



# Пространственные структуры биолюминесцентных белков

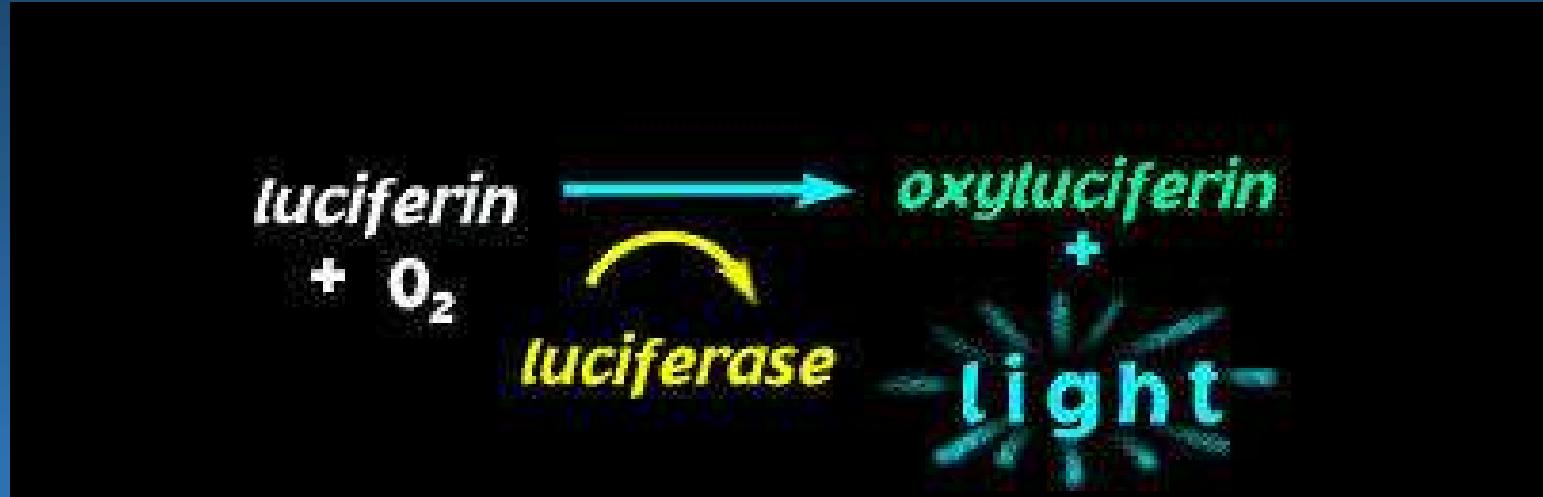
Наташин  
Павел Викторович

*Лаборатория фотобиологии,  
ИБФ СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН,  
Красноярск*



**Биолюминесценция — способность живых организмов светиться, достигаемая самостоятельно или с помощью симбионтов.**

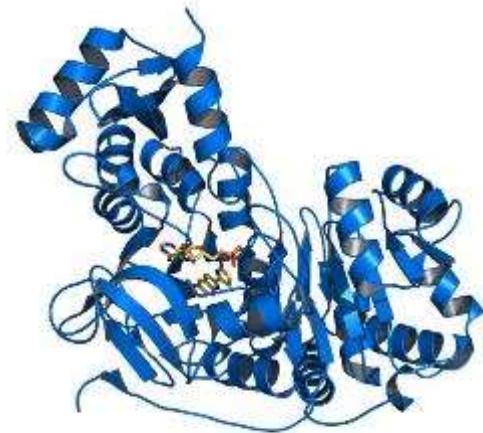
# Биолюминесцентная реакция



**Люцифераза** – общее название класса ферментов, катализирующих биолюминесцентную реакцию.

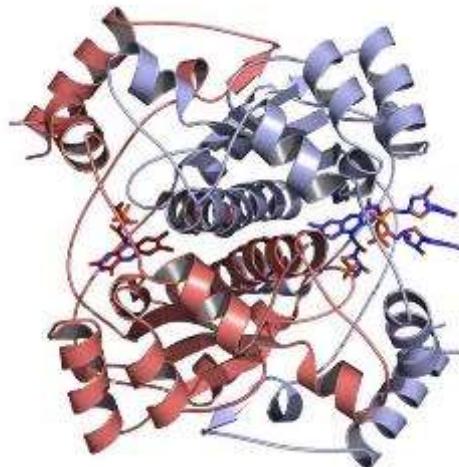
**Люциферин** – общее название класса светоизлучающих веществ, являющихся субстратом биолюминесцентной реакции.

Firefly luciferase

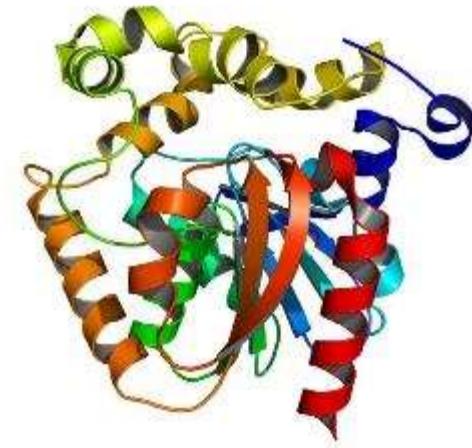


PDB 2D1R

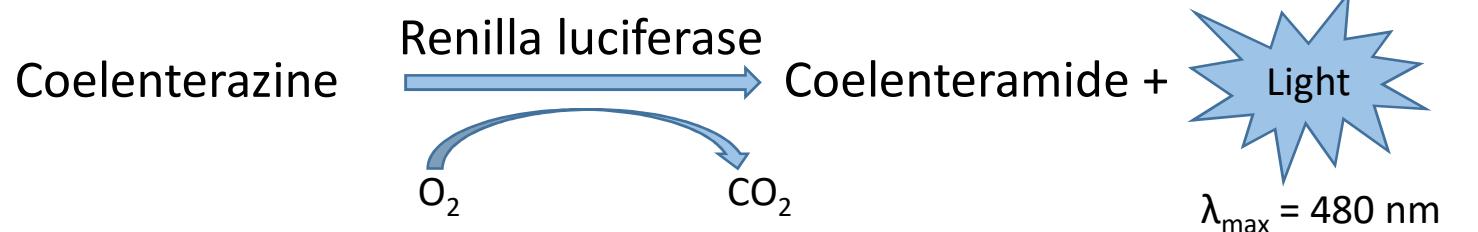
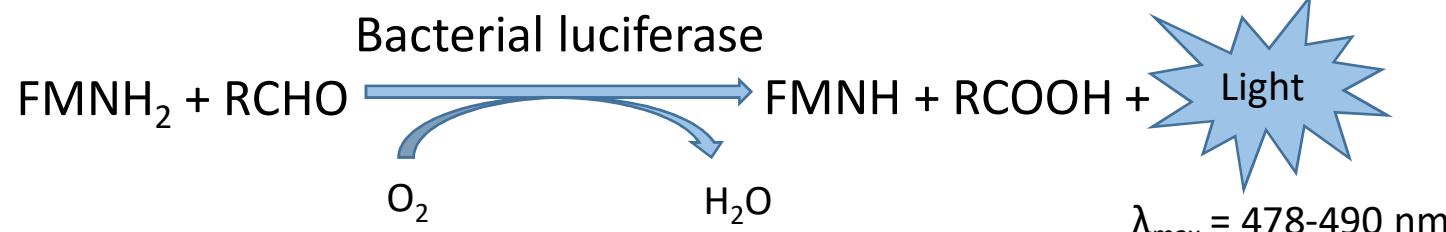
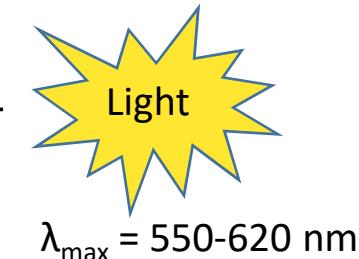
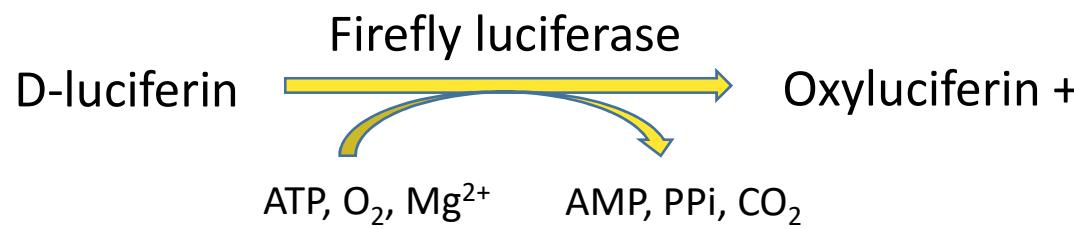
Bacterial luciferase



