Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Сибирский федеральный университет»

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр
Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН) –
обособленное подразделение Институт биофизики
Сибирского отделения Российской академии наук

На правах рукописи

Ларионова Марина Дмитриевна

НОВЫЕ ИЗОФОРМЫ ЛЮЦИФЕРАЗЫ ИЗ КОПЕПОДЫ *METRIDIA LONGA*: СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

03.01.02 – биофизика

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Евгений Степанович Высоцкий

Красноярск – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время стремительно развиваются технологии неинвазивной визуализации молекулярных процессов *in vivo*. Технологии биоимиджинга стали прорывом в области прижизненных исследований динамических процессов в клетках, тканях и целых организмах. Проведение современных прикладных и фундаментальных исследований в области медицины, фармакологии и биотехнологии требует дальнейшего развития методов для прижизненной визуализации.

Наряду с технологиями, основанными на применении флуоресцентных белков и красителей, в биоимиджинге все активнее используют репортерные системы на основе биолюминесцентных белков. Популярность таких систем в первую очередь определяется высокой чувствительностью обнаружения биолюминесцентного репортера и отсутствием токсичности для клеток и организмов [Badr, 2014]. Для совершенствования существующих технологий биолюминесцентного имиджинга, а также разработки новых методик необходим широкий спектр светоизлучающих белков с различными биохимическими свойствами. На сегодняшний день все имеющиеся биолюминесцентные белки имеют те или иные недостатки и ограничения для применения в качестве репортерных – потребность в различных кофакторах, низкий квантовый выход биолюминесцентной реакции и т.д. Поэтому дальнейшее развитие технологий биолюминесцентного биоимиджинга идет по пути поиска новых биолюминесцентных природных белков и улучшения свойств уже используемых репортеров методами белковой инженерии.

Сегодня среди известных биолюминесцентных белков в качестве репортерных наиболее часто используют люциферазы светляков, бактерий, кораллов и ракообразных, а также фотопротеины. Все эти белки различаются аминокислотными последовательностями, структурами, субстратами и кофакторами, квантовым выходом реакции и т.д. Поэтому при выборе репортера для биолюминесцентного биоимиджинга, прежде всего, учитывают

особенности объекта исследования, в котором предполагается использовать репортерную систему, а также свойства самого репортера (спектр излучения, молекулярная масса, потребность в кофакторах, стабильность и т.д.).

Биолюминесценция морских планктонных рачков копепод обусловлена секретируемой люциферазой, использующей, аналогично многим другим биолюминесцентным белкам, целентеразин в качестве субстрата [Markova, Vysotski, 2015]. На сегодняшний день идентифицированы гены люцифераз из копепод *Gaussia princeps*, *Metridia pacifica*, *Metridia longa* и др. Все эти люциферазы имеют небольшую молекулярную массу (до 22 кДа), проявляют высокую степень идентичности аминокислотных последовательностей и требуют для биолюминесцентной реакции присутствия только субстрата и кислорода, т.е. относятся к семейству кофактор-независимых монооксигеназ [Markova, Vysotski, 2015; Takenaka et al., 2017]. С момента клонирования в начале 2000-х годов генов, кодирующих секретируемые люциферазы копепод из *G. princeps* и *M. longa*, эти белки сразу же были опробованы в качестве репортерных в различных экспериментах *in vivo* и *in vitro*, показав свою перспективность [Verhaegen, Christopoulos, 2002; Markova et al., 2004]. Секретируемые биолюминесцентные репортерные белки чрезвычайно удобны для биоимиджинга, так как их можно выявлять без разрушения исследуемых клеток или тканей. Биолюминесцентный сигнал при использовании таких репортеров возможно регистрировать в культуральной среде, межклеточных жидкостях, крови, лимфе и других жидких средах [Tannous et al., 2009; Homaei et al., 2017]. Хотя сегодня секретируемые люциферазы копепод (в основном из *G. princeps* и *M. longa*) активно используются в биоимиджинге, биолюминесцентные и биохимические свойства этих белков изучены неполно. В первую очередь это обусловлено трудностями получения достаточных количеств высокоочищенных активных люцифераз с помощью бактериальных систем экспрессии: в нативной конформации белки содержат несколько внутримолекулярных дисульфидных связей, необходимых для функционирования фермента.

Целью работы являлось изучение физико-химических свойств новых изоформ из *Metridia longa* и исследование их применимости в качестве репортерных молекул в *in vivo* и *in vitro* анализах.

Достижение поставленной цели требовало решения следующих задач:

1. Оптимизировать условия экспрессии секретируемых люцифераз копепод *M. longa* и *G. princeps* в клетках насекомых и разработать технологию получения высокоочищенных белков из культуральной среды;

2. Исследовать биолюминесцентные и биохимические свойства препаратов функционально активных копеподных люцифераз, имеющих нативную конформацию;

3. Идентифицировать аминокислотные остатки, входящие в состав субстрат-связывающей полости люцифераз *M. longa*;

4. Оценить применимость люциферазы *M. longa* в качестве секретируемого репортера *in vivo* при транзиентной экспрессии в клетках млекопитающих;

5. Сконструировать гибридный белок из люциферазы *M. longa* и миниантитела к вирусу клещевого энцефалита, исследовать свойства бифункционального белка и проверить его пригодность для применения в биолюминесцентном иммунном анализе.

Научная новизна

Несмотря на то, что люциферазы копепод в настоящее время широко применяются как репортерные белки в биологических исследованиях, в том числе в биоимиджинге [Markova, Vysotski, 2015], остаются недостаточно изученными их свойства. В настоящей работе впервые получены препараты копеподных люцифераз в природной форме, и описаны физико-химические, биохимические, биолюминесцентные свойства новых изоформ люциферазы Metridia. Одна из новых изоформ люциферазы Metridia была применена в качестве биолюминесцентного *in vivo* репортера в клетках млекопитающих, а

также в составе гибридного бифункционального белка использована в аналитической системе *in vitro* детекции.

Практическая значимость

Определение биохимических и биолюминесцентных свойств люцифераз копепод, обладающих нативной структурой, открывает возможности целенаправленного выбора репортера при разработке технологий биоимиджинга *in vivo* для клеточной биологии и экспериментальной медицины, а также методов анализа *in vitro* для медицинской диагностики.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Технология получения рекомбинантных высокоочищенных люцифераз копепод из культуральной среды клеток насекомых позволяет получать корректно свернутые белки с выходом до 7 мг/л. Полученные люциферазы обладают высокой удельной биолюминесцентной активностью и экстремально высокой термостабильностью;

2. Оптимум температуры биолюминесцентной реакции, катализируемой изоформой MLuc2 люциферазы *M. longa*, находится при экстремально низкой температуре (~5ºC), что позволяет отнести эту изоформу к психрофильным ферментам. Низкий температурный оптимум изоформы обусловлен более высокой пространственной гибкостью белка, возникающей вследствие отсутствия одной внутримолекулярной дисульфидной связи;

3. Аминокислотные остатки Tyr72 и Tyr80 входят в состав активного центра изоформы MLuc7 люциферазы *M. longa* и участвуют в координации субстрата реакции, целентеразина;

4. Применение изоформы MLuc7 люциферазы *M. longa* в качестве биолюминесцентной репортерной молекулы обеспечивает высокую чувствительность *in vitro* и *in vivo* анализов.

Личный вклад автора заключается в непосредственном участии во всех этапах исследования: от постановки цели и задач, выбора методов исследований до проведения экспериментов с последующим обобщением и интерпретацией результатов, подготовкой и оформлением публикаций.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту специальности 03.02.01 – биофизика. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пункту 3 паспорта специальности биофизика.

Степень достоверности результатов

Достоверность результатов подтверждена достаточным объемом данных, их внутренней согласованностью и воспроизводимостью, а также использованием при проведении научной работы современных методов исследования и статистического анализа.

Апробация работы

Материалы диссертации представлены в виде научных докладов и постерных сообщений на Международном семинаре AIST (Цукуба, Япония, 2014), Международных симпозиумах «Белки и пептиды» (Новосибирск, Россия, 2015; Москва, Россия, 2017), VII и VIII съездах Российского фотобиологического общества (Шепси, Россия, 2014, 2017), школе-конференции «North-Biotech Young» (Архангельск, Россия, 2017), Международных научных конференциях «Ломоносов-2016» и «Ломоносов-2018» (Москва, Россия, 2016, 2018), а также на конференциях молодых ученых, ежегодно проводимых ФИЦ «КНЦ СО РАН» и Сибирским Федеральным Университетом.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 10 печатных работ, из них: 4 статьи в зарубежных рецензируемых журналах и 6 публикаций в сборниках докладов научных конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 129 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (методы исследования, результаты исследований и их обсуждение), заключения, выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы. Работа иллюстрирована 5 таблицами и 33 рисунками. Список литературы включает 174 источника, из них 173 иностранных. Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РНФ №14-14-01119, РФФИ, Правительства Красноярского края и Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности №16-44-242099, а также гранта Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере №0019849.

ГЛАВА 1. Целентеразин-зависимые люциферазы и их применение в качестве биолюминесцентных репортеров

1.1 Природа биологического свечения

Биолюминесценция – удивительное природное явление, представленное различными организмами – бактериями, грибами, морскими и сухопутными беспозвоночными, а также некоторыми видами рыб. Наибольшее разнообразие светящихся видов наблюдается среди морских организмов. По оценкам, до 90% глубоководных обитателей способны излучать свет, имея для этого отдельные органы или находясь в симбиозе с фотобактериями [Haddock et al., 2010]. Считается, что функциональная роль биолюминесценции заключается в обеспечении коммуникации между организмами, привлечении добычи, отпугивании хищников, маскировки. Тем не менее, роль свечения для функционирования многих организмов до сих пор до конца не ясна [Shimomura, 2006; Widder et al., 2010].

В основе явления биолюминесценции лежат химические реакции живого организма, сопровождающиеся выделением энергии в виде квантов света. Многолетнее изучение этих процессов, наблюдаемых в огромном количестве разнообразных, эволюционно отдаленных организмов, позволило выяснить некоторые молекулярные механизмы биолюминесцентных реакций. Природа свечения организмов основана на взаимодействии белкового компонента, обладающего ферментативной функцией, и молекулы субстрата. При окислении молекула субстрата переходит в кратковременное возбужденное состояние, а процесс релаксации сопровождается испусканием света.

В настоящее время насчитываются тысячи светящихся видов организмов, являющихся представителями более чем 700 родов [Markova, Vysotski, 2015]. К данному моменту изолировано и изучено более 30 биолюминесцентных систем, различающихся компонентами и механизмами протекания реакции. Несмотря на сходство общего принципа свечения, биолюминесцентные системы из

различных организмов представлены абсолютно независимыми ферментами и субстратами. Так, известные первичные последовательности белков, осуществляющих биолюминесцентные реакции среди представителей разных таксономических групп, не являются гомологичными. Однако в связи с тем, что такие белки схожи функционально, их принято обобщенно называть люциферазами, а соединения, выступающие в роли субстратов – люциферинами [Shimomura, 2006].

На сегодняшний день идентифицировано 9 соединений люциферинов (Рис. 1), строго специфичных отдельным группам люцифераз и требующих наличия различных кофакторов (АТФ, O_2, Ca^{2+}, Mg^{2+} и др.) для их окисления в ходе протекания биолюминесцентных реакций.

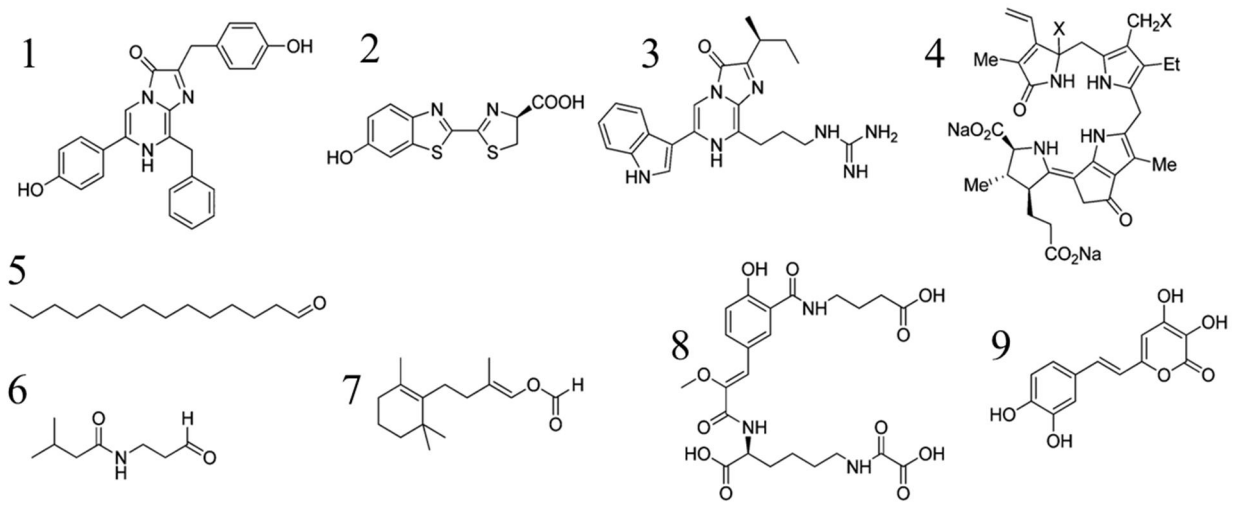


Рисунок 1 – Химические структуры идентифицированных люциферинов (Me – метильная группа): 1 – целентеразин, 2 – светлячковый D-люциферин, 3 – люциферин Cypridina, 4 – люциферин динофлагелят (X=H) и криля (X=OH), 5 – бактериальный люциферин, 6 – люциферин Diplocardia, 7 – люциферин Latia, 8 – субстрат биолюминесцентной системы червей *Fridericia heliota*, 9 – люциферин грибов [Kaskova et al., 2016]

Многие из данных люциферинов, а также их структурные модификации, сегодня являются коммерческими продуктами, широко используемыми как для

фундаментального изучения биолюминесцентных систем, так и для их применения в технологиях биолюминесцентного имиджинга.

1.2 Разнообразие целентеразин-зависимых биолюминесцентных систем

Довольно большая группа светящихся морских организмов с идентифицированным на сегодня типом биолюминесцентной системы использует в качестве субстрата производные имидазолпиразинона, называемые целентеразином (англ. «coelenterazine» от *Coelenterata* – кишечнополостные) и Cypridina-люциферином (от названия рода ракушковых раков Cypridina). При этом, несмотря на схожее химическое строение используемого биолюминесцентного субстрата, данные организмы часто значительно отдалены друг от друга таксономически.

К организмам, использующим целентеразин-зависимую биолюминесцентную систему, относится система мягкого коралла Renilla [Matthews et al., 1977; Lorenz et al., 1991; Titushin et al., 2007], среди ракообразных – копеподы надсемейства Augaptiloidea [Takenaka et al., 2017], глубоководная креветка Oplophorus [Shimomura et al., 1978; Inouye et al., 2000], ракушковые раки остракоды *Conchoecia pseudodiscophora* [Oba et al., 2004]. Среди представителей моллюсков – кальмар Watasenia, использующий целентеразин-дисульфат [Tsuji, 2002], а также кальмар Symplectoteuthis и двустворчатый моллюск *Pholas dactylus*, у которых субстратом является дегидроцелентеразин [Tanaka et al., 2009; Chou et al., 2014]. Известно, что ракушковые раки остракоды *Vargula hilgendorfi* используют Cypridina-люциферин (варгулин) (см. Рис. 1), он же – субстрат для биолюминесцентных систем костных рыб Porichthys, Apogon и Parapriacanthus [Cormier, 1978].

Группу целентеразин-зависимых биолюминесцентных белков по особенностям биолюминесцентной реакции можно разделить на два основных типа – люциферазы и фотопротеины. В ходе люциферазного типа реакции происходит классическое ферментативное окисление субстрата, приводящее к

образованию возбужденного оксилюциферина, который переходит в основное состояние с испусканием света. Во втором случае фермент способен образовывать с субстратом и кислородом устойчивый фотопротеиновый фермент-субстратный комплекс, существующий длительное время, внутримолеулярная реакция в котором запускается внешним фактором.

Первой обнаруженной целентеразин-зависимой люциферазой стала секретируемая люцифераза из декаподного рака *Oplophorus gracilirostris*, открытая Шимомурой в 1978 г. Изначально считалось, что масса люциферазы Oplophorus составляет около 109 кДа, однако в более поздних экспериментах, проведенных группой Инойи [Inouye, Sasaki, 2007] было выяснено, что люцифераза представляет собой гетеротетрамер из 2 типов белков – по 19 и 36 кДа. Показано, что каталитической функцией обладала 19-кДа субъединица, которая осуществляла окисление целентеразина, однако с существенно меньшей эффективностью, чем природная люцифераза. В дальнейшем на базе каталитического домена естественно секретируемой люциферазы Oplophorus путем мутагенеза была создана модернизированная форма, несущая ряд мутаций, придающих стабильность белку и повышенную более чем в 10^6 раз активность. Новая люцифераза, названная NanoLuc, более эффективно использует усовершенствованный субстрат на основе целентеразина – фуримазин [Hall et al., 2012], который также характеризуется повышенным квантовым выходом биолюминесценции, что делает эту систему привлекательной для использования в имиджинговых технологиях (например, [Kelkar, De, 2012; Loh, Proft, 2014; Picaud et al., 2015; Omachi et al., 2018]).

Широко используемая среди современных репортерных систем люцифераза из мягкого коралла Renilla представляет собой мономерный внутриклеточный белок массой 36 кДа. Кроме него в системе также задействован целентеразин-переносящий белок (CBP), активируемый кальцием и исполняющий лишь роль депо люциферина и его транспортировщика, а также GFP (зеленый флуоресцентный белок). При образовании короткоживущего комплекса из трех белков CBP, несущий в субстратной полости целентеразин,

при взаимодействии с кальциевыми ионами делает молекулу субстрата доступной для люциферазы, которая сразу же катализирует окисление целентеразина с испусканием голубого света, который впоследствии возбуждает GFP, являющийся в данной системе вторичным эмиттером [Titushin et al., 2007]. На базе Renilla-люциферазы в настоящее время сконструированы внутриклеточные репортерные системы, так же, как и в природе основанные на BRET переизлучении (биолюминесцентном резонансном переносе энергии) с использованием флуоресцентных белков, возбуждаемых голубым светом ~480 нм [Deriziotis et al., 2014; Kwon et al., 2014; Harikumar et al., 2017].

Фотопротеиновый тип биолюминесценции довольно подробно описан в результате исследований природных и клонированных белков, изолированных из медуз класса Hydrozoa, гребневиков и некоторых моллюсков. Субстратом в таких системах служит производное целентеразина – 2-гидропероксицелентеразин (или преактивированный дегидроцелентеразин), образующий с апобелком стабильный, но нековалентно связанный фермент-субстратный комплекс [Shimomura, 2006]. Как и в случае с CBP из системы Renilla, при взаимодействии молекулы белка, содержащего внутри полости люциферин, с ионами кальция возникает конформационное изменение, приводящее к окислению целентеразина до целентерамида, которое сопряжено с испусканием квантов света. В данном случае свечение от одного комплекса возникает лишь один раз, так как хромофорная группа покидает субстратную полость, а последующее формирование комплекса («зарядка») требует времени. Такая особенность фотопротеинов, основанная на строгой пропорциональности излучаемого света и количества прореагировавших молекул, в сочетании с высокой биолюминесцентной активностью, привлекла внимание исследователей. На основе данных ферментов создана масса тест-систем, пригодных для *in vitro* медицинской диагностики, экологического мониторинга [Tarasova et al., 2012; Krasitskaya et al., 2017; Sharifian et al., 2018], а также *in vivo*-приложений, направленных на сверхчувствительную детекцию кальция в клетках и тканях [Malikova et al., 2014; Gazda et al., 2017; Alonso et al., 2017].

Биолюминесцентные системы, использующие Ca^{2+}-регулируемые фотопротеины, обнаружены более чем у 25 представителей кишечнополостных [Eremeeva, Vysotski, 2017]. Фотопротеины были найдены в ряде медуз – Aequorea [Shimomura et al., 1962], Obelia [Illarionov et al., 1995; Markova et al., 2002], Mitrocoma [Burakova et al., 2016], среди гребневиков Mnemiopsis [Schnitzler et al., 2012], Beroe [Markova et al., 2012] и др.

Часто Ca^{2+}-зависимая биолюминесценция является частью более сложной системы свечения. Например, у медуз *Aequorea victoria* [Shimomura et al. 1962] и *Clytia gregaria* [Markova et al., 2010] на первом этапе фотопротеин акворин или клитин, соответственно, активируется кальцием, поступающим в клетку-фотоцит во время нервного возбуждения. Энергия в виде излучения, наблюдаемого в голубой области спектра, переносится на GFP, также локализованном в фотоцитах медуз, в результате такого переизлучения в природе медуза светится ярким зеленым светом.

Целентеразин был идентифицирован во многих животных, не способных светиться [Shimomura, 2006]. Данное явление, очевидно, не уникально – недавно открытый новый люциферин, участвующий в грибной биолюминесценции (см. Рис. 1), был также в больших количествах найден в несветящихся видах грибов [Purtov et al., 2015]. Логично возникает вопрос, откуда же берется субстрат целентеразин – необходимое соединение для свечения многих живых организмов? В работе «Can coelenterates make coelenterazine?» Хэддок с коллегами [Haddock et al., 2001] экспериментально изучили эффект специфической диеты медузы *A. victoria*, питающейся исключительно креветками рода Artemia, не содержащими целентеразина, на ее способность светиться. Оказалось, что в таких условиях культивируемая популяция медуз потеряла это уникальное свойство. Подобные результаты ранее были получены и при изучении влияния питания на биолюминесценцию светящейся глубоководной рыбы *Porichthys notatus,* использующей в качестве субстрата Cypridina-люциферин [Tsuji et al., 1972, 1975]. Данные наблюдения позволили заключить, что имидазолпиразиноновые люциферины в светящихся

организмах появляются в результате их передачи по пищевым цепям.

Ввиду особенностей питания медуз в естественных условиях, когда в основе рациона лежит мелкий зоопланктон, были рассмотрены пути возможного биосинтеза люциферинов в организмах светящихся ракообразных. В работах ученых из группы Охмийи [Kato et al., 2007; Oba et al., 2009] был исследован биосинтез целентеразина и Cypridina-люциферина, соответственно, в копеподе *Metridia pacifica* и ракушковом раке *Cypridina hilgendorfii.* В состав корма исследуемых популяций входили меченые изотопами L-аминокислоты, которые помогли идентифицировать остатки, входящие в состав люциферинов. В результате показано, что целентеразин синтезируется в живых организмах из Phe и двух Tyr-остатков, в то время как Cypridina-люциферин образуется из триады Trp, Arg и Ile с последовательной циклизацией трипептидов до образования имидазолпиразинонового кольца (Рис. 2).

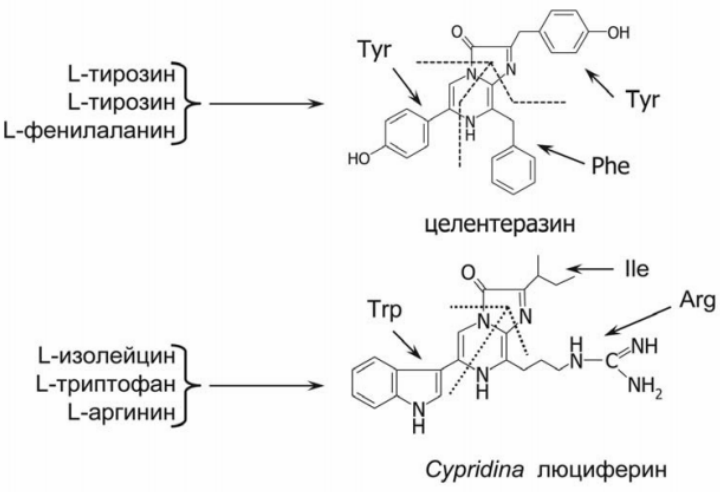


Рисунок 2 – Предположительная схема образования люциферинов имидазолпиразинонового типа в организмах копепод и остракод [Markova, Vysotski, 2015]

Сегодня такими компаниями как NanoLight и Promega налажено химическое производство различных модификаций целентеразина и ципридинового субстратов. Однако до сих пор воспроизвести формирование имидазолпиразиноновых люциферинов путем биосинтеза из исходных аминокислот пока не удалось. Вероятно, возникновение таких люциферинов

является результатом нерибосомального синтеза в клетке, в который может быть вовлечен ряд различных белков.

Разнообразие животных, использующих имидазолпиразиноновые люциферины, потрясает своими масштабами. А тот факт, что все известные люциферазы и фотопротеины разных таксономических групп не проявляют сходства первичных аминокислотных и нуклеотидных последовательностей и подтверждает, что свойство свечения возникало в организмах в разное время и абсолютно независимо.

В то же время для некоторых биолюминесцентных белков обнаружено сходство с клеточными белками, входящими в арсенал белков домашнего хозяйства. Для аминокислотной последовательности люциферазы Renilla показано сходство с клеточными α/β-гидролазами со степенью идентичности до 64% [Markova, Vysotski, 2015]. А для люциферазы Oplophorus была найдена гомология с внутриклеточными липид-связывающими белками [Hall et al., 2012]. Данные свидетельства позволяют сделать предположение об эволюционном приобретении новой функции белков, прежде обеспечивающих жизнедеятельность клетки. Эти преобразования, вероятнее всего, достигались путем мутационных изменений и закрепляющих их эволюционного отбора. Таким образом, биолюминесценция может служить примером конвергентной эволюции, предполагающей независимое возникновение биолюминесцентных белков из совершенно различных предшественников. Возможно, такой путь образования лежит в основе происхождения всех известных люцифераз, входящих в различные биолюминесцентные системы, что и может объяснить их достаточно широкое разнообразие.

1.3 Люциферазы морских копепод. Исследование ферментов и перспективы использования

Целентеразин-зависимые копеподные люциферазы, входящие в биолюминесцентную систему морских рачков, сегодня довольно перспективны

как репортерные молекулы. На их основе создаются репортерные тест-системы, применимые для задач молекулярного имиджинга, а также для проведения лабораторных анализов. Благодаря небольшим размерам и способности естественно секретироваться, данные белки часто служат внеклеточными репортерными молекулами, которые можно обнаружить в кровотоке, моче и межклеточных жидкостях [Badr, 2014; Homaei et al., 2017].

Веслоногие рачки копеподы являются одним из основных таксонов среди представителей зоопланктона. Несмотря на то, что о биолюминесценции копепод известно более века, структура, функционирование и эволюция генов, кодирующих копеподные люциферазы, до конца остаются неясными.

Свечение глубоководных веслоногих (каланоидных) копепод обусловлено секретирующими выделениями эпидермальных железистых клеток (Рис. 3). Их количество и локализация значительно отличаются у разных представителей таксона [Takenaka et al., 2012].

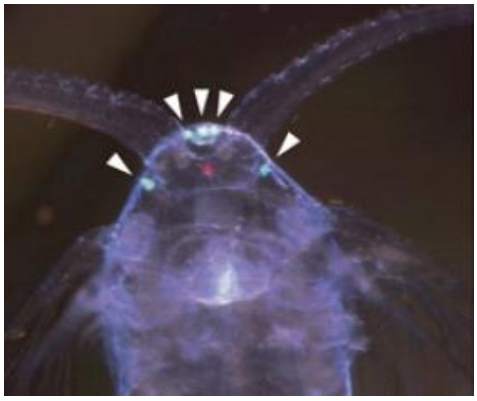


Рисунок 3 – Изображение веслоногой копеподы *Metridia pacifica*, полученное при помощи флуоресцентного микроскопа. Указано расположение желез, секретирующих люциферазу в морскую воду [Takenaka et al., 2012]

Большинство видов копепод, обладающих секретируемой биолюминесценцией, относят к надсемейству Augaptiloidea. Однако лишь 4 семейства среди них включают представителей, являющихся биолюминесцентными: Metridinidae, Heterorhabdidae, Lucicutiidae и Augaptilidae [Herring, 1988]. Кладистические анализы морфологических признаков показали,

что надсемейство Augaptiloidea эволюционно очень рано отделилось от остальных глубоководных каланоидных копепод [Bradford-Grieve et al., 2010; Takenaka et al., 2012] (Рис. 4).

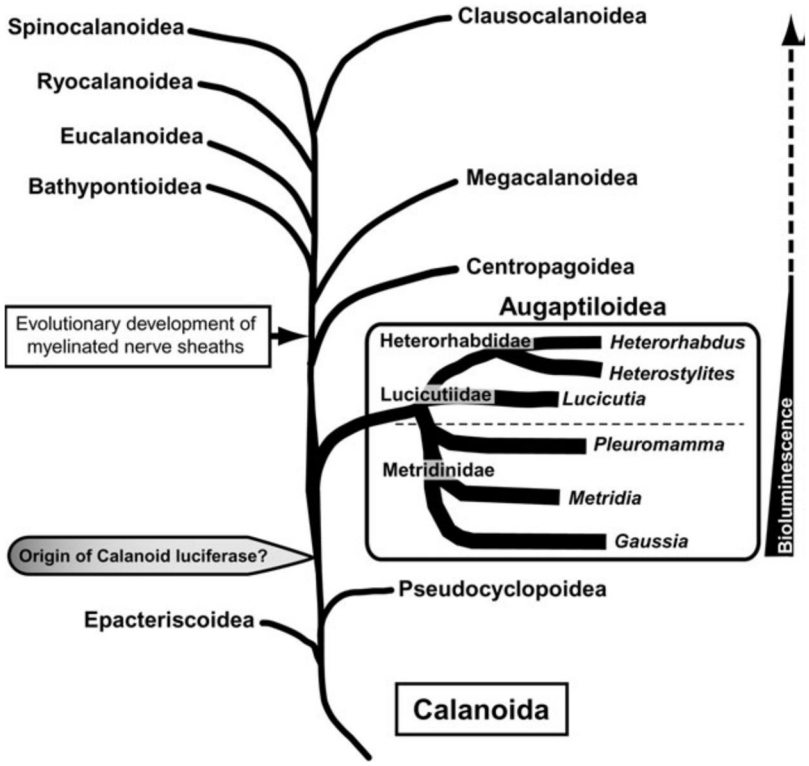


Рисунок 4 – Предполагаемая схема эволюции глубоководных веслоногих копепод. В рамке выделены семейства и роды, имеющие биолюминесцентных представителей [Bradford-Grieve et al., 2010; Takenaka et al., 2012]

Согласно данным базы GenBank, теперь стали известными более 20 генов люцифераз из 12 видов копепод: *Gaussia princeps* [Verhaegen, Christopoulos, 2002], *Metridia longa* [Markova et al., 2004], *Metridia pacifica* [Takenaka et al., 2008], *Metridia oktotensis, Pleuromamma abdominalis, Lucicutia ovariformes, Heterostylites major* [Takenaka et al., 2013] и многих других. Нуклеотидные последовательности генов люцифераз, изолированных из вышеуказанных близкородственных видов, отличаются высокой степенью гомологии. Однако для генов и аминокислотных последовательностей копеподных люцифераз не обнаружено никаких значительных показателей сходства с другими люциферазами, в том числе и целентеразин-зависимыми, что говорит об

уникальности этого класса биолюминесцентных белков, возникших, предположительно, от единой предковой формы [Takenaka et al., 2017].

Целентеразин-зависимые копеподные люциферазы катализируют окисление целентеразина, генерируя при этом CO_2, целентерамид и голубой свет с пиком около 485–487 нм. Для запускания реакции необходимо только присутствие кислорода (Рис. 5). Следует отметить, что для биолюминесцентных реакций с участием бактериальной, светлячковой люцифераз требуется наличие дополнительных кофакторов, таких как ионы металлов, ФМН, НАДН или АТФ [Badr, 2014]. Этот параметр является важной характеристикой, определяющей выбор биолюминесцентного белка как основы для биосенсора, предназначенного для решения конкретных исследовательских задач.

