

1 *УДК 577.112.854*

2 **ЦИАНОКОБАЛАМИН-СВЯЗЫВАЮЩИЙ БЕЛОК ТЕРМОФИЛЬНОГО**  
3 **МИКРООРГАНИЗМА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫХ**  
4 **БИОСЕНСОРОВ ВИТАМИНА В<sub>12</sub>**

5 **Колонтитул: ЦИАНОКОБАЛАМИН-СВЯЗЫВАЮЩИЙ БЕЛОК**  
6 **ТЕРМОФИЛЬНОГО МИКРООРГАНИЗМА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ**  
7 **КОДИРУЕМЫХ БИОСЕНСОРОВ ВИТАМИНА В<sub>12</sub>**

8

9 © 2025 С. Ю. Симоненко\*, И. В. Артамонов, В.С. Лактюшкин, Н. А. Кульдюшев

10

11 Симоненко и др.

12

13 *Научно-технологический университет «Сириус», Россия, 354340, Краснодарский*

14 *край, пгт «Сириус», проспект Олимпийский, д.1*

15 *Электронная почта: Simonenko.SY@talantiuspeh.ru*

16

17 **Поступила в редакцию**

18 После доработки

19 Принята к публикации

20

21 Генетические технологии, такие как редактирование генома или  
22 репрограммирование клеток с помощью вирусов, изменяют последовательности  
23 ДНК. Витамин В<sub>12</sub> участвует в метаболизме фолата и SAM, которые необходимы для  
24 репликации, синтеза нуклеотидов, восстановления и метилирования ДНК и  
25 гистонов, а значит его дефицит может снизить эффективность и безопасность  
26 применения генетических технологий. В геномах термофильных микроорганизмов,  
27 собранных на территории Российской Федерации, нами был найден и клонирован  
28 ген периплазматического В<sub>12</sub>-связывающего белка термофильной бактерии  
29 *Fervidobacterium riparium*. Рекомбинантный белок обладает высокой  
30 термостабильностью, а также связывается с витамином В<sub>12</sub> по результатам  
31 абсорбционной спектрофотометрии и дифференциальной сканирующей  
32 калориметрии. На данный момент не существует чувствительных неинвазивных  
33 методик для динамического определения внутриклеточных концентраций В<sub>12</sub>, но  
34 охарактеризованный нами белок мог бы стать сенсорным доменом генетически  
35 кодируемого флуоресцентного биосенсора В<sub>12</sub> в перспективе заменив

36 неоптимальные подобные биосенсоры и предоставив новый молекулярный  
37 инструмент, в том числе для оптимизации применения генетических технологий.

38

39 **КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** витамин В<sub>12</sub>, цианокобаламин, термофильные  
40 микроорганизмы, генетические технологии, рекомбинантные белки,  
41 периплазматические связывающие белки.

42

43 **DOI:**

44

45 Принятые сокращения: ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия;  
46 ДСФ – дифференциальная сканирующая флуориметрия; ИПСК – индуцированные  
47 плюрипотентные стволовые клетки; МАТ – метионин аденозилтрансфераза; МС –  
48 метионинсинтаза; ТГФК – тетрагидрофолиевая кислота; CNCbl – цианокобаламин;  
49 CRISPR – clustered regularly interspaced short palindromic repeats, регулярно  
50 расположенные группы коротких повторов; FR – исследуемый белок из  
51 *Fervidobacterium riparium*; FRET – Förster resonance energy transfer, Фёрстеровский  
52 перенос энергии; GFP – green fluorescent protein, зелёный флуоресцентный белок;  
53 Hcy – гомоцистеин; ТС – исследуемый белок из *Thermogladus calderae*; Tlet\_1275 –  
54 исследуемый белок из *Thermotoga lettingae*; SAM – S-аденозилметионин.

55 \* Адресат для корреспонденции.

56

57 **ВВЕДЕНИЕ**

58

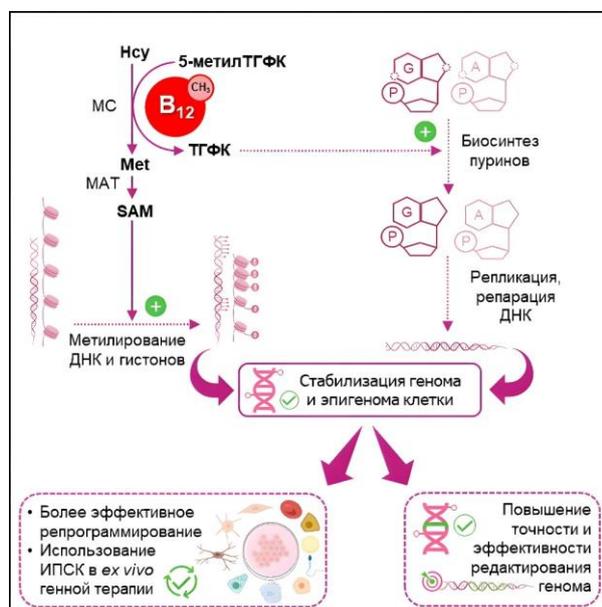
59 Витамин В<sub>12</sub> представляет собой необходимые клеткам человека производные  
60 кобаламина, выполняющие функции кофакторов двух ферментов: метионинсинтазы  
61 (МС), активной в цитоплазме, и 2-метилмалонил-S-CoA мутаза, активной в  
62 митохондриях. Для первого фермента В<sub>12</sub> является кофактором в форме  
63 метилкобаламина, для второго – аденозилкобаламина [1]. Метилкобаламин  
64 участвует в метаболизме фолата и S-аденозилметионина (SAM), которые  
65 необходимы для синтеза нуклеотидов, репликации, восстановления ДНК,  
66 метилирования ДНК и гистонов, а его дефицит в клетках приводит к нарушениям  
67 этих процессов, дестабилизации эпигенома [2, 3, 4], что также может приводить к  
68 переходу клеток в состояние сенесенса [5]. Цианокобаламин (CNCbl) используется  
69 для компенсации дефицита витамина В<sub>12</sub> у пациентов [6]. Фермент ММАСНС  
70 отщепляет его цианогруппу для дальнейшего превращения кобаламина в

71 коферментные формы [7].

72 Физиологическая концентрация витамина В<sub>12</sub> в плазме крови человека  
73 находится в суб-наномолярном диапазоне [8]. Для диагностики дефицита В<sub>12</sub> у  
74 пациентов его концентрация определяется в плазме крови, однако концентрация В<sub>12</sub>  
75 в крови может не отражать выраженный его дефицит в клетках [9]. Концентрация  
76 SAM в значительной степени коррелирует с концентрацией фолата [10, 11] – еще  
77 одного продукта МС. Фолат является активной формой витамина В<sub>9</sub>, которая  
78 восполняется комплексом МС и В<sub>12</sub> из 5-метилТГФК [12]. Дефицит фолата нарушает  
79 процессы синтеза пуринов и SAM, что приводит к нарушениям в процессах  
80 репликации и репарации ДНК, её гипометилированию. Эти процессы ассоциированы  
81 с нестабильностью генетического материала, изменениями экспрессионного  
82 профиля клеток, их онкогенной трансформации [13].