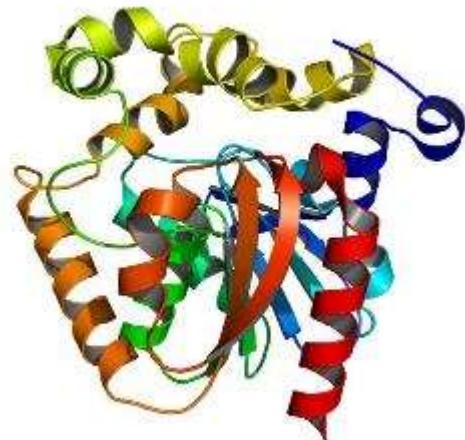
Renilla luciferase



PDB 2PSD

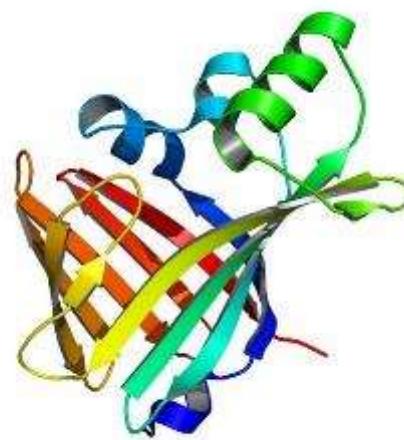


Renilla luciferase



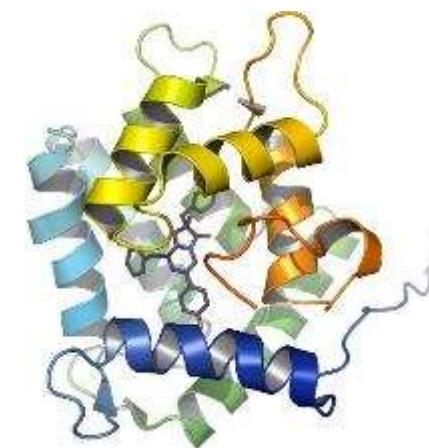
PDB 2PSD

Oplophorus (nanoKAZ)  
luciferase

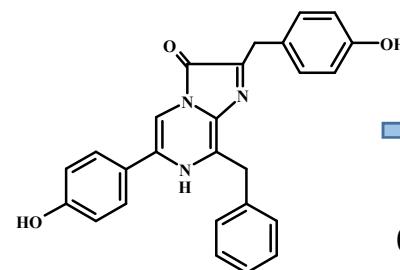


PDB 5B0U

Ca<sup>2+</sup>-regulated  
photoprotein



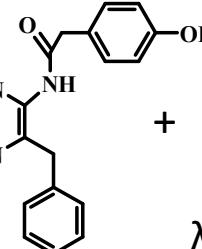
PDB 1QV0



Luciferase

O<sub>2</sub>

CO<sub>2</sub>



+

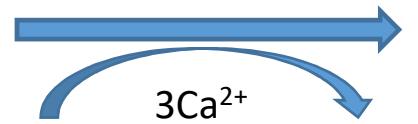


Light

$\lambda_{\text{max}} = 460-480 \text{ nm}$

Coelenterazine

Photoprotein



Ca<sup>2+</sup>-discharged photoprotein +

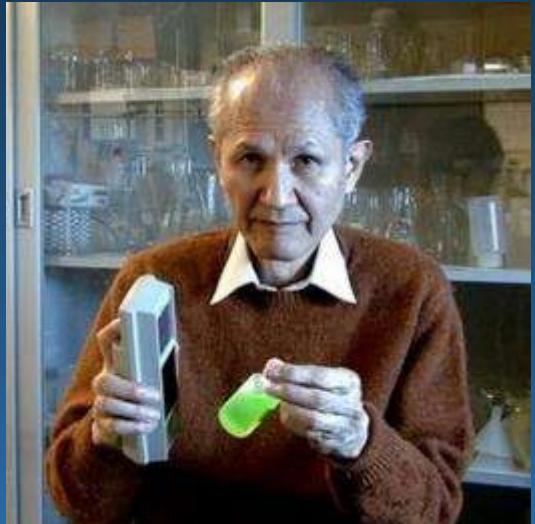
3Ca<sup>2+</sup>



Light

$\lambda_{\text{max}} = 460-495 \text{ nm}$

# Discovery of $\text{Ca}^{2+}$ -regulated photoproteins



Dr. Osamu Shimomura

$\text{Ca}^{2+}$ -regulated photoproteins are “precharged” bioluminescent proteins because the reaction does not require the presence of molecular oxygen or any other cofactor – the photoprotein and the triggering ion are the only components required for light emission. Since the energy emitted as light is derived from the “charged” photoprotein, that molecule can react only once, i.e., it does not “turn over” as an enzyme does.

In this respect, as well as in the lack of a requirement for molecular oxygen or any other cofactor, the reaction is strikingly different from that of classical bioluminescent systems in which an enzyme (luciferase) catalyzes the oxidation of a smaller organic substrate molecule (luciferin) with the creation of an excited state and the emission of light.

This feature prompted Shimomura and Johnson to coin the term “photoprotein” to describe proteins that serve as sole organic molecular species in bioluminescent reaction systems.

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

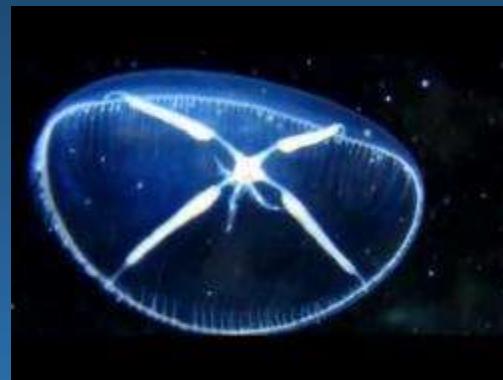
*Aequorea victoria*



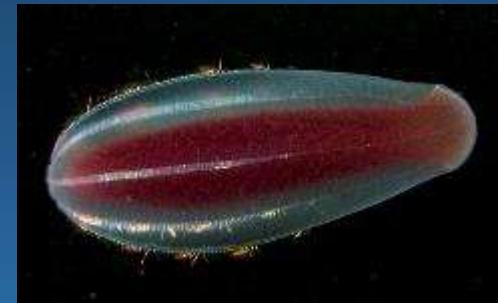
$\text{Ca}^{2+}$ -regulated photoproteins are responsible for the bioluminescence of a variety of cnidarians and ctenophores. Although photoproteins have been detected in many marine organisms, cloning and sequence analysis have been achieved only for:  
**5 hydromedusan** (aequorin, clytin, mitrocomin, and obelins from *Obelia longissima* and *Obelia geniculata*) and **4 ctenophore** (*Beroe abyssicola*, *Bolinopsis infundibulum*, *Mnemiopsis leidyi*, and *Bathocyroe fosteri*) photoproteins.