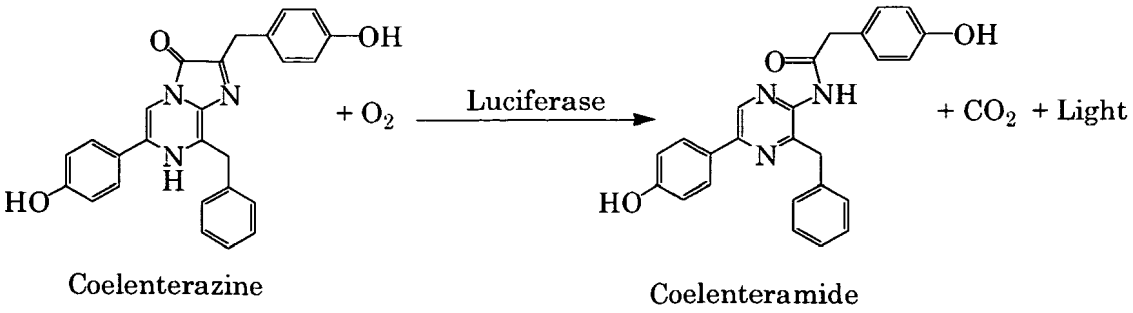


Рисунок 5 – Схематическое изображение механизма биолюминесцентной реакции, катализируемой копеподными люциферазами

Первым из генов каланоидных копепод семейства Metridinae был изолирован ген, кодирующий люциферазу из *Gaussia princeps* [Verhaegen, Christopoulos, 2002]. Особенностями данной люциферазы (GpLuc) являются небольшой молекулярный вес (19,9 кДа), высокая стабильность, а также то, что белок является естественно секретируемым. Люцифераза Gaussia отличается чрезвычайно высокой удельной активностью – использование оптимизированного для экспрессии в клетках млекопитающих гена hGpLuc позволяло регистрировать активность при *in vivo* имиджинге, 1000-кратно превышающую активность Renilla люциферазы и светлячковой люциферазы из

Photinus pyralis (hRluc, hFLuc) [Tannous et al., 2005].

К настоящему времени люцифераза GpLuc, коммерческий продукт компании Prolume (США), обрела высокую популярность и используется в разнообразных диагностических прикладных и фундаментальных исследованиях, позволяющих оценивать белок-белковые взаимодействия, изучать механизмы транспорта белков *in vivo*, проводить высокопоточные скрининги на живых клетках ([Maguire et al., 2009; Ko et al., 2014; Luker et al., 2014] и др.). Однако в последнее время благодаря интенсивному исследованию свойств люциферазы Metridia к данному репортерному белку также возрастает интерес. Подробнее прикладные исследования с использованием копеподных люцифераз будут рассмотрены в одном из следующих разделов.

В 2004 году в лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН был клонирован ряд генов люциферазных изоформ из копеподы *Metridia longa* [Markova et al., 2004; Borisova et al., 2008]. Люцифераза Metridia, как и GpLuc, обладает способностью секретироваться из железистых клеток рачков и характеризуется голубой люминесценцией. Изоформы MLuc164 [Markova et al., 2012] и MLuc39 [Borisova et al, 2008] уже были успешно применены в различных схемах анализа *in vitro* и *in vivo* и продемонстрировали себя как высокочувствительные и стабильные репортерные молекулы.

Обнаружено, что многие из исследованных видов светящихся копепод имеют несколько люциферазных изоформ. Кроме *Metridia longa* изоформы также были найдены в копеподах *M. pacifica, M. oktotensis* [Markova et al., 2004; Takenaka et al., 2008, 2013]. Причем показано, что различия между изоформами одного организма сопоставимы с межвидовыми различиями люцифераз. Предполагается, что такое разнообразие достигается за счет кодирования изоформ группой неаллельных генов.

Биолюминесцентный сигнал для копеподных люцифераз описывается быстрой кинетикой типа «вспышка», характеризующейся предельно высокой скоростью подъема и затуханием потока фотонов со временем. Вероятно, это связано с большим количеством оборотов биолюминесцентных ферментов,

которые катализируют преобразование целентеразина в целентерамид.

Рассматриваемые в данной работе Metridia и Gaussia люциферазы обладают схожей структурой, которая представлена вариабельным N-концом и очень консервативным С-концом (Рис. 6). На N-конце у всех известных изолированных копеподных люцифераз находится гомологичная последовательность из 17 аминокислот. Данный сигнальный пептид, проявляющий высокую гомологию среди копеподных люцифераз, обеспечивает секрецию белка из железистых клеток в морскую воду и при секреции отщепляется ферментом сигнальной пептидазой.

Рисунок 6 – Сравнение аминокислотных последовательностей изоформ MLuc с GpLuc. Серым цветом обозначен сигнальный пептид, зеленым выделены цистеиновые остатки, консервативно расположенные во всех представленных последовательностях. Красные – идентичные, синие – схожие по свойствам, черные – различные остатки

В структуре консервативного для всех копеподных люцифераз С-конца выделяются два повтора, последовательность которых составляет около 70 аминокислотных остатков. В их структуре выделяются консервативные участки (мотивы), проявляющие достаточное сходство (Рис. 6). Предполагается, что такое строение обусловлено дупликацией формы предкового гена с дальнейшей независимой эволюцией повторов. Причем различия между повторами у

некоторых групп люцифераз выражены наиболее явно, что может свидетельствовать об эволюционно более молодых формах генов.

Именно эти участки копеподных люцифераз являются цистеин-богатыми, большинство ферментов содержит до 10 высоко консервативных цистеиновых остатков, которые, предположительно, формируют до 5 дисульфидных связей. Логично допустить, что именно им принадлежит роль стабилизации жесткой молекулярной структуры копеподных люцифераз, в том числе, придания термостабильности.

В одной из работ исследователи продемонстрировали, что каждый из гомологичных повторов люциферазы Gaussia, экспрессированный по отдельности в *E. coli*, обладает ферментативной активностью [Inouye, Sahara, 2008]. Исходя из этого, было выдвинуто предположение, что в состав люциферазы входит два каталитических домена, способных независимо осуществлять окисление субстрата целентеразина. Однако, во многих других работах этот тезис не нашел подтверждения, а данная люцифераза с успехом применяется в комплементационных анализах, которые основаны на использовании фрагментов белков, не обладающих активностью по отдельности и восстанавливающих активность при стерическом сближении.

Несмотря на широкую популярность изоформ люцифераз MLuc и GpLuc, их энзиматические и физико-химические свойства до недавнего времени были недостаточно изучены по причине проблем получения чистых рекомбинантных белков с нативным фолдингом для характеризации. Не установлены к настоящему моменту и пространственные структуры копеподных люцифераз.

Ограничения, накладываемые на получение препаратов нативных белков, вызваны, прежде всего, наличием большого количества внутримолекулярных дисульфидных связей [Wu et al., 2015], что препятствует эффективному фолдингу рекомбинантных белков в бактериальных клетках. Для преодоления этого фактора используются различные варианты экспрессионных систем. На базе традиционной экспрессии в *E. coli* используются подходы, основанные на проведении рефолдинга белков, полученных из нерастворимых телец

включения [Borisova et al., 2008]. Кроме этого, также создаются конструкции, позволяющие переносить люциферазу из бактериальной цитоплазмы в периплазму при помощи лидерных пептидов [Maguire et al., 2009; Tannous, 2009; Oyama et al., 2015], так как в периплазме возможно формирование дисульфидных связей (благодаря присутствию дисульфид-оксидоредуктаз и дисульфид-изомераз [Kraft et al., 2007]). Путем добавления генов вышеупомянутых ферментов были созданы специальные штаммы *E. coli* («Rosetta», «Origami» и др.), позволяющие обеспечить экспрессию цистеин-богатых белков в цитоплазме клеток. Новый штамм «Shuffle» был использован для получения GpLuc в растворимом виде [Lobstein др., 2012]. Попытки обеспечения синтеза люциферазы в растворимой форме были предприняты и при использовании бактериальной холодовой экспрессии в pCold-векторе [Rathnayaka et al., 2010], в том числе и с использованием вспомогательных доменов, повышающих растворимость [Rathnayaka et al., 2011].

Альтернативным способом получения рекомбинантных люцифераз может служить их секретируемая экспрессия, обеспечивающая условия, необходимые для образования дисульфидных связей, и корректное сворачивание белка. В качестве эукариот-продуцентов используются культуры клеток насекомых [Stepanyuk et al., 2008; Ustinova et al., 2014] или млекопитающих [Inouye, 2018], причем для оптимизации экспрессии в клетках млекопитающих нуклеотидную последовательность генов изменяют с учетом частоты встречаемости кодонов в соответствующем организме. При этом подходе сохраняется первичная структура белков-репортеров, однако уровень синтеза значительно возрастает [Tannous et al., 2008]. Кроме этого, для обеспечения высокой продукции люциферазы Gaussia был применен и метод бесклеточного синтеза [Goerke et al., 2008], позволяющий получить как белок дикого типа, так и специальные модификации, например, несущие замены всех метионинов на азидогомоаланин.

Получение достаточного количества рекомбинантных цистеин-богатых копеподных люцифераз в нативной конформации является важной задачей для

исследователей. Решение проблемы фолдинга сможет обеспечить производство нативных белков, изучение свойств которых может пролить свет на внутримолекулярные механизмы процесса биолюминесценции. Кроме того, обеспечение продукции копеподных люцифераз в природной форме и в существенном количестве позволит провести широкомасштабные поисковые работы для нахождения оптимальных условий кристаллизации белков. Знание о третичной структуре белка, его поверхности и активном центре в будущем позволит вводить направленные изменения для улучшения репортерных качеств молекул.

1.4 Усовершенствованные и «искусственные» люциферазы, созданные на основе копеподных

Учитывая растущие потребности в неинвазивной визуализации молекулярных процессов *in vivo* как для фундаментальных, так и прикладных целей, следует ожидать дальнейшего развития биолюминесцентных технологий. Для нужд биолюминесцентного имиджинга требуется широкий спектр белков и их субстратов с различными биофизическими свойствами. На сегодняшний день большинство имеющихся известных репортерных биолюминесцентных систем имеет ряд недостатков и ограничений для целей биолюминесцентного имиджинга. Большинство имеющихся в природе и в арсенале исследователей биолюминесцентных белков излучают в голубой области спектра. Такое излучение эффективно поглощается тканями и гемоглобином, поэтому накладывает ряд ограничений для методов. Кроме того, многие копеподные люциферазы, изолированные из холодолюбивых морских организмов, имеют достаточно низкий температурный оптимум, поэтому их использование в *in vivo* исследованиях осложняется значительным снижением ферментативной активности при физиологических температурах. Некоторыми авторами также показано, что копеподные люциферазы могут претерпевать инактивацию сывороточными белками крови [Hiramatsu et al., 2005].

Поэтому для дальнейшего развития данных технологий необходим поиск новых биолюминесцентных природных белков, а также улучшение известных ферментов методами белковой инженерии – олигонуклеотид-направленным или случайным мутагенезом, созданием гибридных белков, укорачиванием последовательностей и т.д.

Люцифераза Gaussia, лидирующая по популярности среди копеподных люцифераз, повсеместно интенсивно модернизируется рядом исследовательских групп. В работах [Maguire et al., 2009; Welsh et al., 2009; Kim et al., 2011; Degeling et al., 2013] метод случайного мутагенеза, дальнейший скрининг полученных мутантов и объединение ряда полезных замен позволили идентифицировать точечные мутации, приводящие к повышению активности, сдвигу спектра и стабилизации светового сигнала. Так был найден один из лучших вариантов с 4 мутациями (F89W/I90L/H95E/Y97W), получивший название «Monsta», который характеризовался эмиссией с максимумом при λ=503 нм и 5-кратным повышением активности. В результате экспериментов также были обнаружены яркие мутанты, обладающие медленной кинетикой спада люминесценции, что более удобно для некоторых видов аналитических применений, в том числе и для применения в качестве *in vivo* репортера в животных тканях. Среди них идентифицированы: двойной мутант (M60L/M127L), замедляющий испускание квантов света более чем на порядок [Welsh et al., 2009], а также вариант GLuc4, несущий замены (L30S/L40P/M43V) и приводящий к медленно затухающему «glow»-свечению и 4-кратному повышению квантового выхода [Degeling et al., 2013].

Кроме этого, исследуются варианты люцифераз, полученные путем усечения первичной последовательности. Такой прием необходим для предельного уменьшения молекулярной массы репортеров, применимых в дальнейшем для гибридизации с белками-партнерами в различных схемах анализа. При этом важно, чтобы в результате таких манипуляций потери активности были минимальны. Так, в работе [Markova et al., 2012] было показано, что укорачивание N-концевого вариабельного домена люциферазы

Metridia (MLuc164) на 55 аминокислотных остатков приводит к 3,5-кратному повышению активности по сравнению с полноразмерной формой белка. Вышеупомянутый мутантный вариант люциферазы Gaussia GLuc4 в исследовании [Hunt et al., 2016] также подвергался укорачиванию и модификации путем введения тирозинов, необходимых для химической конъюгации с белками-партнерами.

Стоит отдельно упомянуть работы группы ученых, разрабатывающих дизайн новых люцифераз на базе природных копеподных ферментов. С помощью подхода, основанного на создании консенсусной последовательности всех гомологичных люцифераз из близкородственных видов копепод («consensus sequence-driven mutagenesis strategy», [Lehmann et al., 2002]), был сконструирован ряд новых ALuc-люцифераз [Kim et al., 2013, 2015; Kim, Izumi, 2014]. ALuc-люциферазы (от англ. *Artificial* – искусственные) представляют собой вариативные комбинации последовательностей копеподных люцифераз, несущих наиболее встречаемые аминокислотные остатки – консервативные у большинства белков. Считается, что с помощью такой стратегии можно найти первичную последовательность, способную обеспечить самую термодинамически оптимальную конфигурацию белка, которая, однако, не выходит за пределы природных вариаций.

В результате были сконструированы варианты, придающие стабильность, в том числе, температурную, повышенную ферментативную активность, а также сдвиг максимума эмиссии в дальневолновую область спектра. Самыми успешными оказались варианты искусственных люцифераз (ALuc16, ALuc23, ALuc25), имеющие высокую степень гомологии с люциферазой из *Metridia pacifica* – порядка 80%. Новые искусственно созданные формы отличались увеличенной активностью и имели максимум биолюминесценции λ~530 нм. Сопоставимый по значению максимум в зеленой области спектра был обнаружен у усовершенствованных мутантных форм люциферазы Renilla при взаимодействии с модификацией природного целентеразина (целентеразином-v) – RLuc8, λ=535 нм [Woo et al., 2008] и SuperRLuc8, λ=540 нм [Rahnama et al.,

2017]. Такие результаты являются серьезным прорывом в модернизации природных целентеразин-зависимых белков, эмиссия большинства из которых наблюдается в диапазоне 460–490 нм.

1.5 Применение копеподных люцифераз для *in vitro* и *in vivo* визуализации

Стремительное развитие медицины, фармацевтической промышленности, а также фундаментальные биологические исследования требуют набора репортерных молекул, предназначенных для решения исследовательских задач. Целентеразин-зависимые люциферазы на сегодняшний день зарекомендовали себя как инструменты эффективной неинвазивной визуализации в технологиях *in vivo* биоимиджинга, а также *in vitro*-приложений. Благодаря одновременному усовершенствованию репортерных молекул, изящному дизайну экспериментов и развитию регистрационного оборудования (микроскопов, люминометров, CCD (charge-coupled device) камер и т.д.) использование копеподных люцифераз как репортеров открывает впечатляющий спектр возможностей для неинвазивной визуализации динамических процессов: на уровне молекул, клеточных органоидов, тканей и целых организмов. Технологии биолюминесцентного имиджинга с использованием копеподных люцифераз позволяют всесторонне изучить различные сложные процессы – рост клеток и их миграцию, транспорт интересующих белков, экспрессию генов, межбелковые и лиганд-белковые взаимодействия, иммунодетекцию аналитов в пробе, жизнеспособность культуры клеток или их инфицированность и т.д.

1.5.1 Иммунологические анализы

Современные методы медицинской диагностики в настоящее время не обходятся без качественных и количественных иммунологических анализов, основанных на выявлении аффинного взаимодействия антиген-антитело в

твердофазном формате. Долгое время для эффективной детекции исследуемых антигенов в качестве проявляющих агентов использовались радионуклидные метки, требующие особых условий для безопасности анализа и специальной подготовки персонала. На смену им пришли конъюгированные с антителами ферментные метки, которые в ходе анализа позволяют оценить взаимодействие с антигеном по степени окраски пробы. Такой способ детекции, ELISA («Enzyme linked immunosorbent assay»), сегодня повсеместно применяется в исследовательских целях и в диагностических медицинских лабораториях для определения множества жизненно важных аналитов.

В качестве репортерных молекул в ELISA традиционно используются ферменты пероксидаза хрена, β-*D*-галактозидаза, щелочная фосфатаза, проявляющие специфическое связывание путем реакции с субстратом, который после его окисления придает пробе соответствующую окраску, интенсивность которой прямо пропорциональна концентрации искомого антигена [Grange et al., 2014]. Несмотря на то, что фотометрически детектируемые метки зарекомендовали себя как простые и эффективные инструменты обнаружения агентов, все же они не лишены недостатков. Развитие окраски продукта реакции в таком формате анализа происходит неравномерно, зависит от окружающей температуры, кроме того, в ходе анализа требуется внесение «стоп»-реагента для того, чтобы остановить ферментативную реакцию.

Сегодня разрабатываются новые метки для иммуноанализов, основанные на применении флуоресцентных и биолюминесцентных белков, причем в качестве биоспецифических доменов используются антитела или аптамеры [Wang et al., 2013; Burakova et al., 2015; Krasitskaya et al., 2017; Huang et al., 2017; Zamay et al., 2017; Smirnova, Ugarova, 2017]. Биолюминесцентные метки обеспечивают высокую чувствительность детекции, позволяя идентифицировать аналиты в концентрациях ниже пикомолярных, а также характеризуются широким линейным диапазоном обнаружения, стабильностью в растворах и простотой запускаемой биолюминесцентной реакции, интенсивность которой можно оценить с помощью люминометра.

На основе копеподных люцифераз Gaussia и Metridia уже были разработаны системы биолюминесцентного иммуноанализа. Было показано, что копеподные люциферазы могут служить эффективными репортерами для *in vitro* исследований крови лабораторных животных в планшетном формате, так как они позволяют уменьшить время анализа, делать множественные тесты и являются более чувствительными, чем широко используемая секретируемая щелочная фосфатаза (SEAP) [Tannous, Teng, 2011; Bovenberg et al., 2012]. В исследованиях [Hiramatsu et al., 2005, 2006] MLuc люциферазу сопоставляли с применением SEAP в рамках анализа по оценке клеточного метаболизма в условиях стресса эндоплазматического ретикулума. В одной из работ была также оптимизирована методика быстрой иммунодетекции циркулирующей в крови GpLuc с использованием антител, специфичных к люциферазе, которые позволяют захватывать репортер и в дальнейшем проводить иммунологический анализ [Bovenberg et al., 2012].

В иммуноанализах часто используются биотинилированные метки, служащие универсальными инструментами в обнаружении агентов с помощью авидин-содержащих антител. В исследованиях [Verhaegen, Christopoulos, 2002; Borisova et al., 2008] продемонстрирована возможность использования биотинилированных люцифераз Gaussia и Metridia (MLuc39) в качестве маркеров, обеспечивающих детекцию с пределом обнаружения 1 амоль.

На основе GpLuc были созданы системы, имеющие большое клиническое значение. В исследовании [Ustinova et al., 2014] авторы разработали химерные белки с использованием люциферазы Gaussia, предназначенные для детекции аутоантител ZnT8, являющихся специфическими маркерами при диабете 1 типа. В исследовании [Oyama et al., 2015] были разработаны биоспецифические метки на базе мутанта GpLuc с медленным свечением и одноцепочечных миниантител (scFv), специфичных к кортизолу (Рис. 7). Такой подход обеспечил сверхчувствительную детекцию кортизола в сыворотке крови, кроме того, позволил разработать упрощенный по исполнению анализ, не требующий наличия планшетного люминометра с системой быстрого впрыска субстрата.

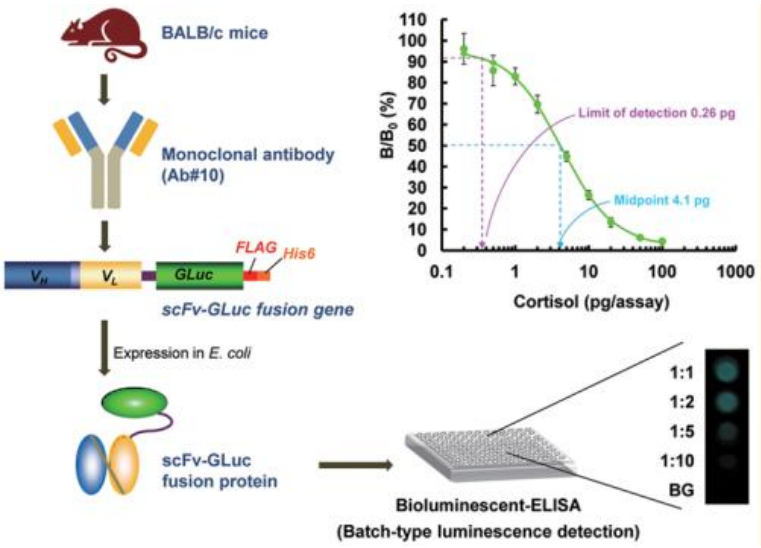


Рисунок 7 – Дизайн исследования [Oyama et al., 2015] с использованием нового одноцепочечного миниантитела в виде вариабельной части полноразмерного антитела, специфичного к кортизолу. Для анализа использовались экстракты бактериальной периплазматической фракции, содержащие химерные биоспецифические белки

Вышеупомянутый в этом обзоре мутант люциферазы Gaussia, имеющий тирозин-содержащий «хвост», использован в работе [Moutsiopoulou et al., 2017] для получения конъюгатов с полноразмерным антителом, специфичным к γ-интерферону. В результате оптимизированного иммуноанализа по «сэндвич»-типу были получены показатели высокочувствительной детекции интерферона в сыворотке крови.

1.5.2 Комплементационные анализы для оценки белок-белковых взаимодействий

Изучение белок-белковых взаимодействий в живой клетке или в *in vitro* условиях важно для установления функциональных характеристик ферментов, рецепторов, сигнальных путей, определения воздействия лигандов на ассоциацию комплексов и т.д. Такие сети межмолекулярных взаимодействий в литературе называют интерактомом [Valencia, Pazos, 2002].

В последнее время проводится большое количество исследований, направленных на изучение взаимодействий белков с помощью комплементационных (или «split» от англ. – «расщепление») анализов [Villalobos et al., 2007; Shavkunov et al., 2015]. Такой подход основан на использовании двух частей репортерного белка, по отдельности слитых с интересующими белками, которые при их взаимодействии стерически сближаются и образуют функциональный репортер. При этом важно, чтобы по отдельности фрагменты не проявляли активность [Shekhawat, Ghosh, 2011].

Комплементационные анализы, реализованные в различных схемах, могут идентифицировать взаимодействие белков с лигандами и друг с другом при их близком взаиморасположении, регистрировать конформационные изменения в белках и пептидах, действие протеаз и т.д. Широкий спектр возможного использования метода представлен на рисунке 8.

Комплементационный анализ предполагает использование белков, обладающих какими-либо характерными функциональными свойствами. Первые такого рода анализы были разработаны при участии убиквитина [Johnsson, Varshavsky, 1994], сегодня в исследованиях также применяются дигидрофолат редуктаза [Pelletier et al., 1998], β-лактамаза [Galarneau et al., 2002], TEV-протеаза [Wehr et al., 2006] и др. Одной из популярных систем, также позволяющих оценить образование комплексов белок-белок или белок-ДНК является двухгибридная система («Yeast two-hybrid system», Y2H), основанная на тестировании макромолекул, которые, взаимодействуя друг с другом, индуцируют транскрипцию репортерного гена [Joung et al., 2000].

Наиболее привлекательными репортерными характеристиками для комплементационных анализов обладают биолюминесцентные и флуоресцентные белки – GFP и его модификации [Ghosh et al., 2000; Hu, Kerppola, 2003; Magliery et al., 2005; Lindman et al., 2010], а также многие из известных люцифераз.

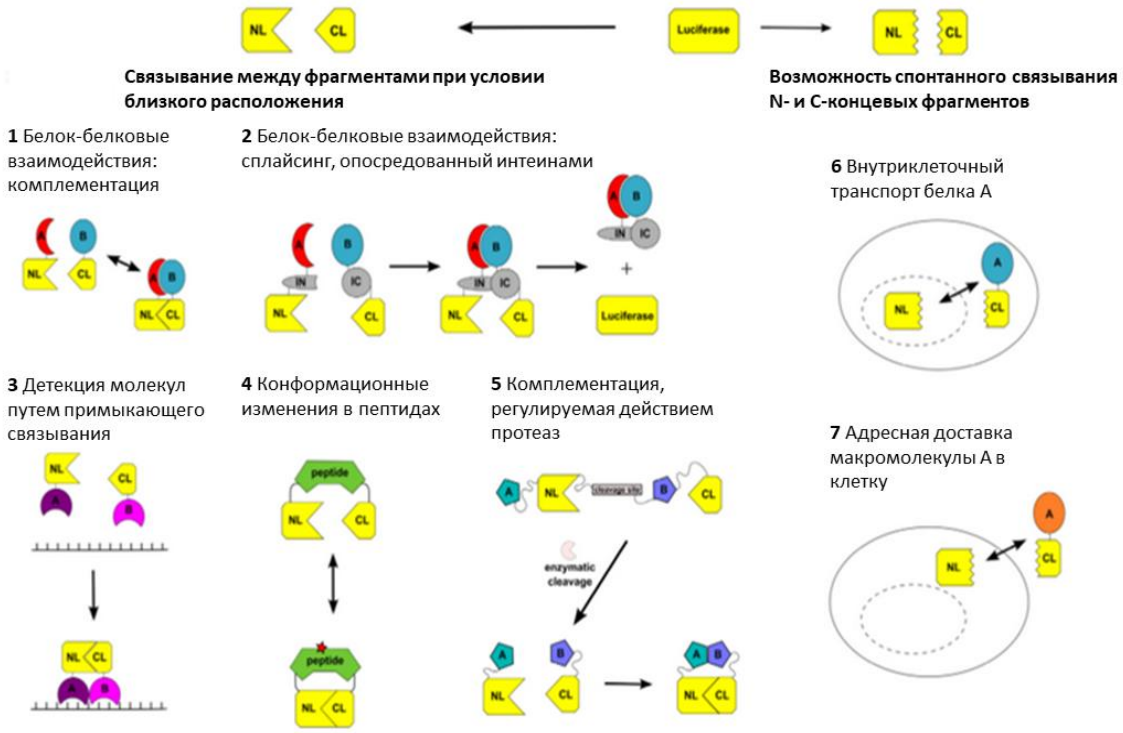


Рисунок 8 – Возможные схемы комплементационных анализов с использованием фрагментов люцифераз, по иллюстрации из работы [Lake, Aboagye, 2014]

Комплементационные анализы в различных модификациях были разработаны для популярных светлячковой и Renilla люцифераз, продемонстрировав широчайший спектр применения для оценки: влияния фосфорилирования на ассоциацию макромолекул, действия лигандов на клеточные рецепторы, детекции метилирования ДНК и пр. ([Villalobos et al., 2007; Hida et al., 2009; Lake, Aboagye, 2014; Azad et al., 2014; Smirnova, Ugarova, 2017]). Большой интерес к вышеупомянутым репортерным белкам при использовании в качестве компонентов комплементационных анализов вызван, безусловно, имеющимися пространственными структурами и возможностью прямого моделирования взаимодействующих доменов, линкеров и т.д.

Несмотря на то, что третичная структура ни одной из копеподных люцифераз до сих пор не идентифицирована, показано, что представители данной группы также могут использоваться в качестве репортеров в «сплит»-анализах. Впервые способность взаимной комплементации фрагментов люциферазы Gaussia была продемонстрирована в работе [Remy, Michnik, 2006].

Авторы оптимизировали разделение двух фрагментов путем подбора конструктов с различными точками расщепления люциферазы, которые могли бы соединяться при сближении расположенных на концах контрольных лейциновых «зипперов». В результате отбора была идентифицирована оптимальная пара фрагментов (GpLuc1-93 и GpLuc94-169), соответствующих отдельным тандемным повторам люциферазы. Идентифицированные фрагменты массой порядка 9–10 кДа представляли собой предельно малые домены для присоединения к целевым белкам, что может обеспечить простоту и достоверность комплементационного анализа. В отличие от результатов исследования [Inouye, Sahara, 2008], фрагменты не проявляли биолюминесцентную активность. Комплементация N- и C-концевых фрагментов приводила к восстановлению 10% начальной активности, однако даже эти показатели превышали удельную активность RLuc и FLuc [Tannous et al., 2005]. Такой анализ в работе Реми позволил оценить взаимодействие клеточного белка, связывающегося с иммуносупрессором FK506 (FKBP), с рапамицин-связывающим доменом FRAP-киназы (FRB), точно определить константы диссоциации и даже динамику связывания.

Разнообразные «сплит»-анализы с участием Gaussia люциферазы разрабатывались для обширного спектра прикладных задач – исследования интерактома в патогенном микроорганизме *Salmonella enterica* [Wille et al., 2012], оценки ассоциации хемокинов со специфическими рецепторами на уровне клеток и лабораторных мышей [Luker, Luker, 2014]. На основе фрагментов GpLuc проведены комплементационные анализы при исследовании димеризации белка APP (предшественника амилоидных пептидов) [Hashimoto et al., 2011; Decock et al., 2015], количественной оценке и визуализации транспорта внутриклеточного кальция при слиянии частей люциферазы с кальмодулином [Kim et al., 2009] и во многих других работах.

Копеподные люциферазы с малой молекулярной массой, высокой активностью, отсутствием кофакторов, требуемых для запуска люминесценции, можно считать перспективными молекулами для создания

высокочувствительных «сплит»-биосенсоров. Люцифераза Gaussia уже зарекомендовала себя как эффективный инструмент, способный в рамках комплементационных анализов эффективно восстанавливать активность из фрагментов и обнаруживать целевые белки в предельно малых концентрациях [Malleshaiah et al., 2016]. Ввиду высокой степени гомологии остальные родственные люциферазы могут также быть использованы в качестве эффективных комплементационных репортеров.

1.5.3 Проведение высокопоточных скринингов

Исследование множественных сетей взаимодействия внутриклеточных транспортных белков, ферментов, рецепторов и т.д. является важной задачей для фундаментальной науки, а также биомедицинских приложений. Копеподные люциферазы, будучи высокоактивными ферментами с предельно малой массой, могут обеспечить эффективную репортерную функцию не только в маломасштабных экспериментах, но и успешно проявить себя при проведении крупноформатных скрининговых работ. Критериями подходящего репортера для такого рода исследований служит минимальное количество стадий пробоподготовки, минимальное количество кофакторов, обеспечивающих простоту детекции взаимодействий, обеспечивающих проведение высокопоточных скринингов (High-Throughput Screening, HTS) в автоматическом режиме [Remy, Michnik, 2006].

Стадия HTS-поисковых тестирований играет важную роль при разработке химических соединений, имеющих клиническую значимость. Так, на основе люциферазы Metridia в исследовании [Tsujita et al., 2015] была разработана репортерная система HTS-анализа для выявления факторов, индуцирующих клеточную гипоксию (HIF). MLuc-сенсор был применен для анализа транскрипции генов в системе ответа HIF, в котором были протестированы потенциальные агенты, вызывающие гипоксию. Более 9000 низкомолекулярных соединений было проанализировано в исследовании

[Murakami et al., 2011] по поиску критических агентов, участвующих в развитии бокового амиотрофического склероза.

Обнаружение и дальнейшее исследование микроРНК, регулирующих экспрессию многих генов, также является актуальной фундаментальной задачей. С использованием MLuc и GpLuc созданы системы скрининга, позволяющие изучать динамические изменения микроРНК-активности в одной популяции клеток в течение времени [Huang et al., 2009; Tian et al., 2012; Ko et al., 2014], вести поиск микроРНК, участвующих в системе репарации ДНК при действии ионизирующего излучения [Hatano et al., 2015] и др.

Широкомасштабные HTS проведены с использованием сенсоров, сконструированных на основе комплементационной системы Gaussia-люциферазы. Так, например, в работе [Gilad et al., 2014] была представлена платформа для детекции взаимодействий белков, участвующих в клеточном апоптозе – в результате авторами проанализированы более 3000 комбинаций белковых пар и найдены около 50 новых взаимодействий, прежде никогда не описанных (Рис. 9).

