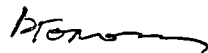


На правах рукописи



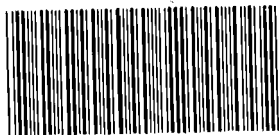
Голотин Василий Александрович

**Рекомбинантная щелочная фосфатаза морской бактерии *Cobetia marina*:
получение, свойства и перспективы применения**

03.01.04 – биохимия

Автореферат диссертации на соискание ученой
степени кандидата биологических наук

15 ЯНВ 2015



005557552

Владивосток – 2014

Работа выполнена в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова
ДВО РАН

Научный руководитель:

кандидат биологических наук
Балабапова Лариса Анатольевна

Официальные оппоненты:

Брыков Владимир Алексеевич
доктор биологических наук, профессор, зав.
лабораторией генетики Института биологии моря им.
А.В. Жирмунского ДВО РАН

Невинский Георгий Александрович
доктор химических наук, профессор, зав.
лабораторией ферментов репарации Института
химической биологии и фундаментальной медицины
СО РАН

Ведущая организация:

Институт биоорганической химии им. академика
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Защита состоится «6» марта 2015 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета
005.005.01 при Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН по
адресу: 690022, г. Владивосток, проспект 100 лет Владивостоку, 159, ТИБОХ ДВО РАН. Факс
(423)231-40-50, e-mail: dissovet@piboc.dvo.ru

С диссертацией можно ознакомиться в филиале Центральной научной библиотеки ДВО РАН
г.Владивосток, проспект 100 лет Владивостоку, 159, ТИБОХ ДВО РАН)

Текст диссертации и автореферата размещен на сайте www.piboc.dvo.ru

Автореферат разослан «34» декабря 2014 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета, к.б.н.



Черников О. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В настоящее время предметом особого внимания учёных являются адаптированные к холоду ферменты из-за их способности функционировать при низких температурах. Богатейшим источником таких ферментов являются морские микроорганизмы, адаптированные не только к низким температурам, но и к другим экстремальным условиям обитания: высокому давлению, вязкости и солености морской воды, а также сезонному дефициту питательных веществ (De Prada, Brenchley, 1997; Feller *et al.*, 2003; Hoppe, 2003). Интерес к термолабильным ферментам возник благодаря их повышенной, по сравнению с наземными аналогами, каталитической активности. Поэтому изучение структурных особенностей этих ферментов позволит выявить причины их высокой эффективности. К сожалению, такие уникальные ферменты присутствуют, как правило, в природном источнике в следовых количествах, что значительно затрудняет их выделение, к тому же многие морские микроорганизмы трудно культивировать в лабораторных условиях. Однако в настоящее время методы генной инженерии позволяют получать как рекомбинантные аналоги таких ферментов, так и создавать на их основе белки с заданными свойствами и функциями, что расширяет возможности их использования в биотехнологии, медицине и пищевой промышленности (Глик, Пастернак, 2002). Возможность использования уникальных свойств ферментов морских психрофильных микроорганизмов для целей биотехнологии и медицины побуждает к исследованию их молекулярно-генетических характеристик и созданию суперпродуктов ценных рекомбинантных белков. В качестве примера таких белков могут являться термолабильные щелочные фосфатазы (ЩФ) морского происхождения. Щелочные фосфатазы [3.1.3.1] являются неспецифическими моноэстеразами, катализирующими удаление фосфатных групп ДНК или РНК, а также расщепление макроэргических связей рибо- и дезоксирибонуклеозидфосфатов, что определяет их важную роль в метаболизме и круговороте фосфора. Практический интерес к ЩФ объясняется их широким использованием в генной инженерии, гибридизационной ДНК-технологии и в медицине для получения иммуноконъюгатов и рекомбинантных антител (McComb, 1979; Tu *et al.*, 2004).

Ранее в лаборатории морской биохимии ТИБОХ ДВО РАН была выделена и охарактеризована ЩФ из психрофильной морской бактерии *Cobetia marina* КММ 296 с уникально высокой удельной активностью (≥ 10000 ед./мг), что является самым высоким показателем на сегодняшний день для представленных на мировых рынках коммерческих препаратов (Иванова и др., 1994; Plisova *et al.*, 2005; Nasu *et al.*, 2012). Предполагалось, что морская бактерия, способная размножаться в широком интервале температур (от 4 до 42 °C), специализируется в симбиозе с моллюском *Crenomytilus grayanus* как участник процесса биоминерализации экоскелета этого моллюска (Иванова и др., 1994; Lévêque *et al.*, 2004;

Ivanova *et al.*, 2005; Dorozhkin, 2009). Наличие у данной ЦФ высокой активности и стабильности в условиях различных химических модификаций белка оказалось важным фактором для получения на ее основе конъюгатов и её использования как в иммуоферментном анализе, так и в генно-инженерных исследованиях (Plisova *et al.*, 2005).

Целью данной работы являлось получение рекомбинантной высокоактивной ЦФ морской бактерии *C. marina* KMM 296 в клетках продуцента *Escherichia coli*, изучение ее структурных особенностей, физико-химических и каталитических свойств, а также перспектив применения в генной инженерии, молекулярной биологии и диагностике.

В соответствии с заявленной целью работы были поставлены следующие задачи:

1. Получить оптимальные генетические конструкции, несущие ген ЦФ морской бактерии *C. marina* KMM 296, для синтеза высокоактивной рекомбинантной щелочной фосфатазы (CmAP).
2. Оптимизировать условия для экспрессии высокоактивной CmAP.
3. Разработать и оптимизировать схему выделения CmAP.
4. Исследовать физико-химические и каталитические свойства CmAP.
5. Методами моделирования пространственной структуры и сайт-направленного мутагенеза исследовать структуру белков CmAP, CmAP/LoC, CmAP/CGL, CmAP/MBL-AI.
6. Применить CmAP для дефосфорилирования концов генно-инженерных векторов перед лигированием.
7. Апробировать CmAP в составе химерных многофункциональных белков для мониторинга экспрессии и очистки различных рекомбинантных белков на примере бифункционального силикатениноподобного катепсина губки *Lantriculia oparinae* (CmAP/LoC).
8. Применить CmAP как молекулярный маркер в лектин-иммуоферментных методах с использованием гибридных бифункциональных галактозосвязывающего лектина мидии *C. grayanus* (CmAP/CGL) и маннан-связывающего лектина трепанга *Apostichopus japonicus* (CmAP/MBL-AI).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Штамм *E. coli* Rosetta (DE3)/40Pho, несущий рекомбинантную плазмиду 40PhI, продуцирует функционально активную CmAP в растворимой форме.
2. Оптимальные условия для экспрессии позволяют увеличить выход CmAP до 10 мг из 1 л культуры клеток *E. coli* Rosetta (DE3)/40Pho.
3. Оптимальная схема выделения позволяет получать 2 мг гомогенного препарата CmAP с удельной активностью 12920 ед/мг из 1 л культуры клеток *E. coli* Rosetta (DE3)/40Pho.
4. CmAP с молекулярной массой 55 кДа проявляет максимальную активность при значении pH 10,3 и температуре 40 - 50 °C в 1 М ДЭА буфере при отсутствии экзогенных ионов металлов.

Максимальная эффективность катализа у *CmAP* - $8,2 \times 10^7 \text{ с}^{-1}/\text{M}^{-1}$ в 1 М ДЭА при значении pH 8,0 и температуре 25 °C.