*Aequorea victoria*



*Mitrocoma cellularia*



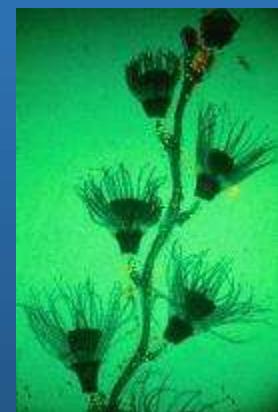
*Beroe abyssicola*



*Clytia gregaria*

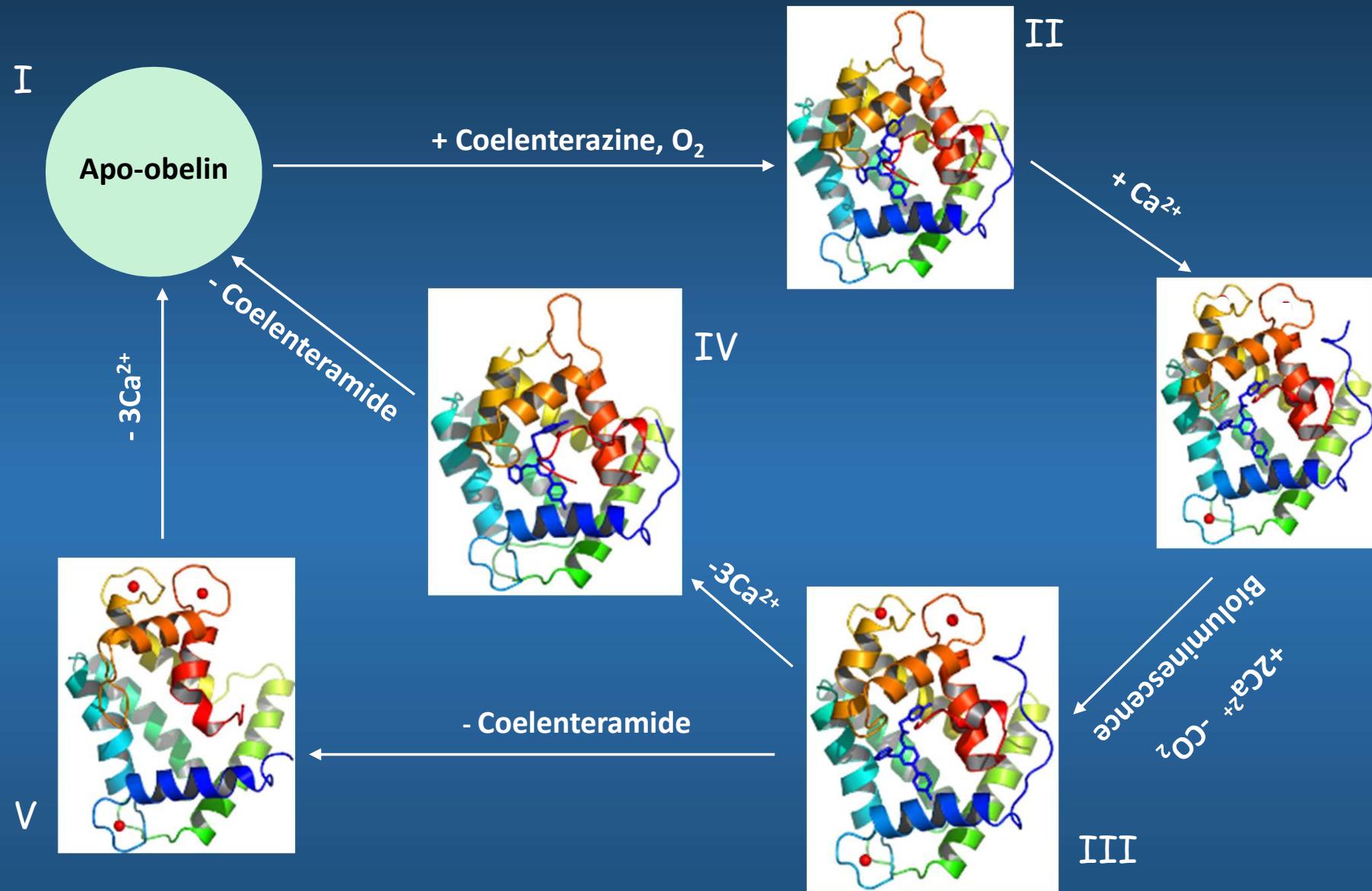


*Obelia longissima*

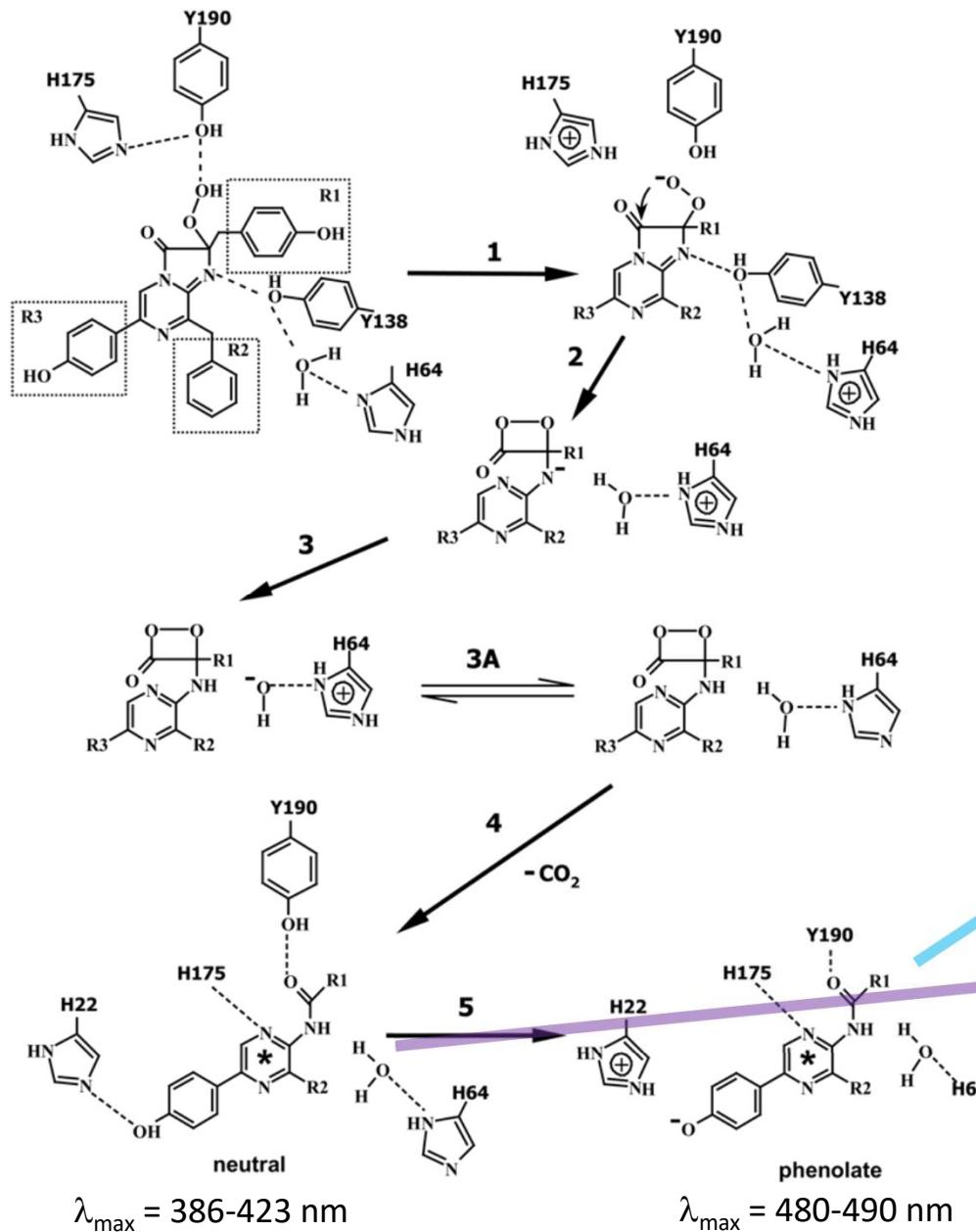


*Obelia geniculata*

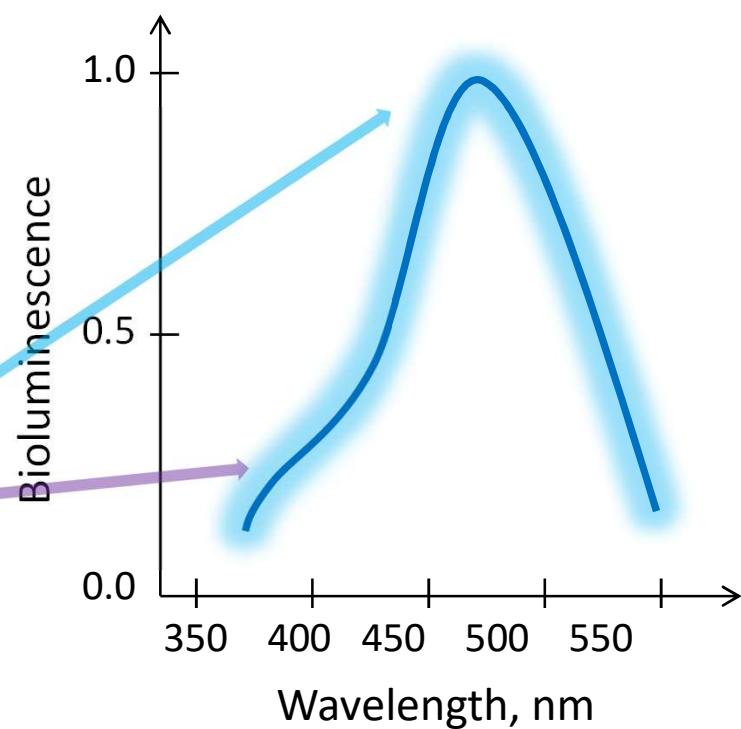
# Ligand-dependent conformation states of hydromedusan $\text{Ca}^{2+}$ -regulated photoproteins