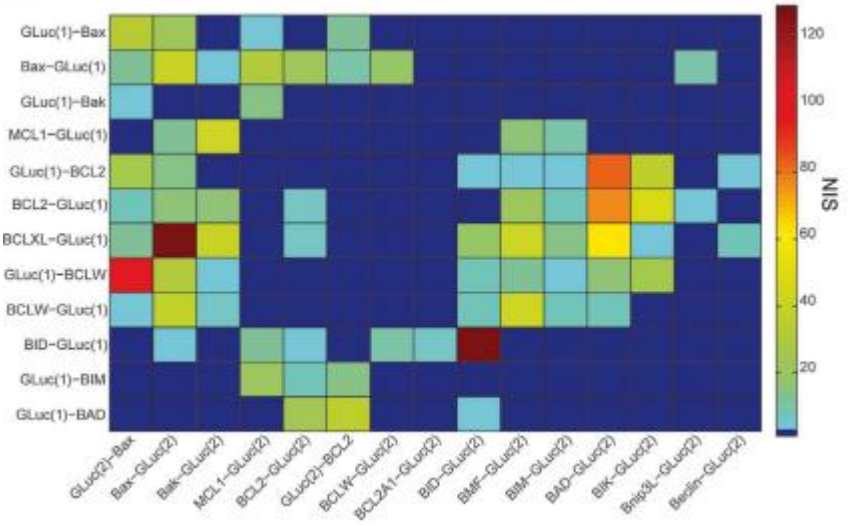


Рисунок 9 – Результат HTS-тестирования взаимодействий белков, участвующих в клеточном апоптозе [Gilad et al., 2014], шкала от голубого до красного иллюстрирует биолюминесцентную активность, пропорциональную силе белок-белковых взаимодействий

Также путем модернизированного для масштабирования «сплит»-анализа

была углубленно изучена сеть взаимодействий среди белковых компонентов, обеспечивающих функционирование теломерных участков хромосом [Ma et al., 2017]. Интересное исследование с участием GpLuc-биолюминесцентного сенсора, как одного из репортеров, способных легко визуализировать состояние интересующих белков [Sheahan et al., 2016], позволило протестировать лекарственные химические соединения, способные предотвратить денатурацию и ошибочное сворачивание ферментов.

Не меньшую фундаментальную и клиническую значимость имеют результаты работ, посвященных изучению интерактома вирусных белков, которые были проведены с участием сенсоров на базе копеподных люцифераз. В исследованиях были изучены взаимодействия белковых компонентов вируса папилломы человека (GpLuc в комбинации с Y2H-системой) [Neveu et al., 2012], а также филовирусов, в том числе был осуществлен широкий поиск ингибиторов репликации вирусов Эбола и Марбурга (MLuc-репортер) [Uebelhoer et al., 2014].

1.5.4 Использование люцифераз в *in vivo* биоимиджинге

На сегодняшний день существует ряд технологий, позволяющих прижизненно визуализировать процессы, происходящие в живом организме, тканевой модели или клеточной культуре, в режиме *in vivo*. К ним относят позитронно-эмиссионную томографию (PET), однофотонную эмиссионную компьютерную томографию (SPECT), магнитно-резонансную томографию (MRT), а также методы оптической визуализации, основанные на применении флуоресцентных красителей, генетически кодируемых флуоресцентных и биолюминесцентных белков. Все эти технологии наравне с рентгеновской компьютерной томографией, ультразвуковыми исследованиями обеспечивают неинвазивный мониторинг (биоимиджинг) живых объектов в динамическом, пространственно-временно́м разрешении [Бондарь и др., 2012].

Вышеперечисленные методики могут обеспечить проведение

биомедицинских диагностических и фундаментальных исследований с визуализацией процессов, происходящих на разных структурных уровнях, от организменного до молекулярного. Сочетание этих методов предоставляет возможность всестороннего изучения исследуемого объекта.

Данные группы технологий биоимиджинга отличаются стоимостными характеристиками, чувствительностью, разрешением и т.д. Однако флуоресцентные и биолюминесцентные методы оптической визуализации, будучи довольно доступными, могут обеспечить высокочувствительную детекцию динамических процессов в реальном времени даже в отдельных клеточных органеллах. Стремительное развитие аппаратуры для регистрации световых сигналов (флуоресцентных, конфокальных микроскопов, высокочувствительных охлаждаемых CCD-камер) позволяет добиться высокого разрешения визуализации с использованием светоизлучающих репортерных белков и красителей.

Флуоресцентные репортеры зарекомендовали себя как общепринятые эффективные инструменты для мечения исследуемых клеточных культур, отдельных клеток и тканей лабораторных животных. На базе GFP, RFP и их многочисленных синтезированных производных, теперь являющих собой целую палитру флуоресцентных меток (Рис. 10А), созданы системы, предназначенные для окрашивания клеток и их отдельных органелл, мониторинга экспрессии генов, пролиферации клеток, ангиогенеза, метастазирования и т.д. [Chudakov et al., 2010; Walker et al., 2015]. Проводящиеся в настоящее время исследования, посвященные мониторингу клеток, изучению их морфологических особенностей, дифференцировки, не обходятся без применения флуоресцентных красителей или репортеров. Часто гены флуоресцентных белков служат контролями проведения трансфекции [Tsien, 2009], обеспечивая качественное исполнение экспериментов.

Несмотря на безусловную привлекательность флуоресцентных репортеров как меток, их широкую гамму, где представлены белки, способные излучать даже в дальней красной области спектра, стоит учитывать, что такой

метод визуализации требует наличия внешнего источника излучения (Рис. 10Б). Это приводит к удвоению длины светового пути, к тому же происходит интенсивное рассеивание и поглощение света тканями исследуемого организма до момента его регистрации. Кроме этого, аутофлуоресценция тканей может вносить существенный вклад в фоновое излучение, тем самым снижая чувствительность используемого метода [Badr, 2014].

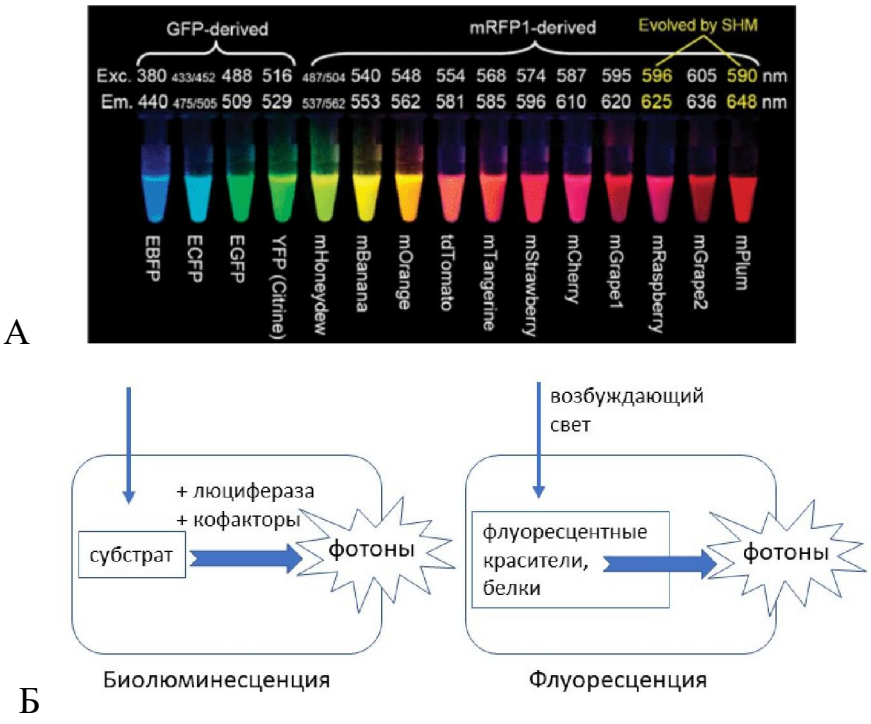


Рисунок 10 – А – разнообразие новых флуоресцентных белков, применимых для внутриклеточной визуализации [Tsien, 2009];
Б – схематическое изображение *in vivo* имиджинга с использованием биолюминесцентных и флуоресцентных репортеров

Биолюминесцентные технологии, основанные на взаимодействии люциферина с люциферазой, лишены многих недостатков, характерных для флуоресцентных меток (Рис. 10Б). Прежде всего, использование биолюминесцентных репортеров не требует источника внешнего излучения, а светоизлучательные процессы, катализируемые люциферазами, протекают с высоким квантовым выходом [Haugwitz et al., 2008; Paley, Prescher, 2014].

Благодаря высокому соотношению сигнала к фону биолюминесцентный имиджинг характеризуется чувствительностью 10^{-10}–10^{-11} М (выше, чем у флуоресцентных меток) и пространственным разрешением ~1 мм [Rodrigues, Mota, 2016].

Большое количество имеющихся люцифераз было апробировано в технологиях прижизненной визуализации. Однако требование к наличию дополнительных соединений, необходимых для осуществления ферментативного катализа, часто является ключевым фактором для выбора репортера [Paley, Prescher, 2014]. Для большинства исследований важно, чтобы репортер имел как можно меньшее количество необходимых кофакторов, что обеспечивало бы простоту запуска биолюминесцентной реакции и минимум параметров, которые могут повлиять на результаты эксперимента.

Однако в ряде случаев необходимость кофакторов определяет специфику применения репортеров для детекции внутриклеточных метаболитов. Светлячковая люцифераза FLuc, проявляющая ферментативную активность в присутствии ATP, эффективно применяется как чувствительный инструмент для измерения внутриклеточного уровня ATP, может служить сенсором идентичности нуклеотидных последовательностей, а также оценивать бактериальную контаминацию проб [Ahmadian et al., 2006; Frundzhyan, Ugarova, 2007; Sharifian et al., 2018]. FLuc при использовании с новым гидразиновым производным D-люциферина, специфичным к Cu^{2+}, может также служить сенсором для контроля внутриклеточного содержания меди [Zheng et al., 2016]. Фотопротеины в сочетании с усовершенствованными производными целентеразина широко применяются для детекции внутриклеточного кальция, обеспечивая точное измерение ионов Ca^{2+} в отдельных органеллах [de la Fuente et al., 2012; Sharifian et al., 2018]. Люциферазы, требующие наличия кислорода для преобразования субстрата, могут применяться для оценки внутриклеточного содержания молекулярного кислорода в опухолях при индуцированной гипоксии [Saha et al., 2011].

Секретируемые репортеры, к которым относятся все копеподные

люциферазы, являются удобным инструментом для биолюминесцентного имиджинга, так как их применение обеспечивает неинвазивный мониторинг и позволяет оценивать биолюминесцентную активность в культуральных средах, межклеточных жидкостях, крови, сыворотке животных [Tannous, Teng, 2011; Badr, 2014; Lashgari et al., 2017]. Такая особенность секретируемых репортеров позволяет, не лизируя клетки, осуществлять множественные *ex vivo* анализы наблюдаемой клеточной культуры или образцов крови, перенося исследуемые пробы культуральной среды в измерительный прибор, или производить прижизненный мониторинг, проводя инъекции субстрата в кровеносные сосуды лабораторных животных. В качестве модельных животных могут использоваться мыши, а также более крупные, например, овцы [Griesenbach et al., 2011].

В данном случае секретируемость репортера является преимуществом, так как позволяет производить неинвазивные манипуляции. Несмотря на то, что субстрат целентеразин может проникать сквозь клетки (однако при *in vivo* имиджинге характеризуется низкой биодоступностью вследствие неспецифического окисления в крови [Rodrigues, Mota, 2016]), в исследованиях часто не учитывается и тот факт, что как ксенобиотик он может «выкачиваться» системами множественной лекарственной устойчивости, особо активными у опухолевых клеток [Pichler et al., 2004]. Для повышения биодоступности субстрата для секретируемого репортера в биологических жидкостях теперь в распоряжении исследователей есть новые синтезированные производные целентеразина, не способные проникнуть в клетку [Lindberg et al., 2013].

Секретируемые копеподные люциферазы, имеющие высокую активность по сравнению с другими биолюминесцентными репортерами и не требующие кофакторов, кроме молекулярного кислорода, находят довольно широкое применение в *in vivo* имиджинге на уровне клеток и организмов [Close et al., 2011]. Люцифераза Gaussia в этом отношении занимает лидирующие позиции и используется при решении огромнейшего спектра разнообразных прикладных задач. Так, на базе репортера GpLuc, локализованного на клеточных мембранах,

были исследованы пути распространения Т-лимфоцитов [Santos et al., 2009], произведен мониторинг имплантированных стволовых клеток в технологиях «нейроимиджинга» [Mezzanottea et al., 2013; Aswendt et al., 2014]. В ряде исследований с помощью Gaussia и Metridia люцифераз в *in vivo* формате были исследованы агенты бактериальной и вирусной инфекции, такие как *Candida albicans* [Delarze et al., 2015], *Escherichia coli* [Liu et al., 2014], *Micoplasma sp.* [Degeling et al., 2014], вирус геморрагической септисемии [Kim, Kim, 2012], пикорновирус [Puckette et al., 2017], возбудитель энтеровирусных инфекций [Xu et al., 2015], вирус гриппа А [Eckert et al., 2014] и др.

Обширной областью применения GpLuc и MLuc являются онкологические исследования – были проведены многочисленные работы по изучению миграции раковых клеток в реальном времени, метастазирования, а также ответа привитых опухолей на терапию ([Yamashita et al., 2014; Wu et al., 2014; Hatano et al., 2015; Bibi et al., 2016; Alessandrini et al., 2016; Kantar et al., 2016] и др.). В ходе таких исследований используют культуру опухолевых клеток, ранее трансфецированных генетическими конструкциями с репортерными элементами, которая прививается лабораторному животному, имеющему низкий иммунный статус (Рис. 11).

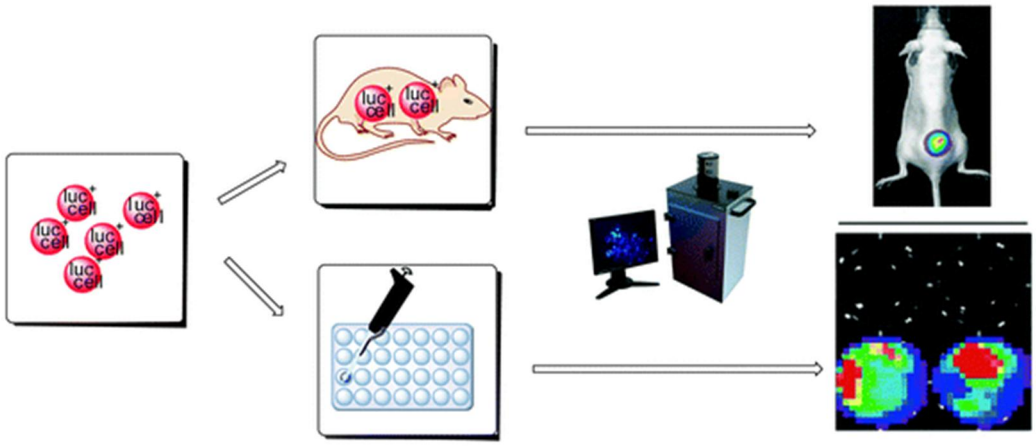


Рисунок 11 – Схема визуализации опухолей с использованием мелких лабораторных животных и имиджинговой камеры

При наблюдении за изменяющейся в ходе исследования опухолью

внутривенно вносят субстрат и регистрируют свечение в высокочувствительных имиджинговых камерах (например, «IVIS Spectrum», PerkinElmer, США). Тонкие кожные покровы позволяют визуализировать и внутренние органы лабораторных животных, в результате исследователь имеет возможность оценить интенсивность излучения с использованием программного обеспечения прибора.

Многие работы демонстрируют применение копеподных люцифераз в разработке новых простых методов оценки метаболической активности исследуемых клеточных культур. Так, на базе ряда секретируемых люцифераз, включая GpLuc и MLuc, был разработан метод оценки цитотоксичности [Matta et al., 2014; Tsuji et al., 2016]. Также данные репортеры могут служить индикаторами клеточной смерти, свидетельствующими, к примеру, об активации внутриклеточных каспаз [Knol-Blankevoort et al., 2016; Gaur et al., 2017]. С участием Metridia люциферазы (MLuc164) была получена система оценки жизнеспособности клеток [Lupold et al., 2012]. Все эти разработки позволяют достаточно быстро и нетрудоемко тестировать метаболическую активность клеток, не предполагая стадий разрушения клеток, микроскопирования или проведения, например, стандартного колориметрического МТТ-теста.

С использованием копеподных люцифераз разработаны системы биолюминесцентного анализа, вовлекающие сразу несколько репортеров, катализирующих окисление разных субстратов и излучающих в разных областях спектра. В работе [Michelini et al., 2008] впервые была применена система тройного анализа с использованием светлячковых люцифераз (*Photinus pyralis* – излучающая в зеленой области спектра, *Luciola italica* – красный термостабильный мутантный вариант), а также люциферазы Gaussia, излучающей голубой свет. В результате авторам удалось исследовать экспрессию ферментов, участвующих в биосинтезе желчных кислот в клетках млекопитающих. Технология позволила одновременно отслеживать экспрессию интересующих белков, а секретируемая копеподная люцифераза в данной

системе анализа служила внутренним контролем для мониторинга метаболической активности.

Такой подход, который основан на применении нескольких биолюминесцентных репортеров, называемый ортогональным, теперь достаточно распространен. Это довольно удобная технология, позволяющая одновременно отслеживать разные внутриклеточные события с использованием одной культуры клеток или модельного животного. Анализ с использованием ортогональных субстратов был проведен с участием GpLuc в паре с NanoLuc, специфичной к фуримазину, где отслеживали экспрессию целевых генов в клетках млекопитающих [Heise et al., 2013]. Тройная репортерная система также была создана на основе люцифераз FLuc, GpLuc и CLuc (ципридиновой), использующих 3 разных субстрата, для проведения исследования влияния терапевтически перспективного соединения Trail на активацию транскрипционного фактора в мозговой опухоли мыши [Maguire et al., 2013]. В данной работе по люциферазе Cypridina производили мониторинг доставки агента через гематоэнцефалический барьер, красная FLuc служила для отслеживания изменений размера опухоли, а люцифераза Gaussia позволила выявлять связывание исследуемого соединения с клеточными рецепторами, которое приводило к активации NF-*k*B. Также мультиплексный анализ с репортерами (GpLuc, SEAP, VLuc) позволил по нескольким параметрам одновременно анализировать циркулирующую кровь [Bovenberg et al., 2013; Lashgari et al., 2017]. В недавней работе [Wider, Picard, 2017] была разработана система анализа с использованием ортогональной пары в виде люциферазы GpLuc и флуоресцентного белка mCherry, где оба репортера, включая флуоресцентный, являлись секретируемыми и отвечали за разные события. В исследовании было показано применение репортерной пары для анализа транскрипционной активности на примере различных активаторов.

Кроме этого, некоторыми коммерческими фирмами создаются готовые комплекты плазмид и реагентов для проведения тестирований с применением двойных репортеров – GpLuc в сочетании с SEAP (GeneCopoeia, США), а также

в паре с FLuc (ThermoFisherScientific, Pierce, США) [Dobbs et al., 2013] и с CLuc (NEB, Великобритания) [Wider, Picard, 2017]. Подбор репортеров, использующих ортогональные субстраты и излучающих в разных областях спектра, позволяет в рамках одного биоимиджингового эксперимента отслеживать несколько независимых процессов, протекающих в рамках одной экспериментальной модели.

Довольно удобными инструментами являются системы, основанные на применении биолюминесцентных белков в паре с флуоресцентными репортерами. Обусловлено это, прежде всего, достаточно коротковолновым голубым излучением большинства самых «ярких» биолюминесцентных люцифераз, которое поглощается тканями и не позволяет с высокой чувствительностью проводить эксперименты на животных моделях. На базе BRET-систем, основанных на возбуждении флуоресцентных белков, продемонстрировано использование гибридного белка Gaussia с EYFP, для быстрой детекции энтерокиназы, которая проявляла свою протеолитическую активность, разрывая части репортерного белка (Рис. 12).

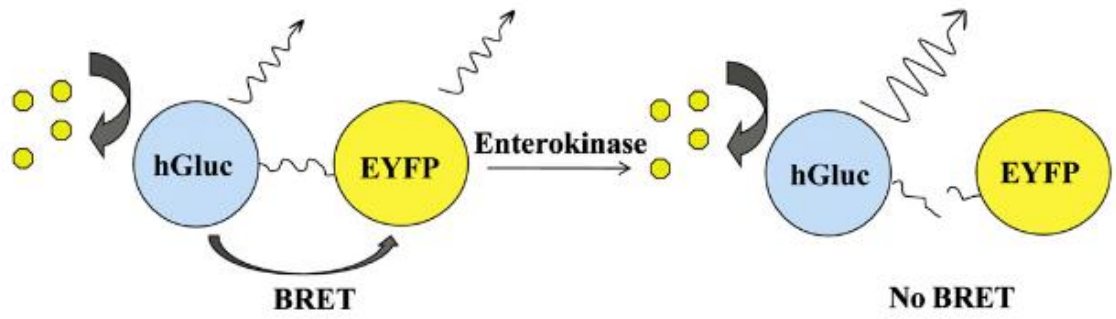


Рисунок 12 – Схема исследования, позволяющего осуществлять визуализацию действия энтерокиназы [Li et al., 2012]

Интересное применение для люциферазы GpLuc нашлось в работах [Berglund et al., 2013, 2016; Park et al., 2017], где ее использовали как белок-партнер в паре с родопсином (активируемым светом ионным каналом). Такие химерные конструкты были названы авторами люминопсинами. С помощью

нового подхода в области оптогенетики в многочисленных исследованиях были изучены функциональные характеристики культур клеток нейронов, а также в *in vivo* экспериментах рассмотрены особенности протекания нейродегенеративных заболеваний на модельных лабораторных животных ([Tung et al., 2014; Berglund et al., 2016a; Zenchak et al., 2018] и др.).

Таким образом, разнообразие биолюминесцентных систем предоставляет широкий спектр ферментов, отличающихся своими физико-химическими свойствами, спектральными характеристиками, специфичностью к субстратам, чувствительностью к окружению, температуре и т.д., что обусловливает их применение в определенных схемах анализа. Обширная область применения копеподных секретируемых люцифераз демонстрирует универсальность этих репортеров, которая в первую очередь обусловлена простотой катализируемой ими реакции и ее высоким квантовым выходом, что позволяет детектировать люциферазы в аттомолярных количествах.

Однако, несмотря на высокий интерес к копеподным люциферазам как к репортерам, их физико-химические и биолюминесцентные свойства до сих пор остаются неисследованными вследствие трудностей с получением белков в нативной конформации при использовании традиционных бактериальных систем экспресии. Поэтому целью данной работы являлась разработка технологии получения корректно свернутых новых изоформ MLuc7 и MLuc2 люциферазы *Metridia longa* и люциферазы копепод *Gaussia princeps*, исследование их биохимических, кинетических и биолюминесцентных свойства, а также проверка применимости новой изоформы люциферазы MLuc7 в качестве репортерной молекулы в *in vivo* и in *vitro* анализах.

ГЛАВА 2. Материалы и методы

2.1 Материалы

В работе использованы следующие реактивы: синтетический целентеразин (NanoLight, США), бычий сывороточный альбумин, смесь ингибиторов клеточных протеаз, Tween-20 (Bio-Rad, США), ЭДТА-натриевая соль, желатин, NP-40, гуанидин-HCl, HEPES, Трис, Бис-Трис пропан, глицерин, имидазол (Sigma, США), ампициллин, канамицин, гентамицин, тетрациклин (Синтез, Россия), бактотриптон (Difco, США), дрожжевой экстракт (Difco, США), мочевина (PanReac, Испания), дитиотриетол (Gerbu, Германия), ДТНБ (Merch, Германия), раствор антибиотиков-антимикотиков для клеточных культур, Lipofectamine-2000, Cellfectin (Invitrogen, США), телячья фетальная сыворотка, трипановый синий (ThermoFisherScientific, США).

Для электрофореза белков использовали акриламид, бис-акриламид (Медиген, Россия), ТЕМЕД (Helicon, Россия), персульфат аммония, додецилсульфат натрия, стандартные смеси белков для электрофореза (Bio-Rad, США). Для агарозного ДНК-электрофореза использовались легкоплавкая агароза (Gerbu, Германия), маркеры молекулярного веса 1000 н.п., 100 н.п. (NEB, Великобритания), бромистый этидий, краситель для образцов (Qiagen, Германия). Остальные использованные реактивы относились к категории ХЧ.

Для молекулярного клонирования использовались: ферменты эндонуклеазы рестрикции, ДНК-лигаза, ДНК-полимераза (SibEnzyme, Россия; Agilent, США; NEB, Великобритания), наборы дезоксирибонуклеотид-трифосфатов (dNTP) (Agilent, США).

В качестве клеток-хозяев использовали бактериальные штаммы *E. coli* XL1Blue (Clontech, США), BL21(DE3)-CodonPlus(RIPL) (Stratagene, США) и DH10Bac (Invitrogen, США), культуру клеток из листовой совки *Spodoptera fruigiperda* «Sf9» (Invitrogen, США), культуру человеческих эмбриональных клеток почек «HEK293» (Sigma, США).

2.2 Буферные растворы и среды

Состав буферных растворов и сред представлен в таблице 1. Кроме этого в работе были использованы коммерческие среды для культивирования клеток насекомых «Sf-900 II SFM» и среда Грэйса (Invitrogen, США), для клеток HEK293 – «DMEM» (ПанЭко, Россия).

Таблица 1 – Состав буферных растворов и сред

Название	Состав
LB-среда	20 г/л бактотриптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 7,5 г/л NaCl
SOB-среда	20 г/л бактотриптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 0,6 г/л NaCl, 2,5 мМ KCl, 10мМ $MgCl_2$, 10 мМ $MgSO_4$
SOC-среда	SOB, 20 мМ глюкозы
LB-агар	1,5% агара в LB-среде
TFB буфер	0,1 М KCl, 10 мМ $CaCl_2$, 45 мМ $MnCl_2$, 10 мМ K MES, pH 6,2, 3 мМ $Co(NH_2)_6Cl_3$
PBS	0,1 М NaH_2PO_4, 0,1 М K_2HPO_4, 0,15 М NaCl
ML буфер	0,5 М NaCl, 50 мМ Трис-HCl, pH 7,5, 0,01% желатин, 10 мМ $MgCl_2$
Промывочный буфер для планшетов	PBS, 0,1% Tween20, 5 мМ ЭДТА
TGB	3 г/л трис, 1 г/л ДСН, 14 г/л глицин

2.3 Молекулярное клонирование

2.3.1 Получение конструкций для экспрессии изоформ люциферазы Metridia и Gaussia в клетках насекомых

В работе использовались гены изоформ люциферазы Metridia (MLuc), ранее полученные из созданной кДНК-библиотеки путем функционального скрининга, проведенного в лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН. Кроме этого, для получения люциферазы из копеподы *Gaussia princeps* (GpLuc) был использован ген *gpluc*, амплифицированный из коммерческой плазмиды pCMV-GpLuc (NanoLight Technology, США).

В работе использовались полноразмерные гены изоформ люциферазы *mluc2*, *mluc7* и *gpluc* длиной 570, 507 и 555 н.п., соответственно, кодирующие люциферазы с их собственными сигнальными пептидами. Для получения экспрессионных плазмид, обеспечивающих бакуловирусную экспрессию, методом ПЦР проводили амплификацию вставок с использованием праймеров, которые вводили терминальные рестрикционные сайты, а также кодировали полигистидиновый фрагмент, расположенный через последовательность ENLYFQG, специфичную для TEV-протеазы. Сконструированные олигонуклеотиды с перекрывающимися участками позволяли проводить двухстадийную ПЦР, в результате которой к исходным генам добавлялись запланированные модификации. Структуры олигонуклеотидов для получения конструкций представлены далее:

BamHI-MLuc7-ENLYFQG-HHHHHH-XhoI:
прямой 5’-GACGGATCCATGGATATCAAATTTATTTT-3’и обратные:
5’-TGATGATGACCTTGAAAGTACAAGTTCTCACGATCTCCAGCAAGAC-3’,
5’-TACTCGAGTCATTAGTGATGGTGATGGTGATGATGACCTTGAAAG-3’.

KpnI-MLuc2-ENLYFQG-HHHHHHH-XhoI:
прямой 5’-CAAGGTACCATGGGAGTCAAACTTATTTT-3’ и обратные:
5’-TGATGATGACCTTGAAAGTACAATTCTCACGATCTCCAGCCAAAC-3’,
5’-TACTCGAGTCATTAGTGATGGTGATGGTGATGATGACCTTGAAAG-3’.

KpnI-GpLuc-ENLYFQG-HHHHHHH-XhoI:
прямой 5’-ACAGGTACCATGGGAGTCAAAGTTCTG-3’ и обратные:
5’-TGATGATGACCTTGAAAGTACAAGTTCTCGTCACCACCGGCCCCC-3’,
5’-TACTCGAGTCATTAGTGATGGTGATGGTGATGATGACCTTGAAAG-3’.

После ПЦР-синтеза ДНК-фрагментов оценивали их размер и концентрацию, очищали с использованием набора «QIAquick PCR purification kit» (Qiagen, Германия) и сорбирующих колонок. Далее производили препаративную рестрикцию полученных фрагментов путем инкубации ДНК с эндонуклеазами рестрикции (BamHI/KpnI и XhoI) и последующего

препаративного разделения в агарозном геле. Вставки с полученными «липкими» концами очищали из геля при помощи набора «QIAquick gel extraction kit» (Qiagen, Германия), оценивали концентрацию и использовали для лигирования (Т4-ДНК-лигазой (SibEnzyme, Россия)) с заранее подготовленным вектором для клонирования pFastBac1 (Invitrogen, США), обработанным соответствующими рестриктазами, в молярном соотношении ~1:3.

Лигазную смесь инкубировали при 64°С для инактивации фермента и использовали для трансформации химически компетентных клеток *E. coli* XL1Blue, приготовленных при помощи TFB-буфера, обеспечивающего эффективную трансформацию. Лигазную смесь инкубировали с аликвотой клеток в течение 30 мин при 0°С, затем проводили трансформацию путем теплового шока (45 с, 42°С). К смеси добавляли 5-кратный объем среды SOC и инкубировали (1 ч, 37°С), после чего рассевали на чашки с LB-агаром, содержащим ампициллин в концентрации 150 мкг/мл.

Полученные бактериальные колонии наращивали в жидкой культуре и использовали для препаративного выделения плазмидной ДНК методом щелочного лизиса с помощью набора «Plasmid miniprep kit» (Qiagen, Германия). Правильность конструкций была подтверждена рестриктным анализом и секвенированием, проведенном в ЦКП «Геномика» (г. Новосибирск).

2.3.2 Проведение олигонуклеотид-направленного мутагенеза

Олигонуклеотид-направленный мутагенез проводили методом ПЦР с использованием набора «Quick-change site-directed mutagenesis kit» (Agilent, США), позволяющего вносить планируемые изменения в нуклеотидные последовательности двуцепочечной молекулы ДНК.

Имеющуюся плазмидную ДНК pFastBac1-S-MLuc7-His6, содержащую полноразмерный ген изоформы люциферазы *mluc7* с природным сигнальным пептидом и последовательностью, кодирующей полигистидиновый пептид, использовали в качестве матрицы. ПЦР-амплификацию проводили с

использованием высокоточной ДНК-полимеразы «Pfu-Turbo DNA» (Agilent, США) и двух пар праймеров. Для внесения точечной мутации Y72F использовался прямой праймер 5’-GCCAAAATGAAGCAGTTTATTCCAGGAAGATG-3’ в паре с комплементарным; для получения мутантного варианта с заменой Y80F – 5’-CAGGAAGATGTCATGACTTTGGAGGAGACAAGAA-3’ в паре с комплементарным ему.

Для снижения уровня контаминации мутантных ДНК и матричной последовательности метилированные участки на матричной ДНК расщепляли путем инкубации с ферментом DpnI (3 ч, 37°C). После этого проводили трансформацию плазмиды в клетки *E. coli* XL1Blue и по схеме, описанной ранее, выделяли плазмидную ДНК.