83 Генетические технологии, такие как редактирование генома, направлены на  
84 изменение последовательностей ДНК [14]. Хотя сам витамин В<sub>12</sub> не является  
85 объектом генетических технологий, его дефицит может влиять на стабильность и  
86 целостность генетического материала, что делает его важным фактором  
87 эффективности и безопасности генной терапии, генетических исследований и их  
88 приложений, например, при получении индуцированных стволовых клеток или  
89 репрограммировании клеток *in vivo*. На рис. 1 изображена схема, отражающая роль  
90 витамина В<sub>12</sub> в клеточных процессах и современных генетических технологиях. Роль  
91 витамина В<sub>12</sub> как лимитирующего фактора при репрограммировании факторами  
92 Яманаки была недавно показана на мышцах [15], при этом дополнительный В<sub>12</sub> не  
93 влиял на скорость образования индуцированных плюрипотентных стволовых клеток  
94 (ИПСК). Оптимизация концентрации В<sub>12</sub> в клетках во время репрограммирования в  
95 перспективе может значительно повысить его эффективность.  
96 Репрограммированные клетки могут как быть получены с помощью генной терапии  
97 *in vivo* для частичного возвращения физиологической молодости [16], так и  
98 использоваться для *ex vivo* генной терапии для трансплантации пациенту клеток с *in*  
99 *vitro* отредактированным геном при этиотропной терапии моногенных врожденных  
100 иммунодефицитов, патологий гемостаза, бета-талассемии [17]. Эффективность и  
101 точность редактирования генома с помощью CRISPR-Cas9 зависит от  
102 эпигенетических факторов: для промоторных областей эффективность  
103 редактирования снижается и соотношение вставок к делециям изменяется при  
104 метилировании этих областей [18], а активность Cas9 подавляется, если целевая  
105 последовательность связана с нуклеосомой *in vitro* [19] и в клетках дрожжей [20].

106 Более того, состояние хроматина влияет на эффективность не только Cas9 нуклеазы,  
 107 но и TALEN [21]. Таким образом, эпигенетическая стабильность клеток является  
 108 важным фактором, влияющим на эффективность и точность редактирования генома.



109

110 **Рис. 1.** Роль витамина В<sub>12</sub> в повышении стабильности генома и эпигенома клетки.  
 111 Поддержание его достаточного уровня в клетках повышает эффективность их  
 112 репрограммирования и получения из них ИПСК, может повысить точность и  
 113 эффективность редактирования генома, в том числе, для использования в *ex vivo*  
 114 генной терапии.

115 Для определения концентрации В<sub>12</sub> в клетках могут применяться генетически  
 116 кодируемые биосенсоры на основе периплазматических связывающих белков [22,  
 117 23]. Периплазматические белки термофильных микроорганизмов характеризуются  
 118 высокой устойчивостью к денатурации, сохраняют стабильность структуры при  
 119 заменах аминокислот и встраивании в них доменов, ортогональны по отношению к  
 120 млекопитающим, характеризуются схожими механизмами взаимодействия с  
 121 субстратом [24, 25, 26]. В геномах термофильных микроорганизмов мы обнаружили  
 122 гены не охарактеризованных ранее периплазматических белков, предположительно  
 123 обладающих В<sub>12</sub>-связывающими доменами. Мы клонировали и экспрессировали  
 124 гены этих белков. После выделения и очистки способность белка *Fervidobacterium*  
 125 *riparium* связывать CNCbl была подтверждена *in vitro*. В перспективе данные белки  
 126 могут быть использованы для создания флуоресцентных биосенсоров витамина В<sub>12</sub>.  
 127

128 **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

129

130 **Поиск генов В<sub>12</sub>-связывающих белков, их получение, подготовка к экспрессии.**

131 Поиск проводился по каталогу ВКМ с выбором организмов, для которых  
132 оптимальная температура роста составляет 65, 70, 75, 80, 85° С, собранных на  
133 территории РФ и с опубликованными геномами. В базах данных UniProt, InterPro  
134 [27], PROSITE [28], PANTHER [29] проверялось наличие белков с В<sub>12</sub>-  
135 связывающими доменами и укладкой периплазматических связывающих белков.  
136 Аминокислотные последовательности анализировались при помощи SOSUI для  
137 удаления трансмембранных участков и сигнального пептида [30], выравнивались с  
138 помощью ClustalΩ [31] и визуализировались с помощью JalView [32].

139 **Получение экспрессионных векторов.** Жидкие культуры термофильных  
140 микроорганизмов *Thermogladius calderae* штамм 1633 (номер в ВКМ В-2946) [33] и  
141 *Fervidobacterium riparium* штамм 1445t<sup>T</sup> (В-2549) [34] были получены из  
142 Всероссийской коллекции микроорганизмов. Геномная ДНК из клеток была  
143 извлечена с помощью набора Genomic DNA from any sample («Lumiprobe», США) по  
144 протоколу от производителя. Ампликоны для клонирования в экспрессионный  
145 вектор рЕТ30а были получены ПЦР с полимеразой Q5 с горячим стартом («NEB»,  
146 США) (нуклеотидные последовательности приведены в табл. S1 ESM\_1.pdf).  
147 Фрагмент из *T. calderae* (TC) был клонирован в 2 этапа с помощью  
148 олигонуклеотидов 1, 2 и 7, 8 по сайтам NdeI и XhoI. Фрагмент из *F. riparium* (FR) с  
149 помощью олигонуклеотидов 3, 4 и 5, 6 по сайтам BamHI и XhoI. Для рестрикции  
150 использовались ферменты («NEB», США и «SibEnzyme», РФ), лигирование  
151 выполнялось с помощью T4 ДНК лигазы («ThermoFisher Scientific», США).

152 Ген В<sub>12</sub>-связывающего [35, 36] белка btuF из геномной ДНК *E. coli* был клонирован  
153 в вектор рсDNA3.1LIC с помощью олигонуклеотидов 12, 13, HS Taq полимеразы  
154 («Биолабмикс», РФ), T4 полимеразы («SibEnzyme», РФ) и T4 ДНК лигазы. Затем он  
155 был амплифицирован с помощью полимеразы Tersus («Евроген», РФ) и  
156 олигонуклеотидов 16, 17, клонирован в рЕТ30а по сайтам NdeI и XhoI. С помощью  
157 данных плазмид, Phusion 2.0 полимеразы («Биолабмикс», РФ) и олигонуклеотидов  
158 64-69 были получены фрагменты гена *btuF*, содержащего вместо кодонов для Cys  
159 кодоны Ser. Они были клонированы в вектор рАТТ-Dest методом Golden Gate с  
160 использованием ферментов BsaI-HFv2 («NEB», США) и T4 ДНК лигазы.

161 Векторы экспрессии гена SenVitAL были собраны методом Golden Gate с  
162 помощью BsmBIv2 («NEB», США). Последовательности, кодирующие  
163 флуоресцентные белки CFP, YFP и В<sub>12</sub>-связывающий домен btuF *E. coli*, были

164 амплифицированы с помощью полимеразы Phusion 2.0. Для сборки бактериального  
165 экспрессионного вектора использовался вектор pTKEI-Dest и олигонуклеотиды 46-  
166 51, для вектора для экспрессии в НЕК 293TN – олигонуклеотиды 54-63 и вектор  
167 pcDNA3.1.

168 Кодированная последовательность В<sub>12</sub>-связывающего белка из *Thermotoga*  
169 *lettingae* (Tlet\_1275) была синтезирована из олигонуклеотидов 23-45 с помощью  
170 Phusion 2.0 полимеразы методом AESOE2 [37] с небольшими изменениями:  
171 продукты каждой ПЦР очищались с помощью Cleanup mini («Евроген», РФ),  
172 точечные мутации были исправлены с помощью ПЦР с перекрывающимися  
173 олигонуклеотидами 52, 53.

174 Корректность всех собранных конструкций подтверждалась секвенированием  
175 плазмид по Сэнгеру обеих цепей ДНК. Последовательности всех использованных в  
176 работе олигонуклеотидов размещены в табл. S2 ESM\_1.pdf.

