center SB RAS", Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk, Russia

² Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ AIRI, Moscow, Russia

* Larionova.marina@inbox.ru

Key words: bioluminescence; mutagenesis; ProteinMPNN; AlfaFold2; coelenterazine; protein rational design; bioluminescent reporter

Renilla luciferase is a monomeric protein which belongs to the α/β -hydrolase enzyme family, responsible for the bioluminescence of the marine soft coral *Renilla*. The wild-type luciferase catalyzes the oxidative decarboxylation of the substrate coelenterazine, this being accompanied by blue light emission ($\lambda_{\max} = 480$ nm) [1]. Multiple attempts have been made to improve Renilla luciferase, including mutagenesis based on consensus sequences of α/β -hydrolases [2], random mutagenesis [3, 4], and the

introduction of disulfide bonds [5]. One of the most promising and highly active variants of Renilla luciferase is the “yellow” mutant luciferase (RmY), emitting light with a peak at 535 nm with native coelenterazine (CTZ) and at 574 nm in reaction with a synthetic CTZ-v analog [6]. The one has proven to be a convenient intracellular sensor for bioluminescent imaging.

Aim: Modern bioinformatics approaches allow not only modification of the protein enzymatic functions but the de novo prediction of proteins with desired properties as well [7]. Therefore, the rational design aimed at enhancing RmY as a reporter bioluminescent protein in terms of its enzymatic characteristics and spectral properties is objectively of great interest.

Methods: To predict amino acid substitutions capable of altering the biophysical properties of Renilla luciferase (RmY), we applied state-of-art molecular modeling and deep learning methods, including inverse folding models (ProteinMPNN). For this purpose, the models of Renilla in complex with CTZ/CTZ-v substrates were reconstructed, based on which the mutations capable of altering the substrate's polar environment, enhancing thereby the enzyme thermostability, and affecting bioluminescence kinetics were predicted.

Results: The predicted point and multiple mutations were introduced into the RmY sequence to obtain mutant luciferase variants through expression in *E. coli* cells. As a result of primary screening conducted on bacterial lysates, the mutants that mostly affected the enzymatic and spectral characteristics of luciferase were identified.

The perspective mutants were further characterized as pure protein preparations. An optimized protocol to obtain luciferase samples from bacterial cytoplasm was developed, preserving up to 80 % bioluminescent activity and yielding up to 30 mg/L. Rational mutagenesis identified the RmY mutants demonstrating the expected effects – increased thermostability and changes in bioluminescence spectra. The mutants with a shift in the enzyme's temperature optimum from 26 °C to 37 °C were identified and a single substitution K189Q was shown to be responsible for the shift. In addition, the analysis of mutants revealed amino acid residues playing a critical role in the formation of the emitter and, consequently, in altering the spectral characteristics of mutant luciferases.

Conclusions: Taken together, we succeeded in demonstrating high potential of ProteinMPNN and AlphaFold2 computational algorithms for protein structure prediction which allowed for the rational design of Renilla luciferase. As a result of the study, thermostable mutants of Renilla luciferase with optimal performance under mammalian cell culture conditions (37 °C) were obtained. Moreover, the novel identified mutants expanded the row of coelenterazine-dependent luciferases with the emission ranging from 400 nm (purple) to 575 nm (yellow). Computer modeling and experimental work have allowed us to identify new Renilla luciferase mutants that have advantages for their use as bioluminescent reporters for various analytical applications.

Funding: The study was supported by the grant of the Russian Science Foundation No. 22-14-00125.

Список литературы/References

1. Titushin M.S., Markova S.V., Frank L.A. et al. Coelenterazine-binding protein of Renilla muelleri: cDNA cloning, overexpression, and characterization as a substrate of luciferase photochem. *Photobiol Sci.* 2008;(7):189-196
2. Loening A.M., Fenn T.D., Wu A.M., Gambhir S.S. Consensus guided mutagenesis of Renilla luciferase yields enhanced stability and light output. *Protein Eng Des Sel.* 2006;19(9):391-400
3. Loening A., Wu A., Gambhir S. Red-shifted Renilla reniformis luciferase variants for imaging in living subjects. *Nat Methods.* 2007;4:641-643

4. Woo J., von Arnim A.G. Mutational optimization of the coelenterazine-dependent luciferase from Renilla. *Plant Methods*. 2008;(4):23
5. Kahrani Z.F., Emamzadeh R., Nazari M., Mahdi Rasa S.M. Molecular basis of thermostability enhancement of Renilla luciferase at higher temperatures by insertion of a disulfide bridge into the structure. *BBA Proteins Proteom*. 2017;1865(2):252-259
6. Stepanyuk G.A., Unch J., Malikova N.P. et al. Coelenterazine-v ligated to Ca²⁺-triggered coelenterazine-binding protein is a stable and efficient substrate of the red-shifted mutant of Renilla muelleri luciferase. *Anal Bioanal Chem*. 2010;398:1809-1817
7. Yeh A.H.W., Norn C., Kipnis Y. et al., De novo design of luciferases using deep learning. *Nature*. 2023;614:774-780