Наличие точечных аминокислотных мутаций было подтверждено секвенированием ДНК, проведенном в ЦКП «Геномика» (г. Новосибирск).

2.3.3 Получение конструкций для экспрессии бифункциональных гибридных белков

Для создания генетических конструкций использовали ген люциферазы MLuc7 и ген, кодирующий тяжелую и легкую цепи миниантитела 14D5a, которые были расположены в разных комбинациях. Домены располагались через гибкий глицин-сериновый мостик, который обеспечивал подвижность элементов гибридных белков, а также представлял собой последовательность уникального рестрикционного сайта BamHI, позволяющего в дальнейшем изменять составляющие части конструкции.

ПЦР-амплификацию фрагментов ДНК, необходимых для сборки конструкций, проводили с использованием специфических олигонуклеотидов. Сконструированные праймеры имели перекрывающиеся последовательности, необходимые для дальнейшего слияния фрагментов.

Для синтеза конструкции pFastBac5-S-14D5a-GSG-ML7-H7 (№1)

использовали следующие олигонуклеотиды:

5’-AAAATGATAACCATCTCGC-3’ и

5’-CCAGCTGCACCTCGGCAGCCTGGACCAATGCAA-3’ для амплификации фрагмента, кодирующего сигнальный пептид;

5’-TTGCATTGGTCCAGGCTGCCGAGGTGCAGCTGG-3’ и

5’-ATTGTTTACAGTAGGGTTGCCGGATCCACGTTTGATTTCCAGC-3’ для амплификации последовательности, кодирующей домен миниантитела (содержащей -GSG-стык с BamHI-сайтом);

5’-GCTGGAAATCAAACGTGGATCCGGCAACCCTACTGTAAACAAT-3’ и

5’-TACTCGAGTCATTAGTGATGGTGATGGTGATGATGACCTTGAAAG-3 для получения последовательности MLuc7-His7, перекрывающейся с фрагментом миниантитела (содержащие рестрикционные сайты BamHI и XhoI).

Для синтеза конструкции pFastBac5-S-ML7-GSGG-14D5a-H7 (№2) использовались следующие праймеры:

5’-AAAATGATAACCATCTCGC-3’ и

5’-CAGCTGCACCTCGGCACCACCGGATCCACGATCTCCAGCAAGAC-3’ для амплификации последовательности, кодирующей MLuc7 с сигнальным пептидом (содержащей -GSGG-стык с BamHI-сайтом);

5’-GTCTTGCTGGAGATCGTGGATCCGGTGGTGCCGAGGTGCAGCTG-3’ и

5’-ATGATGATGACCTTGAAAGTACAAGTTCTCACGTTTGATTTCCAGC-3’

для получения последовательности, кодирующей миниантитело (перекрывающейся с предыдущим фрагментом и кодирующей -GSGG-стык с BamHI-сайтом);

5’-AAAATGATAACCATCTCGC-3’ и

5’-TACTCGAGTCATTAGTGATGGTGATGGTGATGATGACCTTGAAAG-3’

для добавления к общей слитой последовательности полигистидинового фрагмента и сайта рестрикции XhoI).

Сборка целевых фрагментов массой ~1400 н.п. осуществлялась методом ПЦР-слияния отдельных фрагментов с использованием терминальных

олигонуклеотидов в режиме амплификации с постепенным понижением температуры отжига праймеров.

Полученные слитые фрагменты очищались с использованием набора «QIAquick PCR purification kit» (Qiagen, Германия) на сорбирующих колонках, обрабатывались специфическими рестриктазами (KpnI/XhoI). ДНК-фрагменты с «липкими» концами препаративно разделяли в агарозном геле, далее вырезали полосы нужного размера из геля (~1400 н.п.) и препаративно выделяли ДНК с помощью набора «QIAquick gel extraction kit» (Qiagen, Германия).

Далее фрагменты клонировали в вектор pFastBac5 по соответствующим сайтам рестрикции с использованием ДНК-лигазы. Лигазные смеси трансформировались в клетки *E. coli* (штамм XL1-Blue), затем из полученных клонов выделяли плазмидную ДНК. Правильность полученных конструкций pFastBac5-S-14D5a-GSG-ML7-H7 (№1) и pFastBac5-S-ML7-GSGG-14D5a-H7 (№2) была подтверждена секвенированием (проведено в ЦКП «Геномика», г. Новосибирск).

2.4 Получение вирусных стоков для бакуловирусной «Bac-to-Bac» экспрессии белков в клетках насекомых Sf9

Конструкции, полученные путем клонирования генетических элементов по специфическим сайтам в специальные бакуловирусные векторы pFastBac1 и pFastBac5, использовались для трансформации в штамм *E. coli* DH10Bac. Методом бело-голубой селекции на LB-агаре с реагентом «X-gal» (Sigma, США) были отобраны белые рекомбинантные колонии, несущие бакуловирусные плазмиды – бакмидные ДНК, имеющие в своем составе интересующие вставки. После ПЦР-скрининга данных колоний с использованием специфических праймеров были выделены препараты бакмидной ДНК. Для выделения бакмид использовались растворы из набора «Plasmid miniprep kit» (Qiagen, Германия). Бакмидные ДНК в дальнейшем

трансфецировались в клетки Sf9 с помощью реагента «Cellfectin» (Invitrogen, США), который обеспечивает проникновение бакмиды в комплексе с липидами сквозь мембрану клеткок насекомых. Трансфекцию производили с использованием среды Грэйса (Invitrogen, США) с добавлением смеси антибиотиков-антимикотиков.

При трансфекции использовали культуры клеток, находящихся в экспоненциальной фазе роста с плотностью ~10^6 кл/мл. Подсчет клеток производили путем их фиксации трипановым синим и микроскопирования в камере Горяева.

Спустя 4 суток после трансфекции вирусные стоки использовали для повторного заражения клеток в большем объеме для амплификации вирусных частиц. Вирусные частицы второго поколения изолировались путем центрифугирования (2000 x g, 10 мин), супернатант использовали для инфицирования терминальных клеточных культур. Инкубацию культур проводили в бессывороточной среде «SF-900 II SFM» (Invitrogen, США) с добавлением 0,1% пеногасителя Pluronic-68 (Invitrogen, США) при 28ºС с постоянным перемешиванием в течение 2,5–3 дней. Эффективность экспрессии целевых белков оценивали по значениям биолюминесцентной активности культуральной жидкости.

2.5 Выделение и очистка белков из культуральной среды клеток Sf9

Для концентрирования и разделения белков из культуральной среды применялась методика дифференциального высаливания белков 40–65% сульфатом аммония. Культуру клеток предварительно центрифугировали (2000 x g, 10 мин), к среде порционно добавляли сульфат аммония, перемешивали на магнитной мешалке, центрифугировали (13000 об/мин, 30 мин), надосадочную жидкость дополнительно фильтровали при помощи 1,2 мкм фильтров на вакуумном насосе. Белковый осадок растворяли в буфере для металл-аффинной хроматографии и проводили очистку в буфере, содержащем 20 мМ Трис-HCl

pH 7,5, 150 мМ NaCl, 5% глицерина и 20 мМ имидазола. Металл-аффинная хроматография проводилась на колонке «His-trap HP» (GE Healthcare, Великобритания) со ступенчатым повышением концентрации имидазола. Фракцию, элюированную 300 мМ имидазола, концентрировали в центрифужных концентраторах «Amicon» (Millipore, Германия) и переводили в буфер, содержащий 20 мМ Трис-HCl pH 7,5, 150 мМ NaCl, 0,5 мМ ЭДТА. Полученную фракцию в течение 10 ч обрабатывали TEV-протеазой (в молярном соотношении 1:50), которая обеспечивала расщепление полигистидинового фрагмента от люциферазы по специфическому сайту. Для разделения компонентов после сайт-направленного протеолиза проводили металл-аффинную хроматографию на сорбенте «Talon» (Clontech, США), где собирали фракцию, прошедшую сквозь колонку, смытую 20 мМ имидазолом в буфере с 150 мМ NaCl, 20 мМ Трис-HCl, pH 7,5. Далее проводили гель-фильтрацию белкового препарата на колонке «Superdex-75» (GE Healthcare, США) в буфере, содержащем 20 мМ Трис-HCl pH 7,5, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 5% глицерина и 0,02% NP-40.

Хроматографические очистки были проведены с помощью систем низкого давления BioLogic LP (Bio-Rad, США) и высокого давления AKTA purifier (GE Healthcare, Великобритания). Использованные при очистках буферы фильтровались с помощью 0,22 мкм нитроцеллюлозных фильтров (Millipore, США) на вакуумном насосе.

2.6 Определение биолюминесцентной активности люцифераз

Биолюминесцентную активность белков измеряли люминометром (модель «БЛМ 003», СКБ Наука, Россия), оснащенным термостатом и программным обеспечением для обработки цифрового сигнала (BLM-8812, Оберон-К, Россия). В кювету для измерения в стандартных условиях вносили 500 мкл ML-буфера (0,5 М NaCl, 50 мМ Трис-HCl, pH 7,5, 10 мМ $MgCl_2$, 0,01% желатин) и 5 мкл образца белка. Для запуска биолюминесцентной реакции в

кювету автоматическим дозатором (Hamilton, США) впрыскивали 5 мкл целентеразина (1 мкМ). За биолюминесцентную активность образцов принимали среднее значение как минимум трех параллельных измерений. При разведении препаратов люцифераз для измерения использовали стабилизирующий ML-буфер с добавлением 0,02% неионного детергента NP-40 (Sigma, США).

2.7 Измерение спектров биолюминесценции и флуоресценции

Спектры биолюминесценции и флуоресценции регистрировались на флуоресцентном спектрофотометре «Varian Cary Eclipse» (Agilent, США), оснащенном термоконтроллером «Cary Single cell Peltier Accessory» (Agilent, США). Все спектры были корректированы на чувствительность ФЭУ к различным длинам волн с помощью программного обеспечения прибора. Спектры поглощения, спектры флуоресценции люцифераз в концентрации 0,05–0,1 мг/мл измеряли в буфере, содержащем 20 мМ Трис-HCl, pH 7,5, 150 мМ NaCl. Измерения проводились при возбуждении 275 и 295 нм для тирозиновой и триптофановой флуоресценции, соответственно, при установленной ширине щели 5 мм. Спектры биолюминесценции измеряли в белковых растворах в ML-буфере, для запуска биолюминесцентной реакции в кювету впрыскивали 1 мкМ целентеразина.

2.8 Измерение спектрокинетики методом «остановленной струи»

Кинетику биолюминесценции исследуемых люцифераз измеряли методом «остановленной струи» на спектрометре «SX-20» (Applied Photophysics, Великобритания) с объемом камеры 20 мкл и мертвым временем 1,1 миллисекунды. Температурный контроль обеспечивался с помощью подключенного к прибору водяного термостата. Измерения проводились при оптимальной для каждого белка температуре. В шприцы, предназначенные для

одновременного впрыскивания в измерительную камеру, помещали образец белка с концентрацией 5 нМ в 20 мМ Трис-HCl, pH 7,5 и 150 мМ NaCl и раствор с различными концентрациями целентеразина в том же буфере. Константы кинетики подъема и спада биолюминесцентных реакций были рассчитаны с помощью программы «Sigma Plot 12.5» (Systat Software, Inc., США). Приведенные значения представляют собой среднее 3-х независимых измерений.

2.9 Определение температуры плавления белков

Для определения значения температурного перехода при тепловой денатурации белков был использован метод исследования собственной триптофановой флуоресценции при последовательном нагревании. Флуоресценцию белков измеряли при помощи флуоресцентного спектрофотометра «Varian Cary Eclipse», оснащенного термоконтроллером «Cary Single cell Peltier Accessory» (Agilent technologies, США). Нагревание кюветы с образцом производилось со скоростью 1ºC/мин в диапазоне 20–95ºC. Для исследования использовали образцы белков в концентрации 0,1–0,15 мг/мл в буфере, содержащем 150 мМ NaCl и 20 мМ HEPES, pH 7,5. Возбуждение триптофановой флуоресценции осуществляли λ=295 нм, регистрация интенсивности проводилась на 330 нм.

Завершенность теплового перехода α рассчитывали, используя уравнение (1) [Permyakov, Burstein, 1984]:

$$\alpha = \frac{I - I_f}{I_u - I_f}, \qquad (1),$$

где I – исходная интенсивность флуоресценции, а параметры I_f и I_u – интенсивность флуоресценции до и после теплового перехода. Финальные кривые были нормализованы и описаны сигмоидной функцей Больцмана (2), определяющей завершенность перехода α от значения температуры T:

$$\alpha(\mathrm{T}) = 1 - \frac{1}{1+e^{\frac{T-T_{0,5}}{d}}} \quad (2),$$

где $T_{0,5}$ – температура полуперехода, (Tm), d – угол наклона нормализованной кривой. Расчеты были произведены с помощью программного обеспечения «OriginPro 9.0» (OriginLab Corp., США).

2.10 Определение свободных тиольных групп

Количественное определение концентрации свободных сульфгидрильных групп проводили с помощью колориметрического метода по Эллману [Ellman, 1959]. Белковые препараты с известной концентрацией растворяли в 1 мл денатурирующего раствора, содержащего 6 М гуанидин-гидрохлорида в 0,1 М Трис-HCl, pH 8,0. К пробам добавляли 0,18 мМ ДТНБ (5,5'-дитиобис-(2-нитробензойной кислоты) (Merch, Германия), инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре и измеряли поглощение при 412 нм. Количество тиольных групп на молекулу белка расчитывали с учетом коэффициента экстинкции гуанидин-гидрохлорида 13700 $см^{-1}М^{-1}$.

2.11 Экспрессия люциферазных изоформ в клетках HEK293

Для исследования транзиентной экспрессии изоформ люциферазы MLuc7 и MLuc164 в клетках HEK293 (Human embryo kidney) полноразмерные гены были клонированы в экспрессионный эукариотический вектор pcDNA3.1+. Контроль экспрессии осуществлялся цитомегаловирусным промотором CMV. В качестве контроля использовали клетки, трансфецированные исходным вектором pcDNA3.1+.

Клетки HEK293 культивировали в 96-луночном планшете в питательной среде Игла в модификации Дульбекко – DMEM (ПанЭко, Россия), с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки в условиях 5% CO_2 при 37ºС. Трансфекцию клеток HEK293 проводили с помощью реагента

«Lipofectamine 2000» (Invitrogen, США) согласно протоколу производителя. Через 7 ч культуральную среду заменяли на свежую, для анализа отбирали аликвоты и измеряли биолюминесцентную активность культуральной жидкости.

2.12 Модельный твердофазный биолюминесцентный иммуноанализ

Модельный анализ с использованием полученных биоспецифических биолюминесцентных меток проводился в лунках планшета. В первую очередь в лунки вносили по 100 мкл гликопротеина E, растворенного в буфере PBS, pH 7,0, в ряде концентраций от 0,05 до 1000 нг/мл, инкубировали в течение 1 ч при 37ºС без перемешивания. Лунки планшета промывали при помощи автоматического устройства «Аквамарин» (BioSan, Россия) буфером, содержащим PBS, pH 7,0, 150 мМ NaCl, 0,02% Tween-20, 5 мМ ЭДТА. Далее проводили блокировку, внося в каждую лунку 160 мкл 0,5% БСА, разведенного в буфере PBS, pH 7,0, инкубировали в термошейкере при 23ºС в течение 1 ч с интенсивным перемешиванием. После удаления содержимого и последующей промывки осуществляли сорбцию анализируемых меток, внося препараты белков, разведенных в буфере ML, с концентрацией около 10 нг/мл в объеме 100 мкл в каждую лунку. После 1 ч перемешивания при 23ºС содержимое лунок выливали, вносили промывочный буфер с добавлением 0,07% NP-40, инкубировали в течение 10 мин, далее следовал 1 цикл автоматической промывки. Световой сигнал регистрировали на планшетном люминометре «Mithras» (Berthold, Германия) путем быстрого впрыска 100 мкл 2 мкМ целентеразина, растворенного в буфере ML, в каждую лунку. Полученные цифровые данные обрабатывали программами «MS Excel-16» (Microsoft corp., США), «SigmaPlot 12.5» (Systat Software, США).

2.13 Биолюминесцентный «сэндвич»-анализ с использованием природных клещевых экстрактов

Для тестирования биоспецифических меток на препаратах клещей использовались клещевые экстракты, предоставленные Красноярской санитарно-эпидемиологической службой. В ходе анализа на первой стадии осуществляли сорбцию полноразмерного антитела 1B1, специфичного к гликопротеину E, в объеме 100 мкл с концентрацией 5 мкг/мл, инкубировали 1 ч при 37ºС без перемешивания. После блокировки поверхности лунок 0,5% БСА и промывки вносили лизированные клещевые препараты в объеме 100 мкл. На следующем этапе вносили образцы гибридных белков миниантитело-люцифераза в концентрации около 10 нг/мл в объеме 100 мкл в каждую лунку. Далее действовали по схеме, описанной для проведения модельного твердофазного анализа. Данные, представленные в настоящей работе, являются результатами как минимум трех независимых повторов.

Для подтверждения данных одновременно с биолюминесцентным анализом тестировали образцы клещевых экстрактов с использованием набора «ВектоВКЭ-антиген» (Вектор-БЕСТ, Россия). Анализ проводился на имеющихся в наборе преактивированных лунках планшета по схеме, представленной производителем. Оптическая плотность финальных растворов в лунках планшета регистрировалась на спектрофотометре (Bio-Rad, США) при установленной длине волны λ=450 нм. Результаты оценивали по формуле (3):

$$ОП_{крит} = ОП_{ср}К^{-} + 0,25 \quad (3),$$

где $ОП_{крит}$ – критическое значение оптической плотности, $ОП_{ср}К^{-}$ – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом. При значениях оптической плотности исследуемой пробы $ОП_{обр} \geq ОП_{крит}$ результат считался положительным, при $ОП_{обр} < ОП_{крит}$ – отрицательным.

2.14 Качественная и количественная оценка белковых препаратов

Концентрацию белков определяли спектрофотометрически по методу Лоури при помощи наборов «Bio-Rad Lowry protein assay» (Bio-Rad, США), а также «Pierce BCA protein assay kit» (Thermo Scientific, США), в качестве стандарта для калибровки использовался BSA (Bio-Rad, США).

ДСН-ПААГ электрофорез проводили в камере (PerkinElmer, США) в буфере TGB с постоянной подачей тока 10 мА. Денатурированные образцы готовили с использованием лизирующего буфера (2% ДСН, 10% глицерин, 45 мМ Трис-HCl, pH 6,8, 50 мМ ДТТ, 5% β-меркаптоэтанол, бромфеноловый синий) и кипятили в течение 3 мин. При проведении электрофореза в полунативных условиях образцы не денатурировали и для приготовления использовали буфер без ДТТ и β-меркаптоэтанола, камеру во время процедуры охлаждали подведенной в нее проточной водой.

Для окрашивания гелей использовали раствор (20% уксусной кислоты, 50% этанола, Coomassie R-250 (Bio-Rad, США)) с последующей промывкой. В случае с окрашиванием гистидин-содержащих белков предварительно фиксировали гель в растворе с 10% ускусной кислотой и 50% этанолом в течение 20 мин, отмывали водой в течение 10 мин и заливали раствором флуоресцентного красителя «InVision» (Invitrogen, США). Съемку гелей при естественном освещении или в ультрафиолетовом свете осуществляли в камере AlphaImager (AlphaInnotech, США).

ГЛАВА 3. Получение изоформ рекомбинантных люцифераз *Metridia longa* в нативной форме из клеток насекомых

Ранее в лаборатории фотобиологии Института биофизики СО РАН была создана библиотека генов ярко светящихся планктонных рачков-копепод *Metridia longa,* собранных в ходе биологической экспедиции на Белое море, Россия. Методом функционального скрининга по биолюминесцентной активности с субстратом целентеразином из кДНК-библиотеки был выделен ряд клонов, несущих кДНК-гены для изоформ люциферазы [Markova et al., 2004; Borisova et al., 2008]. Две из изолированных изоформ, MLuc164 и MLuc39, были частично охарактеризованы и успешно применены в качестве репортерных молекул в диагностических анализах [Markova et al., 2004, 2012; Stepanyuk et al., 2008; Borisova et al., 2008; Murakami et al., 2011; Matta et al., 2018].

Основной проблемой, препятствовавшей характеризации люциферазы *M. longa,* было получение достаточных количеств рекомбинантного белка в его нативной форме вследствие наличия большого количества дисульфидных связей в молекуле люциферазы. Это обстоятельство существенно затрудняет корректный фолдинг люциферазы при использовании бактериальных систем экспрессии, и, соответственно, получение достаточных для характеризации количеств гомогенного препарата рекомбинантного белка. Для изоформы MLuc164 была показана возможность получения рекомбинантной люциферазы в нативной форме из клеток насекомых [Stepanyuk et al., 2008]. В настоящем исследовании эта работа продолжена и расширена, в результате чего на основе использования бакуловирусной секретируемой экспрессии в клетках насекомых разработана технология получения корректно свернутых препаратов люцифераз копепод с продукцией высокочистого белка 6–7 мг из 1 литра культуры. С использованием данной системы были впервые в чистом виде получены и охарактеризованы две новые люциферазные изоформы, MLuc7 и MLuc2, обладающие уникальными свойствами, которые потенциально

расширяют спектр применения биолюминесцентных репортеров. Свойства новых изоформ сопоставлены с характеристиками коммерчески реализуемой и широко используемой люциферазы GpLuc из близкородственной копеподы *Gaussia princeps* (семейство Metridinidae), которая также была впервые получена в виде нативного гомогенного препарата при использовании разработанной технологии.

3.1 Сравнение последовательностей новых изоформ MLuc7 и MLuc2 люциферазы *Metridia longa*

Одной из новых изоформ люциферазы из копеподы *Metridia longa* стал фермент под кодовым названием MLuc7. Последовательность мРНК (729 н.п., включая сигнал полиаденилирования), идентифицированная в ходе функционального скрининга библиотеки, зарегистрирована в системе «GeneBank» под номером KP242023. Аминокислотная последовательность изоформы (AJC98141) включает 169 аминокислотных остатков, кодирующих 16,5-кДа зрелый белок. На сегодняшний день такая молекулярная масса люциферазы является наименьшей среди известных люцифераз, вовлеченных в обнаруженные биолюминесцентные системы различных организмов.

Аминокислотная структура новой изоформы MLuc7 отличается достаточно высокой степенью гомологии с остальными копеподными люциферазами (Рис. 13). N-концевая часть зрелого фермента MLuc7 является короткой и близкой по размеру с делетированными вариантами MLuc164 [Markova et al., 2012]. Предположительно, этот самый небольшой среди разнообразия изоформ фермент может являться минимальной основой каталитического домена гомологичных копеподных люцифераз.

Следует отметить, что как и остальные изоформы, MLuc7 представляет собой цистеин-богатый белок, несущий в консервативной части 10 цистеиновых остатков. Ранее экспериментально было показано, что восстановительные условия приводят к полной потере каталитической

активности фермента. Из этого следует, что нативная люцифераза содержит дисульфидные связи, необходимые для функционирования биолюминесцентного белка.

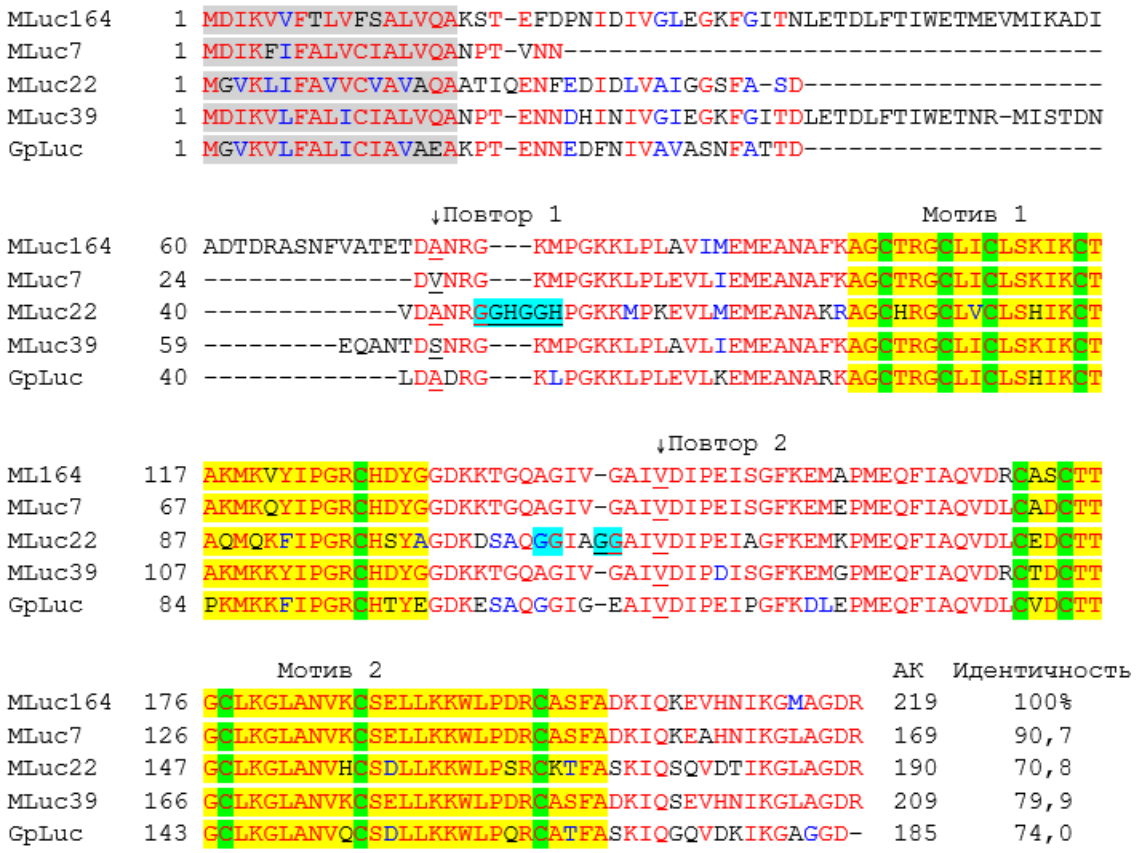


Рисунок 13 – Аминокислотные последовательности изоформ MLuc и GpLuc. Серым цветом обозначен сигнальный пептид, зеленым выделены консервативные цистеиновые остатки. Выравнивание последовательностей производилось на платформе ClustalW; красные – одинаковые аминокислотные остатки, синие – схожие, черные – различные

Получение рекомбинантных белков, имеющих в третичной структуре большое количество дисульфидных связей – проблематичная задача при использовании традиционной бактериальной экспрессии в *E. coli*. Окислительно-восстановительный потенциал бактериальной цитоплазмы не позволяет сформировать растворимый белок в правильной природной конформации. Ранее был предпринят ряд попыток получения люциферазы в нативном виде: путем ее рефолдинга из телец включения, экстракции периплазматического содержимого, растворимой экспрессии в цитоплазме в

специальных штаммах, предназначенных для получения рекомбинантных белков с множественными S-S связями («Rozetta», «Shuffle»). Однако ни один из подходов не обеспечил получения гомогенного белка MLuc7 в нативном виде в существенном количестве. В связи с проблемами синтеза люцифераз в бактериальной системе экспрессии в ходе работы был предложен альтернативный путь получения люциферазы MLuc7 в природной форме для последующего анализа и описания.

Другая изолированная новая изоформа MLuc2 (зрелый белок обладает молекулярной массой 18,5 кДа, код в базе данных «GeneBank» KY124138) явно представляет другую паралогичную группу, поскольку имеет очень сильные отличия в последовательности от 3 других изоформ люциферазы *M. longa*. Идентичность аминокислотной последовательности новой изоформы MLuc2 составляла лишь 70% по сравнению с последовательностями других MLuc-изоформ. Анализ аминокислотных гомологий также выявил, что новая изоформа MLuc2 имеет большее сходство с люциферазами *M. pacifica* (MpLuc) и *M. okhotensis* (MoLuc), идентичность составляет до 91%. Кроме этого, новая изоформа MLuc2 демонстрировала различия в строении структуры повторов, находящихся в консервативной области люцифераз (Рис. 14).

```
MLuc2-1     52        -GKKMPKEVLMEMEANAKRAGCHRGCLVCLSHIKCTAQMQKFIPGRCHSYAGDKDSAQGGIAGGA-115
MLuc7-1     25-VNRGKMPGKKLPLEVLIEMEANAFKAGCTRGCLICLSKIKCTAKMKQYIPGRCHDYGGDKKTGQAGIVGA-  94
MLuc164-1   75-ANRGKMPGKKLPLAVIMEMEANAFKAGCTRGCLICLSKIKCTAKMKVYIPGRCHDYGGDKKTGQAGIVGA- 144
MLuc39-1    65-SNRGKMPGKKLPLAVLIEMEANAFKAGCTRGCLICLSKIKCTAKMKKYIPGRCHDYGGDKKTGQAGIVGA- 134
GpLuc-1     42-ADRGKLPGKKLPLEVLKEMEANARKAGCTRGCLICLSHIKCTPKMKKFIPGRCHTYEGDKESAQGGIGEA- 101
MLuc2-2    124        -GFKEMKPMEQFIAQVDLCEDCTTGCLKGLANVHCSDLLKKWLPSRCKTFASKIQSQVDTIKGLA-187
MLuc7-2     96-VDIPEISGFKEMEPMEQFIAQVDLCADCTTGCLKGLANVKCSELLKKWLPDRCASFADKIQKEAHNIKGL- 165
MLuc164-2  146-VDIPEISGFKEMAPMEQFIAQVDRCASCTTGCLKGLANVKCSELLKKWLPDRCASFADKIQKEVHNIKGM- 215
MLuc39-2   136-VDIPDISGFKEMGPMEQFIAQVDRCTDCTTGCLKGLANVKCSELLKKWLPDRCASFADKIQSEVHNIKGL- 205
GpLuc-2    113-VDIPEIPGFKDLEPMEQFIAQVDLCVDCTTGCLKGLANVQCSDLLKKWLPQRCATFASKIQGQVDKIKGA- 182
```

Рисунок 14 – Сравнение гомологичных повторов (1 и 2) копеподных люцифераз: красным обозначены одинаковые аминокислотные остатки, синим – схожие, черным – различные

Для многих идентифицированных изоформ данные участки проявляют достаточную степень сходства. Однако MLuc2 демонстрирует укороченные консенсусные последовательности по сравнению с остальными описанными

люциферазами из *M. longa* и меньшую степень идентичности между повторами 1 и 2. Можно предположить, что такие различия возникли благодаря тому, что данная изоформа является эволюционно более молодой, что и обусловливает значительную отдаленность от предковых генов.

3.2 Использование бакуловирусной системы экспрессии в клетках насекомых для секреции рекомбинантных люцифераз

Ген люциферазы *mluc7* (507 н.п.), кодирующий аминокислотную последовательность со своим собственным сигнальным пептидом, был амплифицирован специфическими праймерами. В структуру последовательности были введены сайты клонирования и полигистидиновый фрагмент на С-конец белка для его аффинной очистки, между которыми вводился сайт расщепления TEV-протеазы (-ENLYFQ/G HHHHHH) для удаления аффинного «хвоста» в процессе очистки. ПЦР-амплификацию проводили в 2 этапа с промежуточной очисткой при использовании двух перекрывающихся 3’-праймеров, поскольку вводимая дополнительная С-концевая последовательность была слишком длинной для кодирования только одним 3’-праймером. Далее модифицированный ген был клонирован по сайтам BamHI-XhoI в коммерческую плазмиду pFastBac1 (Invitrogen, США) (Рис. 15А) и трансформирован в штамм *E. coli* DH10Bac (Invitrogen, США). Данные клетки содержат бакуловирусный вектор (бакмиду) с сайтом для транспозона mini-*att*Tn7, а также вспомогательную плазмиду, позволяющую синтезировать ферменты для осуществления транспозиции интересующего гена из рекомбинантного вектора в бакмиду. Методом бело-голубой селекции на LB-агаре с реагентом X-gal были отобраны белые рекомбинантные колонии, несущие бакмиды, имеющие в своем составе ген *mluc7* (Рис. 15Б). После ПЦР-проверки данных колоний препаративно была выделена бакмидная ДНК, которая в дальнейшем использовалась для трансфекции клеток Sf9 с помощью реагента Cellfectin, который обеспечивает проникновение бакмиды в комплексе

с липидами в клетки насекомых. После получения первичных вирусных стоков и их амплификации было произведено заражение терминальной культуры продуцентов.