177 **Выделение, очистка, концентрирование и обессоливание белков.** Экспрессия в  
178 *E. coli* штамм BL21 (DE3) проводилась аналогично ранее описанной процедуре [38] с  
179 небольшими изменениями, а именно: клетки после осаждения обрабатывались 0,5  
180 г/л лизоцимом («Helicon», РФ) в PBS (pH=8,0), после металл-хелатной  
181 хроматографии буфер для элюирования заменялся буфером для спектрофотометрии  
182 (50 мМ имидазол-HCl, 500 мМ NaCl, 0,5 мМ дитиотреитол; pH=7,8) с помощью  
183 обессоливания в колонках для ультрафильтрации до 3 кДа Amicon® Ultra-2  
184 («Millipore Corporation», США) или до 5 кДа JetSpin («Biofil», КНР) до достижения  
185 расчётной концентрации имидазола 50 мМ, также не отщеплялась полигистидиновая  
186 метка. Целевые белки очищались из лизатов методом металл-хелатной  
187 хроматографии с помощью хроматографической системы NGC («Bio Rad», США) на  
188 колонке с сорбентом Ni-NTA SA00405 («Smart-LifeSciences», КНР). Молекулярную  
189 массу белков во фракциях оценивали с помощью Ds-Na-ПААГ-электрофореза в 10%  
190 ПААГ в Tris-глициновом буфере в присутствии маркеров молекулярных масс Protein  
191 Blue Plus® II, либо IV («TransGen BioTech», КНР).

192 **Абсорбционная спектрофотометрия.** Все спектрофотометрические эксперименты  
193 выполнялись на спектрофотометре U-3900 под управлением UV Solutions («Hitachi»,  
194 Япония). Молярные концентрации обессоленных белков оценивались по  
195 поглощению на 280 нм (A<sub>280</sub>) с коэффициентами молярной экстинкции: FR – 42400  
196 л/(моль·см), Tlet\_1275 – 30370 л/(моль·см), предсказанными с помощью ProtParam  
197 [39]. В экспериментах с кобаламином спектры регистрировались в диапазоне длин

198 волн 340-580 нм со скоростью 2 нм/с. Сначала регистрировали спектр 15 мкМ CNCb1  
199 (Дальхимфарм, РФ), затем добавляли избыток белка до конечной концентрации 50  
200 мкМ и регистрировали спектр повторно. В качестве отрицательного контроля было  
201 использовано антитело канакинумаб [40], не способное связывать CNCb1. Для белка  
202 Tlet\_1275 было выполнено суммарно 10 измерений (2 биологические повторности),  
203 для белка FR – 6 измерений (2 биологические повторности), для канакинумаба – 3  
204 технические повторности. В эксперименте с канакинумабом концентрации были  
205 уменьшены в 3 раза. Стандартные отклонения рассчитывались с помощью Microsoft  
206 Office Excel. Визуализация выполнялась с использованием matplotlib.

207 **Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК).** Образец с  
208 концентрацией 1 г/л исследуемого белка, растворенного в буфере для  
209 спектрофотометрии в присутствии 100 мкМ В<sub>12</sub> или без него, загружался в ячейку  
210 микрокалориметра NanoDSC («TA Instruments», США). В качестве образца  
211 сравнения использовался буфер для спектрофотометрии со 100 мкМ витамином В<sub>12</sub>  
212 или без него, соответственно. Определение тепловых переходов проводилось в  
213 соответствии с программой: ячейка охлаждалась до 5°C, уравнивалась в  
214 течение 10 мин, затем образец и раствор сравнения нагревались в ней до 100°C со  
215 скоростью 1°C/мин. Чтобы исключить возможное наложение пиков тепловых  
216 переходов белка, витамина В<sub>12</sub> и компонентов буфера для спектрофотометрии, также  
217 были исследованы эти растворы в диапазоне от 5 до 130°C, что гарантировано  
218 перекрывает температурный диапазон, в котором определялись тепловые переходы  
219 исследуемого белка. Определялась пиковая температура термперехода (Т<sub>м</sub>) образца  
220 в присутствии CNCb1 и без него.

221 **Флуоресцентная микроскопия.** За день до трансфекции клетки НЕК 293ТN  
222 рассеивали в лунки 6-луночного планшета («Service Bio», КНР) в среде DMEM с 4,5  
223 г/л глюкозы («Панэко», РФ) и 10% фетальной бычьей сыворотки («Service Bio»,  
224 КНР). При конфлюентности 40-50% трансфицировали 2 мг плазмиды pcDNA3.1 при  
225 помощи 6 мкг PEI MAX («Polysciences», США). Через 2 дня производили измерения  
226 на конфокальном микроскопе LSM 980 («Carl Zeiss Microscopy GmbH», ФРГ). Для  
227 съёмки использовался объектив 10x/0.3 EC Plan-Neofluar и лазер 405 нм. Сигнал CFP  
228 (донора) регистрировался в диапазоне 409-505 нм, сигнал YFP (акцептора) в  
229 диапазоне 529-618 нм. Также регистрировался канал проходящего света (T-PMT).  
230 Измерения проводили в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> при 37°C.

231

232 **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

233

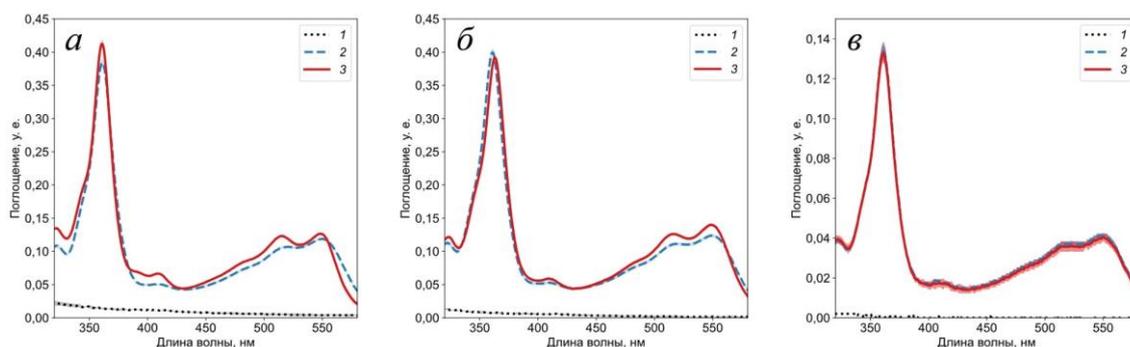
234 **Воспроизведение биосенсора SenVitAL.** При экспрессии SenViTAL в клетках НЕК  
235 293ТН большая часть флуоресцентных белков была сосредоточена в «точках», либо  
236 в круглых клетках (изображения размещены на рис. S1 ESM\_1.pdf), что указывает на  
237 неоптимальность этого биосенсора витамина В<sub>12</sub> и расходится с данными в  
238 оригинальной работе [22]. Известно, что GFP-подобные белки могут агрегировать в  
239 клетках, однако, мы проверили другие возможные причины. В результате выделения  
240 и очистки биосенсора SenVitAL после экспрессии в бактериальной системе  
241 обнаружено, что при 20°C и 37°C он экспрессируется с низким выходом, причем  
242 слабо растворим при 37°C (электрофореграммы размещены на рис. S2 ESM\_1.pdf).  
243 Флуоресцентные генетически кодируемые биосенсоры состоят из сенсорного и  
244 флуоресцентного доменов. Белок btuF *E. coli*, использованный в SenVitAL в качестве  
245 сенсорного домена, содержит два остатка Cys, которые образуют дисульфидную  
246 связь [36]. Растворимость и выход btuF *E. coli*, содержащего остатки Cys, и варианта  
247 с замененными на Ser остатками Cys настолько же низкие, насколько и для  
248 SenVitAL. Это указывает на то, что некорректная локализация SenVitAL хотя бы  
249 частично обусловлена сенсорным доменом, но не необходимостью дисульфидной  
250 связи. Поэтому мы провели поиск альтернативных В<sub>12</sub>-связывающих белков.