5. Незначительные отличия в структуре *CmAP* от ее прототипа из *Vibrio* sp. (VAP) согласно *in silico* данным могут объяснить причины повышения термостабильности и каталитической эффективности, увеличения значений K_m и k_{cat} при значении pH $\geq 10,0$, образования активного мономера, и субстратной специфичности.
6. *CmAP* эффективно дефосфорилирует концы векторов перед лигированием, повышая эффективность лигирования генов в вектор до 99%.
7. *CmAP* в составе химерного белка с силикатениноподобным катепсином *L. oparikaе* перспективна как молекулярный маркер для мониторинга катепсин-содержащих фракций при его хроматографической очистке.
8. *CmAP* в составе химерных белков с манан-связывающим лектином голотурини *A. japonicus* и галактозосвязывающим лектином мидии *C. grayanus* перспективна для определения уровня гликозилирования клеточных маркеров патологических состояний человека и их ранней дифференциальной диагностики.

Научная новизна и практическая значимость. Впервые получена рекомбинантная высокоактивная ЩФ *C. marina* KMM 296 в клетках *E. coli* с выходом 10 мг на 1 л культуры. Мономерный фермент выделен в гомогенном состоянии с удельной активностью 12920 ед/мг и каталитической эффективностью $8,2 \times 10^7 \text{ с}^{-1}/\text{M}^{-1}$, что в настоящее время является самыми высокими показателями для ЩФ. Впервые показано, какие структурные изменения могут влиять на повышение термостабильности *CmAP* в 4 раза по сравнению с гомологом из *Vibrio* sp. (82 % гомологии). Впервые получены мутанты *CmAP*, доказывающие наличие эндогенного иона Mg^{2+} в активном центре мономера и его участие в катализе. Впервые на примере силикатениноподобного катепсина губки *L. oparikaе* генно-инженерными методами показана перспектива применения *CmAP* в качестве молекулярного маркера для проведения очистки труднотестируемых рекомбинантных белков. Впервые на основе *CmAP* получены рекомбинантные гибридные бифункциональные лектины - манан-связывающий лектин голотурини *A. japonicus* и галактозосвязывающий лектин мидии *C. grayanus*, перспективные диагностические средства для выявления онкологических и других патологий человека, связанных с изменением профиля гликозилирования клеточных маркеров.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на второй (2011), четвертой (2012), пятой (2013) и шестой (2014) международных научно-практических конференциях "Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине", Санкт-Петербург; I-м Симпозиуме по морским ферментам и полисахаридам (1st symposium on marine enzymes and polysaccharides), Нячанг, Вьетнам, 2012;

на 2-м международном симпозиуме по наукам о жизни (2nd International Symposium on Life Sciences), Владивосток, 2013; международной конференции FEBS EMBO, Париж, Франция, 2014.

Личный вклад автора. Автор лично участвовал в планировании экспериментов, а также лично проводил большинство представленных в диссертации экспериментов, участвовал в анализе и обсуждении всех полученных результатов. Эксперименты с применением методов биоинформатики проводились совместно с к.ф.-м.н. Лихацкой Г.Н.

Публикации. Всего опубликовано 30 работ, из них по материалам диссертации опубликовано 18 работ, в том числе 2 статьи в цитируемых рейтинговых зарубежных журналах, 1 статья в отечественном рецензируемом журнале, 2 патента, 13 статей и тезисов в материалах научных конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, обсуждения результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Список литературы включает 177 наименований. Диссертация изложена на 167 страницах машинописного текста, содержит 8 таблиц и 61 рисунок.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность своему руководителю аспирантуры к.б.н. Рассказову Валерию Александровичу, а также руководителю диссертационной работы к.б.н. Балабановой Ларисе Анатольевне. Автор выражает признательность сотрудникам ТИБОХ ДВО РАН: к.х.н. Мензоровой Наталье Ильиничне, к.б.н. Сибирцеву Юрию Тимофеевичу и м.н.с. Сейткалиевой Александре Валерьевне за ценные консультации по вопросам жидкостной хроматографии, к.х.н. Мензоровой Наталье Ильиничне и д.б.н. Бакуниной Ирине Юрьевне за ценные консультации по вопросам ферментативного катализа, к.ф.-м.н. Лихацкой Галине Николаевне за результаты исследований, полученных с помощью методов биоинформатики, к.ф.-м.н. Зелепуте Елене Александровне за консультирование по вопросам моделирования, к.б.н. Булгакову Александру Александровичу и к.б.н. Чикаловец Ирине Владимировне за помощь в проведении лектин-ферментного анализа и предоставлении антител и лигандов к лектинам CGL и MBL-*AA*. Автор выражает благодарность сотрудникам БПИ ДВО РАН: д.б.н. Булгакову Виктору Павловичу и к.б.н. Шкрыль Юрию Николаевичу за предоставленные данные электронной микроскопии наночастиц кремния. А также автор выражает глубокую благодарность к.б.н. Ковальчук Светлане Николаевне за неоценимую помощь и консультации при выполнении диссертации.

Работа поддержана грантами РФФИ 12-04-00825-а и 14-04-00696 А, и программой "Дальний Восток" 15-1-5-020.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Материалы и методы исследования

Выделение геномной ДНК *C. marina* проводили фенольной экстракцией с использованием гуанидинизотиоцианата при pH 8.0. Гель-электрофорез ДНК проводили по стандартным методикам (Sambrook *et al.*, 1989). Амплификация специфических фрагментов с ДНК *C. marina* и кДНК *C. gracilis*, *A. japonicus* и *L. oparinae* проводили с геноспецифичными праймерами и Энцкло ДНК полимеразой (Евроген) в амплификаторе «Eppendorf». Температура отжига праймеров рассчитывалась по формуле: $(4GC+2AT)+5^{\circ}C$. Мутации в гены рекомбинантных белков вводили методом ПЦР-опосредованного сайт-направленного мутагенеза. Лигирование рестриктв ПЦР-фрагментов в плазмиду pET-40b(+) в эквимольном количестве проводили в 20 мкл инкубационной смеси с использованием Т4ДНК-лигазы (Fermentas) при +14°C в течение ночи. Трансформацию *E. coli* плазмидной ДНК проводили с использованием хлористого марганца (Hanahan, 1983). Выделение плазмидной ДНК из *E. coli* осуществляли методом щелочного лизиса (Мазин и др., 1990). Секвенирование ДНК проводили на автоматическом анализаторе 310 (ABI PRISM). Экспрессию рекомбинантных белков проводили в *E. coli* Rosetta (DE3). Оптимизацию экспрессии проводили при различных температуре (12-24°C), концентрации индуктора экспрессии ИПТГ (0,2-0,5 mM) и времени культивирования (12-18 ч). Очистку рекомбинантных белков осуществляли с использованием анионообменного сорбента (ДЭАЭ-52 целлюлоза, Whatman), металлоафинной смолы (Ni-NTA агароза, Qiagen) и гель-фильтрации (сефакрил S-100HR и супердэкс 200PG, Sigma). Влияние различных солей, ионов металлов, температуры, а также каталитические параметры определяли на обессоленном гомогенном препарате фермента. Содержание ионов двухвалентных металлов в белке определяли методом атомно-адсорбционной спектроскопии (Shimadzu 6800).

Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с помощью программ Maestro (<http://www.sqlmaestro.com>), GENERUNNER, CHROMAS, BLAST, ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/>). Теоретические модели пространственных структур белков получали с помощью программы MOE (<http://www.chemcomp.com/>) с использованием в качестве прототипов известные кристаллические структуры белков (PDB; <http://www.rcsb.org/pdb>). Молекулярный докинг белков с субстратами, мутагенез *in silico* проводили с помощью программы MOE. Конформационную подвижность белков рассчитывали методом нормальных мод с использованием серверов elNEMO (<http://www.sciences.univ-nantes.fr/elnemo/>) и программы GROMACS (www.gromacs.org). Значения pKa определяли с помощью сервера PROPKA (<http://propka.ki.ku.dk>).

широком интервале pH (6,0 – 11,0) в 0,1 М Трис-НСl и ДЭА, и 3-25 % активности - при тех же значениях pH в ацетатном, карбонатном и глициновом буферных растворах (рис. 2 А). При значениях pH ниже 6 препарат необратимо теряет свою активность.

В ходе исследований было выявлено два оптимальных температурных режима для проявления максимальной активности *СтАР* – 40 и 50 °С (рис. 2 Б), что может указывать на конформационные перестройки в пространственной структуре белка при этих значениях. Предварительная инкубация фермента в течение 15 мин в интервале температур 20 – 45 °С в присутствии ионов Mg^{2+} слабо влияет на стабильность, тогда как предварительная инкубация при 50 °С понижает фосфатазную активность до 20 % от исходной величины. При отсутствии ионов Mg^{2+} время полуинактивации *СтАР* при 47 и 37 °С составляет 15 и 45 мин соответственно (рис. 2 В). Это показывает, что *СтАР* является умеренным психрофилом, проявляя большую температурную стабильность, чем его ближайший гомолог - ЩФ *Vibrio* sp. (VAP), время полуинактивации которого при 40 и 32 °С составляет 6 и 30 мин соответственно.

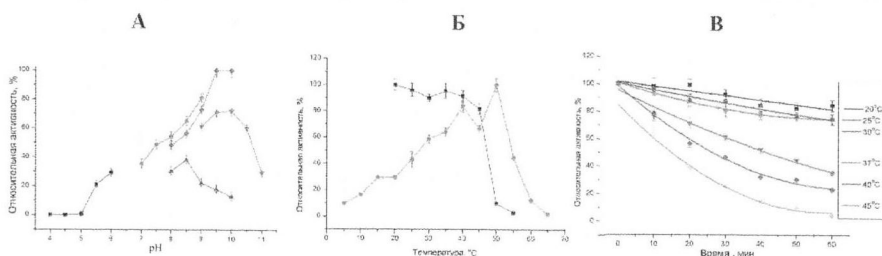


Рис. 2 А - Графики зависимости активности *СтАР* от различных значений pH и природы буферных растворов: черный - 30 мМ Na-ацетатного; красный - 50 мМ трис-НСl; зеленый - 20 мМ ДЭА; синий - 20 мМ глицин-NaOH; сиреневый - 20 мМ Na-карбонатного; **Б** - Графики зависимости активности *СтАР* от температуры: измерение активности проводили в стандартном буфере в течение 30 мин при различных температурных режимах (красный); измерение остаточной активности проводили после предварительной инкубации фермента при 25 °С (черный); **В** - Графики зависимости стабильности *СтАР* от температуры в присутствии ионов Mg^{2+} : фермент предварительно инкубировали при различных температурах, отбирая аликвоту через каждые 10 минут. Остаточную активность измеряли в стандартном буфере при 25 °С.

Несмотря на существенное влияние ионов Mg^{2+} на стабильность *СтАР*, активность фермента в отсутствие катионов двухвалентных металлов в инкубационной среде не изменялась. Кроме того, добавление ЭДТА до 100 мМ и ДСН до 5 % в инкубационную смесь уменьшает активность *СтАР* лишь до 60 и 40% соответственно. Отсутствие значительного ингибирующего эффекта может указывать на мономерное состояние *СтАР* и экранирование активного центра фермента элементами пространственной структуры, предохраняющими прочно связанные каталитические ионы Zn^{2+} и Mg^{2+} с аминокислотными остатками (а.о.)

активного центра от воздействия хелатирующего агента. В присутствии солей NaCl или KCl в буферном растворе 0,1 М трис-HCl, pH 10, при концентрации от 0,2 до 0,3 М активность *CmAP* увеличивается в 2 раза, но при дальнейшем увеличении концентрации NaCl активность снижается, в то время как 1 М KCl практически не влияет на активность фермента. Вероятно, избирательная устойчивость к высоким концентрациям ионов K^+ помогает ЩФ *C. marina* КММ 296 выполнять свою функцию в тканях моллюска, участвующих в минерализации постоянно растущей раковины, так как уже существуют доказательства необходимости повышения концентрации ионов K^+ при зарождении и развитии остеобластов, из которых формируется костная ткань (Henpey *et al.* 2009).

Кинетические параметры *CmAP* были определены при различных значениях pH (от 8,0 до 10,3). *CmAP* имела уникально высокие значения числа оборотов (keat) и константу Михаэлиса-Ментен (K_m), равные, соответственно, 28300 c^{-1} и 13,2 мМ в 1 М ДЭА (pH 10,3) с каталитической эффективностью (keat/ K_m) $2,1 \times 10^6 c^{-1}/M^{-1}$ для субстрата *n*-НФФ. Значения величин каталитической эффективности и K_m в 1 М ДЭА при pH 8,0 были $8,2 \times 10^7 c^{-1}/M^{-1}$ и 0,3 мМ соответственно. Сравнительные каталитические показатели для некоторых ЩФ, измеренные в трис-HCl буферном растворе, pH 8,0, при 25°C, представлены в Таблице 1. Каталитические параметры ЩФ кишечника телянка, включая ее высокоэффективные мутанты, также значительно уступают показателям *CmAP* (Kozlenkov *et al.* 2002, Nasu *et al.*, 2012). В зависимости от условий реакции K_m ЩФ кишечника телянка с удельной активностью до 5600-7800 ед/мг находится в пределах от 1,3 до 3,9 мМ, keat - от 1800 до 6100 c^{-1} , а максимальная каталитическая эффективность достигает не более $1,4 \times 10^6 - 1,6 \times 10^6 c^{-1}/M^{-1}$ (Kozlenkov *et al.*, 2002).

Таблица 1. Сравнительная характеристика каталитических параметров *CmAP*, VAP и ECAP в трис-HCl буферном растворе (pH 8,0) при 25°C.

Щелочная фосфатаза	keat, c^{-1}	K_m , мМ	keat/ K_m , c^{-1}/M^{-1}
<i>C. marina</i> , <i>CmAP</i>	1500	0,045	$3,3 \times 10^7$
<i>Vibrio</i> sp., VAP (Hauksson, Andresson, 2000)	204	0,17	$1,2 \times 10^6$
<i>E. coli</i> , ECAP (Tibbitts <i>et al.</i> , 1994)	62	0,06	$1,1 \times 10^6$

Таким образом, *CmAP* на сегодняшний день является не только самой высокоактивной, но и самой эффективной из известных ЩФ. Необычные свойства *CmAP* может объяснить её уникальная структура.