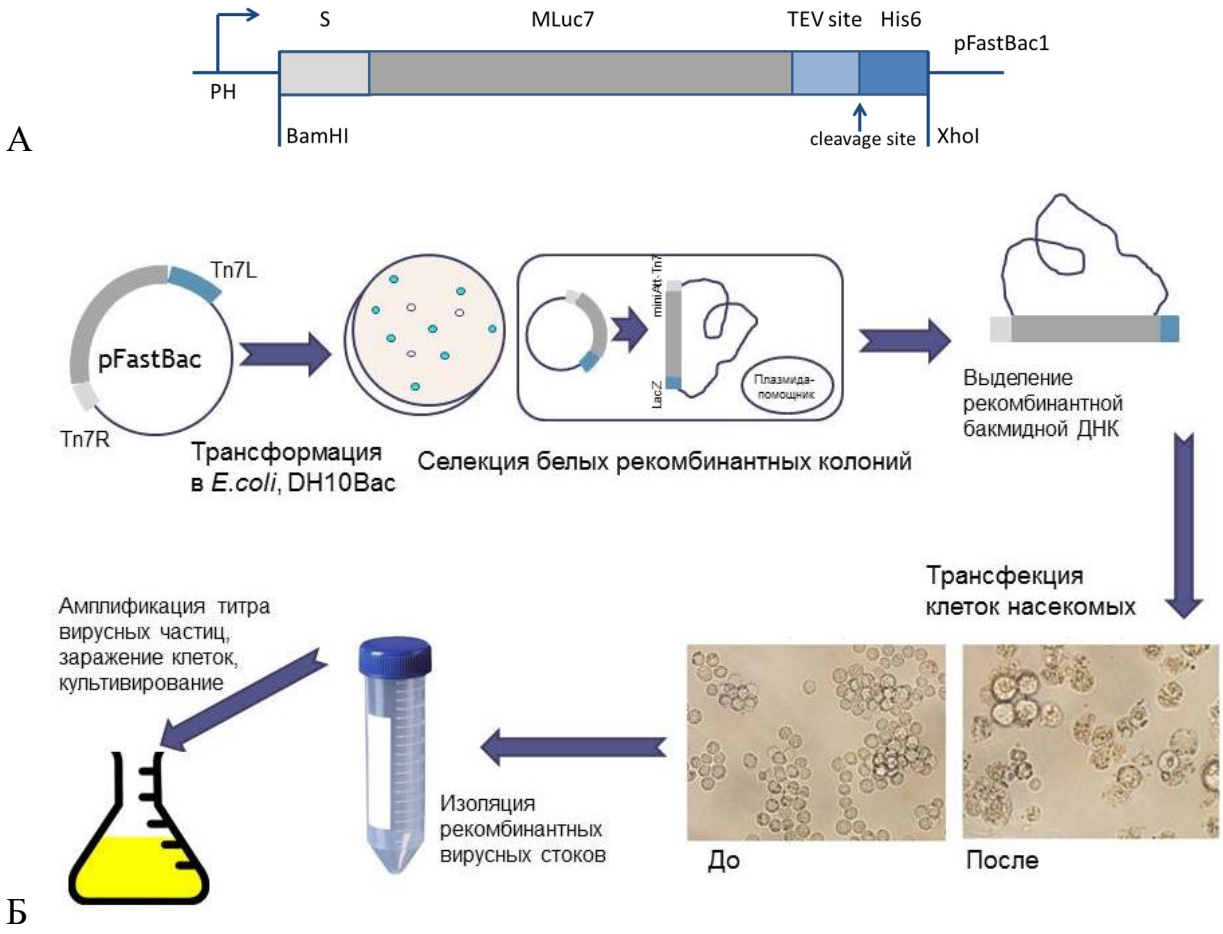


Рисунок 15 – А – схема генетической конструкции на основе вектора pFastBac1 для экспрессии *mluc7* в клетках Sf9, где S – сигнальный пептид, PH – полиэдриновый промотор, His6 – полигистидиновый фрагмент для аффинной очистки, TEV-сайт – место специфического расщепления протеазой; Б – схема получения бакмид и трансфекции клеток насекомых

Аналогичным образом были получены генетические конструкции для экспрессии в клетках насекомых Sf9 другой новой изоформы MLuc2 и люциферазы GpLuc из близкородственной копеподы *Gaussia princeps*. Для получения GpLuc в клетках Sf9 был использован оптимизированный для клеток человека ген, амплифицированный из плазмиды pCMV-GLuc (NanoLight Technology, США).

3.3 Очистка люцифераз из культуральной среды клеток Sf9

Для получения препаратов копеподных люцифераз из культуральной жидкости клеток насекомых необходимо было разработать эффективную систему продукции и очистки целевого белка. Время культивирования после заражения культуры рекомбинантным бакуловирусом, несущим люциферазный ген, было подобрано эмпирически. Несмотря на то, что активность секретируемой люциферазы в среде зараженных Sf9 клеток нарастала постоянно, оптимальное время культивирования составило 2,5–3 суток. При превышении этого срока наблюдали деградацию целевых рекомбинантных белков.

Люциферазу MLuc7 выделяли из бессывороточной среды клеток Sf9, культивировавшихся при 28ºС с постоянным перемешиванием. Для концентрирования культуральной среды (V~400 мл), проявляющей биолюминесцентную активность, была использована методика высаливания белков сульфатом аммония (Рис. 16А).

В ходе оптимизации очистки люциферазы MLuc7 из культуральной жидкости были подобраны условия дифференциального высаливания белка с использованием сульфата аммония, порционно добавляемого к среде. Показано, что концентрации $(NH_4)_2SO_4$ в диапазоне 40–65% приводят к осаждению люциферазы. Применение дифференциального осаждения позволило провести эффективное выделение целевого белка, снизив уровень белковой контаминации на первых стадиях очистки.

Использование генетической конструкции, кодирующей люциферазу с полигистидиновым фрагментом, обеспечивало последующую аффинную очистку белка. Полученный осадок сконцентрированного белка растворяли в буфере для металл-аффинной хроматографии (IMAC) и наносили на никель-содержащий агарозный сорбент («His-Trap HP», GE, Великобритания). Фракция белка, аффинно связавшаяся с сорбентом, элюировалась 0,3 М имидазола, в дальнейшем препарат белка переводили в исходный буфер. Введение 20 мМ

имидазола в буфер для нанесения позволило существенно снизить неспецифическую сорбцию и повысить чистоту получаемого препарата после первой аффинной хроматографии.

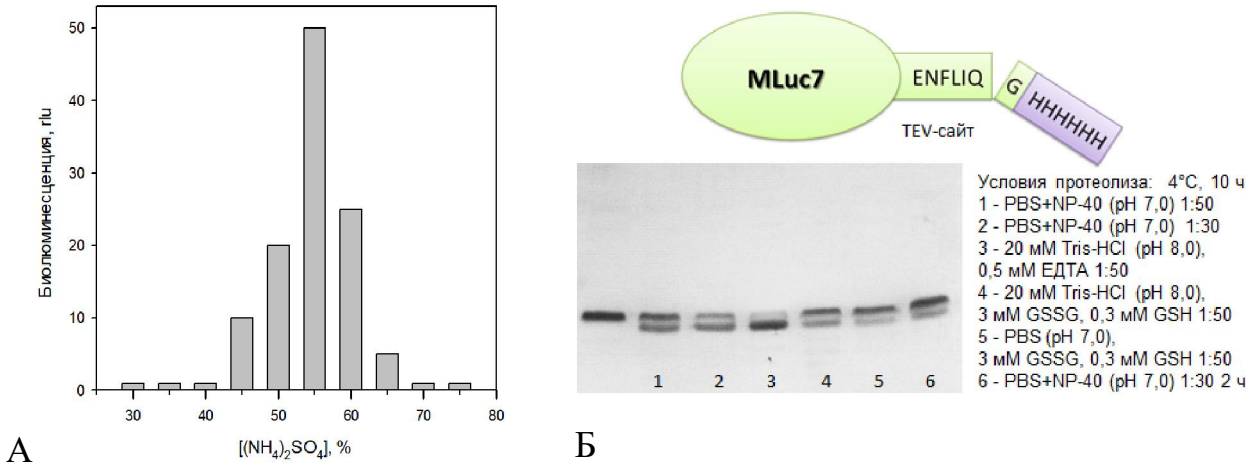


Рисунок 16 – Оптимизация выделения MLuc7 из культуральной среды Sf9:
А – биолюминесцентная активность осадка MLuc7, полученного при аналитическом дифференциальном высаливании белков культуральной жидкости, rlu – условные световые единицы; Б – подбор условий для расщепления гистидинового фрагмента, оценка эффективности с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза

Произведенный аналитический подбор условий расщепления N-концевого гистидинового пептида с помощью TEV-протеазы позволил оптимизировать эффективное получение целевого белка. На рисунке 16Б показано, что наиболее качественный протеолиз протекал при использовании 20 мМ Трис-HCl буфера, pH 8,0, 0,5 мМ ЕДТА в молярном соотношении протеазы-люциферазы 1:50.

Далее оптимизированная схема очистки (Рис. 17А) включала металл-аффинную хроматографию, где собирали фракцию, проходящую сквозь носитель. После концентрирования белок MLuc7 очищался в ходе финальной гель-проникающей хроматографии на колонке Superdex-75, где осуществляли сбор мономерной фракции согласно профилю разделения калибровочных белков (Рис. 17Б). В результате проведенных процедур был получен гомогенный белковый препарат (Рис. 17Г), обладающий высокой

люциферазной активностью. Продукция MLuc7 составила около 6 мг/л культуральной среды клеток насекомых.

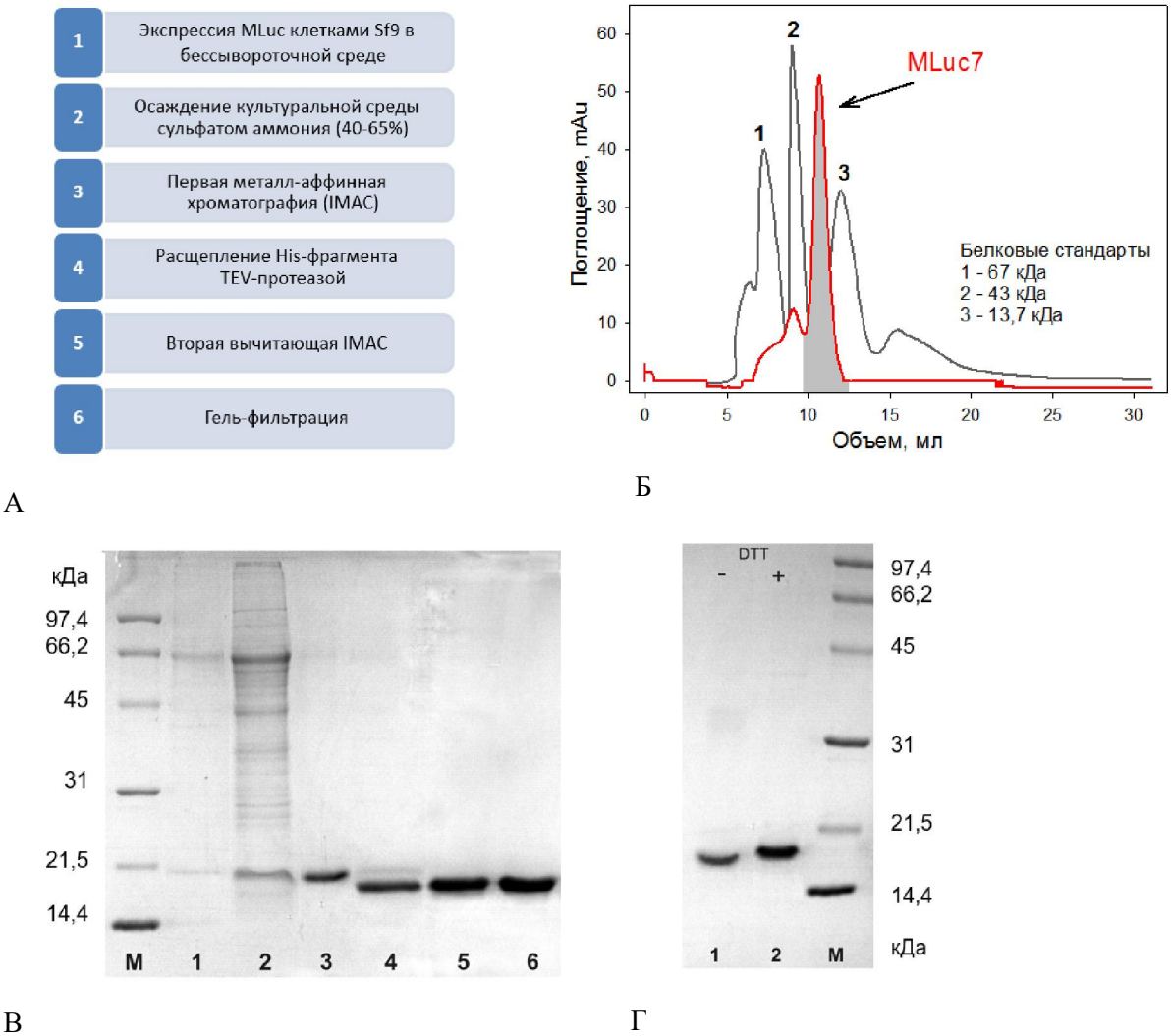


Рисунок 17 – Очистка изоформы MLuc7: А – схема очистки; Б – профиль гель-фильтрации образца MLuc7 на Superdex-75 (красная кривая), с разделением стандартных белков; В, Г – ДСН-ПААГ-электрофорез, В: М – маркеры молекулярного веса, 1 – культуральная жидкость Sf9, 2 – растворенный осадок, 3 – пик после IMAC, 4 – расщепление образца TEV-протеазой; 5 – препарат после IMAC, 6 – пик гель-фильтрации на Superdex-75; Г – ДСН-ПААГ-электрофорез в полунативных условиях без кипячения: 1 – нативный образец MLuc7, 2 –MLuc7 с добавлением ДТТ

Степень олигомеризации полученного белкового препарата изоформы люциферазы MLuc7 оценивалась в ходе гель-фильтрации и при проведении полунативного белкового гель-электрофорез в условиях охлаждения (Рис. 17Б,

Г). Результаты экспериментов показали, что подобранная оптимизированная система очистки с минимальными потерями позволила получить препарат цистеин-содержащей люциферазной изоформы MLuc7, находящейся в гомогенном мономерном состоянии.

В ходе исследования было обнаружено, что при разведениях препарата люциферазы MLuc7 в измерительном буфере ML до концентраций менее 0,1 нг/мл наблюдалось значительное снижение ферментативной активности. Для оптимизации хранения препарата люциферазы были протестированы агенты, предотвращающие неспецифическую агрегацию (Рис. 18).

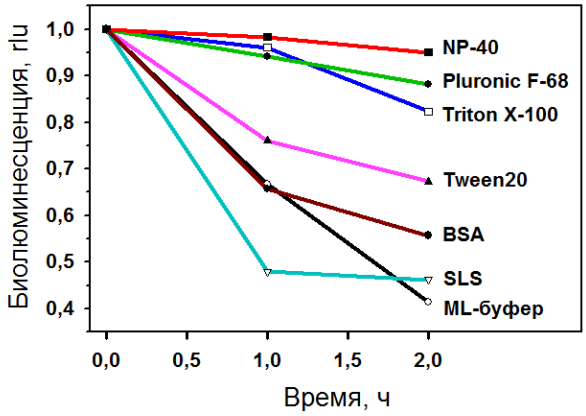


Рисунок 18 – Подбор условий хранения препарата люциферазы MLuc7

Все выбранные соединения, обладающие свойствами поверхностно-активных веществ и применяемые для стабилизации белковых препаратов, использовались в концентрациях, не превышающих концентрацию мицеллообразования. В результате подбора обнаружено, что неионный детергент NP-40 в концентрации 0,02% значительно стабилизирует фермент при хранении. Для повышения эффективности и оптимизации процедур очистки данный агент был использован при финальной гель-фильтрации при получении препаратов копеподных люцифераз, а также входил в состав буфера для долговременного хранения белковых препаратов в 50% глицерине.

Для получения препарата новой изоформы MLuc2 люциферазы *M. longa* использовалась подобранная система бакуловирусной экспрессии и оптимальная схема очистки люциферазы из культуральной среды клеток

насекомых Sf9. Произведенные процедуры позволили получить гомогенные образцы новой люциферазы MLuc2, находящейся в нативной мономерной форме (см. раздел 4.2).

Люцифераза из копеподы *Gaussia princeps*, относящейся к семейству Metridinae, является широко используемым белком в технологиях имиджинга и диагностики. Несмотря на активное использование люциферазы как генетически кодируемого репортера, а также в составе *in vitro*-меток, некоторые аспекты биохимических свойств описаны не полно. Ранее были предприняты множественные попытки получения рекомбинантной люциферазы GpLuc при экспрессии в бактериальных клетках в растворимой и нерастворимой формах [Rathnayaka et al., 2010, 2011; Lobstein et al., 2012; Oyama et al., 2015], в клетках млекопитающих [Inouye, 2018] и в бесклеточных системах [Goerke et al., 2008]. Результаты исследований демонстрировали высокую активность GpLuc, однако в работах не проводилось сравнительной оценки препаратов копеподных люцифераз, параллельно полученных при помощи одной системы экспрессии. Для адекватного сравнения параметров новых изоформ люциферазы Metridia с GpLuc, люцифераза Gaussia была также выделена в виде рекомбинантного белка (см. раздел 4.3).

Таким образом, в результате проведенных исследований оптимизирована продукция новых изоформ люциферазы *M. longa*, MLuc7 и MLuc2, а также люциферазы из *G. princeps* в нативной конформации в бакуловирусной системе экспрессии, а также разработана схема получения высокоочищенных целевых белков, обладающих высокой удельной биолюминесцентной активностью.

ГЛАВА 4. Физико-химические свойства новых изоформ MLuc7, MLuc2 люциферазы из *M. longa* и люциферазы из копеподы *G. princeps*

4.1 Свойства изоформы MLuc7

В работе исследовались различные физико-химические свойства полученного препарата люциферазы MLuc7 из клеток насекомых в сравнении белком, выделенным из телец включения *E. coli* (Рис. 19) и секретируемым клетками человека. Заметный синтез рекомбинантного белка MLuc7 в клетках *E. coli* удалось получить только в виде нерастворимых телец включения, как описано в работе [Markova et al., 2004]. Люциферазу MLuc7, синтезированную в бактериальных клетках, подвергали процедуре рефолдинга для формирования дисульфидных связей *in vitro* с помощью глутатиона в восстановленной и окисленной формах. Рефолдинг выполнялся по схеме, описанной в работе [Borisova et al., 2008]; для исследования свойств использовалась мономерная фракция, собранная при гель-фильтрационной очистке.

Было определено, что удельная биолюминесцентная активность люциферазы MLuc7, полученной при экспрессии в клетках насекомых, в ~10^2 превышала активность препарата MLuc7, выделенного из телец включения *E. coli*. Этот факт демонстрирует, что при бактериальной экспрессии люциферазы и последующем рефолдинге лишь около 1% мономерного целевого белка находится в правильном конформационном состоянии.

Кроме рефолдированного препарата MLuc7 для сопоставления свойств люциферазы также использовалась культуральная среда линии человеческих клеток HEK293, транзиентно экспрессирующих секретируемый репортерный белок (Рис. 19). Биохимические параметры люциферазы, секретирующейся эукариотическими клетками, служили контролем нативного фолдинга репортера.

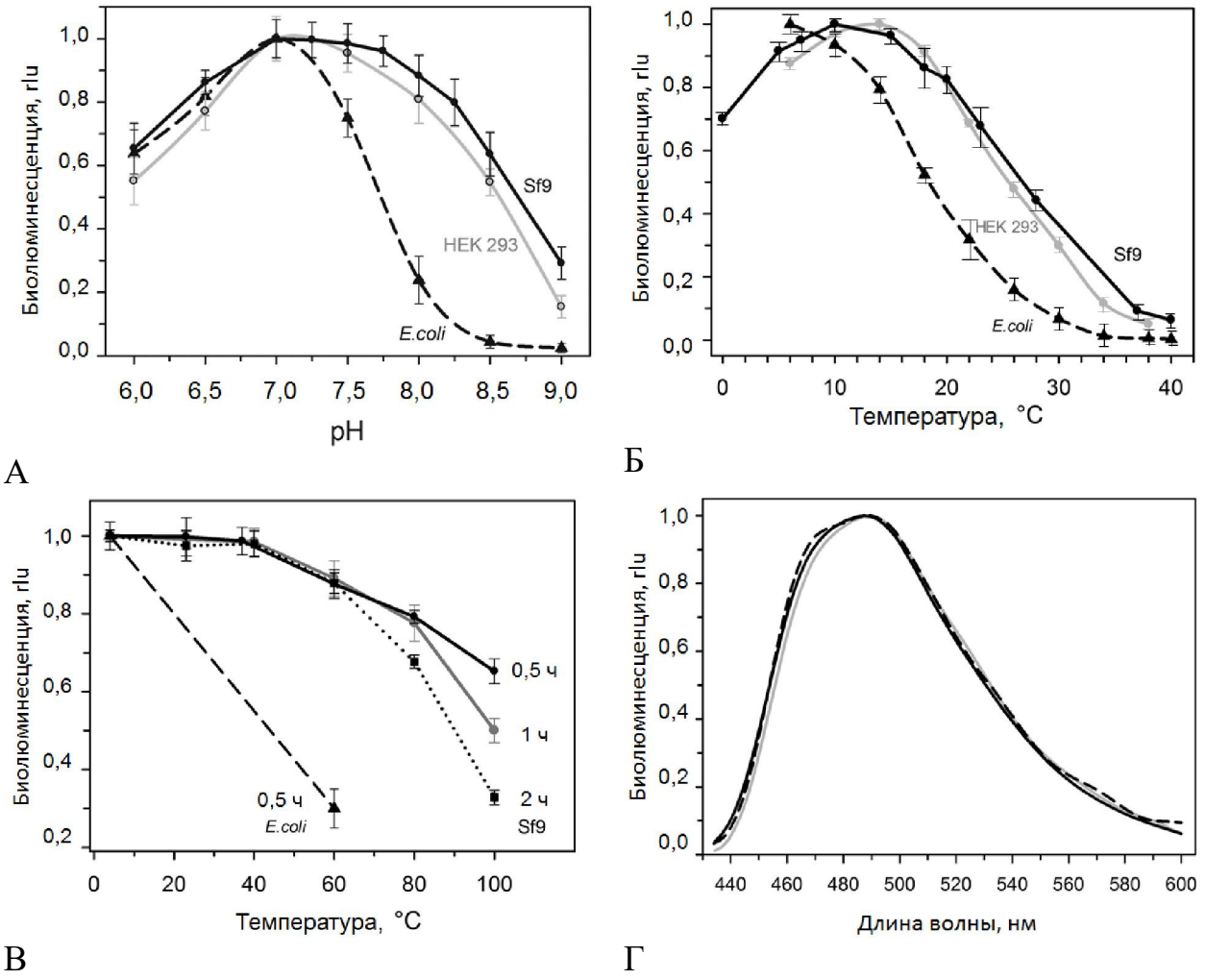


Рисунок 19 – Исследование свойств изоформы люциферазы MLuc7 (черные линии) в сравнении с MLuc7, выделенной из бактериальных телец включения (штриховые линии) и находящейся в культуральной среде HEK293 (серые линии). Зависимость максимума биолюминесценции от pH (А), температуры (Б); В – исследование термостабильности MLuc7 из Sf9 и *E. coli* при инкубации при соответствующих температурах;
Г – спектры биолюминесценции

Экспериментально было показано, что новая изоформа MLuc7, полученная при бакуловирусной экспрессии, обладала свойствами, близкими к свойствам культуральной среды клеток линии HEK293 (Рис. 19). Люцифераза проявляла максимальную функциональную активность в более широком диапазоне значений pH (7,0–8,0), чем рефолдированный препарат, а также отличалась более высоким оптимумом температуры с максимумом в области 15°C. Несмотря на различия в оптимальных условиях работы ферментов, все исследуемые белковые препараты имели одинаковый максимум спектра

биолюминесценции, который составил 487–488 нм (Рис. 19Г). Это свидетельствует о строгом формировании активного центра люцифераз независимо от образования внутримолекулярных дисульфидных связей или возможных молекулярных агрегаций, так как значительных различий между спектрами биолюминесценции образцов люциферазы не наблюдалось.

Кроме этого, было показано, что новая изоформа отличается экстремальной термостабильностью, позволяющей сохранять до 30% изначальной биолюминесцентной активности после 2 ч инкубации при 100°C (Рис. 19В), в отличие от рефолдированного препарата люциферазы, теряющей активность при инкубации при 60°C в течение получаса. Такие результаты демонстрируют неэффективность рефолдинга люциферазы из телец включения, в котором, по всей видимости, только небольшая доля из общего пула мономерных молекул обладает правильной конформацией.

Предположительно, термостабильность люциферазы обусловлена наличием множественных дисульфидных связей, стабилизирующих молекулу. Часто введение дополнительных цистеинов, образующих S-S мосты, используется для повышения температурной устойчивости рекомбинантных белков [Dombkowski et al., 2014]. Во время интенсивного нагревания происходит тепловая денатурация белка, в результате которой нарушаются водородные, ионные связи, однако, дисульфидные остаются неповрежденными. Именно это обстоятельство может обеспечить эффективную ренатурацию белка – в ходе данного эксперимента перед измерением биолюминесцентной активности образцы предварительно охлаждались. Такая способность репортера MLuc7, обеспечивающая устойчивость к повышенным температурам, потенциально позволяет применять люциферазу в схемах *in vitro* тестирований, предполагающих стадии нагревания.

В результате проведенных исследований определены основные физико-химические свойства новой изоформы люциферазы Metridia и показана идентичность свойств рекомбинантной MLuc7 из клеток насекомых и люциферазы, транзиентно экспрессируемой клетками линии HEK293, что

подтверждает нативную конформацию выделенной люциферазы MLuc7.

Полученные данные демонстрируют уникальные свойства нового биолюминесцентного репортера MLuc7 – высокую активность, минимальную молекулярную массу, экстремально высокую термостабильность, а также низкий предел обнаружения и широкий линейный диапазон детекции люциферазы, охватывающий 7 порядков (см. раздел 6.1). Эти результаты показывают, что изоформа MLuc7 люциферазы *Metridia longa* является чрезвычайно перспективным репортером для использования как в технологиях биолюминесцентного имиджинга *in vivo*, так и в качестве метки в биолюминесцентном микроанализе *in vitro.*

4.2 Получение новой психрофильной изоформы MLuc2

В исследовании описана новая изоформа MLuc2, обладающая молекулярной массой 18,5 кДа. Для оценки ее физико-химических параметров был проведен анализ свойств люциферазы MLuc2 в сравнении с ранее описанной изоформой MLuc7.

MLuc2-люцифераза обладала высокой активностью (Табл. 2), при оптимальных условиях превышающей MLuc7, а также являлась очень термостабильным ферментом с сохранением до 60% начальной активности после 1 ч кипячения (Рис. 20В). Кроме этого, показано, что новая изоформа отличалась чрезвычайно низким температурным оптимумом биолюминесцентной активности (~5°C), что позволило отнести ее к экстремально психрофильным ферментам (Рис. 20Б).

Таблица 2. Свойства изоформ MLuc7 и MLuc2, выделенных из Sf9 (показана удельная активность, измеренная при оптимальных условиях)

Изоформа	Удельная активность, rlu/мг × 10^{10}	Относительная удельная активность, %	λ_{max}, нм	K_M, мкМ
MLuc2	189	112	487	4,7±0,3
MLuc7	168	100	487	3,2±0,2

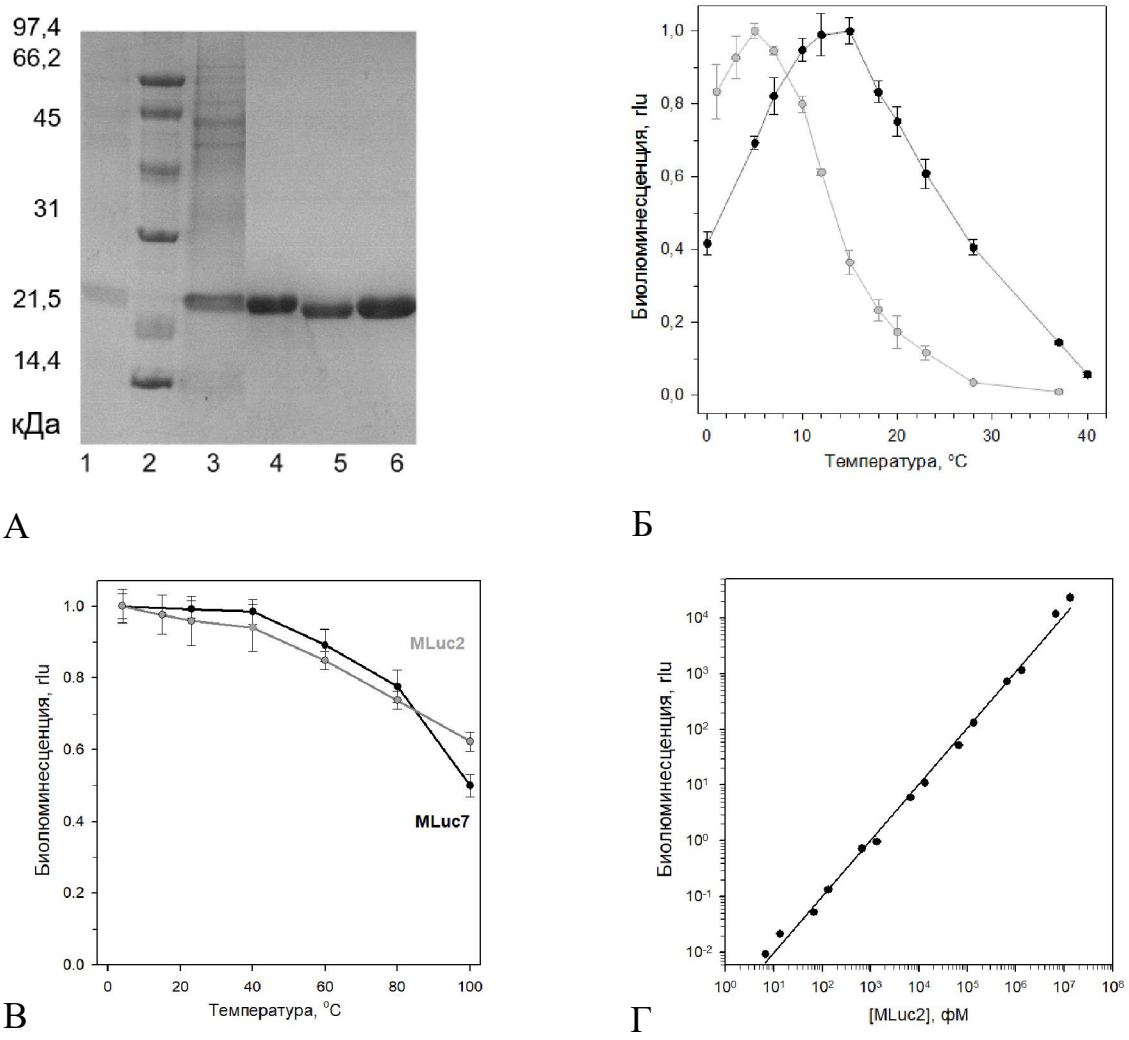


Рисунок 20 – А – ДСН-ПААГ-электрофорез MLuc2 из Sf9 клеток: 1 – культуральная среда, 2 – стандарты молекулярного веса, 3 – сульфат-аммонийный белковый осадок, 4 – MLuc2 после IMAC, 5 – расщепленный TEV-протеазой белок, 6 – MLuc2, очищенный на Superdex-75; Б – зависимость ферментативной активности MLuc2 (серые) и MLuc7 (черные линии) от температуры, В – исследование термостабильности при инкубации при разных температурах в течение 1 ч, Г – исследование предела обнаружения MLuc2

Предположительно, такие существенные различия родственных гомологичных ферментов могут быть связаны с особенностями жизнедеятельности планктонных рачков, которые в течение суток вертикально мигрируют на глубину до 100 м. В Белом море, где были собраны образцы биомассы копепод *M. longa*, температурный диапазон глубинных и поверхностных вод составляет 0–20°C [Petrzova, Kosobokova, 2000].