251 **Выбор белка для исследований.** При выборе белка для использования в качестве  
252 сенсорного домена высокая стабильность будет преимуществом, т. к. такой домен с  
253 большей вероятностью сохранит свою функцию после слияния с флуоресцентным  
254 доменом. Белки термофильных микроорганизмов отличаются высокой  
255 стабильностью из-за суровых условий обитания. Поэтому мы провели виртуальный  
256 поиск предполагаемых В<sub>12</sub>-связывающих белков термофильных организмов.  
257 Критериями для микроорганизма-источника были: организм обитает при  
258 температуре более 65° С на территории РФ, принадлежит к царству бактерий или  
259 архей для обеспечения ортогональности к клеткам эукариот, имеется во  
260 Всероссийской коллекции микроорганизмов, и его геном опубликован. Критериями  
261 для белка были: наличие предположительно укладок периплазматического  
262 связывающего и В<sub>12</sub>-связывающего белков, а также отсутствие цистеинов, чтобы  
263 исключить потенциальные окислительные пост-трансляционные модификации. В  
264 результате для экспериментальной проверки были выбраны 2 белка: AFK51173.1  
265 (сокращенно TC) из *T. calderae* штамм 1633 и UXF00406.1 (сокращенно FR) из *F.*  
266 *riparium* штамм 1445t<sup>T</sup> (названия белков соответствуют записям в GenBank [41],  
267 последовательности белков приведены в табл. S3 ESM\_1.pdf и рис. S3 ESM\_1.pdf в

268 виде множественного выравнивания). Анаэробная термофильная архея *T. calderae*  
269 обитает в наземном горячем источнике в кальдере вулкана Узон, Камчатка, с  
270 оптимальной температурой для роста 85° С [33]. *F. riparium* обитает в горячем  
271 источнике острова Кунашир, с оптимальной температурой для роста 65° С [34].  
272 Домены белков TC и FR относятся к В<sub>12</sub>-связывающим периплазматическим белкам  
273 по классификаторам доменов белков InterPro [27], PROSITE [28], PANTHER [29].  
274 **Сборка генетических конструкций. Экспрессия, выделение, очистка, анализ,**  
275 **обессоливание белков.** Аминокислотные последовательности предполагаемых В<sub>12</sub>-  
276 связывающих белков были проанализированы с помощью сервиса SOSUI [30] и  
277 отредактированы (измененные и исходные аминокислотные последовательности  
278 указаны в табл. S3 ESM\_1.pdf): исключались N-концевые сигнальные  
279 последовательности и концевые гидрофобные последовательности, характерные для  
280 мембранных белков. Полученные участки кодирующей последовательности были  
281 клонированы в экспрессионный вектор. Была проведена контролируемая экспрессия,  
282 клетки были лизированы ультразвуком, растворимые целевые белки очищены с  
283 помощью металл-хелатной хроматографии, фракции с целевыми белками  
284 определены с помощью Ds-Na-ПААГ-электрофореза, затем буфер при  
285 обессоливание был заменен на буфер для спектрофотометрии. После выделения  
286 белка с помощью металл-хелатной хроматографии, наличие целевых белков во  
287 фракциях было подтверждено с помощью Ds-Na-ПААГ (электрофореграммы  
288 размещены на рис. S2 ESM\_1.pdf). Белки btuF *E. coli*, TC оказались слабо  
289 растворимы по результатам Ds-Na-ПААГ-электрофореза растворимых и  
290 нерастворимых фракций после лизиса бактерий, поэтому этапы очистки,  
291 обессоливания и проверки связывания с CNCbl выполнялись только для  
292 растворимых белков Tlet\_1275 и FR.

293 **Абсорбционная спектрофотометрия.** CNCbl обладает характерным спектром  
294 поглощения со спектральными полосами вблизи 280, 360, 500 и 550 нм [42]. При  
295 связывании CNCbl белками спектр цианокобаламина меняется: изменяется  
296 амплитуда полос вблизи 360 нм, 550 нм, появляются дополнительные спектральные  
297 полосы (например, на 405 нм, 473 нм), не характерные ни для свободного CNCbl [43,  
298 44]. Для подтверждения связывания белков Tlet\_1275 и FR с CNCbl анализировались  
299 изменения в спектрах поглощения витамина без белков и в присутствии белков в  
300 области 340-580 нм. Мы использовали избыточное количество белка, чтобы весь  
301 CNCbl был связан для максимально выраженного эффекта. При инкубации CNCbl с  
302 белком Tlet\_1275 увеличивалась амплитуды полос вблизи 360 нм и 550 нм,

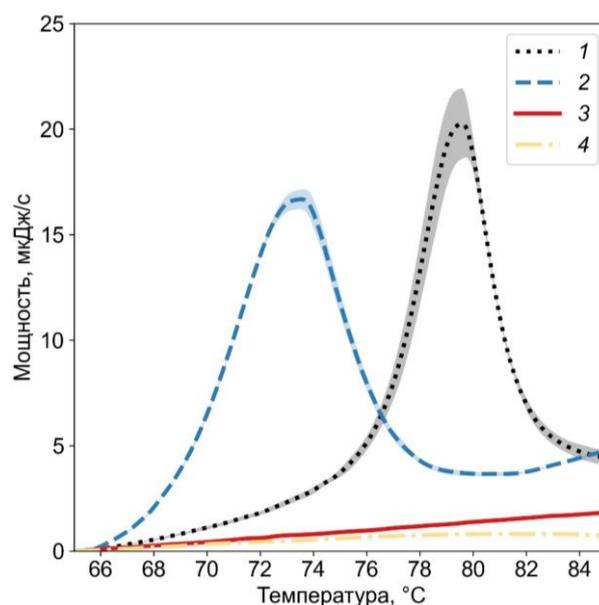
303 регистрировались новые спектральные полосы вблизи 405 нм, 515 нм. При  
304 инкубации CNCbI с белком FR амплитуда полосы вблизи 360 нм не увеличивалась,  
305 но максимум этой полосы сдвигался к 363 нм, также были выявлены новые  
306 спектральные полосы вблизи 405 нм и при 515 нм, увеличивалась амплитуда полосы  
307 вблизи 550 нм. Подобные изменения спектра  $V_{12}$  не наблюдались при инкубации  
308 CNCbI с канакинумабом. Спектры изображены на рис. 2, разностный спектр  
309 действия белков на CNCbI приведен на рис. S4 ESM\_1.pdf.



310

311 **Рис. 2.** Спектры поглощения растворами: а – белка Tlet\_1275 без CNCbI (1), только  
312 CNCbI (2), белка Tlet\_1275 и CNCbI (3); б – белка FR без CNCbI (1), только CNCbI  
313 (2), белка FR и CNCbI (3); в – не связывающего  $V_{12}$  антитела канакинумаб без CNCbI  
314 (1), только CNCbI (2), CNCbI и канакинумаба (3). Концентрации белков – 50 мкМ (а,  
315 б) и 16,7 мкМ (в); концентрации CNCbI – 15 мкМ (а, б) и 5 мкМ (в). Кривыми  
316 показаны средние значения поглощения, стандартные отклонения обозначены  
317 соответствующими областями.