2.3. Моделирование пространственной структуры *CmAP*. На основе пространственной структуры прототипа из *Vibrio* sp. (VAP; PDB: 3E2D_A) построена высокоточная модель пространственной структуры *CmAP* со среднеквадратичным отклонением Ca-атомов (RMSD) 0,46 Å (Рис. 3 А). Упаковка *CmAP* и VAP относится к (α - β - α) типу: β -лист

состоит из 9 β -тяжей, с обеих сторон окруженных α -спиралями. *CmAP* имеет большой «краун»-домен и длинные протяженные петли, покрывающие активный центр, как у *VAP*. Как и в структуре *VAP*, каталитический центр *CmAP* глубоко погружен в щель между двумя петлями и образован идентичными металлосвязывающими а.о., каталитическим остатком Ser65 и субстрат-связывающим остатком Arg129. Незначительные отличия, обнаруженные в пространственной структуре молекулы *CmAP*, обусловлены наличием некоторых отличий в первичной структуре, что показывает выравнивание последовательностей а.о. *CmAP* и *VAP*. Это преимущественно гидрофобные а.о., располагающиеся на поверхности молекулы *CmAP* (Рис. 3 Б).

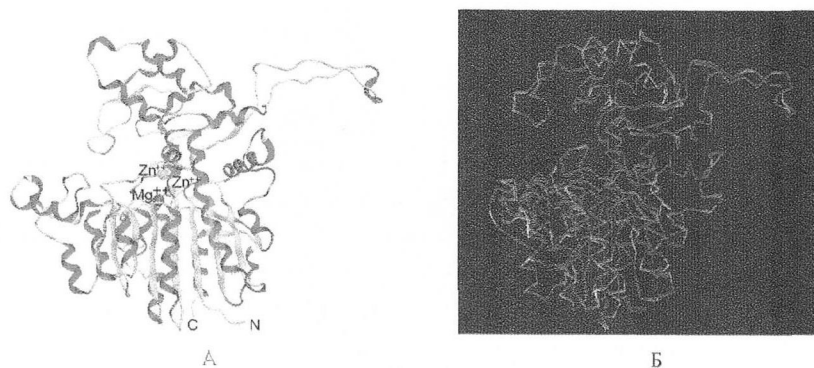


Рис. 3. (А) – Теоретическая модель мономера *CmAP* (UniProt: Q1W622). Структура белка показана в виде ленточной диаграммы, β -структура показана желтым цветом, α -спирали – красным цветом, изгибы – голубым цветом, неупорядоченная структура – серым цветом; (Б) – Суперпозиция α -атомов модели *CmAP* и пространственной структуры *VAP*. Синим цветом обозначены идентичные участки аминокислотных последовательностей, зеленым, желтым и красным обозначены гомологичные и негомологичные аминокислотные остатки.

Методом нормальных мод было определено, что петля, участвующая в образовании димера в структуре *VAP*, у *CmAP* имеет большую конформационную подвижность (Рис. 4 А). Это может объяснить преобладание мономерной формы *CmAP* в растворе в условиях проведения хроматографий. К тому же каждая субъединица не нуждается в структурной кооперации для выполнения субстрат-связывающей и каталитической функций и обладает независимой конформационной подвижностью (Рис. 4 Б).

Анализ протонирования а.о. в *CmAP* при значении pH ≥ 10 показал, что положительно заряженный субстрат-связывающий остаток Arg становится нейтральным и неспособным связывать отрицательно заряженный субстрат. В дополнении к этому нейтрально заряженный остаток Trp441 становится отрицательно заряженным, что способствует ускорению высвобождения продукта реакции PO_4^{2-} из ферментативной щели. Этим можно объяснить столь высокие каталитические показатели *CmAP* (Km и kcat). Согласно модели пространственной структуры *CmAP* остаток Trp274 образует стэкинг-взаимодействие с кольцом субстрата АМФ над входом в активный центр *CmAP*, что определяет ее специфичность к молекуле ДНК (Рис. 5 А).

2.4. Направленный мутагенез *CmAP*. Результаты атомно-адсорбционной спектроскопии показали, что на одну мономерную молекулу *CmAP* приходится два атома Zn и один атом Mg, как и в большинстве известных структур ЦФ (Helland *et al.*, 2009). Так как для всех ЦФ, включая VAR, оба сайта связывания ионов цинка являются идентичными, то для выявления роли а.о., формирующих третий Mg^{2+} -связывающий сайт в структуре *CmAP*, получали мутанты с заменой а.о. на нейтральный остаток Gly в местах предположительного связывания ионов Mg^{2+} : Asp12Gly, Asp273Gly, Asp315Gly, His316Gly, Trp118Gly, Glu268Gly и Trp274Gly. Практически все мутанты *CmAP*, в которых был нарушен прямой контакт а.о. с ионом Mg^{2+} или их косвенный контакт через атомы других а.о. или воды, оказались неактивными, что также подтверждает наличие эндогенного иона Mg^{2+} в структуре *CmAP*. Мутанты Asp64Gly и Asp443Gly, где нарушение контактов происходит на периферии молекулы, сохраняли, соответственно, 14% и 67% активности по сравнению с природным типом *CmAP*. Компьютерный анализ пространственной структуры мутантов выявил, что нарушение любого внутримолекулярного контакта Mg^{2+} с а.о. приводит к нарушению координации сразу всех ионов металлов в *CmAP*. На 3D-модели *CmAP* показано, что ион Mg^{2+} принимает участие в формировании общей сети водородных связей, пронизывающей структуру активного центра *CmAP*.

2.5. Перспективы применения рекомбинантной *CmAP*.

2.4.1. Применение *CmAP* для дефосфорилирования векторов. Для повышения эффективности лигирования при получении плазмидных конструкций рестрицированные плазмиды обрабатывались *CmAP* для дефосфорилирования её 3'-концов с целью предотвращения самолигирования вектора. При использовании *CmAP* эффективность получения рекомбинантных конструкций составила 99 % и намного превышала эффективность использования классической ЦФ из *E. coli* (Fast AP, Fermentas).

2.4.2. Получение гибридного бифункционального силикатенноподобного катепсина *СmAP/LoC*. Силикатены, гомологи катепсина *L*, – белки спикул губок, которые обладают способностью гидролизовать эфиры кремниевой кислоты с образованием аморфного кремнезема и конденсировать молекулы предшественника – тетраэтоксисилана с образованием кремниевых наноструктур определенной формы (Cha *et al.*, 1999). Широкие возможности применения силикатенов в биотехнологии получения нанокомпозитных материалов на основе кремния делают перспективным исследование свойств силикатенов разных видов губок и их рекомбинантных аналогов (Müller *et al.*, 2009; Schröder *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012). Ранее в лаборатории морской биохимии ТИБОХ ДВО РАН был получен рекомбинантный аналог силикатенноподобного катепсина морской губки *L. oparinae* (Ковальчук и др., 2013). Однако метод определения количества осажденного им кремнезема из кремнесодержащих веществ часто приводил к недостоверным результатам, так как примесные белки способны к неспецифическому агрегированию друг с другом и к неспецифическому осаждению их компонентом самого субстрата, THEOS (тетракис (2-гидроксисетил) ортосиликат). Это сильно затрудняло определение специфической активности содержащих рекомбинантный силикатенин фракций при хроматографической очистке.