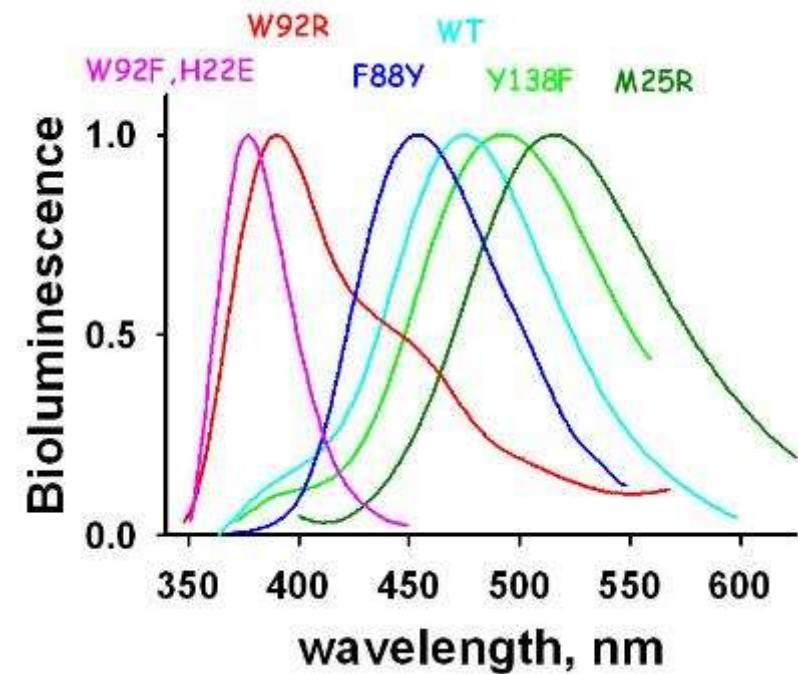
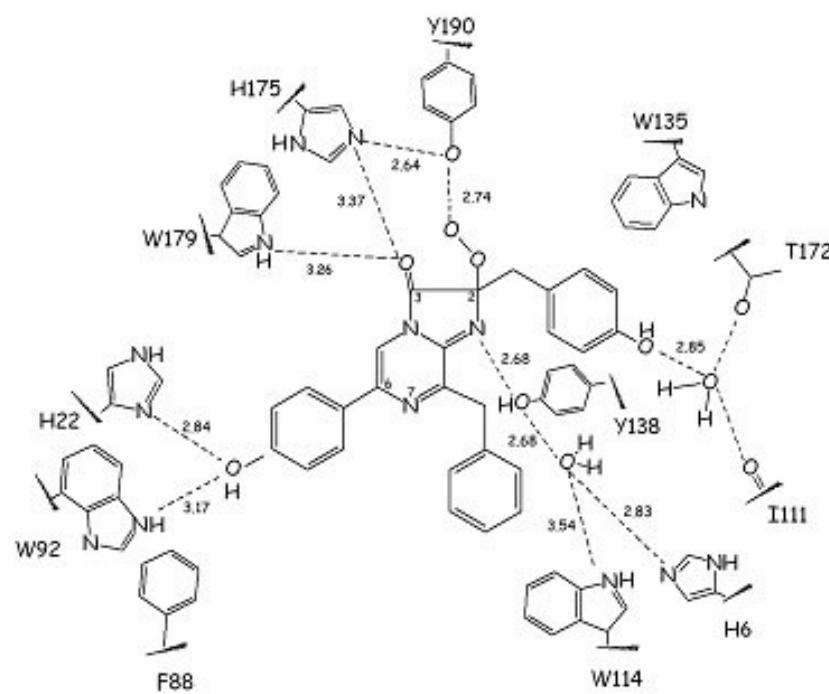
# Proton-relay mechanism of the photoprotein Ca<sup>2+</sup> trigger and formation of the product excited states



Bioluminescence spectrum of obelin



Site-directed mutagenesis of active site AA makes the bioluminescent activity and (or) spectra change