318 **ДСК.** В результате проведенных исследований было показано, что на термограммах  
319 буфера для спектрофотометрии и витамина  $V_{12}$  отсутствуют тепловые переходы (на  
320 рис. 3) компонентов в диапазоне тепловых переходов белка, что позволило  
321 исследовать белок в их присутствии. Мы использовали избыточную концентрацию  
322 CNCbI для гарантированного насыщения сайта связывания в белке. Исследуемый  
323 белок имеет выраженный тепловой переход в диапазоне от 68 до 86 градусов, в  
324 зависимости от присутствия витамина  $V_{12}$  в буфере. Установлено, что единственный  
325 пик теплового перехода комплекса 1 г/л белка с 100 мкМ CNCbI регистрируется при  
326  $73,5 \pm 0,1^\circ\text{C}$  (2 технических повторности), тогда как пик теплового перехода белка без  
327 CNCbI – при  $79,7 \pm 0,2^\circ\text{C}$  (3 технических повторности). Примеры полученных  
328 термограмм представлены на рис. 3.



329

330 **Рис. 3.** Термограммы, полученные методом ДСК: 1 – белка FR (1 г/л) без CNCbI;  
 331 2 – белка FR (1 г/л) в присутствии 100 мкМ CNCbI; 3 – буфера без белка и без  
 332 CNCbI; 4 – буфера с 100 мкМ CNCbI. Кривыми обозначены средние значения,  
 333 стандартные отклонения от которых обозначены соответствующими областями.

### 334 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

335

336 Проведенное нами исследование позволило найти и охарактеризовать B<sub>12</sub>-  
 337 связывающий белок *F. riparium* с ранее неизвестной функцией. Связывание  
 338 рекомбинантного белка с витамином B<sub>12</sub> было подтверждено двумя независимыми  
 339 методами, экспериментально подтверждены его высокие термостабильность,  
 340 растворимость и уровень экспрессии в *E. coli* при 37°C. Белок Plet\_1275 ранее был  
 341 охарактеризован как связывающий витамин B<sub>12</sub>, в нашем исследовании это свойство  
 342 было также подтверждено. В настоящее время периплазматические связывающие  
 343 белки часто используются для создания флуоресцентных биосенсоров малых  
 344 молекул: аминокислот, глюкозы, лактата, азотистых оснований и неорганических  
 345 ионов [24, 45, 46], поэтому исследованные нами белки могут быть использованы в  
 346 качестве сенсорных доменов для генетически кодируемых биосенсоров витамина  
 347 B<sub>12</sub>.

348 Экспрессия гена биосенсора витамина B<sub>12</sub> SenViTAL в клетках *E. coli* оказалась  
 349 невысока. Белок btuF *E. coli*, на основе которого данный биосенсор был  
 350 сконструирован, после экспрессии при 37°C обнаруживался в осадке. Его низкая  
 351 растворимость не зависела от наличия остатков Cys, не влияющих на связывающую  
 352 функцию [47], но потенциально способных нарушать укладку. Это было показано

353 при экспрессии варианта *btuF*, где кодоны для *Cys* были заменены на кодоны для  
354 *Ser*. Для белка TC также была показана низкая растворимость, в его структуре  
355 остатки *Cys* отсутствуют. Для эффективной экспрессии в *E. coli* генов термофильных  
356 микроорганизмов может требоваться оптимизация кодонов, тщательный подбор  
357 условий культивирования и индукции, влияющих на фолдинг [48, 49].  $K_d$  комплекса  
358 *btuF E. coli* с витамином  $B_{12}$  составляет, по различным оценкам, от 11,5-15 нМ до 30-  
359 50 нМ [47, 50, 51]. В то же время,  $K_d$  биосенсоров на его основе на порядки выше и  
360 составляет 157 мкМ для SenVitAL и 93,36 мкМ для его улучшенной версии,  
361 опубликованной позже [23]. Поскольку указанные выше биосенсоры не позволяют  
362 различать суб-наномолярные концентрации витамина  $B_{12}$  в физиологическом  
363 диапазоне в клетках [52], создание новых биосенсоров  $B_{12}$  на основе  
364 периплазматических связывающих белков из *F. riparium* или *T. lettingae* на текущий  
365 момент перспективнее.

366 Результаты спектрофотометрии  $B_{12}$  с белком Tlet\_1275, полученные в работе  
367 [43] в похожих условиях (концентрация имидазола в составе буфера для  
368 спектрофотометрии была нами повышена в 50 раз для повышения буферной  
369 емкости, компенсирующей снижение pH раствором цианокобаламина), отличаются  
370 от полученных нами: по нашим данным, изменения спектра, вызванные добавлением  
371 данного белка, значительно менее интенсивные. Полученные нами спектры CNCbI с  
372 Tlet\_1275 лучше сходятся со спектром CNCbI при добавлении к нему белка TM0080,  
373 чем при добавлении к нему Tlet\_1275. В этой же работе описано увеличение пиковой  
374 температуры теплового перехода ( $T_m$ )  $B_{12}$ -связывающих белков как признак  
375 взаимодействия с витамином, определяемый с помощью дифференциальной  
376 сканирующей флуориметрии (ДСФ), что расходится с нашими результатами ДСК  
377 для белка FR, где, напротив, наблюдается снижение его  $T_m$  в присутствии избытка  
378 витамина  $B_{12}$ . Это может указывать на дестабилизацию структуры FR при  
379 связывании с ним витамина  $B_{12}$ , что облегчает термическую денатурацию, тогда как  
380 связывание  $B_{12}$  с белком Tlet\_1275, по данным авторов работы [43], наоборот,  
381 стабилизирует его структуру. В работе [44] описана стабилизация комплекса  $B_{12}$  с  
382 ферментом CblC *Trichoplax adhaerens*, обусловленная их связыванием и  
383 зарегистрированная с помощью ДСФ, причём разница в  $T_m$  достигала примерно  
384 13°C, тогда как в нашей – 6°C. В той же работе описаны изменения в спектре CNCbI  
385 при переходе в связанное состояние: уменьшение амплитуды пика при 361 нм с  
386 небольшим спектральным сдвигом вправо хорошо согласуется с результатами  
387 спектрофотометрии, выполненной с белком FR. В той же работе пики в спектре

388 связанного CNCb1 вблизи 515 нм и 550 нм также выражены сильнее, чем у  
389 свободного CNCb1, однако имеют меньшую амплитуду, что может  
390 свидетельствовать о слабом связывании витамина с данным ферментом.

391 Поскольку витамин B<sub>12</sub> в клетках млекопитающих замедляет апоптоз,  
392 способствует пролиферации [53], поддерживает соотношение SAM/SAH, влияющее  
393 на метилирование ДНК и модификации гистонов [54]; опосредует биосинтез  
394 нуклеотидов, обеспечивает стабильный одноуглеродный метаболизм, стабильность  
395 генома и эпигенома [55], важно поддержание в клетках его достаточного уровня для  
396 эффективной реализации экспериментов, связанных с индукцией плюрипотентности,  
397 редактированием генома, механизмами репликации и репарации ДНК. В связи с  
398 этим целесообразна разработка молекулярных инструментов для динамического  
399 неинвазивного отслеживания дефицита витамина B<sub>12</sub> в клеточных культурах.

400 **Вклад авторов.** С. Ю. Симоненко, Н.А. Кульдюшев, И. В. Артамонов, В.С.  
401 Лактюшкин – проведение экспериментов, написание первоначального текста; С. Ю.  
402 Симоненко, Н. А. Кульдюшев – обсуждение результатов исследования,  
403 редактирование текста; Н. А. Кульдюшев – концепция и руководство работой.

404 **Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского  
405 научного фонда (проект 23-75-01141 «Создание генетически кодируемого биосенсора  
406 витамина B<sub>12</sub> для повышения эффективности сенсенса-зависимых стратегий лечения  
407 онкологических заболеваний»).