На основе плазмиды pET-40b(+) была получена химерная конструкция, несущая структурные гены фосфатазы *СmAP* и силикатенноподобного катепсина морской губки *L. oparinae* (*LoC*). После проведения экспрессии в клетках *E. coli* было выявлено повышение выхода *LoC* в клеточном экстракте в полтора раза по сравнению с ранее разработанным методом его получения (Ковальчук и др., 2013). Это, вероятно, связано с особенностями процессинга химерного белка в клетках рекомбинантного штамма. ЦФ морской бактерии, расположенная с N-конца химерного белка *СmAP/LoC*, может выполнять роль шаперона для силикатенина эукариотического происхождения, механизм действия которого требует дополнительного изучения. Выделение химерного белка было основано на оптимизированной схеме выделения *СmAP*, за исключением последней стадии. Для гель-хроматографии вместо сефакирила S-100HR использовали супердэкс 200PG, предназначенный для белков с молекулярной массой до 600 кДа. Способность химерного силикатенноподобного катепсина *СmAP/LoC* осаждать аморфный кремний из субстрата THEOS подтвердил его функциональность. Обработка химерного белка *СmAP/LoC* энтерокиназой приводила к получению функционально активного *LoC*, который в перспективе можно будет применять для получения наночастиц для различных целей, в том числе для целей фотоники и получения биокompозитных наноматериалов.

Таким образом, слияние *LoC* и *СmAP* для получения бифункционального белка с легко детектируемой фосфатазной активностью позволило более точно и быстро определять наличие

и количество силикатина во фракциях при проведении хроматографий. Кроме того, было установлено, что слияние структурного гена *СmAP* с генами белков, склонных к быстрой агрегации, таких как силикатинны, повышает их растворимость и, соответственно, функциональность при гетерологической экспрессии.

2.4.3. Получение гибридного бифункционального галактозосвязывающего лектина *СmAP/CGL*. В современном представлении лектины - это обширный класс белков, обладающих общим свойством обратимо и избирательно связывать углеводы и углеводные детерминанты биополимеров без изменения их структуры (Королёв, 1984; Jialong *et al.*, 2011; Wei-Chuan Chang, 2011). На основе способности лектинов определять профиль микрогетерогенности углеводов на поверхности клеток, измененных патологическим процессом, были разработаны различные лектин-ферментные и лектин-иммуноферментные методы ранней и дифференциальной диагностики (ELLA) (Чикаловец и др., 2010; Kuzmanov *et al.*, 2013). Ранее из морской мидии *C. grayanus* был выделен и охарактеризован галактозоспецифичный (Gal/GalNAc-специфичный) лектин (CGL), на основе которого для выявления различий в гликозилировании онкофетальных антигенов (ОФА) были разработаны методы твердофазного лектин-ферментного анализа (ТЛФА) (Чикаловец и др., 2010; Фуртак и др., 1999; 2000). Было показано, что лектин проявляет специфичность к углеводным цепям, характерным для злокачественного роста клеток, таким как Т-антиген (Gal β 1 $\rightarrow$ 3GalNAc-O-Ser/Thr) и Тn-антиген (GalNAc-O-Ser/Thr). Была определена нуклеотидная последовательность гена CGL, что позволило открыть новый класс лектинов, близких по структуре к ризину (Kovalchuk *et al.*, 2013).

В лектин-иммуноферментном методе для детекции связанных с лектином углеводных цепей необходимо получить меченные пероксидазой А хрена антитела к лектину, что является затратной по времени и ресурсам процедурой. В данной работе вместо использования конъюгатов пероксидазы хрена и антител к CGL предложено использование *СmAP* для цветной визуализации лектин-связанных комплексов. Для этого использовали генно-инженерные методы сшивания *СmAP* и CGL с целью получения бифункционального гибрида *СmAP/CGL*. В результате оптимизации генетических конструкций была получена плаزمида pET40*СmAP/CGL*, имеющая 8192 п.о. и характеризующаяся наличием NcoI/Sall-фрагмента плазмиды pET-40b(+) и фрагмента ДНК размером 2028 п.о., содержащего гены *СmAP* и CGL, соединенных между собой гибким линкером (G₄S)₃ с сайтом энтерокиназы. После экспрессии рекомбинантной плазмиды в клетках *E. coli* гибрид *СmAP/CGL* был очищен по такой же схеме, что и *СmAP*. Фракции *СmAP/CGL* определяли по активности *СmAP*. Согласно данным гель-хроматографии на супердэксе 200PG, химерный белок элюировал как мономер, имеющий молекулярную массу 104 кДа с плазмидным белком DsbC и 72 кДа - без DsbC (рис. 6 А, Б).

Для тестирования функциональности гибрида *CmAP/CGL* лектин-ферментным методом использовали муцин желудка свиньи (PSM). Было установлено, что существует линейная зависимость между концентрациями гибрида *CmAP/CGL* и лиганда, указывающая на высокую специфичность такого взаимодействия (Рис. 6 В).

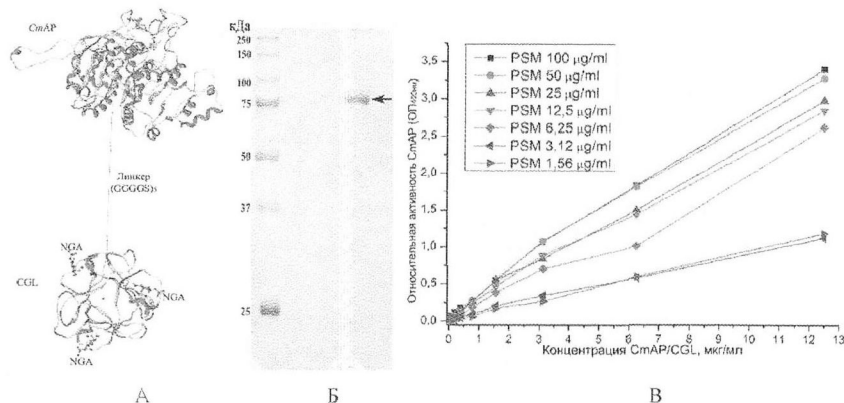


Рис. 6. А - Модель пространственной структуры гибрида *CmAP/CGL*. NGA – галактозсвязывающие сайты CGL. Б - Электрофореграмма очищенного гибридного белка *CmAP/CGL* в 12,5 % ДСН-ПААГ (показано стрелкой). В - Влияние различных концентраций *CmAP/CGL* и муцина (PSM) на чувствительность лектин-ферментного метода: по оси абсцисс показана концентрация *CmAP/CGL* (мкг/мл); по оси ординат – относительная активность ЩФ (ОП при $\lambda=400\text{nm}$).

Таким образом, предложенный ранее метод использования CGL (Чикаловец и др., 2010) усовершенствован, что позволяет проводить анализ лектин-связанных форм в образце при концентрации как гибридного лектина *CmAP/CGL*, так и муцина менее 2 мкг/мл. Это делает *CmAP/CGL* перспективным для использования в диагностике патологий трофобласта и рака прямой кишки.