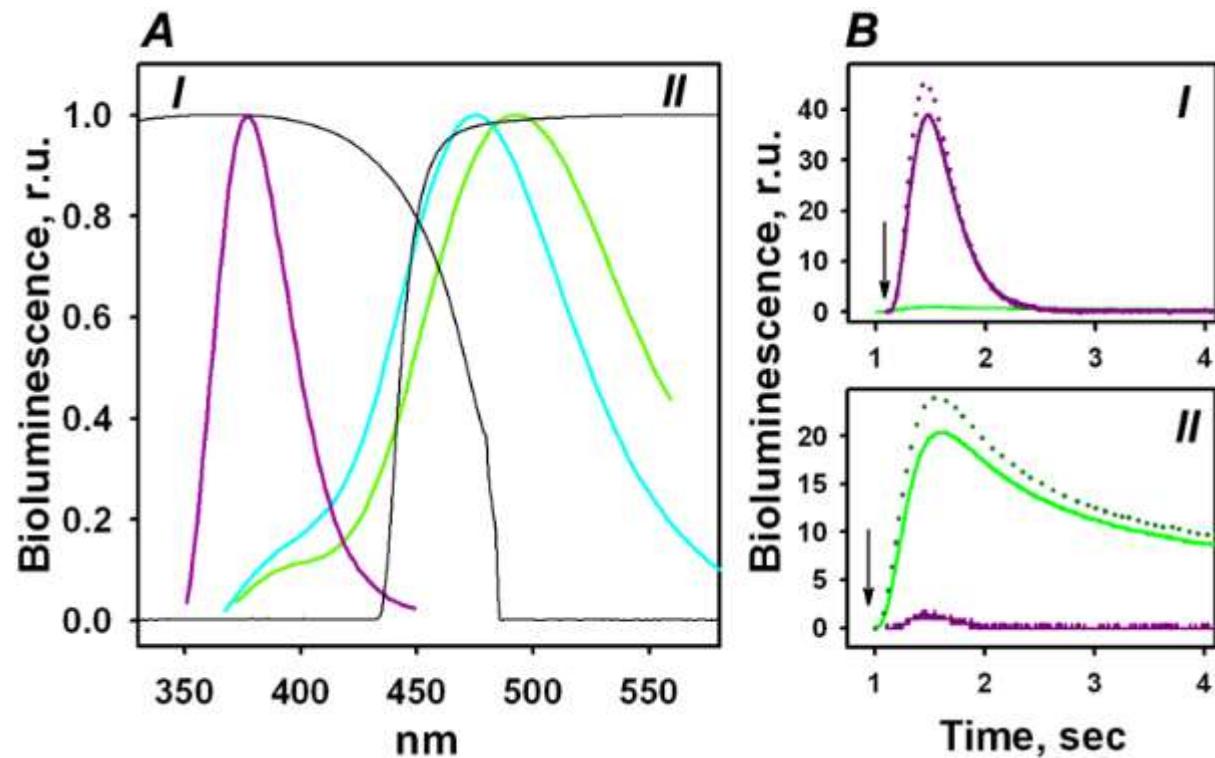


*Obelia longissima*

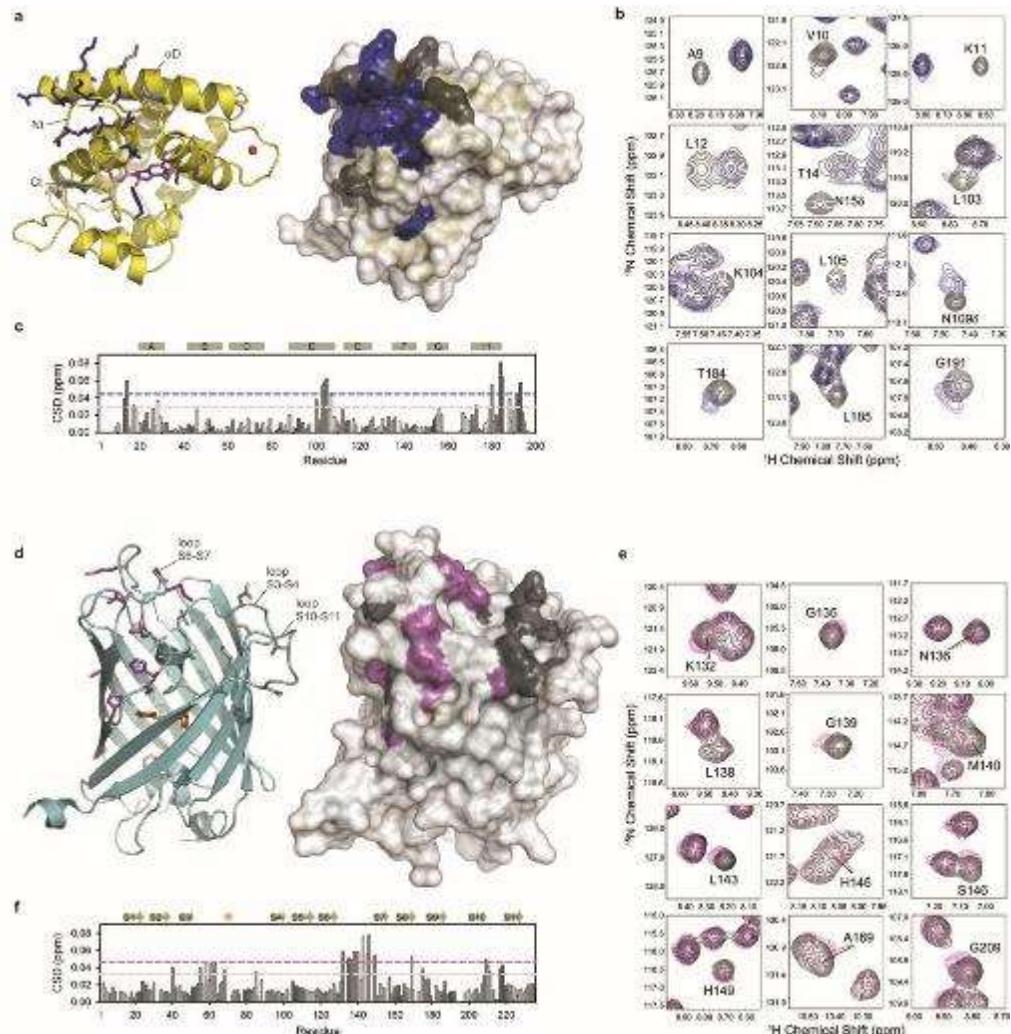
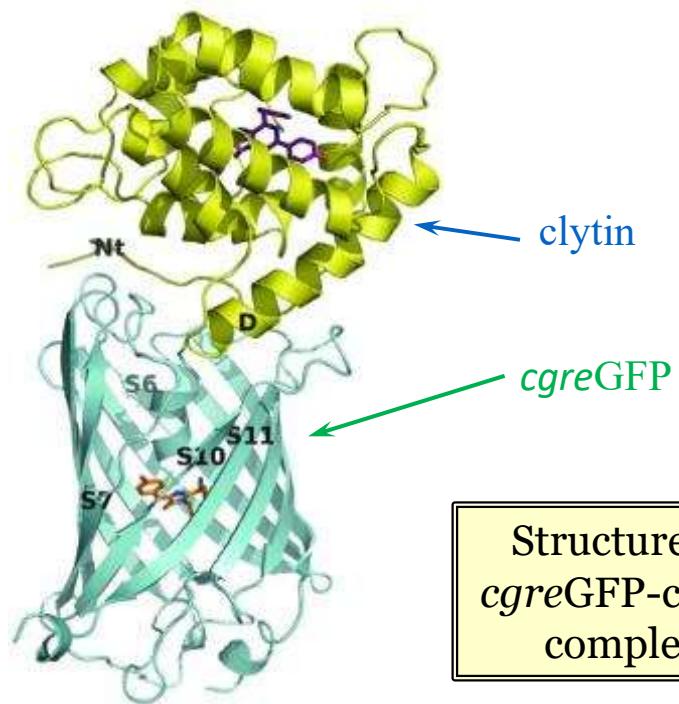
W92F,H22E and Y138F reveal violet and greenish bioluminescence, high quantum yield and stability

Protein Mutation	Bioluminescence $\lambda_{\text{max}}/\text{shoulder}$ (nm)	Activity % of WT	$I_{\text{Ca-free}}/\text{protein}$ (r.u./mg)	$I_{\text{Ca}} / I_{\text{Ca-free}} \times 10^7$	$k_d$ ( $s^{-1}$ )
WT	482/400	100	1	1.2	6.9
W92F,H22E	387	10	2.1	0.3	6.1
Y138F	493/400	68	0.3	0.4	0.6

Signals may be separated with wide-band pass optical filters



# Bioluminescence system of jellyfish *Clytia gregaria* – a natural BRET pair

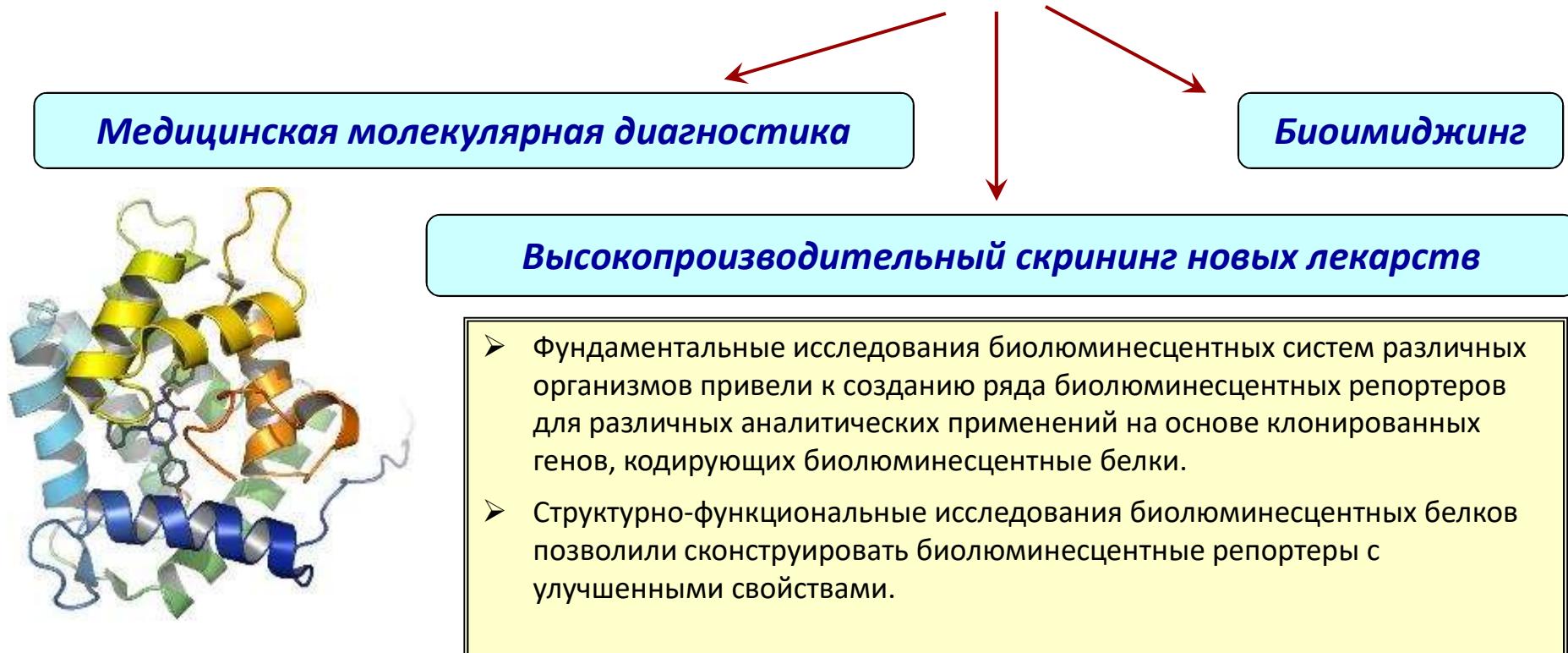


NMR determination of residues participating in formation of *cgreGFP*-clytin complex

## Решены структуры:

- *Обелин дикий тип* – 2F8P, 1SL9, 1SL8, 1SL7, 1S36, 1QV0, 1QV1, 1EL4
- *Обелины 88Y, 138F и 92F* – 4MRX, 4MRY, 4N1F, 4N1G, 1JF2
- *Обелин из Obelia geniculata* – 1JF0
- *Митрокомин* – 4NQG
- *Беровин* – 5BPJ, 4MN0
- *Клитин* – 3KRX
- *GFP из Clytia gregaria* – 2HPW
- *Целентеразин связывающий белок (CBP)* – 2HPS, 2HQ8

# Биолюминесценция для медицины и биотехнологии



Биолюминесцентные репортеры – основные преимущества:

- Высокая чувствительность, сопоставимая с изотопной меткой
- Простота регистрации потока фотонов
- Широкий линейный диапазон
- Отсутствие токсичности для живых организмов
- Возможность оценки динамики процессов *in vivo*