Известно, что психрофильные свойства белков часто определяются их

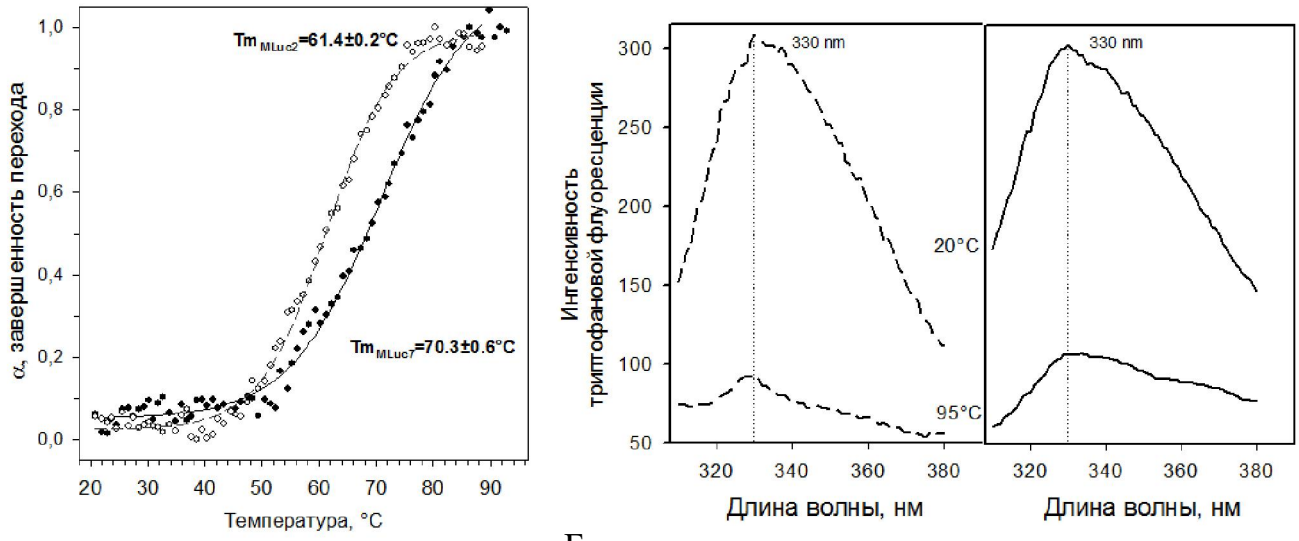
структурными особенностями. В частности, белки, предпочитающие холодные условия, отличаются от близких мезофильных гомологов большей конформационной мобильностью белковой структуры. Такая подвижность может быть обусловлена ослаблением внутримолекулярных взаимодействий (водородных, ковалентных, ионных связей, гидрофобных взаимодействий) [Struvay, Feller, 2014; Sarmiento et al., 2015].

При анализе аминокислотной структуры люциферазы MLuc2 были обнаружены кластеры, богатые глициновыми остатками (см. Рис. 13, выделено голубым). Такие участки, вероятно, могут обеспечивать большую мобильность и возникновение неупорядоченных элементов третичной структуры молекулы. Интересно также заметить, что подобные глицин-содержащие вставки наблюдаются у известных люцифераз из близкородственных копепод *M. curticauda, M. pacifica, M. Asymmetrica* и *M. okhotensis* (по информации базы данных «GeneBank»). К сожалению, большинство ферментов в настоящее время еще не охарактеризованы, также неизвестен температурный оптимум их биолюминесцентной реакции.

Для оценки структурных различий двух разных изоформ, MLuc7 и MLuc2, значительно отличающихся оптимумом биолюминесценции, были проведены спектральные исследования. С помощью оценки собственной триптофановой флуоресценции, оптимум которой наблюдался при 330 нм и свидетельствовал о гидрофобном окружении единственного для каждого белка триптофана, были проведены эксперименты по термическому тушению флуоресценции (Рис. 21).

Путем исследования интенсивности триптофановой флуоресценции при последовательной тепловой денатурации (1°C/мин) было показано, что для обоих ферментов максимум спектра флуоресценции (330 нм) не изменяется (Рис. 21Б). Это свидетельствует о схожем окружении триптофановых остатков в исследуемых белках, в том числе и во время тепловой денатурации. Температура плавления (T_m), определенная для MLuc2, составила 61,4±0,2°C, в то время как термоустойчивость MLuc7 значительно отличалась – температура

полуперехода для мезофильного гомолога наблюдалась при 70,3±0,6ºС. Такое существенное различие в значениях температурного перехода между гомологичными белками может свидетельствовать о том, что для психрофильного белка характерна более подвижная структура.



А Б

Рисунок 21 – Исследование зависимости собственной триптофановой флуоресценции MLuc2 (○, штриховые линии) и MLuc7 (●, черные линии) от температуры: А – определение температуры плавления белков посредством расчета степени завершенности теплового перехода α из нативного в денатурированное состояние, Б – положение максимумов спектров триптофановой флуоресценции при терминальных температурах эксперимента

Для идентификации особенностей, придающих, предположительно, структурную гибкость психрофильному белку, препараты были дополнительно проанализированы на наличие свободных тиольных групп (по методу Эллмана). Было выявлено, что доля свободных сульфгидрильных групп для MLuc7 изоформы составила 0,2±0,1, в то время как для MLuc2 – 1,5±0,2. Этот факт может свидетельствовать о том, что в более мезофильном гомологичном белке все цистеиновые остатки образовывали цистины, а в психрофильном белке наблюдалась пара несвязанных цистеинов со свободными тиольными группами.

Таким образом, в результате выполненных исследований охарактеризована новая изоформа MLuc2 люциферазы *Metridia longa*, обладающая уникальными свойствами – высокой термостабильностью в сочетании с экстремально низким температурным оптимумом биолюминесцентной реакции, характерным для психрофильных ферментов. Показано, что низкий температурный оптимум биолюминесцентной реакции обусловлен структурными особенностями изоформы MLuc2 – повышением гибкости структуры из-за отсутствия одной внутримолекулярной дисульфидной связи по сравнению с MLuc7.

Предполагается, что новая уникальная изоформа MLuc2, расширяющая спектр существующих репортерных молекул, в перспективе может быть применена при исследовании других психрофильных белков, а также может использоваться как *in vivo* репортер для изучения экстремальных психрофильных организмов.

4.3 Получение люциферазы Gaussia, исследование свойств

Люцифераза GpLuc из *Gaussia princeps* сегодня является широко используемым белком в качестве биолюминесцентного репортера в биологических исследованиях. Несмотря на огромный интерес к белку и широчайший спектр применения, физико-химические свойства GpLuc охарактеризованы совершенно недостаточно и даже противоречиво. В настоящей работе полученный нативный препарат рекомбинантной GpLuc из клеток насекомых был использован для определения основных люминесцентных и структурных свойств люциферазы.

Биолюминесцентные спектры всех исследованных в данной работе люцифераз оказались сходны (Рис. 22), проявляя максимум в области λ_{max}~487 нм, что может свидетельствовать об одинаковом аминокислотном окружении субстрата в субстрат-связывающей полости в процессе реакции. В некоторых исследованиях сообщалось, что спектр люциферазы *Gaussia* имеет

λ_{max}~470 нм [Verhaegen, Christopoulos, 2002; Kim et al., 2011]. Данные различия могут быть связаны с тем, что для определения спектра использовали препараты GpLuc, полученные при бактериальном синтезе и возможно имеющие неправильный фолдинг.

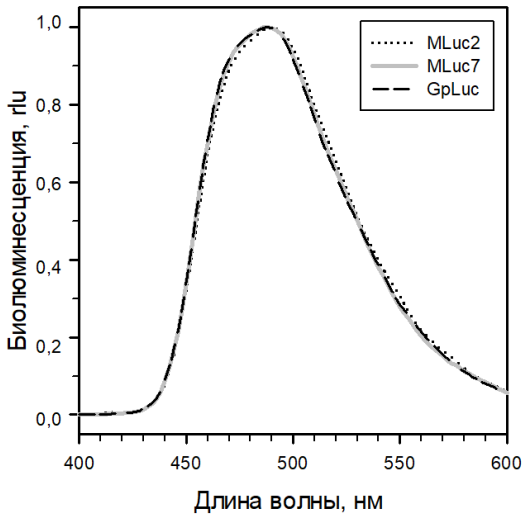


Рисунок 22 – Спектры биолюминесценции копеподных люцифераз MLuc2, MLuc7 и GpLuc

Таблица 3. Сравнительная характеристика исследуемых копеподных люцифераз (измерения проводились при оптимальных температурах)

Luc	Относи-тельная активность, %	Оптимум			λ_{max}, нм	Tm, °C	Свободные SH-группы
		T, °C	NaCl, M	pH			
GpLuc	100	18–20	1,0–1,5	7,5–8,5	487	72,1±0,6°C	0,2±0,1
MLuc2	77	5	1,0	7,0–7,75	487	61,4±0,2°C	1,5±0,2
MLuc7	68	15	0,5	7,0–8,0	487	70,3±0,6°C	0,2±0,1

Было показано, что исследуемые в работе копеподные люциферазы проявляли биолюминесцентную активность при разных температурных условиях (Рис. 23Б, Табл. 3). Такие значительные различия могут быть обусловлены местом обитания светящихся копепод в северных и умеренных широтах, а также структурными особенностями гомологичных белков, приводящих к адаптации к разным температурным условиям.

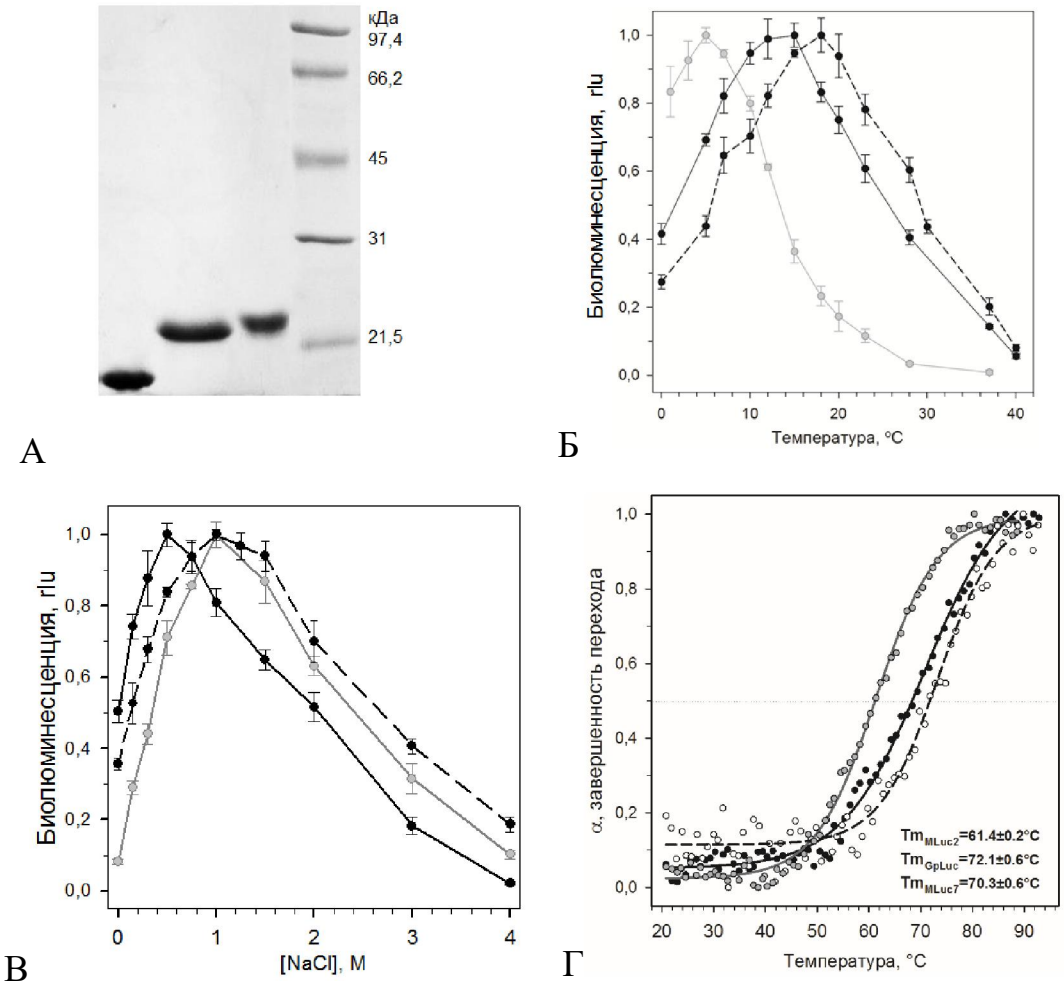


Рисунок 23 – А – ДСН-ПААГ-электрофорез образцов копеподных люцифераз, очищенных из культуральной среды Sf9. 1 – MLuc7, 16,5 кДа, 2 – MLuc2, 18,5 кДа, 3 – GpLuc, 19,9 кДа, 4 – маркеры молекулярного веса; Б – зависимость биолюминесцентной активности люцифераз от температурных условий, В – от концентрации NaCl; Г – исследование термического тушения триптофановой флуоресценции образцов. MLuc7 – черные, MLuc2 – серые, GpLuc – штриховые линии

Следует отметить, что ранее сообщалось, что солевой оптимум для GpLuc составляет 0,15 M NaCl. Можно предположить, что такое существенное различие свойств было обусловлено выбранной системой экспрессии и схемой получения рекомбинантного белка (*E. coli* в работе [Ratnayaka et al., 2010]). В исследовании [Inouye, 2018] люциферазу получали при экспрессии в клетках CHO (Chinese hamster ovary), однако, не расщепляли концевой His-пептид. Оставшийся полигистидиновый фрагмент, имеющий значительный положительный заряд, вероятно, мог повлиять на свойства изучаемого белка.

В настоящем исследовании процедура очистки включала отщепление His7-фрагмента, и в предыдущих разделах было продемонстрировано, что свойства люциферазы, полученной из культуральной среды клеток насекомых, совпадают со свойствами репортера, секретируемого клетками HEK293. Исходя из этого, можно утверждать о получении препаратов белков, проявляющих свойства природных люцифераз.

Кроме этого, установлено, что GpLuc, как и изоформы MLuc, является термостабильным ферментом – долгое инкубирование при повышенных температурах, включая условия кипячения, не приводит к полной потере биолюминесцентной активности. Схожие выводы о термостабильности копеподных люцифераз были сделаны при исследовании одной из изоформ люциферазы из *M. pacifica*, которая сохраняла 2,4% активности даже после 20 мин автоклавирования при 120°C [Takenaka et al, 2008].

Такая экстремальная термостабильность, по всей видимости, связана с наличием множественных стабилизирующих структуру дисульфидных связей. В данной работе было определено, что GpLuc не имеет в своей структуре свободных SH-групп, что предполагает наличие 5 S-S связей, и обладает жесткой структурой с температурой плавления, составляющей 72,1±0,6°C (Рис. 23Г, Табл. 3). Ранее, однако, для препаратов GpLuc, выделенных из *E. coli*, с помощью метода CD-спектрометрии также была определена Tm, составившая ~60°C [Rathnayaka et al., 2011]. Можно предположить, что в данном случае различия также объясняются недостатками выбранной системы экспрессии.

В данной работе определено, что спектр биолюминесценции рассматриваемых люцифераз абсолютно идентичен, и максимум эмиссии наблюдается около 487 нм (см. Рис. 22). Данный параметр не зависит от метода выделения рекомбинантного белка для изоформ люциферазы *M. longa*: образцы люцифераз, полученные при недостаточно эффективном рефолдинге из телец включения, несмотря на низкую активность, имели спектры, идентичные правильно свернутым белкам (см. Рис. 19Г). Кроме этого, показано, что изменение pH от 6,0 до 9,0 не оказывает влияния на спектр биолюминесценции

копеподных люцифераз, в отличие от FLuc, чей спектр сильно зависит от окружения и может сдвигаться почти на 100 нм [Hosseinkhani, 2011].

Таким образом, использование бакуловирусной экспрессионной системы, обеспечивающей продукцию корректно свернутых белков с многочисленными внутримолекуляными дисульфидными связями, позволило получить ряд новых данных о биолюминесцентных и биохимических свойствах люцифераз копепод и объективно сравнить их свойства как биолюминесцентных репортеров. Кроме того, определение оптимальных параметров биолюминесцентных реакций может быть в дальнейшем использовано для оптимизации измерений активности репортеров в различных схемах анализа.

ГЛАВА 5. Локализация аминокислот активного центра люциферазы MLuc7

Изучение хемилюминесценции имидазолпиразиноновых производных позволило предложить механизм биолюминесцентной реакции, катализируемой целентеразин-зависимыми ферментами. В работе [Kondo et al., 2005] было предложено, что целентеразин претерпевает ряд преобразований (Рис. 24) путем депротонирования N7-атома с образованием C2(-) анион-интермедиата и формирования реакционноспособного пероксид-аниона. В ходе дальнейшего преобразования пероксид-анион «атакует» C3-позицию в молекуле целентеразина, что ведет к образованию интермедиата в виде диоксиэтанона. Это нестабильное соединение быстро распадается с высвобождением CO_2 и формированием амид-аниона в возбужденном состоянии.

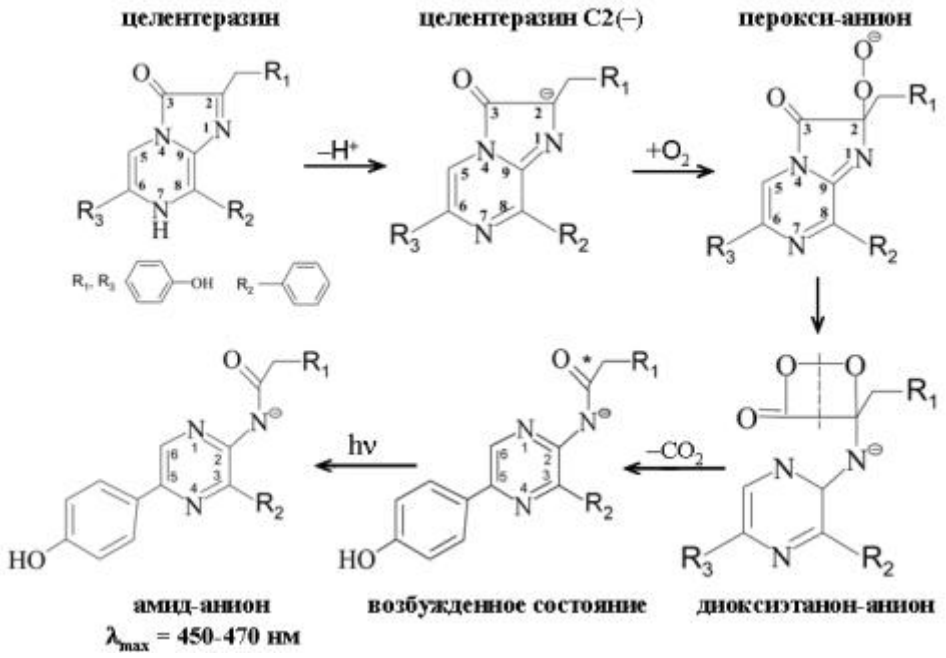


Рисунок 24 – Предположительная схема образования пероксид-аниона целентеразина (по работе [Kondo et al., 2005])

Реакция, приводящая к образованию пероксид-аниона целентеразина, происходит при участии биолюминесцентного фермента и аминокислотных

остатков, входящих в его активный центр. В настоящее время установлено, что ароматические остатки целентеразин-зависимых фотопротеинов вовлечены в процессы внутримолекулярного связывания субстрата. В работах, посвященных анализу пространственных структур Ca^{2+}-регулируемых фотопротеинов, было показано, что остатки Tyr190, Trp179 и His175 в обелине стабилизируют гидроперокси-группу целентеразина в субстратной полости посредством образования сети водородных связей, а Tyr138 связывает N1-атом гидропероксицелентеразина [Liu et al., 2000, Eremeeva et al., 2012] (Рис. 24). Известно также, что точечные замены этих ароматических аминокислот вызывают значительные изменения в биолюминесцентных свойствах ферментов [Eremeeva et al., 2013].

Ввиду того, что изменение аминокислотного окружения субстрата может повлиять на спектральные и биохимические параметры биолюминесцентной реакции, были предприняты попытки идентификации остатков люциферазы MLuc7, имеющих существенное значение в реализации каталитической функции и потенциально входящих в активный центр фермента.

Копеподная целентеразин-зависимая люцифераза MLuc7 содержит 4 остатка фенилаланина, 2 тирозина, 2 гистидина и единственный остаток триптофана. Однако консервативными из них являются His78, His160, Tyr80, Phe104, Phe113, Phe151 и Trp143 (Рис. 25). Было выдвинуто предположение, что гидроксильные группы единственных тирозиновых остатков, Tyr72 и Tyr80, потенциально образующих водородные связи, могут находиться в субстратной полости люциферазы и принимать участие в связывании субстрата целентеразина. Для оценки функциональной роли отдельных тирозиновых остатков были созданы мутанты с их точечными аминокислотными заменами на фенилаланиновые остатки.

Методом олигонуклеотид-направленного мутагенеза были получены мутантные варианты люциферазы MLuc7 с заменами Y72F и Y80F. Для получения гомогенных белковых препаратов в количествах, достаточных для измерения биохимических свойств, использовали бакуловирусную

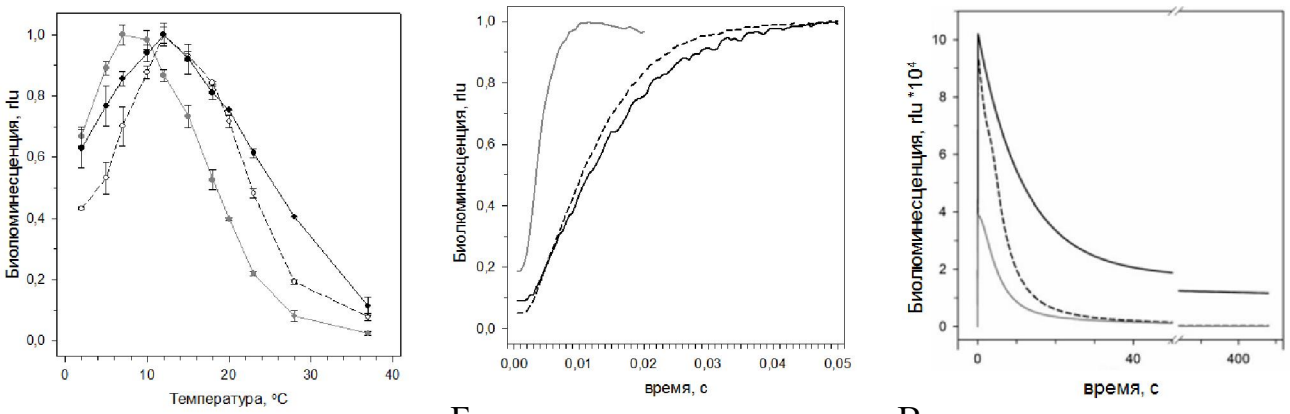
экспрессионную систему; очистку целевых белков из культуральной среды клеток насекомых Sf9 производили по методике, описанной ранее.

Рисунок 25 – Сравнение аминокислотных последовательностей MLuc7 и GpLuc: в рамке выделены сигнальные пептиды, консервативные мотивы заключены в серые рамки, ароматические остатки выделены жирным шрифтом, мутированные тирозины подчеркнуты. «*» – идентичные, «:» – схожие, «.» – различные остатки

В результате работы было показано, что мутантные белки проявляли биолюминесцентную активность, с сохранением 90% исходной активности у варианта Y80F и 15% – у Y72F. Замена тирозинового остатка у люциферазы GpLuc (Y97F), соответствующего Tyr80 в последовательности MLuc7, также приводила к практически полному сохранению начальной активности [Kim et al., 2011].

Следует отметить, что мутант с заменой Y72F имел значительный сдвиг температурного оптимума в сторону низких температур (7°C), однако вариант Y80F характеризовался неизменным оптимумом по сравнению с диким типом MLuc7 (~15°C) (Рис. 26A). Значения K_M, определенные по интенсивности биолюминесценции, показали, что сродство мутанта Y72F к субстрату снизилось (K_M=4,2±0,4 мкМ), в то время как вариант Y80F, напротив, проявлял большую аффинность к целентеразину (K_M=1,2±0,1 мкМ), чем дикий тип (K_M=3,2±0,2 мкМ). Исходя из полученных данных, можно предположить, что

мутация Y72F приводила к образованию более конформационно нестабильной, подвижной структуры MLuc7, как это было ранее показано для психрофильной изоформы MLuc2. Кроме этого, изоформа MLuc2 характеризовалась идентичной комбинацией ароматических остатков в консервативной части белка, имея только один остаток тирозина, соответствующий Tyr80 в MLuc7 (см. Рис. 13).



А Б В

Рисунок 26 – А – температурные зависимости вариантов MLuc7 (дикий тип – черные, Y80F – штриховые, Y72F – серые линии), Б – измерения кинетики методом «остановленной струи», В – кинетика биолюминесцентной реакции, зарегистрированная за 420 с; все измерения выполнены при оптимальной для каждого препарата температуре

Измерения быстрой спектрокинетики методом «остановленной струи» выявили значительные отличия ферментов по начальной скорости биолюминесцентной реакции. Результаты данного метода, позволяющего проводить сверхбыстрые измерения интенсивности светового потока с мертвым временем 1,1 мс, демонстрируют, что мутант Y72F характеризуется более быстрым преобразованием целентеразина с константой подъема (k_{rise}) 256 $с^{-1}$, в то время как природный вариант люциферазы, имеющий два тирозина, и мутант Y80F с оставшимся Tyr72 имеют скорости подъема в ~5 раз ниже (Табл. 4).

Мутантные варианты люциферазы MLuc7, как и дикий тип, характеризовались вспышкообразной кинетикой биолюминесции (Рис. 26В).

Однако исследуемые тирозиновые мутанты имели более быструю скорость затухания биолюминесценции с ~2-кратным повышением константы спада (k_{decay}), что приводило к уменьшению интегрированного светового сигнала, испускаемого при окислении целентеразина.

Таблица 4. Свойства тирозиновых мутантов люциферазы MLuc7

Люцифераза	Относительная начальная скорость реакции, %	λ_{max}, нм	Topt, °C	k_{rise}, c^{-1}	k_{decay}, c^{-1}	K_M, мкМ
MLuc7	100	487	15	56	0,085	3,2±0,2
Y72F	15	487	7	256	0,176	4,2±0,4
Y80F	90	487	15	65	0,157	1.2±0,1

В ходе исследования были рассмотрены спектральные параметры люциферазы MLuc7 и ее тирозиновых мутантов. Спектры тирозиновой флуоресценции, возбуждаемой 275 нм, имели максимумы при 303 нм (Рис. 27А, Б, В). Однако, один из мутантов с заменой Y72F демонстрировал появление дополнительного максимума в области 330 нм (Рис. 27Б). Максимум эмиссии в этой области спектра может наблюдаться у остатков триптофана. Единственный остаток Trp143 при возбуждении 295 нм флуоресцирует с λ_{max}=330 нм (см. Рис. 21Б). Этот эффект может наблюдаться вследствие переизлучения, возникающего по причине близкого взаиморасположения флуорофоров и переноса энергии по Ферстеровскому механизму. Такое обстоятельство может свидетельствовать о том, что Trp143, находящийся во втором консервативном повторе люциферазы (см. Рис. 14), пространственно расположен достаточно близко к первому повтору. Это позволяет также предположить, что два консервативных участка белка могут образовывать активный центр люциферазы.

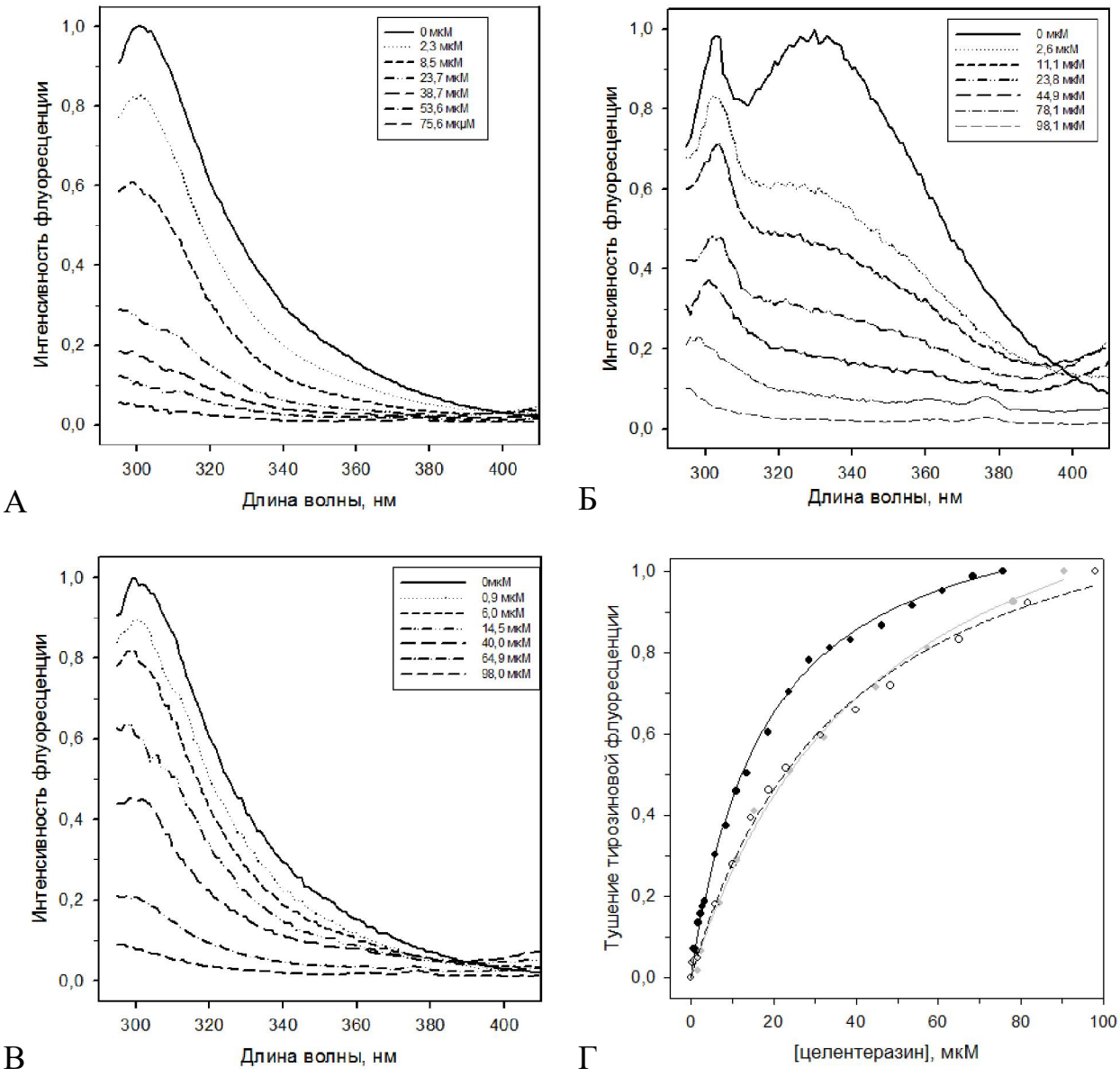


Рисунок 27 – Тушение тирозиновой флуоресценции образцов дикого типа MLuc7 и мутантов целентеразином. А, Б, В – нормализованные спектры тушения флуоресценции MLuc7 и мутантов Y72F и Y80F, соответственно.

Г – кривые для определения K_D для MLuc7 (•), мутантов Y72F (•) и Y80F (о)

Стоит также отметить, что собственная триптофановая флуоресценция люциферазы MLuc7 имела довольно низкую интенсивность, составляющую 10% от тирозиновой, несмотря на близкий квантовый выход флуоресценции этих аминокислот [Lakowicz, 2006]. Это позволяет предположить, что флуоресценция триптофанового остатка может значительно тушиться окружающими его группами.