2.4.4. Получение гибридного бифункционального маннан-связывающего лектина *CmAP/MBL-A/I*. К числу лектинов с высоконаправленной углеводной специфичностью относится и маннан-связывающий лектин С-типа дальневосточного трепанга *MBL-A/I* (Bulgakov *et al.*, 2007). Было показано, что результаты исследований углеводного профиля гликоконъюгатов *MBL-A/I* могут найти широкое практическое применение при разработке методов диагностики рака на основе определения раковоэмбриональных антигенов (РЭА) (Булгаков и др., 2011). Так как для количественного определения лектин-субстратных комплексов в данном методе так же, как и для лектина CGL, требуется дополнительное получение антител к *MBL-A/I*, меченных пероксидазой А хрена, представляется перспективным

использовать *CmAP* в качестве цветного маркера для визуализации образовавшихся комплексов. В результате использования генно-инженерных *CmAP*-содержащих химерных конструкций для синтеза рекомбинантного лектина MBL-*AJ* удалось получить растворимый бифункциональный гибрид *CmAP*/MBL-*AJ* с активностью *CmAP* и специфичностью MBL-*AJ*. Рекомбинантная плаزمида pET40*CmAP*/MBL-*AJ* состоит из 8194 п.о. и характеризуется наличием NcoI/SalI-фрагмента плазмиды pET-40b(+) и фрагмента ДНК размером 2034 п.о., содержащего химерный ген, трансляция которого начинается с *CmAP* и заканчивается маннан-связывающим лектином MBL-*AJ*. Функциональные домены молекулы *CmAP*/MBL-*AJ* соединены между собой гибким линкером (G₃S)₄. Экспрессию и очистку гибрида *CmAP*/MBL-*AJ* проводили, как описано выше. Активные фракции определяли по активности *CmAP*. На последней стадии гель-хроматографии на супердэксе 200PG рекомбинантный гибрид *CmAP*/MBL-*AJ* элюировал в виде димера с молекулярной массой 200 кДа – с плазмидным белком DsbC, и 140 кДа – без DsbC (pH 8,2). При более высоком значении pH (>9,2) активность *CmAP*/MBL-*AJ* определялась как во фракциях белков с молекулярной массой 200 кДа, так и 400 кДа, а после обработки *CmAP*/MBL-*AJ* энтерокиназой - 140 кДа и 280 кДа. Так как, согласно полученным результатам, *CmAP* является мономером, а MBL-*AJ* существует в природе в активной форме в виде димера и тетрамера (Bulgakov *et al.*, 2007), было предположено, что гибридный белок *CmAP*/MBL-*AJ* может образовывать олигомерные структуры за счет субъединиц лектина. Для подтверждения этого предположения была получена модель пространственной структуры гибридного лектина *CmAP*/MBL-*AJ* в димерной форме.

2.4.5. Моделирование пространственной структуры маннан-связывающего лектина и его гибридного аналога *CmAP*/MBL-*AJ*. Модель пространственной структуры лектина MBL-*AJ* получили на основе пространственной структуры его ближайшего гомолога из голотурии *Cucumaria echinata* (CEL-IV, код PDB: 3ALU) (Рис. 7 А). Мономер MBL-*AJ* содержит один углевод-распознающий домен, поэтому функционально активной формой лектина является димер (Bulgakov *et al.*, 2007). Согласно 3D-модели MBL-*AJ*, в формирование димера MBL-*AJ* вовлечены дисульфидные мостки между мономерами (Рис. 7 Б). Димеры MBL-*AJ* в природе способны образовывать тетрамеры за счет а.о. цистеинов, расположенных на N-концах каждого мономера.

Модель структуры димера бифункционального гибрида *CmAP*/MBL-*AJ*, состоящего из высокоактивной щелочной фосфатазы *CmAP* и маннан-связывающего лектина MBL-*AJ*, была также получена с помощью программы MOE. (Рис. 7 В). Анализ пространственной структуры гибридного белка *CmAP*/MBL-*AJ* выявил возможные механизмы образования олигомерных структур. Каждый мономер лектина, входящий в состав химеры *CmAP*/MBL-*AJ*, также как и природный аналог, стабилизирован двумя внутримолекулярными S-S связями и образует еще

два дисульфидных мостика за счет близко расположенных к N-концу а.о. цистеина (Рис. 7 Б). При этом N-концы каждого из мономеров лектина расходятся в противоположные стороны под некоторым углом, что позволяет двум доменам *CmAP* в составе химеры *CmAP/MBL-A/* располагаться в пространстве независимо друг от друга (Рис. 7 В). Однако механизм образования тетрамерной формы химерного белка *CmAP/MBL-A/* при $\text{pH} \geq 9,2$, скорее всего, отличается от природного, так как N-концевые а.о. цистеина в химерном белке заняты связью с линкером $(\text{G}_4\text{S})_3$, к которому прикреплен фосфатазный домен (Рис. 7).

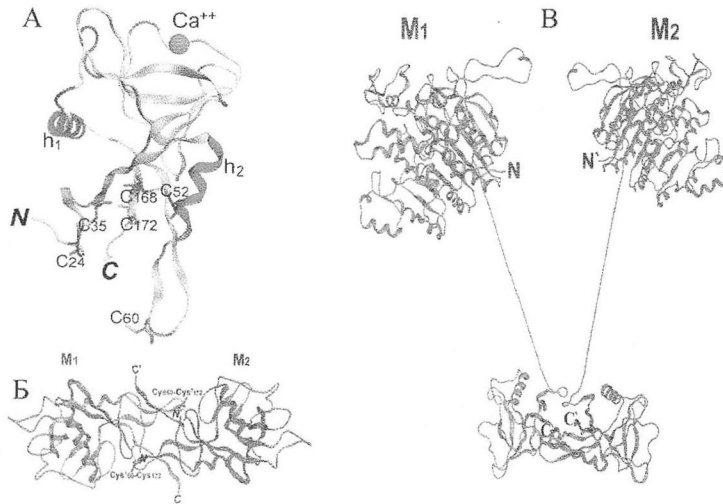


Рис. 7. А – Модель пространственной структуры мономера *MBL-A/*: показаны дисульфидные мостики (Cys24-Cys35 и Cys52-Cys168) и свободные группы а.о. Cys60 и Cys172 на С-конце мономера лектина. Б – Модель пространственной структуры димера *MBL-A/*: M_1 (оранжевый) и M_2 (фиолетовый) – субъединицы *MBL-A/*; показаны два межсубъединичных дисульфидных мостика Cys60-Cys'172 и Cys'60-Cys172. В – Модель пространственной структуры димера *CmAP/MBL-A/*: M_1 и M_2 – субъединицы (оранжевый и фиолетовый); N и C – концы субъединицы M_1 ; N' и C' – концы субъединицы M_2 .

2.4.6. Молекулярный докинг *in silico* и мутагенез лектина в гибридном бифункциональном белке *CmAP/MBL-A/*. Для выяснения структурных особенностей и углеводной специфичности лектина *MBL-A/* был проведен молекулярный докинг лектина с модельным манноолигосахаридом. На основе этих данных в лектин *MBL-A/* были введены точечные аминокислотные замены: W100A, Q103H, A156N, F159K и A156N/F159K (Табл. 2).

В результате тестирования полученных экспериментальным путем мутантных форм гибридного лектина *CmAP/MBL-A/* методом лектин-ферментного анализа было установлено,

что при мутации W100A происходит уменьшение связывания лектина с лигандом на 14 ± 3 %, соответствующее расчетным данным (Рис. 8 А, Табл. 2).