408 **Благодарности.** Авторы выражают благодарность сотрудникам НЦ ТМ Научно-  
409 технологического университета «Сириус»: Василию Владимировичу Решетникову за  
410 предоставление химически компетентных клеток *E. coli* BL21 (DE3) и плазмиды  
411 pET30a; Загоскину Александру Александровичу за обучение Ds-Na-ПААГ-  
412 электрофорезу и аффинной хроматографии; Сергею Альбертовичу Чувпило за  
413 предоставление плазмид pсDNA3.1, pсDNA3.1LIC.

414 **Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

415 **Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания  
416 выполненных авторами исследований с участием людей или использованием  
417 животных в качестве объектов.

418

#### 419 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 420 1. Kräutler, B. (2012) Biochemistry of B<sub>12</sub>-Cofactors in Human Metabolism. in Water  
421 Soluble Vitamins (Stanger, O. ed.), Springer Netherlands, Dordrecht. pp 323-346
- 422 2. Froese, D. S., Fowler, B., and Baumgartner, M. R. (2019) Vitamin B<sub>12</sub>, folate, and

- 423 the methionine remethylation cycle—biochemistry, pathways, and regulation, *J of*  
424 *Inher Metab Disea*, 42, 673-685, doi: 10.1002/jimd.12009.
- 425 3. Halczuk, K., Kaźmierczak-Barańska, J., Karwowski, B. T., Karmańska, A., and  
426 Cieślak, M. (2023) Vitamin B<sub>12</sub>—Multifaceted *In Vivo* Functions and *In Vitro*  
427 Applications, *Nutrients*, 15, 2734, doi: 10.3390/nu15122734.
- 428 4. Guéant, J.-L., Caillerez-Fofou, M., Battaglia-Hsu, S., Alberto, J.-M., Freund, J.-N.,  
429 Dulluc, I., Adjalla, C., Maury, F., Merle, C., Nicolas, J.-P., Namour, F., and Daval,  
430 J.-L. (2013) Molecular and cellular effects of vitamin B<sub>12</sub> in brain, myocardium and  
431 liver through its role as co-factor of methionine synthase, *Biochimie*, 95, 1033-  
432 1040, doi: 10.1016/j.biochi.2013.01.020.
- 433 5. Li, F., Liu, P., Mi, W., Li, L., Anderson, N. M., Lesner, N. P., Burrows, M., Plesset,  
434 J., Majer, A., Wang, G., Li, J., Zhu, L., Keith, B., and Simon, M. C. (2024)  
435 Blocking methionine catabolism induces senescence and confers vulnerability to  
436 GSK3 inhibition in liver cancer, *Nat Cancer*, 5, 131-146, doi: 10.1038/s43018-023-  
437 00671-3.
- 438 6. Obeid, R., Fedosov, S. N., and Nexø, E. (2015) Cobalamin coenzyme forms are not  
439 likely to be superior to cyano- and hydroxyl-cobalamin in prevention or treatment  
440 of cobalamin deficiency, *Molecular Nutrition Food Res*, 59, 1364-1372, doi:  
441 10.1002/mnfr.201500019.
- 442 7. Hannibal, L., Kim, J., Brasch, N. E., Wang, S., Rosenblatt, D. S., Banerjee, R., and  
443 Jacobsen, D. W. (2009) Processing of alkylcobalamins in mammalian cells: A role  
444 for the *MMACHC (cb1C)* gene product, *Molecular Genetics and Metabolism*, 97,  
445 260-266, doi: 10.1016/j.ymgme.2009.04.005.
- 446 8. Harrington, D. J. (2017) Laboratory assessment of vitamin B<sub>12</sub> status, *J Clin Pathol*,  
447 70, 168-173, doi: 10.1136/jclinpath-2015-203502.
- 448 9. Zhang, Y., Hodgson, N. W., Trivedi, M. S., Abdolmaleky, H. M., Fournier, M.,  
449 Cuenod, M., Do, K. Q., and Deth, R. C. (2016) Decreased Brain Levels of Vitamin  
450 B<sub>12</sub> in Aging, Autism and Schizophrenia, *PLoS ONE*, 11, e0146797, doi:  
451 10.1371/journal.pone.0146797.
- 452 10. Hirsch, S., Ronco, A. M., Guerrero-Bosagna, C., De La Maza, M. P., Leiva, L.,  
453 Barrera, G., Llanos, M., Alliende, M. A., Silva, F., and Bunout, D. (2008)  
454 Methylation status in healthy subjects with normal and high serum folate  
455 concentration, *Nutrition*, 24, 1103-1109, doi: 10.1016/j.nut.2008.05.018.
- 456 11. Stabler, S. P., Allen, R. H., Dolce, E. T., and Johnson, M. A. (2006) Elevated serum  
457 S-adenosylhomocysteine in cobalamin-deficient elderly and response to treatment,

- 458 The American Journal of Clinical Nutrition, 84, 1422-1429, doi:  
459 10.1093/ajcn/84.6.1422
- 460 12. Banerjee, R. V., and Matthews, R. G. (1990) Cobalamin-dependent methionine  
461 synthase, *FASEB j.*, 4, 1450-1459, doi: 10.1096/fasebj.4.5.2407589.
- 462 13. Duthie, S. J., Narayanan, S., Brand, G. M., Pirie, L., and Grant, G. (2002) Impact of  
463 Folate Deficiency on DNA Stability, *The Journal of Nutrition*, 132, 2444S-2449S,  
464 doi: 10.1093/jn/132.8.2444S.
- 465 14. Maeder, M. L., and Gersbach, C. A. (2016) Genome-editing Technologies for Gene  
466 and Cell Therapy, *Molecular Therapy*, 24, 430-446, doi: 10.1038/mt.2016.10.
- 467 15. Kovatcheva, M., Melendez, E., Chondronasiou, D., Pietrocola, F., Bernad, R.,  
468 Caballe, A., Junza, A., Capellades, J., Holguín-Horcajo, A., Prats, N., Durand, S.,  
469 Rovira, M., Yanes, O., Stephan-Otto Attolini, C., Kroemer, G., and Serrano, M.  
470 (2023) Vitamin B<sub>12</sub> is a limiting factor for induced cellular plasticity and tissue  
471 repair, *Nat Metab*, 5, 1911-1930, doi: 10.1038/s42255-023-00916-6.
- 472 16. Macip, C. C., Hasan, R., Hoznek, V., Kim, J., Lu, Y. R., Metzger, L. E., Sethna, S.,  
473 and Davidsohn, N. (2024) Gene Therapy-Mediated Partial Reprogramming Extends  
474 Lifespan and Reverses Age-Related Changes in Aged Mice, *Cellular*  
475 *Reprogramming*, 26, 24-32, doi: 10.1089/cell.2023.0072.
- 476 17. Ferrari, G., Thrasher, A. J., and Aiuti, A. (2021) Gene therapy using  
477 haematopoietic stem and progenitor cells, *Nat Rev Genet*, 22, 216-234, doi:  
478 10.1038/s41576-020-00298-5.
- 479 18. Příbylová, A., Fischer, L., Pyott, D. E., Bassett, A., and Molnar, A. (2022) DNA  
480 methylation can alter CRISPR/Cas9 editing frequency and DNA repair outcome in  
481 a target-specific manner, *New Phytologist*, 235, 2285-2299, doi:  
482 10.1111/nph.18212.
- 483 19. Hinz, J. M., Laughery, M. F., and Wyrick, J. J. (2015) Nucleosomes Inhibit Cas9  
484 Endonuclease Activity *in Vitro*, *Biochemistry*, 54, 7063-7066, doi:  
485 10.1021/acs.biochem.5b01108.
- 486 20. Yarrington, R. M., Verma, S., Schwartz, S., Trautman, J. K., and Carroll, D. (2018)  
487 Nucleosomes inhibit target cleavage by CRISPR-Cas9 *in vivo*, *Proc. Natl. Acad.*  
488 *Sci. U.S.A.*, 115, 9351-9358, doi: 10.1073/pnas.1810062115.
- 489 21. Chen, X., Rinsma, M., Janssen, J. M., Liu, J., Maggio, I., and Gonçalves, M. A. F.  
490 V. (2016) Probing the impact of chromatin conformation on genome editing tools,  
491 *Nucleic Acids Research*, 44, 6482-6492, doi: 10.1093/nar/gkw524.
- 492 22. Ahmad, M., Mohsin, M., Iqar, S., Manzoor, O., Siddiqi, T. O., and Ahmad, A.