## **Медицинская молекулярная диагностика**

- На основе  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемого фотопротеина обелина разработаны высокоэффективные биолюминесцентные методы микроанализа ряда социально-значимых заболеваний и инфекций
- Разработаны экспрессионные конструкции и технология получения высокоочищенного рекомбинантного обелина для создания диагностических наборов



**Диагностические наборы, использующие обелин в качестве метки, опробованы при диагностике:**

- дисфункции щитовидной железы ( $T_3$ ,  $T_4$ )
- дисфункции женской репродуктивной системы (пролактин)
- туберкулезного токсина, гепатитов В и С

**Применение биолюминесцентной метки в диагностических наборах позволяет:**

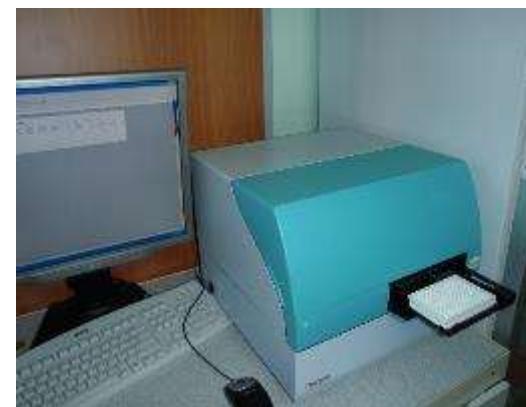
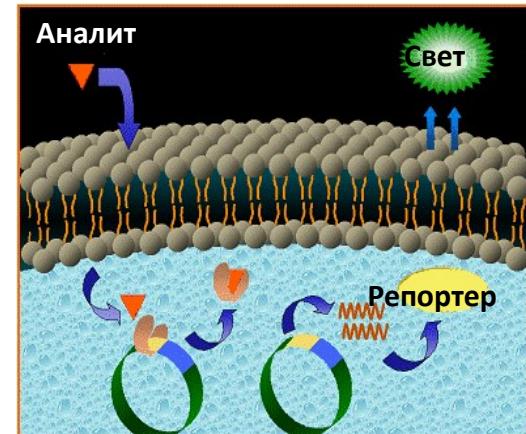
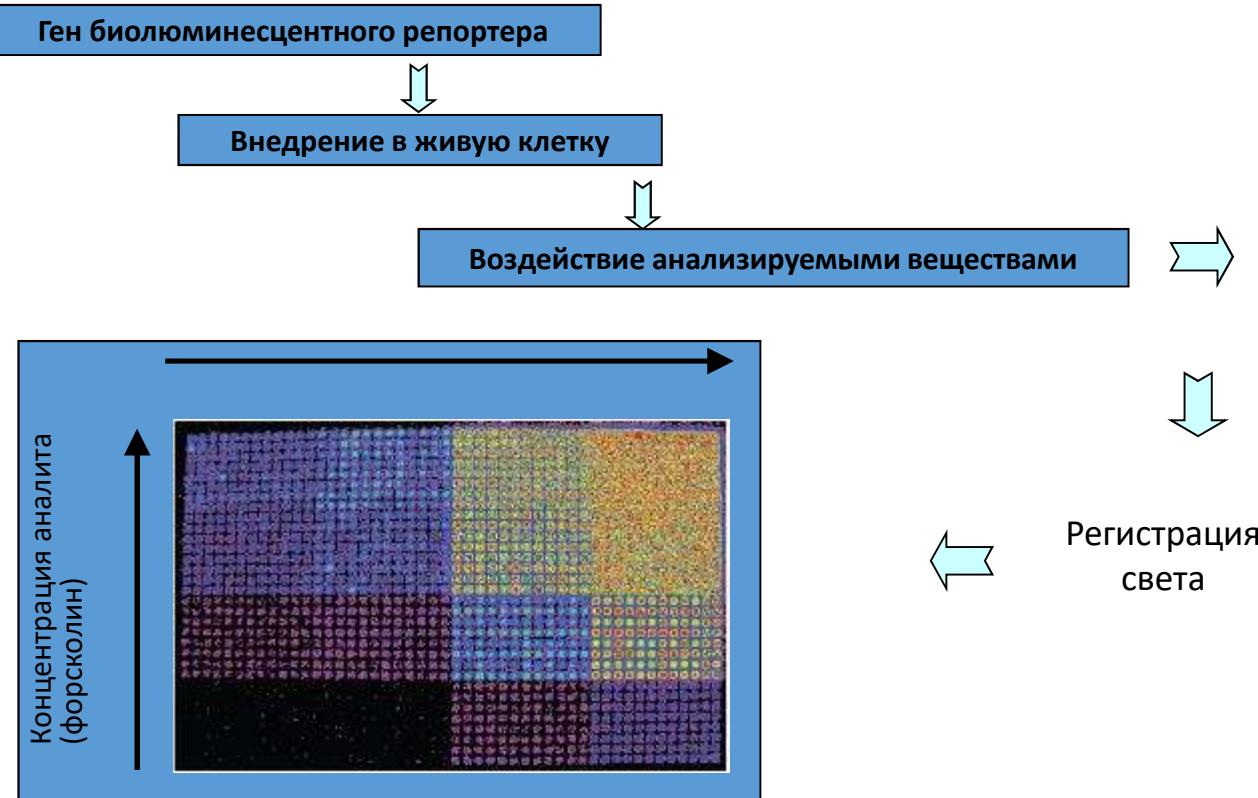
- исключить использование радиоизотопных материалов
- заменить импортные наборы
- проводить анализ быстро



## Высокопроизводительный скрининг новых лекарственных соединений

Генетически кодируемые биолюминесцентные репортеры для мониторинга генной экспрессии, в том числе для лекарственного молекулярного скрининга:

- 1) секретируемые репортеры - люциферазы из копепод *Metridia longa*
- 2) внутриклеточные репортеры - фотопротеины гидромедуз (обелин, клитин и др.)



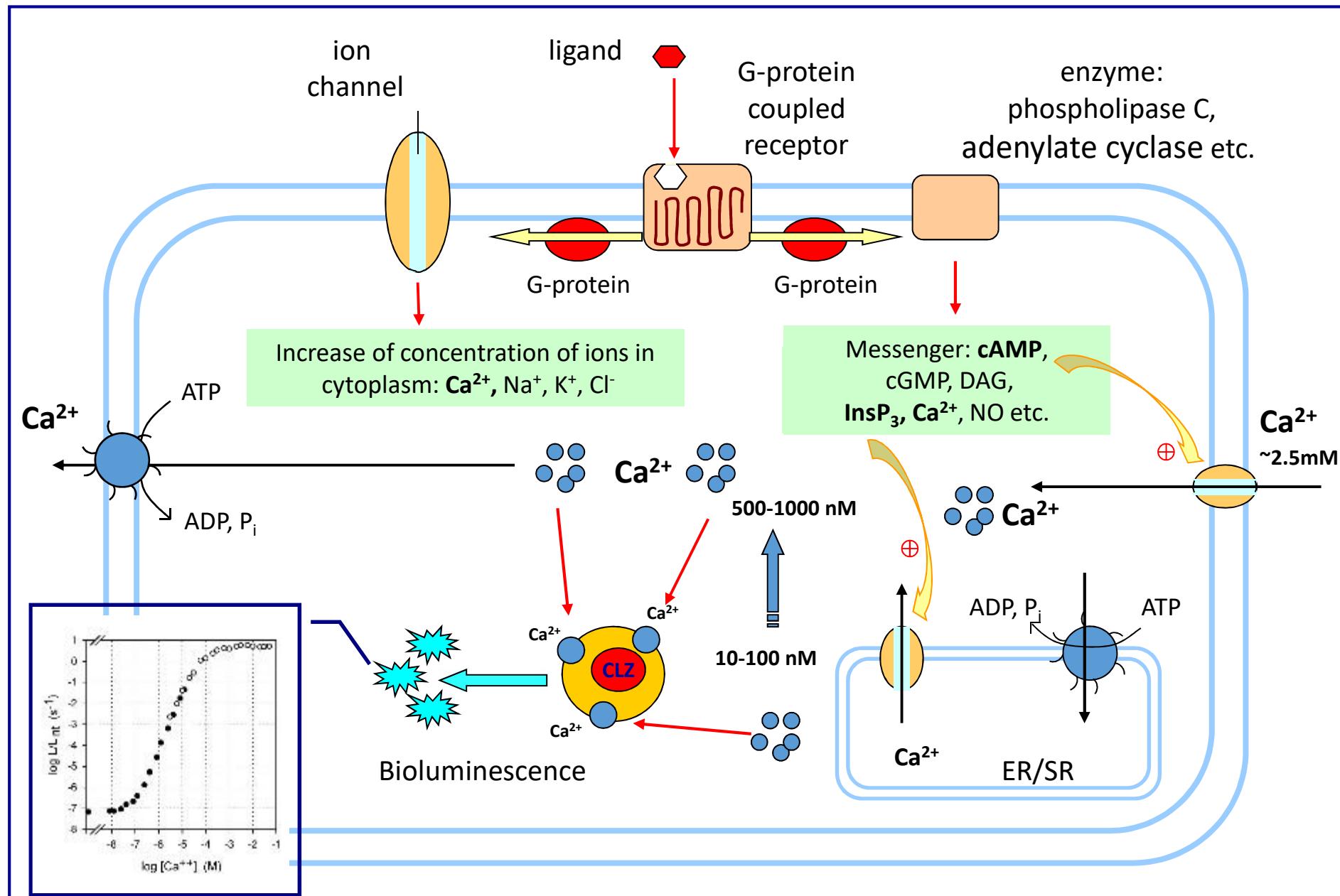
## *Биоимиджинг – визуализация молекулярных процессов в живых объектах*