Таблица 2. Энергия взаимодействия и степень сродства MBL-AJ с модельным манноолигосахаридом

Лектин MBL-AJ	Сольватация*, kcal/mol	Аффинность**, kcal/mol
Дикий тип	-57,70	-7,69
W100A	-44,77	-5,66
Q103H	-46,35	-6,62
A156N	-58,68	-8,49
F159K	-65,58	-8,21
A156N/F159K	-74,53	-9,49

*- свободная энергия связывания лиганда с рецептором в присутствии растворителя, включая Ван-ден-Ваальсовы и электростатические взаимодействия, **- аффинность связывания лиганда (ккал/моль), рассчитанная с оценочной функцией GBVI/WSA dG (Corbeil *et al.*, 2012).

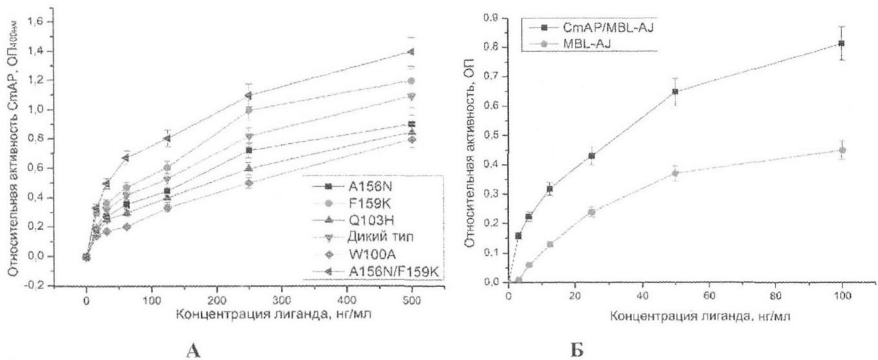


Рис. 8. А – Графики зависимости концентрации углевод-связанных форм *CmA/MBL-AJ* от концентрации *CmA/MBL-AJ* дикого типа (розовый) и концентрации мутантов *CmA/MBL-AJ*. Гибридные лектины *CmA/MBL-AJ* использовали в сериях двукратных разведений. В качестве лиганда использовали муцин желудка свиньи в одинаковой концентрации. По оси абсцисс обозначена концентрация лиганда (нг/мл), по оси ординат – относительная активность *CmA* (ОП при $\lambda=400$ нм). Б – Сравнительный лектин-иммуноферментный анализ с использованием нативного лектина MBL-AJ (нижняя кривая) (по оси ординат – ОП при $\lambda=492$ нм) и гибрида *CmA/MBL-AJ* (верхняя кривая) (по оси ординат – ОП при $\lambda=400$ нм). В качестве лиганда использовали эмбриональный α -1-кислый гликопротеин в сериях двукратных разведений, лектины были использованы в одинаковой концентрации. По оси абсцисс обозначена концентрация лиганда (нг/мл).

Мутации Q103H и A156N приводили к ухудшению связывания лектина с лигандом, соответственно, на 12 ± 2 % и 8 ± 2 %, а замена а.о. F159K улучшала связывание с лигандом на 10 ± 3 %. Однако наибольшей углевод-связывающей активностью обладал двойной мутант A156N/F159K, который показывал на 25 ± 5 % большую аффинность к муцину, чем гибрид *CmA/MBL-AJ* с природным типом лектина (Рис. 8 А). Кроме того, при использовании

гибридного лектина *СтАР/MBL-AJ* чувствительность лектин-иммуноферментного метода повышалась в 2 раза по сравнению с чувствительностью природного лектина *MBL-AJ* (Рис. 8 Б). Увеличение чувствительности может объясняться тем, что удельная активность используемой для визуализации лектин-субстратного комплекса пероксидазы А хрена составляет 576 ед/мг, в то время как активность *СтАР* в гибриде *СтАР/MBL-AJ* достигает 1500 ед/мг в 0,1 М трис-НСl буферном растворе и 5100 ед/мг в 1 М ДЭА.

Таким образом, использование гибрида *СтАР/MBL-AJ* позволяет повысить чувствительность лектин-иммуноферментного метода и уменьшить время проведения анализа и его стоимость. Метод перспективен для ранней дифференциальной диагностики рака шейки матки (Булгаков и др., 2011).

ВЫВОДЫ

1. Разработана оптимальная конструкция - плаزمида 40Ph размером 7699 п.о., включающая *NcoI/SacI* фрагмент плазмиды pET-40b(+) и ген щелочной фосфатазы морской бактерии *C. marina*. Получен рекомбинантный штамм *E. coli* Rosetta (DE3)/40Pho, позволяющий получать рекомбинантный белок (*СтАР*) со свойствами щелочной фосфатазы морской бактерии *C. marina* в растворимой форме.
2. Подобраны оптимальные условия для экспрессии *СтАР* с использованием рекомбинантного штамма *E. coli* Rosetta (DE3)/40Pho, что повысило уровень ее экспрессии до 10 мг в 1 л культуры клеток.
3. Разработана и оптимизирована схема выделения и очистки *СтАР* из 1 л культуры клеток *E. coli* Rosetta (DE3)/40Pho с итоговым выходом 2 мг гомогенного (>99%) препарата белка с удельной активностью фермента 12920 ед/мг.
4. Определены физико-химические свойства *СтАР*, а именно: молекулярная масса, стабильность (при различных значениях pH, температуры в присутствии и отсутствии экзогенных ионов Mg^{2+}), температурный оптимум, pH-оптимум, влияние высокой ионной силы, ионов тяжелых металлов, ингибиторов, устойчивость к хелатирующему агенту ЭДТА и детергенту ДСН, а также определены каталитические параметры *СтАР* (kcat, Km, kcat/Km).
5. Методами компьютерного моделирования получены теоретические модели пространственных структур *СтАР*, силикатеиноподобного катепсина *L. oparinae* (LoC), галактозосвязывающего лектина *C. graminis* (CGL), маннан-связывающего лектина *A. japonicus* (MBL-AJ) и *СтАР*-содержащих гибридных белков. Установлены структуры их активных центров, металлосвязывающих сайтов и сайтов связывания с субстратами, подтверждающие свойства белков. Выявлено, что нарушение любого внутримолекулярного контакта Mg^{2+} в *СтАР* коррелирует с потерей каталитической активности фермента. Предсказана структура

гибридного мутантного лектина *СтАР/МВЛ-А/* с более высокой углеводов-связывающей активностью.

6. Показана возможность применения *СтАР* в генной инженерии. Использование *СтАР* вместо ЩФ из *E. coli* позволило повысить эффективность лигирования целевых генов до 99%.
7. Показано, что *СтАР* может быть использована в качестве молекулярного маркера для детекции целевого рекомбинантного белка – силикатениноподобного катепсина *La. oparinae* (*LoC*), при гетерологической экспрессии и хроматографической очистке.
8. Получены рекомбинантные гибридные *СтАР*-содержащие белки на основе галактозосвязывающего лектина *C. gruyanus* (*СтАР/CGL*) и маннан-связывающего лектина *A. japonicus* (*СтАР/МВЛ-А/*) для усовершенствования лектин-иммуноферментных методов определения уровня гликозилирования при различных патологиях человека, в частности, при онкологических заболеваниях.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях

1. Golotin V., Balabanova L., Likhatskaya G., Rasskazov V. Recombinant production and characterization of a highly active alkaline phosphatase from marine bacterium *Cobetia marina* // Marine Biotechnology. – 2014. DOI 10.1007/s10126-014-9601-0.
2. Balabanova L., Golotin V., Kovalchuk S., Bulgakov A., Likhatskaya G., Son O., Rasskazov V. A Novel bifunctional hybrid with marine bacterium alkaline phosphatase and Far Eastern holothurians mannan-binding lectin activities // Plos One. 2014. V. 9, N 11. e112729.
3. Голотин В. А. Получение химерного белка на основе щелочной фосфатазы из бактерии *Cobetia marina* и силикатениноподобного катепсина из морской губки *Latrunculia oparinae* // Вестник ДВО РАН. 2014. Т. 1. С. 169–173.