- 493 (2018) Live cell imaging of vitamin B<sub>12</sub> dynamics by genetically encoded  
494 fluorescent nanosensor, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 257, 866-874, doi:  
495 10.1016/j.snb.2017.11.030.
- 496 23. Soleja, N., Agrawal, N., Nazir, R., Ahmad, M., and Mohsin, M. (2020) Enhanced  
497 sensitivity and detection range of FRET-based vitamin B<sub>12</sub> nanosensor, *3 Biotech*,  
498 10, 87, doi: 10.1007/s13205-020-2073-1.
- 499 24. Donaldson, T., Iozzino, L., Deacon, L. J., Billones, H., Ausili, A., D'Auria, S., and  
500 Dattelbaum, J. D. (2017) Engineering a switch-based biosensor for arginine using a  
501 *Thermotoga maritima* periplasmic binding protein, *Analytical Biochemistry*, 525,  
502 60-66, doi: 10.1016/j.ab.2017.02.021.
- 503 25. Edwards, K. A. (2021) Periplasmic-binding protein-based biosensors and  
504 bioanalytical assay platforms: Advances, considerations, and strategies for optimal  
505 utility, *Talanta Open*, 3, 100038, doi: 10.1016/j.talo.2021.100038.
- 506 26. Scheepers, G. H., Lycklama A Nijeholt, J. A., and Poolman, B. (2016) An updated  
507 structural classification of substrate-binding proteins, *FEBS Letters*, 590, 4393-  
508 4401, doi: 10.1002/1873-3468.12445.
- 509 27. Blum, M., Andreeva, A., Florentino, Laise C., Chuguransky, Sara R., Grego, T.,  
510 Hobbs, E., Pinto, Beatriz L., Orr, A., Paysan-Lafosse, T., Ponamareva, I., Salazar,  
511 Gustavo A., Bordin, N., Bork, P., Bridge, A., Colwell, L., Gough, J., Haft, Daniel  
512 H., Letunic, I., Llinares-López, F., Marchler-Bauer, A., et al. (2025) InterPro: the  
513 protein sequence classification resource in 2025, *Nucleic Acids Research*, 53,  
514 D444-D456, doi: 10.1093/nar/gkae1082.
- 515 28. Sigrist, C. J. A., De Castro, E., Cerutti, L., Cuče, B. A., Hulo, N., Bridge, A.,  
516 Bougueleret, L., and Xenarios, I. (2012) New and continuing developments at  
517 PROSITE, *Nucleic Acids Research*, 41, D344-D347, doi: 10.1093/nar/gks1067.
- 518 29. Thomas, P. D., Ebert, D., Muruganujan, A., Mushayahama, T., Albou, L. P., and  
519 Mi, H. (2022) PANTHER: Making genome-scale phylogenetics accessible to all,  
520 *Protein Science*, 31, 8-22, doi: 10.1002/pro.4218.
- 521 30. Hirokawa, T., Boon-Chieng, S., and Mitaku, S. (1998) SOSUI: classification and  
522 secondary structure prediction system for membrane proteins, *Bioinformatics*, 14,  
523 378-379, doi: 10.1093/bioinformatics/14.4.378.
- 524 31. Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A.,  
525 McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.  
526 D., Gibson, T. J., and Higgins, D. G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0,  
527 *Bioinformatics*, 23, 2947-2948, doi: 10.1093/bioinformatics/btm404.

- 528 32. Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., and Barton, G. J.  
529 (2009) Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis  
530 workbench, *Bioinformatics*, 25, 1189-1191, doi: 10.1093/bioinformatics/btp033.
- 531 33. Kochetkova, T. V., Kublanov, I. V., Toshchakov, S. V., Osburn, M. R., Novikov,  
532 A. A., Bonch-Osmolovskaya, E. A., and Perevalova, A. A. (2016) *Thermogladius*  
533 *calderae* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, hyperthermophilic crenarchaeote from a  
534 Kamchatka hot spring, *International Journal of Systematic and Evolutionary*  
535 *Microbiology*, 66, 1407-1412, doi: 10.1099/ijsem.0.000916.
- 536 34. Podosokorskaya, O. A., Merkel, A. Y., Kolganova, T. V., Chernyh, N. A.,  
537 Miroshnichenko, M. L., Bonch-Osmolovskaya, E. A., and Kublanov, I. V. (2011)  
538 *Fervidobacterium riparium* sp. nov., a thermophilic anaerobic cellulolytic  
539 bacterium isolated from a hot spring, *International Journal of Systematic and*  
540 *Evolutionary Microbiology*, 61, 2697-2701, doi: 10.1099/ijms.0.026070-0.
- 541 35. Karpowich, N. K., Huang, H. H., Smith, P. C., and Hunt, J. F. (2003) Crystal  
542 Structures of the BtuF Periplasmic-binding Protein for Vitamin B<sub>12</sub> Suggest a  
543 Functionally Important Reduction in Protein Mobility upon Ligand Binding,  
544 *Journal of Biological Chemistry*, 278, 8429-8434, doi: 10.1074/jbc.M212239200.
- 545 36. Borths, E. L., Locher, K. P., Lee, A. T., and Rees, D. C. (2002) The structure of  
546 *Escherichia coli* BtuF and binding to its cognate ATP binding cassette transporter,  
547 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99, 16642-16647, doi: 10.1073/pnas.262659699.
- 548 37. Nishida, Y., Kayama, K., Endoh, T., Hanazono, K., Camer, G. A., and Endoh, D.  
549 (2023) PCR-Based Gene Synthesis with Overlapping Unisense-Oligomers  
550 Asymmetric Extension Supported by a Simulator for Oligonucleotide Extension  
551 Achieved 1 kbp dsDNA, *BioTechniques*, 74, 317-332, doi: 10.2144/btn-2022-0127.
- 552 38. Черных, М. А., Кульдюшев, Н. А., Пеньёр, С., Беркут, А. А., Титгат, Я.,  
553 Ефремов, Р. Г., Василевский, А. А., and Чугунов, А. О. (2021) Производное  
554 нейротоксина скорпиона ВеМ9, селективное в отношении потенциал-  
555 чувствительных натриевых каналов насекомых, *Биоорган. химия*, 47, 495-505,  
556 doi: 10.31857/S0132342321040060.
- 557 39. Wilkins, M. R., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J.-C., Williams, K. L., Appel,  
558 R. D., and Hochstrasser, D. F. (1998) Protein Identification and Analysis Tools in  
559 the ExPASy Server. in *2-D Proteome Analysis Protocols*, Humana Press, New  
560 Jersey. pp 531-552
- 561 40. Dhimolea, E. (2010) *Canakinumab*, *mAbs*, 2, 3-13, doi: 10.4161/mabs.2.1.10328.
- 562 41. Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., and Sayers, E. W. (2016)