- Анализ белок-белковых взаимодействий
- Мониторинг развития опухолей
- Мониторинг развития инфекционных процессов
- Оценка эффективности действия лекарственных препаратов и схем их применения
- Анализ потоков внутриклеточного кальция с помощью  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых фотопротеинов, экспрессируемых в клетках

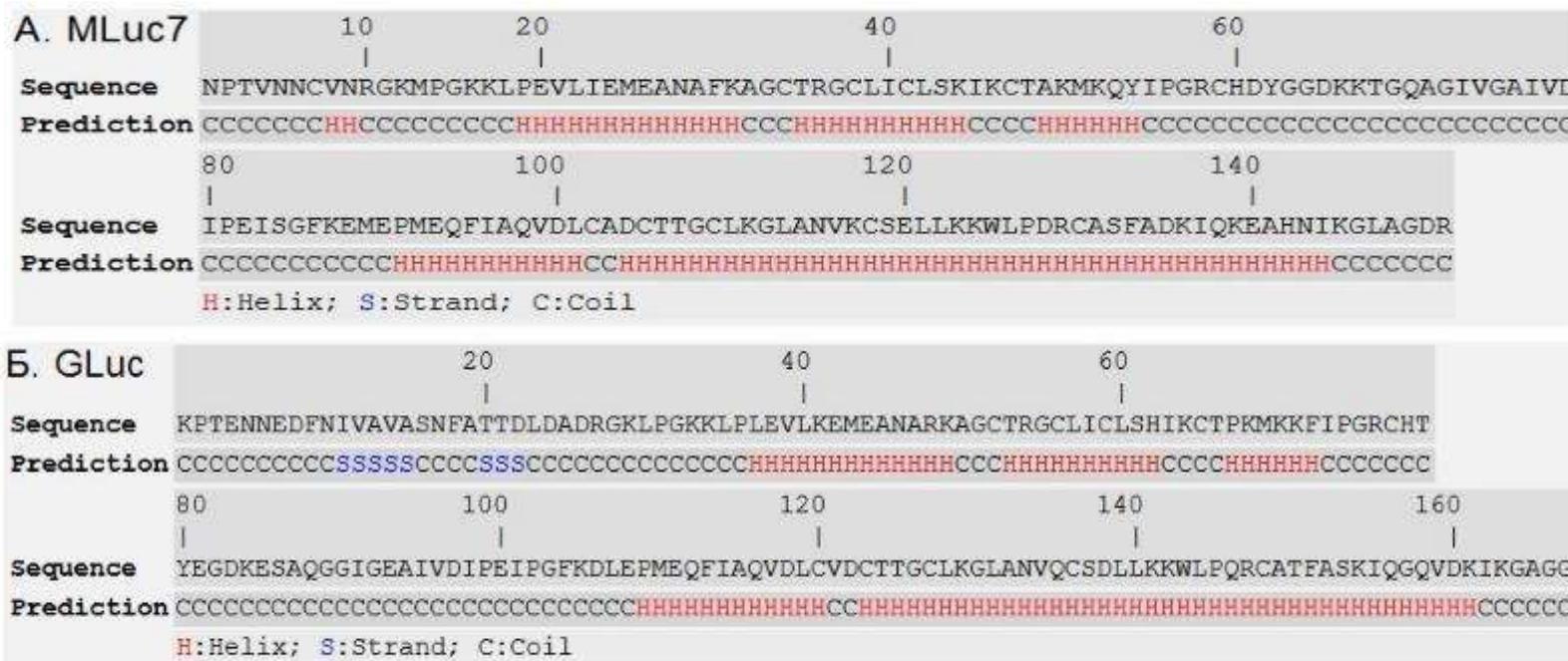


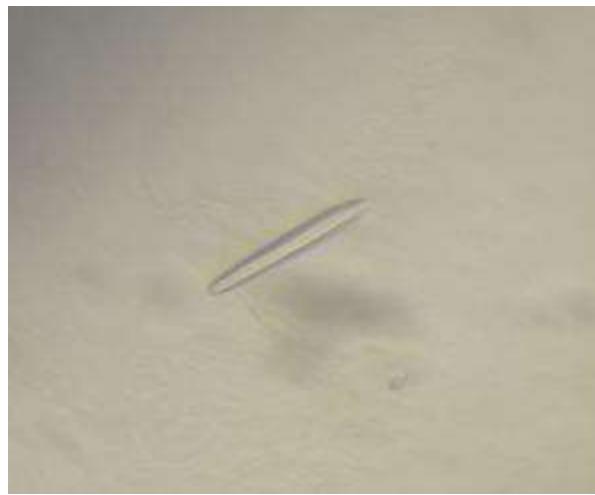
Визуализация потока  
крови в пульсирующем  
сердце с помощью  
рекомбинантной  
люциферазы копепод  
*Gaussia princeps*

# Determination of activity of cell receptors using $\text{Ca}^{2+}$ -regulated photoprotein



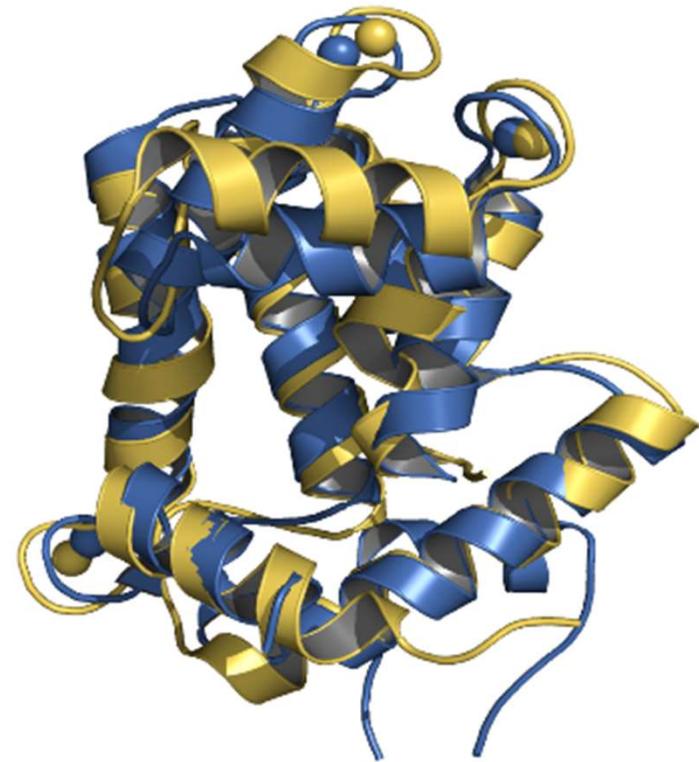
## Luciferases from *Metridia longa* and *Gaussia princeps*







$\text{Ca}^{2+}$ -regulated photoprotein berovin  
from the ctenophore *Beroe abyssicola*



Superposition of the overall structure of  
obelin (yellow) and berovin (blue).  
Calcium ions are shown as balls.