Для определения параметров связывания комплекса MLuc7-целентеразин было проанализировано тушение собственной тирозиновой флуоресценции во время последовательного титрования вариантов люцифераз субстратом. В данном эксперименте определялось значение кажущейся константы диссоциации, так как наблюдаемое снижение интенсивности флуоресценции было обусловлено связыванием с продуктом реакции, а не с добавляемым субстратом. Значения кажущейся K_D определялись с помощью уравнения (4) [Eremeeva et al., 2009], аппроксимирующего нормализованные данные на рисунке 27Г:

$$\frac{Q}{Q_{max}} = \frac{(C + L + K_D) - \sqrt{(C + L + K_D)^2 - 4CL}}{2} \quad (4),$$

где $Q = F_o - F_q$, $Q_{max} = F_o - F_{qmax}$ (F_o – начальная интенсивность тирозиновой флуоресценции, F_q – флуоресценция в присутствии субстрата, F_{qmax} – максимально потушенная флуоресценция при 303 нм, наблюдаемая в насыщающих концентрациях лиганда). Параметры C, L, K_D – концентрации белка, лиганда и значение константы диссоциации, соответственно.

Произведенные расчеты по результатам тушения собственной тирозиновой флуоресценции показали, что значения констант диссоциации для фермент-субстратных комплексов с участием тирозиновых мутантов, повышены по сравнению с MLuc7 (44,9±3,6 и 40,3±2,4 мкМ для Y72F и Y80F, соответственно, в сравнении с MLuc7 K_D=17,3±0,6 мкМ). Это может свидетельствовать о том, что исследованные мутантные варианты MLuc7 по ряду причин проявляли меньшую аффинность к субстрату.

Окружение аминокислотных остатков может значительно влиять на скорость и эффективность каждого этапа преобразования целентеразина через формирование водородных связей боковых цепей аминокислотных остатков субстрат-связывающей полости с его атомами. Поэтому, модификация этого окружения может приводить к изменениям самых различных свойств: кинетики биолюминесцентной реакции, интенсивности светового сигнала, сродства к субстрату и т.д.

Таким образом, исследование мутантов MLuc7 с заменой остатков Tyr на Phe показало, что появление аминокислоты с боковой цепью, в которой отсутствует OH-группа, способная формировать водородные связи как с атомами других аминокислотных остатков, так и с атомами субстрата, приводит к изменению температурного оптимума и кинетики биолюминесцентной реакции, удельной активности фермента, а также аффинности активного центра к субстрату (см. Табл. 4). Эти результаты позволяют сделать выводы о вовлеченности каждого из тирозинов в формирование активного центра люциферазы MLuc7 и их существенной роли в каталитическом окислении целентеразина.

ГЛАВА 6. Применение люциферазы MLuc7 как биолюминесцентного репортера *in vivo* и *in vitro*

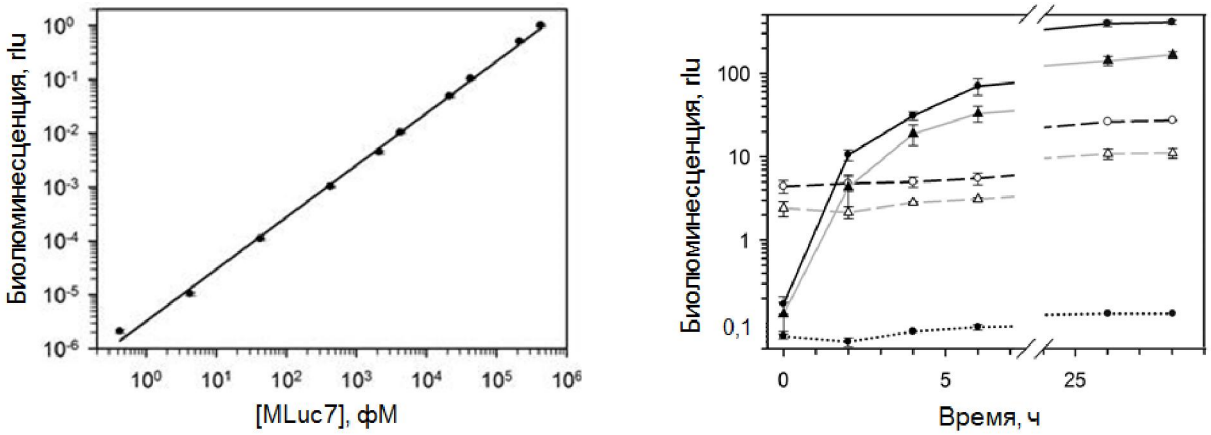
Изоформа MLuc7 люциферазы *M. longa* является термостабильным высокоактивным ферментом с минимальной молекулярной массой (16,5 кДа) среди всех известных на сегодняшний день люцифераз, поэтому ее применение как генетически кодируемого репортера *in vivo* позволяет минимизировать метаболическую нагрузку клетки на биосинтез репортера, имитируя максимально естественные условия для анализа. Кроме того, минимальные размеры репортера привлекательны с точки зрения конструирования различных гибридных белков, где требуется небольшая репортерная часть. В этом случае малые размеры метки предполагают минимальную интерференцию с биоспецифической частью гибридного белка. Кроме того, чем меньше размеры рекомбинантного белка, тем, как правило, легче его получение и стабилизация.

6.1 Использование люциферазы MLuc7 как репортера в клетках млекопитающих

Важной характеристикой биолюминесцентных белков как потенциальных репортерных молекул является их чувствительность, а также линейный диапазон детекции. Для оценки эффективности использования полученной новой люциферазы MLuc7 как метки в *in vitro* и *in vivo* анализах был определен предел обнаружения белка в растворе (Рис. 28А). Биолюминесцентная активность, зарегистрированная по максимуму биолюминесцентного сигнала, была строго пропорциональна концентрации фермента во всем исследуемом диапазоне 0,4 фМ–0,4 нМ и была ограничена лишь характеристиками люминометра – чувствительностью и линейным диапазоном.

Для оценки белка MLuc7 как биолюминесцентного репортера была проведена транзиентная экспрессия клеток млекопитающих HEK293. В ходе эксперимента новая изоформа MLuc7 сравнивалась с ранее описанной

родственной люциферазой MLuc164, эффективно используемой в качестве секретируемого репортера *in vivo* [Markova et. al., 2004; Lupold et. al., 2012].



А Б

Рисунок 28 – А – обнаружение люциферазы MLuc7 в диапазоне 0,4 фМ–0,4 нМ, в эксперименте использовались насыщающие концентрации субстрата; Б – исследование биолюминесцентной активности культуральной среды HEK293, транзиентно экспрессирующих секретируемые люциферазы MLuc7 (●) и MLuc164 (▲), (○ и Δ – активность в целых клетках), штриховыми линиями изображена активность среды трансфецированных контрольным вектором клеток

Полноразмерные гены *mluc7* и *mluc164,* кодирующие люциферазы со своими собственными сигнальными пептидами, были клонированы в экспрессионный эукариотический вектор pcDNA3.1+ под конститутивный промотор цитомегаловируса (CMV). Полученные конструкты использовались для трансфекции клеточной линии эмбриональных почек человека HEK293.

Обнаружено, что люцифераза MLuc7 эффективно секретируется сразу же после трансфекции и накапливается в клеточной культуральной среде (Рис. 28Б). При этом биолюминесцентная активность определяется в миниаликвотах отбираемой клеточной среды, что позволяет наблюдать за активностью репортера (в данном эксперименте свидетельствующую о функциональном состоянии клеток) *in vivo* в реальном времени без фиксации и разрушения клеток. В аликвотах отобранной для анализа среды каталитическая активность репортера стабильно сохранялась более суток, что позволяет

хранить образцы и проводить отсроченные измерения. Результаты эксперимента на рисунке 28Б демонстрируют, что активность новой изоформы превышала биолюминесцентную активность изоформы MLuc164 приблизительно в 3 раза, что позволяет проводить тестирования с помощью изоформы MLuc7 с большей чувствительностью.

Полученные результаты однозначно показывают, что новая изоформа MLuc7 люциферазы *Metridia longa* может быть использована в качестве высокочувствительного репортера для мониторинга внутриклеточных процессов в клетках млекопитающих.

6.2 Использование MLuc7 как белка-партнера для создания гибридных аналитических систем

Для применения люциферазы MLuc7 в качестве репортерного элемента специфической молекулы разработана схема получения бифункционального гибридного белка для биолюминесцентного анализа *in vitro*. В качестве биоспецифического домена было использовано миниантитело 14D5a, специфичное к капсидному гликопротеину Е вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) [Tsekhanovskaya et al., 1993]. Данное миниантитело содержит одну внутримолекулярную дисульфидную связь, поэтому секреторная экспрессия в клетках насекомых должна обеспечить его правильное сворачивание. В ходе исследовательской работы были созданы различные варианты гибридного белка миниантитело-люцифераза для выбора оптимальной конструкции как с точки зрения обеспечения высокой продукции гибридного белка (синтеза и секреции клеткой-хозяином), так и с точки зрения обеспечения максимальной функциональности обоих доменов. Полученные генетические конструкции, кодирующие синтез вариантов рекомбинантных гибридных белков, далее использовали для обеспечения бакуловирусной экспрессии и очистки препаратов биоспецифических биолюминесцентных меток.

6.2.1 Получение генетических конструкций для экспрессии гибридных белков в клетках насекомых

Для создания генетических конструкций использовали ген люциферазы MLuc7 и ген, кодирующий вариабельную часть миниантитела 14D5a, которые были расположены в разных комбинациях через гибкий глицин-сериновый мостик (Рис. 29), внедренный для обеспечения структурной и функциональной независимости обоих доменов.

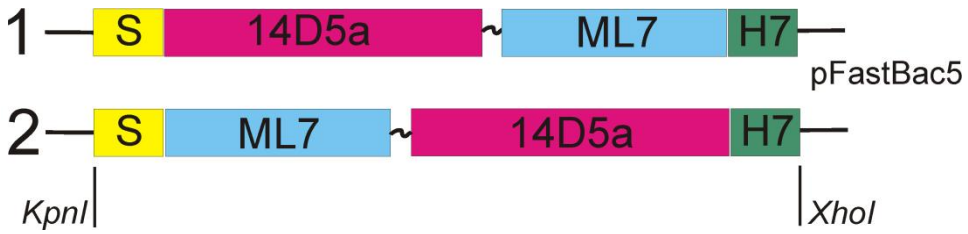


Рисунок 29 – Схематическое изображение генетических конструкций в векторе pFastBac5. S – фрагмент, кодирующий сигнальный пептид для секреции конструктов в культуральную среду, ML7, 14D5a – гены люциферазы MLuc7 и миниантитела, соответственно, H7 – полигистидиновый участок для аффинной очистки белков

Создание вариантов с разными комбинациями взаимного расположения белков было необходимо для определения оптимального взаиморасположения люциферазы как белка-партнера (являющегося N- или C-концевым доменом). Поскольку многие белки при слиянии могут частично терять свою активность при блокировании концов, это существенно важно для дальнейшего конструирования аналитических тест-систем на базе MLuc7.

Как известно, эффективность секреции зависит от последовательности, расположенной сразу за сигнальным пептидом. Для секреции обоих вариантов гибридного белка был использован природный секреторный пептид изоформы MLuc7, поскольку анализ структуры прямого соединения сигнального пептида MLuc7 (S) с миниантителом 14D5a программой «SignalP-4.0» показал высокую вероятность S-отщепления (p=0,898), что означает потенциально высокую

эффективность секреции варианта с миниантелом на первом месте.

В результате ПЦР-амплификации с использованием сконструированных праймеров были получены фрагменты ДНК, кодирующие миниантитело, люциферазу и сигнальный пептид (Рис. 30). Праймеры для амплификации этих фрагментов были сконструированы так, чтобы их концы включали частично соответствующие перекрывающиеся последовательности для последующего слияния. Введение уникального сайта рестрикции BamHI, кодирующего GSG-последовательность, также было предназначено для последующих модификаций конструкции и замен входящих в нее элементов – специфической или репортерной частей.

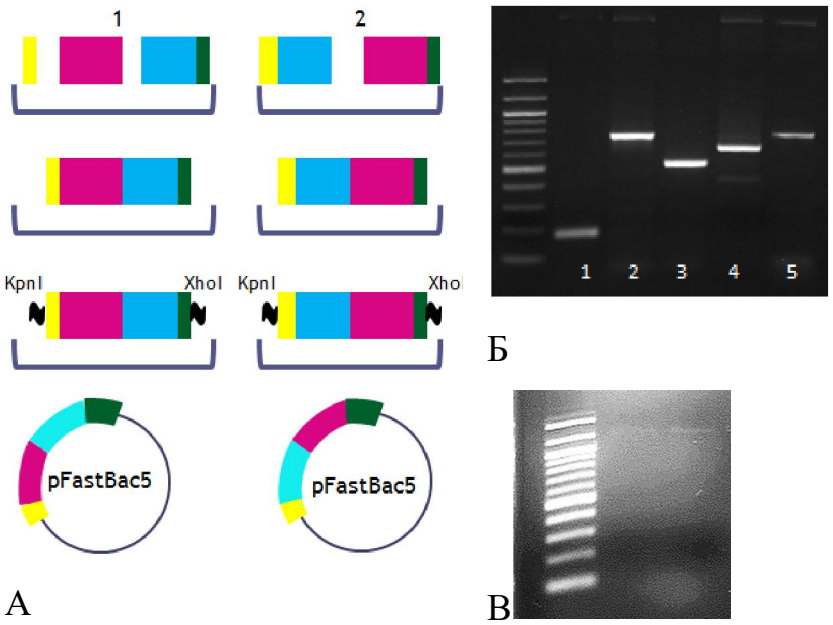


Рисунок 30 – А – схема сборки фрагментов ДНК для получения генетических конструкций; Б – электрофореграммы ПЦР-фрагментов в агарозном геле: 1 – сигнальный пептид ~180 н.п., 2 – 14D5a ~750 н.п., 3 – ML7-H7 ~500 н.п., 4 – S-ML7 ~600 н.п., 5 – 14D5a-H7 ~800 н.п.; В – слитые фрагменты для конструкций 1, 2 после обработки рестриктазами KpnI/XhoI (~1400 н.п.). Для оценки концентраций и молекулярной массы использовались стандарты 1000 н.п., 100 н.п. (NEB, Великобритания)

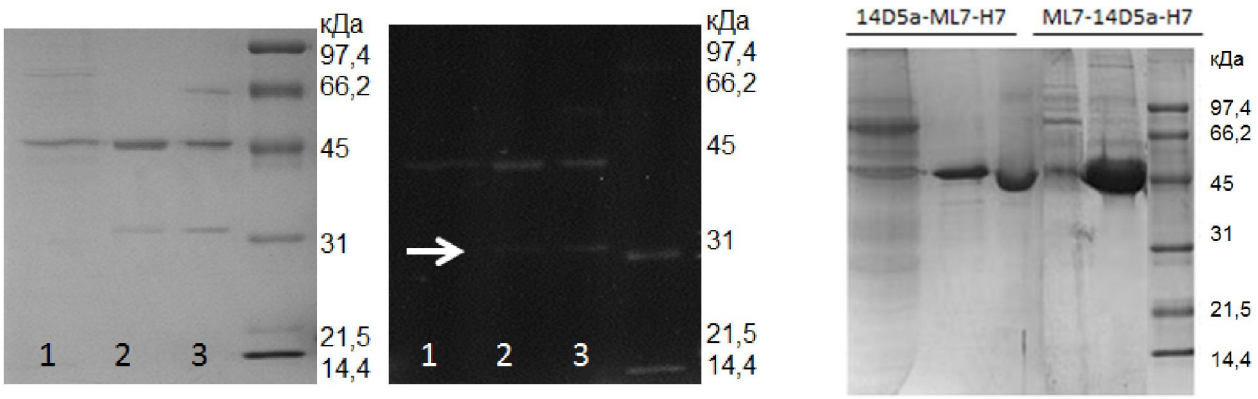
Сборка полноразмерных фрагментов для клонирования осуществлялась методом слияния полученных последовательностей в режиме амплификации с

постепенным понижением температуры отжига праймеров. Полноразмерные конструкции размером ~1400 н.п. очищались, препаративно обрабатывались специфическими рестриктазами и использовались для лигирования с бакуловирусным вектором. Полученные плазмидные конструкции pFastBac5-S-14D5a-GSG-ML7-H7 (№1) и pFastBac5-S-ML7-GSGG-14D5a-H7 (№2) (Рис. 30) далее использовали для получения рекомбинантных бакмидных ДНК, затем вирусных стоков, необходимых для обеспечения секретируемой экспрессии рекомбинантных белков в Sf9-клетках насекомых.

6.2.2 Получение бифункциональных гибридных белков

Выделение биоспецифических биолюминесцентных белков из культуральной среды клеток насекомых проводили по схеме, оптимизированной ранее для получения препаратов люцифераз. Однако в ходе исследования было обнаружено, что полученные гибридные белки подвергались неспецифическому протеолизу с выщеплением фрагмента массой ~30 кДа (Рис. 31А).

Размер домена миниантитела, входящего в состав гибридного белка, составляет ~26 кДа, однако его структура представлена двумя элементами тяжелой и легкой цепи вариабельной части антитела. Размер целого конструкта гибридного белка составляет ~45 кДа, при выщеплении ~30 кДа-фрагмента из химерного белка могла отделяться часть, представленная ~13 кДа элементом антитела. Эти предположения были подтверждены путем анализа электрофоретического разделения конструкта 14D5a-GSG-MLuc7-H7, проведенного в полунативных условиях. С помощью флуоресцентного красителя «InVision» (Invitrogen, США), специфически связывающегося с гистидин-содержащими полипептидами, было достоверно определено, что в ходе неспецифического протеолиза выщепляется ~30 кДа-фрагмент, являющийся N-концевым и включающий His7-полипептид.



А Б

Рисунок 31 – ДСН-ПААГ-электрофореграммы. А – препараты 14D5a-GSG-MLuc7-H7: 1 – растворенный сульфат-аммонийный осадок, 2 – препарат, полученный после IMAC, денатурированный, 3 – нативный; справа изображение геля, окрашенного флуоресцентным красителем; Б – химерные белки, очищенные путем IMAC с добавлением ингибиторов протеаз (фракции растворенного осадка, а также полученные после хроматографии)

Для эффективного выделения белковых препаратов гибридных конструктов при растворении сульфат-аммонийных осадков при хроматографии добавляли коктейль ингибиторов клеточных протеаз (Bio-Rad, США) в концентрациях, рекомендованных производителем. После такой обработки в результате проведенной металл-аффинной очистки белковые препараты сохраняли свое мономерное состояние (Рис. 31Б).

Таблица 5. Свойства гибридных биолюминесцентных белков

Белок	Удельная активность, rlu x 10^4/M	Tm, °C
MLuc7	1000	70,2±0,5
14D5a-MLuc7-H7	990	71,4±0,1
MLuc7-14D5a-H7	970	73,0±0,5

Полученные метки обладали высокой удельной биолюминесцентной активностью, не отличающейся от активности люциферазы MLuc7. Присоединение домена миниантитела к люциферазе также не приводило к изменениям спектров биолюминесценции, спектров тирозиновой и триптофановой флуоресценции. Кроме того, определение температуры

плавления белка по изменению собственной триптофановой флуоресценции показало, что гибридные бифункциональные белки проявляют не меньшую структурную жесткость, что и белок MLuc7, демонстрируя близкие значения Tm (Табл. 5).

6.2.3 Тестирование меток в модельном биолюминесцентном иммуноанализе

Варианты полученных меток, различающиеся взаимным расположением миниантитела и люциферазы, были протестированы как биоспецифические молекулы для биолюминесцентного иммунологического анализа по схеме, представленной на рисунке 32А.

Для оптимизации условий проведения твердофазного модельного анализа был протестирован ряд растворов, необходимых для уменьшения неспецифического связывания метки и повышения чувствительности иммунологического анализа. В качестве таких агентов использовались растворы с поливинилпирролидоном (PVP), фиколлом, бычьим сывороточным альбумином (BSA), обезжиренным молоком, а также растворы с повышенным содержанием детергентов и NaCl для уменьшения неспецифических гидрофобных взаимодействий. В результате подбора установлено, что большая чувствительность анализа с наименьшим значением шума наблюдается при использовании 0,5% BSA в фосфатном буфере (Рис. 32Б).

Для постановки модельного твердофазного анализа использовали препарат вирусного капсидного гликопротеина E (домен 3, 28 кДа) в серии разведений с известными концентрациями (0,05–1000 нг/мл). После инкубации в течение 1 ч при 37ºС планшет промывали, вносили блокировочный буфер, содержащий 0,5% БСА, через 1 ч инкубации при 23ºС производили промывку лунок и вносили препараты сконструированных биолюминесцентных меток. Через 1 ч лунки промывали с помощью оптимизированного буфера, содержащего детергенты Tween-20 и NP-40. Далее на планшетном

люминометре «Mithras» (Berthold, США) производили измерение свечения в лунках, впрыскивая субстрат целентеразин.

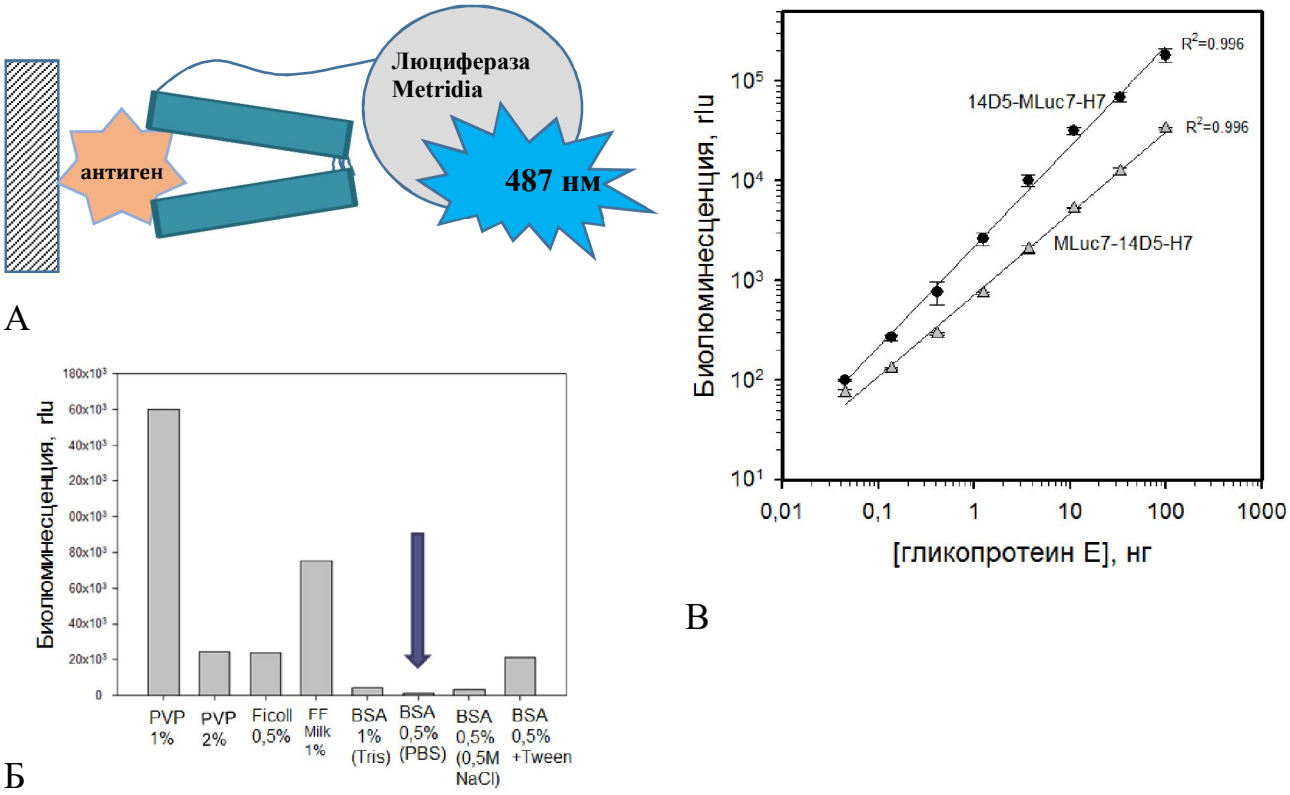


Рисунок 32 – Модельный твердофазный биолюминесцентный анализ: А – схема анализа, поставленного в лунках планшета; Б – оптимизация блокировочных растворов; В – значения биолюминесцентной активности, наблюдаемой при проверке чувствительности меток в анализе

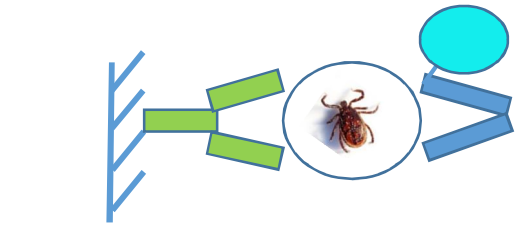
Было показано, что для обеих меток, созданных в рамках данной работы, была характерна аффинность к белку-мишени. Известно, что биоспецифические метки на основе люциферазы Renilla, также предназначенные для обнаружения энцефалита, были способны определять гликопротеин Е до 56 пг в лунке [Burakova et al., 2015]. В настоящем исследовании предельные точки обнаружения антигена были зафиксированы при концентрации 0,45 нг/мл, что позволяет детектировать 45 пг гликопротеина Е в лунке планшета (Рис. 32В). Наименьшую предельную концентрацию при детекции антигена продемонстрировала биолюминесцентная метка 14D5-ML7-

H7, которая была в дальнейшем применялась в иммуноанализе с использованием биопрепаратов клещей.

6.2.4 Проведение анализа на препаратах клещей

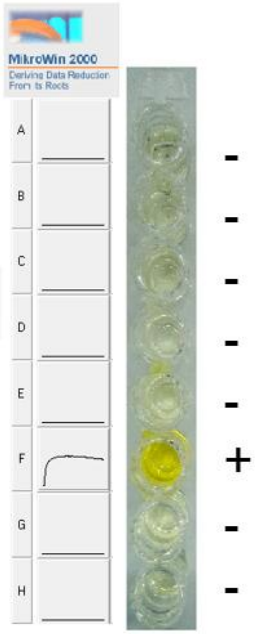
Для проведения твердофазного анализа на препаратах клещей, предоставленных санитарно-эпидемиологической службой, была отобрана одна из меток (14D5-ML7-H7), обладающая большей аффинностью к антигену, как было показано в ходе модельных экспериментов.

При проведении твердофазного анализа для определения ВКЭ на клещевых экстрактах была выбрана схема «сэндвич»-анализа, которая предполагает использование дополнительных полноразмерных антител, специфичных к вирусным частицам (Рис. 33А).



А

Б



В

Рисунок 33 – Биолюминесцентный иммуноанализ для определения клещевого энцефалита: А – схема твердофазного «сэндвич»-анализа, Б – набор для определения ВКЭ «Вектор-Бест», В – результаты анализов, проведенных с использованием стандартного метода и с новой разработанной меткой

На первой стадии иммунологического анализа в лунках планшета сорбировали полноразмерные антитела 1B1, специфичные к ВКЭ, после этого вносили блокировочный буфер, на следующем этапе в лунки добавляли лизированные клещевые экстракты. На последней стадии анализа сорбировали гибридную биолюминесцентную метку 14D5-ML7-H7, после промывки которой измеряли биолюминесцентную активность образцов на планшетном люминометре.

Для оценки эффективности метода экстракты клещей были также проанализированы стандартным набором, используемым в санитарно-медицинских учреждениях. Было показано, что результаты биолюминесцентных измерений, полученные при анализе всех образцов, полностью совпадали с результатами эпидемиологической службы и результатами анализа с реагентами «Вектор-Бест» (Рис. 33Б, В).

Таким образом, на примере гибридного белка, содержащего миниантитело к вирусу клещевого энцефалита и MLuc7 в качестве специфической и репортерной частей, соответственно, показано, что новая изоформа MLuc7 люциферазы *Metridia longa* может служить белком-партнером для конструирования бифункциональных гибридных белков для медицинской диагностики *in vitro*, так как присоединение специфического домена к N- или C-концу люциферазы не приводит к изменению биолюминесцентных и биохимических свойств люциферазы MLuc7.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований впервые, благодаря использованию бакуловирусной системы экспрессии, позволяющей получить рекомбинантные белки с корректно сформированными внутримолекулярными дисульфидными связями, выделены высокоочищенные препараты белков для новых изоформ MLuc7 и MLuc2 копеподной люциферазы из *Metridia longa*, а также люциферазы из *Gaussia princeps*. На примере изоформы MLuc7 продемонстрировано, что люцифераза, полученная с помощью бакуловирусной системы экспресии в клетках насекомых, имеет схожие свойства с MLuc7, синтезированной в клетках млекопитающих HEK293.

В настоящее время новая изоформа MLuc7 люциферазы копепод *Metridia longa* является самой маленькой по размеру из всех известных люцифераз. Маленький размер, а также ее биолюминесцентные и биохимические свойства, делают эту изоформу люциферазы перспективным репортером для конъюгации со специфическими молекулами (антителами, аптамерами, рецепторами и т.д.) для разработки диагностических методов *in vitro*, а также для применения в качестве биолюминесцентного секретируемого репортера для аналитических применений *in vivo*. Другая новая изоформа MLuc2, охарактеризованная в ходе выполнения этих исследований, хотя и имеет высокую степень идентичности аминокислотной последовательности с изоформой MLuc7, оказалась экстремально психрофильным ферментом, имеющим температурный оптимум биолюминесцентной реакции при ~5°C. Это свойство может быть полезным при использовании изоформы MLuc2, например, в качестве репортера для визуализации внутриклеточных процессов при изучении холодолюбивых организмов. Как показали исследования, смещение температурного оптимума реакции и повышение конформационной мобильности молекулы определяет отсутствие одной внутримолекулярной дисульфидной связи.

Несмотря на некоторые различия в свойствах, обе новые изоформы обладают высокой термостабильностью и удельной биолюминесцентной

активностью. Кроме того, активность и MLuc7, и MLuc2, регистрируемая по максимальной интенсивности биолюминесцентного сигнала, строго пропорциональна в широком диапазоне концентрации фермента. Установлено, что активность новых изоформ люциферазы *Metridia longa* сопоставима с активностью широко используемой люциферазой копепод *Gaussia princeps*. Однако, поскольку молекулярная масса изоформ люциферазы *Metridia longa* меньше, их использование в качестве репортерных молекул для неинвазивной визуализации биологических процессов выглядит более предпочтительным.

Применимость новых изоформ для *in vitro* и *in vivo* анализа была продемонстрирована на примере изоформы MLuc7. Сконструированный гибридный белок, состоящий из одноцепочечного антитела, специфичного к вирусу клещевого энцефалита, и MLuc7 в качестве репортерной молекулы, продемонстрировал высокую чувствительность обнаружения гликопротеина E (антигена) в модельном анализе. Кроме этого, гибридная метка на основе MLuc7 была протестирована для детекции вируса энцефалита в экстрактах клещей. Пригодность изоформы MLuc7 для использования в качестве секретируемого репортера в клетках млекопитающих была проверена на клетках HEK293. Культуральная среда транзиентно трансфецированных клеток показала высокий уровень биолюминесцентной активности, что свидетельствовало об эффективной секреции MLuc7. Причем, биолюминесцентная активность культуры клеток, экспрессирующих MLuc7, превышала активность среды клеток, экспрессирующих ранее описанную изоформу MLuc164 люциферазы *Metridia longa*, которая сейчас часто используется наряду с люциферазой Gaussia.

В отличие от некоторых биолюминесцентных белков, которые также используют целентеразин в качестве субстрата реакции, пространственная структура люцифераз копепод пока не определена и, следовательно, аминокислотные остатки, участвующие в каталитическом окислении субстрата и формировании активного центра фермента, пока не идентифицированы. Исследование биолюминесцентных и биохимических свойств мутантов MLuc7

с заменами остатков тирозина на фенилаланин позволило сделать заключение об участии Tyr72 и Tyr80 в формировании активного центра люциферазы и их существенной роли в окислении целентеразина.

Таким образом, результаты, полученные при выполнении данной работы, имеют как фундаментальное, так и прикладное значение.