- 563 GenBank, Nucleic Acids Research, 44, D67-D72, doi: 10.1093/nar/gkv1276.
- 564 42. Chen, P., Wolf, W. R., Castanheira, I., and Sanches-Silva, A. (2010) A LC/UV/Vis  
565 method for determination of cyanocobalamin (VB<sub>12</sub>) in multivitamin dietary  
566 supplements with on-line sample clean-up, Anal. Methods, 2, 1171, doi:  
567 10.1039/c0ay00177e.
- 568 43. Butzin, N. C., Secinaro, M. A., Swithers, K. S., Gogarten, J. P., and Noll, K. M.  
569 (2013) *Thermotoga lettingae* Can Salvage Cobinamide To Synthesize Vitamin B<sub>12</sub>,  
570 Appl Environ Microbiol, 79, 7006-7012, doi: 10.1128/AEM.01800-13.
- 571 44. Krams, C., Esser, A. J., Klenzendorf, M., Klotz, K., Spiekerkoetter, U., Jacobsen,  
572 D. W., Smith, C. A., Maggiolo, A. O., and Hannibal, L. (2024) The cobalamin  
573 processing enzyme of *Trichoplax adhaerens*, Journal of Biological Chemistry,  
574 108089, doi: 10.1016/j.jbc.2024.108089.
- 575 45. Chino, S., Sakaguchi, A., Yamoto, R., Ferri, S., and Sode, K. (2007) Branched-  
576 chain Amino Acid Biosensing Using Fluorescent Modified Engineered  
577 Leucine/Isoleucine/Valine Binding Protein, IJMS, 8, 513-525, doi:  
578 10.3390/i8060513.
- 579 46. Nasu, Y., Murphy-Royal, C., Wen, Y., Haidey, J. N., Molina, R. S., Aggarwal, A.,  
580 Zhang, S., Kamijo, Y., Paquet, M.-E., Podgorski, K., Drobizhev, M., Bains, J. S.,  
581 Lemieux, M. J., Gordon, G. R., and Campbell, R. E. (2021) A genetically encoded  
582 fluorescent biosensor for extracellular L-lactate, Nat Commun, 12, 7058, doi:  
583 10.1038/s41467-021-27332-2.
- 584 47. Nijland, M., Lefebvre, S. N., Thangaratnarajah, C., and Slotboom, D. J. (2024)  
585 Bidirectional ATP-driven transport of cobalamin by the mycobacterial ABC  
586 transporter BacA, Nat Commun, 15, 2626, doi: 10.1038/s41467-024-46917-1.
- 587 48. Kruglikov, A., Wei, Y., and Xia, X. (2022) Proteins from Thermophilic *Thermus*  
588 *thermophilus* Often Do Not Fold Correctly in a Mesophilic Expression System  
589 Such as *Escherichia coli*, ACS Omega, 7, 37797-37806, doi:  
590 10.1021/acsomega.2c04786.
- 591 49. Wang, Y., and Zhang, Y. H. P. (2009) Overexpression and simple purification of  
592 the *Thermotoga maritima* 6-phosphogluconate dehydrogenase in *Escherichia coli*  
593 and its application for NADPH regeneration, Microb Cell Fact, 8, 30, doi:  
594 10.1186/1475-2859-8-30.
- 595 50. Cadieux, N., Bradbeer, C., Reeger-Schneider, E., Köster, W., Mohanty, A. K.,  
596 Wiener, M. C., and Kadner, R. J. (2002) Identification of the Periplasmic  
597 Cobalamin-Binding Protein BtuF of *Escherichia coli*, J Bacteriol, 184, 706-717,

- 598 doi: 10.1128/JB.184.3.706-717.2002.
- 599 51. Mireku, S. A., Ruetz, M., Zhou, T., Korkhov, V. M., Kräutler, B., and Locher, K.  
600 P. (2017) Conformational Change of a Tryptophan Residue in BtuF Facilitates  
601 Binding and Transport of Cobinamide by the Vitamin B<sub>12</sub> Transporter BtuCD-F,  
602 Sci Rep, 7, 41575, doi: 10.1038/srep41575.
- 603 52. Boachie, J., Adaikalakoteswari, A., Goljan, I., Samavat, J., Cagampang, F. R., and  
604 Saravanan, P. (2021) Intracellular and Tissue Levels of Vitamin B<sub>12</sub> in Hepatocytes  
605 Are Modulated by CD320 Receptor and TCN2 Transporter, IJMS, 22, 3089, doi:  
606 10.3390/ijms22063089.
- 607 53. Battaglia-Hsu, S.-f., Akchiche, N., Noel, N., Alberto, J.-M., Jeannesson, E.,  
608 Orozco-Barrios, C. E., Martinez-Fong, D., Daval, J.-L., and Guéant, J.-L. (2009)  
609 Vitamin B<sub>12</sub> deficiency reduces proliferation and promotes differentiation of  
610 neuroblastoma cells and up-regulates PP2A, proNGF, and TACE, Proc. Natl. Acad.  
611 Sci. U.S.A., 106, 21930-21935, doi: 10.1073/pnas.0811794106.
- 612 54. Guéant, J.-L., Guéant-Rodriguez, R.-M., Kosgei, V. J., and Coelho, D. (2022)  
613 Causes and consequences of impaired methionine synthase activity in acquired and  
614 inherited disorders of vitamin B<sub>12</sub> metabolism, Critical Reviews in Biochemistry  
615 and Molecular Biology, 57, 133-155, doi: 10.1080/10409238.2021.1979459.
- 616 55. Smith, D. (2023) Folate and Folic Acid Metabolism: A Significant Nutrient-Gen-  
617 Environment Interaction, MRAJ, 11, doi: 10.18103/mra.v11i5.3824.

618

619 **CYANOCOBALAMIN-BINDING PROTEIN OF A THERMOPHILIC**  
620 **MICROORGANISM FOR THE DEVELOPMENT OF GENETICALLY ENCODED**  
621 **VITAMIN B<sub>12</sub> BIOSENSORS**

622 **S.Y. Simonenko\***, **I.V. Artamonov**, **V.S. Laktyushkin**, **N.A. Kuldyushev**

623 *Research Center for Translational Medicine, Sirius University of Science and Technology,*  
624 *354340 Sochi, Russia; E-mail: Simonenko.SY@talantiuspeh.ru.*

625 Using genetic technologies such as genome editing and cell reprogramming, it is possible  
626 to change DNA sequences. Intracellular vitamin B<sub>12</sub> is involved in the metabolism of folate  
627 and SAM, which are necessary for the replication, nucleotide synthesis, repair, and  
628 methylation of DNA and histones. Therefore, its deficiency can reduce the effectiveness  
629 and safety of genetic technologies. In the genomes of thermophilic microorganisms  
630 collected in the Russian Federation, we found and cloned the gene for the periplasmic B<sub>12</sub>-  
631 binding protein of the thermophilic bacterium *Fervidobacterium riparium*. The  
632 recombinant protein is highly thermostable and binds to vitamin B<sub>12</sub>, as indicated by the

633 results of absorption spectrophotometry and differential scanning calorimetry. Currently,  
634 there are no sufficiently sensitive non-invasive methods for the dynamic measurement of  
635 intracellular B<sub>12</sub> concentrations. However, the protein we characterized could serve as a  
636 sensor domain for a genetically encoded fluorescent B<sub>12</sub> biosensor, potentially replacing  
637 suboptimal similar biosensors and providing a new molecular tool that can be used, in  
638 particular, to optimize the application of genetic technologies.

639 *Keywords:* vitamin B<sub>12</sub>, cyanocobalamin, thermophilic microorganisms, genetic  
640 technologies, recombinant proteins, periplasmic binding proteins.