I

BA	1	MTERLNEQNNE	<b>SYRYLRSVGNQWQFNVEDLH</b>	<b>PKMLSRLYKRFDTFDLDSDGKMEMDE</b>
OL	1	-----	<b>MASKYAVKLKTDFDN</b>	----- <b>PRWIKRHKHMFDLDINGNGKITLDE</b>
AV1	1	-----	<b>MTSEQYSVKLTPDFDN</b>	----- <b>PKWIGRHKHMNFNLDVNHNGRISLDE</b>

BA	58	<b>VLYWP-DRMRQLVNATDEQVEKMRDAVRVFFLHKGV</b>	<b>E PVNGLLREDWVEANRVFAEA</b>	
OL	42	<b>I VSKASDDICAKLEATPEQT</b>	<b>KRHQVCVEAFFRGCGMEYGKEIAFPQFLD</b>	<b>GWKQLATS</b>
AV1	43	<b>MVYKASDIVINNLGATPEQAKRHKDAVEA</b>	<b>FFGGAGMKYGVETEWPEYIEGWKRLASE</b>	

II

BA	114	<b>ERERERRGEPSLTALLSNSYDVLDGGDGTV</b>	<b>DVDELKTMMKA</b>	<b>FDVP--QEAA</b>	<b>YTFF</b>
OL	99	<b>ELKKWARNEPTLIREWGDAVFDI</b>	<b>FDIFDKDGSGTITLDEWKAYGKISGI</b>	<b>SPSQEDCEATF</b>	
AV1	100	<b>ELKRYSKNQITLIRLGDALFDIIDKDQNGAI</b>	<b>SLDEWKAYTKSAGIIQSS</b>	<b>EDCEETF</b>	

III

Identities

BA	169	<b>EKADTDKSGKLERTELVHLFRKFWM</b>	<b>E PYDPQWDGVYAYKY-</b>	
OL	156	<b>RHCDLDNSGDLDVDEMTRQHLGF</b>	<b>WYT-LDPEADGLYGN</b>	<b>GVP 29.4%</b>
AV	157	<b>RVCDIDE SGQLDVDEMTRQHLGF</b>	<b>WYT-MDPACEKLYGGAVP</b>	<b>27.7%</b>

Comparison of the amino acid sequence of berovin (BA) with those of obelin (OL) from *Obelia longissima* and aequorin (AV) from *Aequorea victoria*. Red and blue letters represent identical and similar residues, respectively, black letters show nonsimilar residues. The residues that form the Ca(2+)-binding site are highlighted in yellow. Gaps are shown by dashes. The amino acid residues forming the inner coelenterazine-binding cavity of obelin and aequorin, as well as the berovin residues identical (or similar) to them are shaded.

### **Задачи планируемые к решению:**

- получение пространственных структур неизученных биолюминесцентных белков. Люциферазы из остракоды *Cypridina noctiluca*, олигохеты *Fridericia heliota* и др.
- структурный анализ мутантов биолюминесцентных белков
- структурный анализ биолюминесцентных белков в комплексе с модифицированными лигандами.

Photobiology lab  
IBP SB RAS:

Eugene S. Vysotski  
Pavel V. Natashin  
Ludmila P. Burakova  
Marina D. Larionova

Former members:  
Galina A. Stepanyuk  
Maxim S. Titushin

Collaborators:

Prof. John Lee  
Prof. Bi-Cheng Wang  
Department of Biochemistry and  
Molecular Biology  
University of Georgia, Athens, USA

Prof. Zhi-jie Liu  
iHuman Institute  
ShanghaiTech University  
Shanghai, China

## **Список использованных источников синхротронного излучения:**

- The Advanced Photon Source (APS), USA
- Shanghai Synchrotron Radiation Facility (SSRF), China
- Super Photon ring (Spring-8), Japan
- Swiss Light Source (SLS), Switzerland

## **Список желаемого оборудования:**

### **1 Системы очистки:**

- FPLC, GE AKTA Pure (Avant). Очистка и разделение белков
- HPLC, Agilent. Анализ чистоты белкового образца

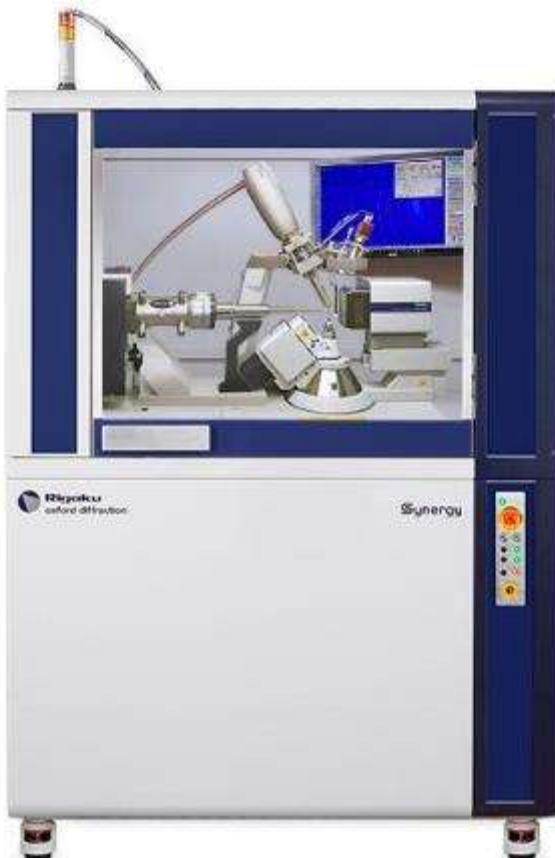
### **2 Работы:**

- Mosquito, TTP Labtech - для скриннинга условий кристаллизации
- NT8, Formulatrix - для скриннинга условий кристаллизации
- Dragonfly, TTP Labtech - для оптимизации условий кристаллизации

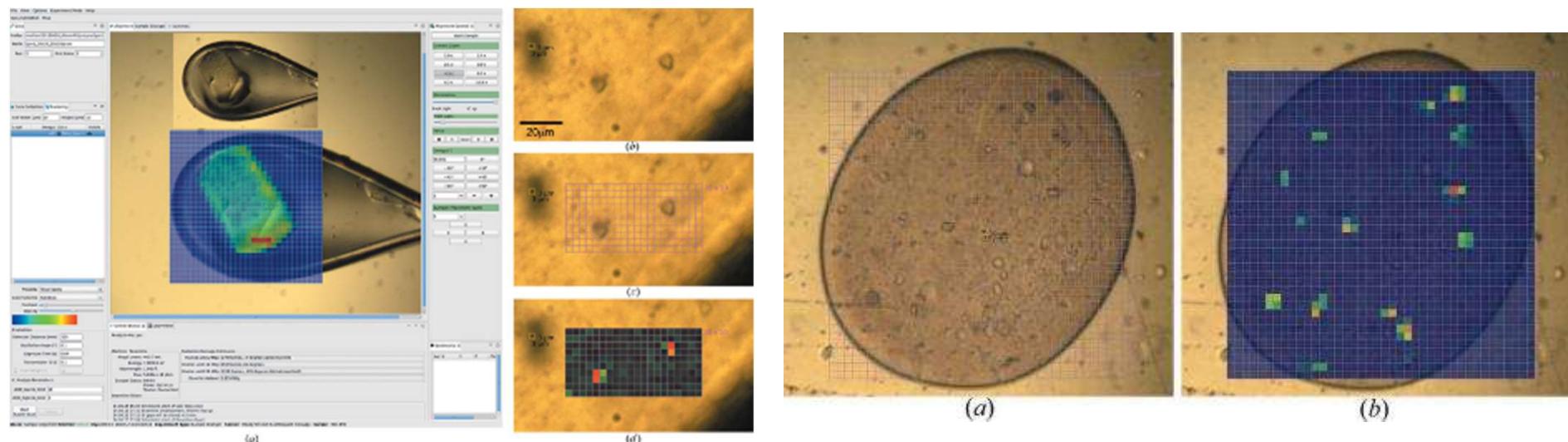
### **3 Центрифуги, микроскопы, пипетки и др.**

## **Список желаемого оборудования:**

4 Microfocus single crystal X-ray diffractometer, XtaLAB Synergy, Rigaku



## 5. Fast two-dimensional grid and transmission X-ray microscopy scanning methods for visualizing and characterizing protein crystals



JOURNAL OF  
APPLIED  
CRYSTALLOGRAPHY

ISSN 1600-5767

## Fast two-dimensional grid and transmission X-ray microscopy scanning methods for visualizing and characterizing protein crystals

Justyna Aleksandra Wojdyla,<sup>a</sup> Ezequiel Panepucci,<sup>a</sup> Isabelle Martiel,<sup>a</sup> Simon Ebner,<sup>a</sup> Chia-Ying Huang,<sup>b</sup> Martin Caffrey,<sup>b</sup> Oliver Bunk<sup>a</sup> and Meitian Wang<sup>a\*</sup>

Received 11 January 2016

Accepted 13 April 2016

<sup>a</sup>Swiss Light Source, Paul Scherrer Institute, 5232 Villigen PSI, Switzerland, and <sup>b</sup>Membrane Structural and Functional Biology Group, School of Medicine and School of Biochemistry and Immunology, Trinity College Dublin 2, Ireland. \*Correspondence e-mail: meitian.wang@psi.ch