Патенты

1. Балабанова Л.А., Голотин В.А., Рассказов В.А. Рекомбинантная плазмидная ДНК рЕТ40*СтАР/МВЛ-Т*, кодирующая гибридный бифункциональный полипептид *СтАР/МВЛ-Т* со свойствами высокоактивной щелочной фосфатазы морской бактерии и маннан-связывающего лектина С-типа, рекомбинантный штамм *E. coli* Rosetta(DE3)/рЕТ40*СтАР/МВЛ-Т* –продуцент гибридного полипептида *СтАР/МВЛ-Т* и способ его получения // Патент РФ, №2538169. 17.10.2014.
2. Балабанова Л.А., Голотин В.А., Ковальчук С.Н., Черников О.В., Чикалов И.В., Рассказов В.А. Рекомбинантная плазмидная ДНК рЕТ40*СтАР/CGL*, кодирующая гибридный бифункциональный полипептид *СтАР/CGL* со свойствами высокоактивной щелочной фосфатазы *СтАР* и галактозоспецифичного лектина CGL, рекомбинантный штамм *E. coli*

Rosetta(DE3)/pET40CmAP/CGL – продуцент гибридного бифункционального полипептида CmAP/CGL и способ его получения // Патент РФ, заявка на патент №2014114093, 2014

Материалы конференций

1. Balabanova L., Golotin V., Kovalchuk S., Likhatskaya G., Bulgakov A., Chernikov O., Chikalovets I., Molchanova V., Rasskazov V. Recombinant chimeric bifunctional proteins with alkaline phosphatase activity of marine bacterium *Cobetia marina* for the assessment of lectin-binding patterns: FEBS EMBO 2014 conference, 30 Aug. – 4 Sept. 2014, Paris, France // FEBS Journal. 2014. V. 281, suppl. 1. – P. 418.
2. Голотин В. А., Балабанова Л. А., Рассказов В. А. Получение экспрессирующего вектора щелочной фосфатазы морской бактерии *Cobetia marina* // Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии, фармакологии и медицине : сб. статей Второй междунар. науч.-практ. конф. «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине», Россия, Санкт-Петербург, 26–28 окт. 2011. – СПб. : Изд-во Политехн. ун-та, 2011. Т. 2. С. 166–167.
3. Голотин В. А., Балабанова Л. А., Рассказов В. А. Оптимизация схемы выделения высокоактивной рекомбинантной щелочной фосфатазы морской бактерии *Cobetia marina* // Физиология, медицина, фармакология. Высокие технологии, теория, практика : сб. статей Четвертой междунар. науч.-практ. конф. «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии, медицине, фармакологии», 15–16 нояб. 2012 г., Санкт-Петербург, Россия. 2012. С. 36–38.
4. Golotin V. A., Balabanova L. A., Rasskazov V. A. Optimization of a highly active recombinant alkaline phosphatase CmAP expression and purification // 1th Symp. on Marine Enzymes and Polysaccharides, Nha Trang, Vietnam, 10–17 Dec. 2012 : abstrs book and sci. progr. – Nha Trang: VAST, 2012. P. 26.
5. Голотин В. А., Балабанова Л. А., Рассказов В. А. Получение химерного белка на основе щелочной фосфатазы из бактерии *Cobetia marina* и маннан-связывающего лектина из голотурии *Apostichopus japonicus* для диагностики рака // Физиология и медицина. Высокие технологии, теория, практика : сб. ст. Пятой междунар. науч.-практ. конф. «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине», 14–15 нояб. 2013 г., Санкт-Петербург. 2013. Т. 1. С. 37–39.
6. Голотин В. А., Балабанова Л. А., Лихачская Г. Н., Рассказов В. А. Структурно-функциональные особенности щелочной фосфатазы морской бактерии *Cobetia marina* [Электронный ресурс] // Всероссийская молодежная конференция «Взгляд в будущее», Владивосток, 7–14 нояб. 2013 г. : сб. работ. Владивосток, 2013. С. 30–40.

7. **Balabanova L. A., Golotin V. A., Likhatskaya G. N., Rasskazov V. A.** Structural study of a marine bacterium *Cobetia marina* alkaline phosphatase // 2nd International symposium on Life Sciences, Vladivostok, Russia, Sept. 4-9, 2013 : progr. and abstrs. Vladivostok, 2013. P. 12.
8. **Golotin V. A., Balabanova L. A., Rasskazov V. A.** Biochemical and catalytic properties of the recombinant alkaline phosphatase from the marine bacterium *Cobetia marina* // 2nd International symposium on Life Sciences, Vladivostok, Russia, Sept. 4-9, 2013 : progr. and abstrs. Vladivostok, 2013. P. 36.
9. Rasskazov V. A., Balabanova L. A., **Golotin V. A.,** Kozhemyako V. B., Kovalchuk S. N., Likhatskaya G. N., Menzorova N. I., Seytkalieva A. V., Sibirtzev Yu. T., Terentyeva N. A., Zvyagintseva T. N. Hydrolytic enzymes of marine organisms as new tools for medicine and biotechnology // 2nd International symposium on Life Sciences, Vladivostok, Russia, Sept. 4-9, 2013 : progr. and abstrs. Vladivostok, 2013. P. 15.
10. **Голотин В. А.,** Ярмоленко Н. С., Балабанова Л. А., Черников О. В., Чикаловец И. В., Молчанова В. И., Рассказов В. А. Получение рекомбинантного бифункционального полипептида на основе щелочной фосфатазы морской бактерии и галактозсвязывающего лектина морской мидии // материалы всероссийской научно-практической конференции «Биологически активные вещества из морских гидробионтов в биотехнологии и медицине». Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2014. – № 3 (57). – С. 22–23.
11. **Голотин В. А.,** Балабанова Л. А., Рассказов В. А. Очистка и лектин-связывающие свойства рекомбинантного гибридного белка для диагностики рака // Физиология и медицина. Исследования, высокие технологии, стартапы: сб. статей Шестой международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине», 22–23 мая 2014., Санкт-Петербург, Россия. – СПб : Изд-во Политехн. ун-та, 2014. С. 150–151.
12. Лихацкая Г. Н., Булгаков А. А., Балабанова Л. А., **Голотин В. А.,** Рассказов В. А., Трифонов Е. В., Тарасов Г. В., Нурминский Е. А. Моделирование пространственной структуры лектина голотурин и его комплексов с манноолигосахаридом // III Международная научная Интернет – конференция "Математическое и компьютерное моделирование в биологии и химии", Казань, 25 сент. 2014. С. 104–106.
13. Шкрыль Ю. Н., Булгаков В. П., Веремейчик Г. Н., **Голотин В. А.,** Семилетова И. В., Тимофеева Я. О., Каменев Д. Г. Синтез кристаллов кремния с использованием силикатина морских губок *Latruncilia oparinae* [Электронный ресурс] // XV Всероссийская молодежная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии, МЭС ТИБОХ, Владивосток, 5–15 сентября 2014 г. С. 14–16.