ВЫВОДЫ

На основе полученных результатов были сформулированы следующие выводы:

1. Впервые разработана технология получения люцифераз копепод в нативной форме, включающая их экспрессию в клетках насекомых с помощью бакуловирусной системы и хроматографическую очистку из культуральной среды, обеспечивающая выход 6–7 мг/л высокоочищенных люцифераз. Показано, что свойства люцифераз, полученных в клетках насекомых, не отличаются от свойств люцифераз, секретируемых клетками млекопитающих.

2. Впервые исследованы биолюминесцентные и биохимические свойства новых изоформ MLuc7 и MLuc2 люциферазы *Metridia long*a, а также люциферазы копепод *Gaussia princeps*, полученных в нативной форме с помощью бакуловирусной системы экспрессии. Показано, что люциферазы обладают высокой удельной биолюминесцентной активностью, что позволяет детектировать их в аттомолярных количествах, а также экстремально высокой термостабильностью.

3. Показано, что температурный оптимум биолюминесцентной реакции, катализируемой новой изоформой MLuc2 люциферазы *M. longa*, находится при экстремально низкой температуре ~5ºC, что позволяет отнести эту изоформу к психрофильным ферментам. Установлено, что низкий температурный оптимум обусловлен более высокой пространственной гибкостью белка, возникающей вследствие отсутствия одной внутримолекулярной дисульфидной связи.

4. Методом сайт-направленного мутагенеза получены мутанты изоформы MLuc7 с заменой Tyr72 и Tyr80 на Phe. Показано, что мутации приводят к изменению температурного оптимума и кинетики биолюминесцентной реакции, удельной активности фермента, а также аффинности активного центра к субстрату. Это указывает на вовлеченность тирозинов в формировании активного центра люциферазы MLuc7 и в каталитическое окисление субстрата.

5. На примере транзиентной экспрессии клеток HEK293 продемонстрирована пригодность новой изоформы MLuc7 в качестве секретируемого репортера *in vivo* в клетках млекопитающих. Показано, что биолюминесцентная активность культуры клеток, экспрессирующих MLuc7, в 3 раза превышает активность среды клеток, экспрессирующих ранее описанную изоформу MLuc164 люциферазы *Metridia longa.*

6. На примере гибридного белка, содержащего одноцепочечное антитело 14D5a к вирусу клещевого энцефалита и MLuc7 в качестве специфической и репортерной частей, соответственно, показано, что новая изоформа MLuc7 может служить белком-партнером при конструировании бифункциональных гибридных белков для применения в диагностике *in vitro.*

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ATP, АТФ – аденозинтрифосфат

BRET – биолюминесцентный резонансный перенос энергии

BSA, БСА – бычий сывороточный альбумин

CBP – целентеразин-переносящий белок

GFP – зеленый флуоресцентный белок

IMAC – металл-аффинная хроматография

rlu – условные световые единицы

SEAP – секретируемая щелочная фосфатаза

ВКЭ – вирус клещевого энцефалита

ДСН – додецилсульфат натрия

ДТТ – дитиотриетол

кДа – килодальтон

кДНК – ДНК, комплементарная матричной РНК

н.п. – нуклеотидная пара

ПААГ – полиакриламидный гель

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ahmadian, A. Pyrosequencing: History, biochemistry and future / A. Ahmadian, M. Ehn, S. Hober // Clin Chim Acta. – 2006. – V. 363. – P. 83–90.
2. Alessandrini, F., Noninvasive monitoring of glioma growth in the mouse / F. Alessandrini, D. Ceresa, I. Appolloni, D. Marubbi, P. Malatesta P // J Cancer. – 2016 – V. 7, N. 13. – P. 1791–1797.
3. Alonso, M.T. Using aequorin probes to measure Ca^{2+} in intracellular organelles / M.T. Alonso, M. Rodríguez-Prados, P. Navas-Navarro, J. Rojo-Ruiz, J. García-Sancho // Cell Calcium. – 2017. – V. 64. – P. 3–11.
4. Aswendt, M. A review of novel optical imaging strategies of the stroke pathology and stem cell therapy in stroke / M. Aswendt, J. Adamczak, A. Tennstaedt // Front Cell Neurosci. – 2014. – V. 226. – P. 1–10.
5. Azad, T. Split-luciferase complementary assay: applications, recent developments, and future perspectives / T. Azad, A. Tashakor, S. Hosseinkhani //Anal Bioanal Chem. – 2014. – V. 406, N. 23. – P. 5541–5560.
6. Badr, C.E. Bioluminescent imaging: methods and protocols / C.E. Badr // Ch. 1. Bioluminescence imaging: basics and practical limitations. – Springer Science, New York – 2014. – V. 1098. – P. 1–18.
7. Berglund, K. a. Combined optogenetic and chemogenetic control of neurons / K. Berglund, J.K. Tung, B. Higashikubo, R.E. Gross, C.I. Moore, U. Hochgeschwender // Methods Mol Biol. – 2016. – V. 1408. – P. 207–225.
8. Berglund, K. Light-emitting channelrhodopsins for combined optogenetic and chemical-genetic control of neurons / K. Berglund, E. Birkner, G.J. Augustine, U. Hochgeschwender // PLoS ONE. – 2013. – V. 8. – e59759.
9. Berglund, K. Luminopsins integrate opto- and chemogenetics by using physical and biological light sources for opsin activation / K. Berglund, K. Clissold, H.E. Li, L. Wen, S.Y. Park, J. Gleixner, M.E. Klein, D. Lu, J.W. Barter, M.A. Rossi, G J. Augustine, H.H. Yin. U. Hochgeschwender // PNAS USA. – 2016. – V. 113. – P. 358–367.
10. Bibi, S. A new humanized *in vivo* model of KIT D816V+ advanced systemic

mastocytosis monitored using a secreted luciferase / S. Bibi, Zhang Y., Hugonin C., Mangean M.D., He L., Wedeh G., Launay J.M., Van R.S., Würdinger T., Louache F., Arock M. // Oncotarget. – 2016. – V. 7, N. 50. – P. 82985–83000.

11. Borisova, V.V. Recombinant Metridia luciferase isoforms: expression, refolding and applicability for *in vitro* assay / V.V. Borisova, L.A. Frank, S.V. Markova, L.P. Burakova, E.S. Vysotski // Photochem Photobiol Sci. – 2008. – V. 7, N. 9. – P. 1025–1031.
12. Bovenberg, M.S. Enhanced gaussia luciferase blood assay for monitoring of *in vivo* biological processes / M.S. Bovenberg, M.H. Degeling, B.A. Tannous // Anal Chem. – 2012. – V. 84, N. 2. – P. 1189–1192.
13. Bovenberg, M.S. Multiplex blood reporters for simultaneous monitoring of cellular processes / M.S. Bovenberg, M.H. Degeling, S. Hejazi, R.J. Amante, M. van Keulen, J.W.M. Jeuken, S. Akbaripanahi, C.L.A. Vleggeert-Lankamp, M. Tannous, P. Wesseling, T. Wurdinger, B.A. Tannous // Anal Chem. – 2013. – V. 85, N. 21. – P. 10205–10210.
14. Bradford-Grieve, J.M. Cladistic analysis of the calanoid Copepoda / J.M. Bradford-Grieve, G. Boxshall, S. Ahyong, S. Ohtsuka // Invertebrate Systematics. –2010. – V. 24. – P. 291–321.
15. Burakova, L.P. Bioluminescent detection probe for tick-borne encephalitis virus immunoassay / L.P. Burakova, A.N. Kudryavtsev, G.A. Stepanyuk, I.K. Baykov, V.V. Morozova, N.V. Tikunova, M.A. Dubova, V.N. Lyapustin, V.V. Yakimenko, L.A. Frank // Anal Bioanal Chem. – 2015. – V. 407, N. 18. – P. 5417–5423.
16. Burakova, L.P. Mitrocomin from the jellyfish *Mitrocoma cellularia* with deleted C-terminal tyrosine reveals a higher bioluminescence activity compared to wild type photoprotein / L.P. Burakova, P.V. Natashin, S.V. Markova, E.V. Eremeeva, N.P. Malikova, E.S. Vysotski, C. Cheng, Z.J. Liu // J Photochem Photobiol B. – 2016. – V. 162. – P. 286–297.
17. Chudakov, D.M. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues / D.M. Chudakov, M.V. Matz, S. Lukyanov, K.A. Lukyanov // Physiol Rev. – 2010. – V. 90. – P. 1103–1163.

18. Close, D.M. *In vivo* bioluminescent Imaging (BLI): noninvasive visualization and interrogation of biological processes in living animals / D.M. Close, T. Xu, G.S. Sayler, S. Ripp // Sensors. – 2011. – V. 11, N. 1. – P. 180–206.
19. Cormier, M.J. Application of Renilla bioluminescence: an introduction / M.J Cormier // Methods Enzymol. – 1978. – V. 57. – P. 237–244.
20. Decock, M. Analysis by a highly sensitive split luciferase assay of the regions involved in APP dimerization and its impact on processing / M. Decock, L. Haylani, S. Stanga, I. Dewachter, J.N. Octave, S.O. Smith, S.N. Constantinescu, P. Kienlen-Campard // FEBS Open Bio. – 2015. – V. 5. – P. 763–673.
21. Degeling, M.H. Gaussia luciferase-based mycoplasma detection assay in mammalian cell culture / M.H. Degeling, M.S. Bovenberg, M. Tannous, B.A. Tannous // Methods Mol Biol. – 2014. – V. 1098. – P. 47–55.
22. Delarze, E. Adaptation of a Gaussia princeps luciferase reporter system in *Candida albicans* for *in vivo* detection in the Galleria mellonella infection model / E. Delarze, F. Ischer, D. Sanglard, A.T. Coste // Virulence. – 2015. – V. 6, N. 7, 684–693.
23. Deriziotis, P. Investigating protein-protein interactions in live cells using bioluminescence resonance energy transfer / P. Deriziotis, S.A. Graham, S.B. Estruch, S.E. Fisher // J Vis Exp. – 2014. – V. 87. – e51438.
24. Dobbs, M. Simultaneous Dual Emission detection of luciferase reporter assays / M. Dobbs, D. Hughes, J. Narahari, J. Choi, G. Los, B. Webb, E. Matthews, C. Peters // BMG Labtech. – 2013. – Rev. 03.
25. Dombkowski, A.A. Protein disulfide engineering / A.A. Dombkowski, K.Z. Sultana, D.B. Craig // FEBS Lett. – 2014. – V. 588, N. 2. – P. 206–212.
26. Eckert, N, Influenza A virus encoding secreted Gaussia luciferase as useful tool to analyze viral replication and its inhibition by antiviral compounds and cellular proteins / N. Eckert, F. Wrensch, S. Gärtner, N. Palanisamy, U. Goedecke, N. Jäger // PLoS ONE. – 2014. – V. 9, N. 5. – e97695.
27. Ellman, G.L. Tissue sulfhydryl groups / G.L. Ellman // Arch Biochem Biophys. – 1959. – V. 82. N. 1. – P. 70–77.
28. Eremeeva, E.V. Bioluminescent and spectroscopic properties of His-Trp-Tyr triad

mutants of obelin and aequorin. / E.V. Eremeeva, S.V.Markova, L.A. Frank, A.J. Visser, W.J. van Berkel and E.S. Vysotski // Photochem Photobiol Sci. – 2012. – V. 12. – P. 1016-1024.

29. Eremeeva, E.V. The intrinsic fluorescence of apo-obelin and apo-aequorin and use of its quenching to characterize coelenterazine binding / E.V. Eremeeva, S.V. Markova, A.H. Westphal, A.J.W.G. Visser, W.J.H. van Berkel, E.S. Vysotski // FEBS Lett. – 2009. – V. 583. – P. 1939–1944.
30. Eremeeva, E.V. Unanimous model for describing the fast bioluminescence kinetics of Ca^{2+}-regulated photoproteins of different organisms / E.V. Eremeeva, S.I. Bartsev, W.J. van Berkel, E.S. Vysotski // Photochem Photobiol. – 2017. – V. 93, N. 2, 495–502.
31. Frundzhyan, V., Ugarova, N. Bioluminescent assay of total bacterial contamination of drinking water / V. Frundzhyan, N. Ugarova // Luminescence. – 2007. – V. 22, N. 3. – P. 241–244.
32. Fuente, S. de la. Mitochondrial free [Ca^{2+}] dynamics measured with a novel low-Ca^{2+} affinity aequorin probe / S. de la Fuente, R.I. Fonteriz, P.J. Cruz, M. Montero, J. Alvarez // Biochem J. – 2012. – V. 445. – P. 371–376.
33. Galarneau, A. Beta-lactamase protein fragment complementation assays as *in vivo* and *in vitro* sensors of protein–protein interactions / A. Galarneau, M. Primeau, L.E. Trudeau, S.W. Michnick // Nat Biotechnol. – 2002. – V. 20. – P. 619–622.
34. Gaur, S. Engineering intracellularly retained Gaussia luciferase reporters for improved biosensing and molecular imaging applications / S. Gaur, A. Bhargava-Shah, R. Afjei, T.V. Sekar, S.S. Gambhir, T.F. Massoud, R. Paulmurugan // ACS Chem Biol. – 2017. – V. 12, N. 9. – P. 2345–2353.
35. Gazda, K. Microscopic imaging of calcium ions with genetically encoded calcium indicators / K. Gazda, M. Bazała, T. Węgierski // Postepy Biochem. – 2017. – V. 63, N. 1. – P. 34–43.
36. Ghosh, I. Antiparallel leucine zipper-directed protein reassembly: application to the green fluorescent protein / I. Ghosh, A.D. Hamilton, L. Regan // J Am Chem Soc. – 2000. – V.122. – P. 5658–5659.

37. Gilad, Y. Discovering protein-protein interactions within the programmed cell death network using a protein-fragment complementation screen / Y. Gilad, R. Shiloh, Y. Ber, S. Bialik, A. Kimch // Cell Reports. – 2014. – V. 8. – P. 909–921.

38. Goerke, A.R. Cell-free metabolic engineering promotes high-level production of bioactive *Gaussia princeps* luciferase / A.R. Goerke, A.M. Loening, S.S. Gambhir, J.R. Swartz // Metab Eng. – 2008. – V. 10. – P. 187–200.

39. Grange, R.D. Radioimmunoassay, enzyme and non-enzyme-based immunoassays / R.D. Grange, J.P. Thompson, D.G. Lambert // Br J Anaesth. – 2014. – V. 112, N. 2. – P. 213–216.

40. Griesenbach, U. Secreted Gaussia luciferase as a sensitive reporter gene for *in vivo* and *ex vivo* studies of airway gene transfer / U. Griesenbach, C.C. Vicente, M.J. Robert, C. Meng, S. Soussi, S. Xenariou, P. Tennant, A. Baker, E. Baker, C. Gordon, C. Vrettou, D. McCormick, R. Coles, A.M. Green, A.E. Lawton, S.G. Jones, S.H. Cheng, R.K. Scheule, S.C. Hyde, D.R. Gill, D.D. Collie, G. McLachlan, E.W. Alton // Biomaterials. – 2011. – V. 32, N. 10. – P. 2614–2624.

41. Haddock, S.H. Bioluminescence in the sea / S.H. Haddock, M.A. Moline, J.F. Case // Ann. Rev. Mar. Sci. – 2010. – V. 2. – P. 443–493.

42. Haddock, S.H. Can coelenterates make coelenterazine? Dietary requirement for luciferin in cnidarian bioluminescence / S.H. Haddock, T.J. Rivers, B.H. Robison // PNAS USA. – 2001. – V. 98. – P. 11148–11151.

43. Harikumar, K.G. Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) Assay for Determination of Molecular Interactions in Living Cells / K.G. Harikumar, Y. Yan, K. Melcher, H.E. Xu, L.J. Miller // Bio Protoc. – 2017. – V. 7, N. 22. – e2904.

44. Hashimoto, T. Characterization of oligomer formation of amyloid-β peptide using asplit-luciferase complementation assay / T. Hashimoto, K.W. Adams, Z. Fan, P.J. McLean, B.T. Hyman // J Biol Chem. – 2011. – V. 286, N. 31. – P. 27081–27091.

45. Hatano, K. A functional screen identifies miRNAs that inhibit DNA repair and sensitize prostate cancer cells to ionizing radiation / K. Hatano, B. Kumar, Y. Zhang, J.B. Coulter, M. Hedayati, B. Mears, X. Ni, T.A. Kudrolli, W.H. Chowdhury, R. Rodriguez, T.L. DeWeese, S.E. Lupold // Nucleic Acids Research. – 2015. – V. 43,

N. 8. – P. 4075–4086.

46. Haugwitz, M. Multiplexing bioluminescent and fluorescent reporters to monitor live cells / M. Haugwitz, O. Nourzaie, T. Garachtchenko, L. Hu, S. Gandlur, C. Olsen, A. Farmer, G. Chaga, H. Sagawa // Curr Chem Genomics. – 2008. – V. 1. – P. 11–19.
47. Heise, K. Dual luciferase assay for secreted luciferases based on Gaussia and NanoLuc / K. Heise, Oppermann H, Meixensberger J, Gebhardt R, F. Gaunitz // Assay Drug Dev Technol. – 2013. – V. 11, N. 4. – P. 244–252.
48. Herring, P.J. Copepod luminescence / P.J. Herring // Hydrobiologia. – 1988. – V. 167. – P. 183–195.
49. Hida, N. High-sensitivity real-time imaging of dual protein-protein interactions in living subjects using multicolor luciferases / N. Hida, Awais M., Takeuchi M., Ueno N., Tashiro M., Takagi C., Singh T., Hayashi M., Ohmiya Y. and Ozawa T. // PLoS ONE. – 2009. – V. 4, N. 6. – e5868.
50. Hiramatsu, N. Alkaline phosphatase vs luciferase as secreted reporter molecules *in viv*o / N. Hiramatsu, A. Kasai, Y. Meng, K. Hayakawa, J. Yao, M. Kitamura // Anal Biochem. – 2005. – V. 339, N. 2. – P. 249–256.
51. Hiramatsu, N. Real-time detection and continuous monitoring of ER stress *in vitro* and *in vivo* by ES-TRAP: evidence for systemic, transient ER stress during endotoxemia / N. Hiramatsu, A. Kasai, K. Hayakawa, J. Yao, M. Kitamura // Nucleic Acids Res. – 2006. – V. 34, N. 13 – e93.
52. Hosseinkhani, S. Molecular enigma of multicolor bioluminescence of firefly luciferase / S. Hosseinkhani // Cell Mol Life Sci. – 2011. – V. 68. – P. 1167–1182.
53. Hu, C.D., Kerppola, T.K. Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. / C.D. Hu, T.K. Kerppola // Nat Biotechnol. – 2003. – V. 21. – P. 539–545.
54. Huang, L. Current advances in highly multiplexed antibody-based single-cell proteomic measurements / L. Huang, S.A. Michael, Y. Chen, H. Wu // Chem Asian J. – 2017. – V. 12, N. 14. – P. 1680–1691.
55. Huang, P.C. A multisampling reporter system for monitoring microRNA activity in the same population of cells / P.C. Huang, C.Y. Chen, F.Y. Yang, L.C. Au // J

Biomed Biotechnol. – 2009. – V. 2009. – P. 104716.

56. Hunt, E.A. Truncated variants of Gaussia luciferase with tyrosine linker for site-specific bioconjugate applications / E.A. Hunt, A. Moutsiopoulou, S. Ioannou, K. Ahern, K. Woodward, E. Dikici, S. Daunert, S.K. Deo // Sci Rep. – 2016. – V. 6. – P. 26814.
57. Illarionov, B.A. Sequence of the cDNA encoding the Ca(2+)-activated photoprotein obelin from the hydroid polyp *Obelia longissima* / B.A. Illarionov, V.S. Bondar, V.A. Illarionova, E.S. Vysotski E.S. // Gene. – 1995. – V. 153, N. 2. – P. 273–274.
58. Inouye, S. Single-step purification of recombinant Gaussia luciferase from serumcontaining culture medium of mammalian cells / S. Inouye // Protein Expr. Purif. – 2018. – V. 141. – P. 32–38.
59. Inouye, S., Secretional luciferase of the luminous shrimp *Oplophorus gracilirostris*: cDNA cloning of a novel imidazopyrazinone luciferase / S. Inouye, K. Watanabe, H. Nakamura, O. Shimomura // FEBS Lett. – 2000. – V. 481. – P. 19–25.
60. Johnsson, N., Varshavsky, A. Split ubiquitin as a sensor of protein interactions *in vivo* / N. Johnsson, A. Varshavsky // PNAS USA. – 1994. – 91, 10340–13044.
61. Joung, J. A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions / J. Joung, E. Ramm, C. Pabo // PNAS USA. – 2000. – V. 97, N. 13. – P. 7382–7387.
62. Kantar, R.S. Imaging tumor vascularity and response to anti-angiogenic therapy using Gaussia luciferase / R.S. Kantar, G. Lashgari, E.I. Tabet, G.K. Lewandrowski, L.A. Carvalho, B.A. Tannous // Sci Rep. – 2016. – V. 6. – P. 26353.
63. Kaskova, Z.M. 1001 lights: luciferins, luciferases, their mechanisms of action and applications in chemical analysis, biology and medicine / Z.M. Kaskova, A.S. Tsarkova, I.V. Yampolsky // Chem Soc Rev. – 2016. – V. 45. – P. 6048–6077.
64. Kelkar, M., De, A. Bioluminescence based *in vivo* screening technologies / M. Kelkar, A. De // Curr Opin Pharmacol. – 2012. – V.12. – P. 592–600.
65. Kim, M.S., Kim, K.H. Effects of NV gene knock-out recombinant VHSV on Mx gene expression in Epithelioma papulosum cyprini (EPC) cells and olive flounder / M.S. Kim, K.H. Kim // Fish Shellfish Imm. – 2012. – V. 32, N. 3. – P. 459–463.

66. Kim, S.B. Cation-driven optical properties of artificial luciferases / S.B. Kim, S. Miller, N. Suzuki, T. Senda, R. Nishihara, K. Suzuki // Anal Sci. – 2015. – V. 31, N. 10. – P. 955–960.

67. Kim, S.B. Creation of artificial luciferases for bioassays / S.B. Kim, M. Torimura, H. Tao // Bioconjugate Chem. – 2013. – V. 24. – P. 2067−2075.

68. Kim, S.B. Split Gaussia luciferase-based bioluminescence template for tracing protein dynamics in living cells / S.B. Kim, M. Sato, H. Tao // Anal. Chem. – 2009. – V. 81. – P. 67–74.

69. Kim, S.B. Superluminescent variants of marine luciferases for bioassays / S.B. Suzuki, M. Sato, H. Tao // Anal Chem. – 2011. – V. 83, N. 22. – P. 8732–8740.

70. Kim, S.B., Izumi, H. Functional artificial luciferases as an optical readout for bioassays / S.B. Kim, H. Izumi // BBRC. – 2014. – V. 448. – P. 418–423.

71. Knol-Blankevoort, V.T. Development of a multicolor bioluminescence imaging platform to simultaneously investigate transcription factor NF-κB signaling and apoptosis / V.T. Knol-Blankevoort, L. Mezzanotte, M.J. Rabelink, C.W. Löwik, E.L. Kaijzel // Methods Mol Biol. – 2016. – V. 1461. – P. 255–270.

72. Ko, H.Y. Bioluminescence reporter gene-based detection of microRNAs / H.Y. Ko, Y.S. Lee, S. Kim // Methods Mol Biol. – 2014. – V. 1098. – P. 85–95.

73. Kondo, H., Substituent effects on the kinetics for the chemiluminescence reaction of 6-arylimidazo[1,2-a]pyrazin-3(7H)-ones (Cypridina luciferin analogues): support for the single electron transfer (SET)–oxygenation mechanism with triplet molecular oxygen / H. Kondo, T. Igarashi, S. Maki, H. Niwa, H. Ikeda, T. Hirano // Tetrahedron Lett. – 2005. – V. 46. – P. 7701–7704.

74. Kraft, M. A dual expression platform to optimize the soluble production of heterologous proteins in the periplasm of *Escherichia coli* / M. Kraft, U. Knupfer, R. Wenderoth, A. Kacholdt, P. Pietschmann, B. Hock, U. Horn // Appl Microbiol Biotech. – 2007. – V. 76, N. 6. – P. 1413-1422.

75. Krasitskaya, V.V. Mutants of Ca^{2+}-regulated photoprotein obelin for site-specific conjugation / V.V. Krasitskaya, L.P. Burakova, A.A. Komarova, E.E. Bashmakova, L.A. Frank // Photochem Photobiol. – 2017. – V. 93, N. 2. – P. 553–557.

76. Kwon, H.J. Simultaneous monitoring of intracellular ATP and oxygen levels in chondrogenic differentiation using a dual-color bioluminescence reporter / H.J. Kwon, Y. Ohmiya, K. Yasuda // Luminescence. – 2014. – V. 29, N. 8. – P. 1194–1198.

77. Lake, M.C., Aboagye, E.O. Luciferase fragment complementation imaging in preclinical cancer studies / M.C. Lake, E.O. Aboagye // Oncoscience. – 2014. – V. 1, N. 5. – P. 310–325.

78. Lakowicz, J.R. Principles of fluorescence spectroscopy / J.R. Lakowicz // Springer, Singapore. – 2006.

79. Lashgari, G. Secreted reporters for monitoring multiple promoter function. / G.Lashgari, R. Kantar, B.A. Tannous // Mammalian synthetic promoters, Ch. 4. – Methods Mol Biol. – 2017. – V. 1651. – P. 33–47.

80. Lehmann, M. The consensus concept for thermostability engineering of proteins: further proof of concept / M. Lehmann, C. Loch, A. Middendorf, D. Studer, S.F. Lassen, L. Pasamontes, A. P. G. M. van Loon, M. Wyss // M Protein Eng. – 2002. – V. 15. – P. 403−411.

81. Li, F. Buffer enhanced bioluminescence resonance energy transfer sensor based on Gaussia luciferase for *in vitro* detection of protease / F. Li, J. Yu, Z. Zhang, Z. Cui, D. Wang, H. Wei, X.-E. Zhang // Anal Chimica Acta. – 2012. – V. 724. – P. 104–110.

82. Li, J. Cage the firefly luciferin! – a strategy for developing bioluminescent probes / J. Li, L. Chen, L. Dua, M. Li // Chem Soc Rev. – 2013. – V. 42, N. 2. – P. 662–676.

83. Lindberg, E. Development of cell-impermeable coelenterazine derivatives / E. Lindberg, S. Mizukami, K. Ibata, T. Fukano, A. Miyawaki, K. Kikuchi // Chem Sci. – 2013. – V. 4. – P. 4395–4400.

84. Lindman, S. *In vivo* protein stabilization based on fragment complementation and a split GFP system / S. Lindman, Hernandez-Garcia A., Szczepankiewicz O., Frohm B., Linse S. // PNAS USA. – 2010. – V. 107. – P. 19826–19831.

85. Liu, M. Secreted Gaussia princeps luciferase as a reporter of *Escherichia coli* replication in a mouse tissue cage model of infection / M. Liu, C. Blinn, S.M.

McLeod, J.W. Wiseman, J.V. Newman // PLoS ONE. – 2014. – V. 9, N. 3. – e90382.

86. Liu, Z.J. Structure of the Ca^{2+}-regulated photoprotein obelin at 1.7 Å resolution determined directly from its sulfur substructure / Liu, Z.J., E.S. Vysotski, C.J. Chen, J.P. Rose, J. Lee and B.C. Wang // Protein Sci. – 2000. – N. 9. – P. 2085–2093.
87. Lobstein, J. SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm / J. Lobstein, C.A. Emrich, C. Jeans, M. Faulkner, P. Riggs, M. Berkmen // Microb Cell Factor. – 2012. – V. 11. – P. 56.
88. Loh, J.M., Proft, T. Comparison of firefly luciferase and NanoLuc luciferase for biophotonic labeling of group A Streptococcus / J.M. Loh, T. Proft // Biotechnol Lett. – 2014. – V. 36. – P. 829–834.
89. Luker, K.E. Kinetics of regulated protein–protein interactions revealed with firefly luciferase complementation imaging in cells and living animals / K.E. Luker, Smith M.C., Luker G.D., Gammon S.T., Piwnica-Worms H., Piwnica-Worms D. // PNAS USA. – 2004. – V. 101. – P. 12288–122893.
90. Luker, K.E. Split Gaussia luciferase for imaging ligand-receptor binding. / K.E., Luker, G.D. Luker // Methods Mol Biol. –2014. – V. 1098. – P. 59–69.
91. Lupold, S.E. A real time Metridia luciferase based non-invasive reporter assay of mammalian cell viability and cytotoxicity via the β-actin promoter and enhancer / S.E. Lupold, T. Johnson, W.H. Chowdhury, R. Rodriguez // PLoS ONE. – 2012. – V. 7, N. 5. – e36535.
92. Ma, W. Telomeres and Telomerase. Using protein-fragment complementation assays (PCA) and peptide arrays to study telomeric protein-protein interactions / W. Ma, O. Lee, H. Kim, Z. Songyang // Humana Press, New York. – 2017.
93. Magliery, T.J. Detecting protein–protein interactions with a green fluorescent protein fragment reassembly trap: scope and mechanism / T.J. Magliery, C. Wilson, W. Pan, D. Mishler, I. Ghosh, A.D. Hamilton, L. Regan // J Am Chem Soc. – 2005. – V. 127. – P. 146–157.
94. Maguire, C.A. Gaussia luciferase variant for high-throughput functional screening applications / C.A. Maguire, N.C. Deliolanis, L. Pike, J.M. Niers, L.A. Tjon-Kon-Fat,

M. Sena-Esteves, B.A. Tannous // Anal Chem. – 2009. – V. 81. – P. 7102–7106.

95. Maguire, C.A. Triple bioluminescence imaging for *in vivo* monitoring of cellular processes / C.A. Maguire, M.S. Bovenberg, M.H. Crommentuijn, M. Kerami, J.M. Niers, J. Teng, M. Sena-Esteves, C.E. Badr, B.A. Tannous // Mol Ther Nucleic Acids. – 2013. – V. 2. – e99.

96. Malleshaiah, M. Real-time protein-fragment complementation assays for studying temporal, spatial, and spatiotemporal dynamics of protein-protein interactions in living cells / M. Malleshaiah, E. Tchekanda, S.W. Michnick // Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 2016.

97. Markova, S.V. Cloning and expression of cDNA for a luciferase from the marine copepod *Metridia longa*. A novel secreted bioluminescent reporter enzyme / S.V. Markova, S. Golz, L.A. Frank // J Biol Chem. –2004. – V. 279, N. 5. – P. 3212–3217.

98. Markova, S.V. High-active truncated luciferase of copepod *Metridia longa* / S.V Markova, L.P. Burakova, E.S. Vysotski // BBRC. – 2012. – V. 412. – P. 98–103.

99. Markova, S.V. Obelin from the bioluminescent marine hydroid *Obelia geniculata*: cloning, expression, and comparison of some properties with those of other Ca^{2+}-regulated photoproteins / S.V. Markova, E.S. Vysotski, J.R. Blinks, L.P. Burakova, B.C. Wang, J. Lee // Biochemistry. – 2002. – V. 41. – P. 2227–2236.

100. Markova, S.V. The light-sensitive photoprotein berovin from the bioluminescent ctenophore *Beroe abyssicola*: a novel type of Ca^{2+}-regulated photoprotein / S.V. Markova, L.P. Burakova, S. Golz, N.P. Malikova, L.A. Frank, E.S. Vysotski // FEBS Journal – 2012. – V. 279, N. 5. – P. 856–870.

101. Markova, S.V., Vysotski, E.S. Coelenterazine-dependent luciferases / S.V. Markova, E.S. Vysotski // Biochemistry Moscow. – 2015. – V. 80. – P. 714.

102. Matta, H. Development and characterization of a novel luciferase-based cytotoxicity assay / H. Matta, R. Gopalakrishnan, S. Choi, R. Prakash, V. Natarajan, R. Prins, S. Gong, S.D. Chitnis, M. Kahn, X. Han, V. Chaudhary, A. Soni, J. Sernas, P. Khan, D. Wang, P.M. Chaudhary / Sci Rep. – 2018. – V. 8. – P. 199.

103. Matthews, J.C. Purification and properties of *Renilla reniformis* luciferase / J.C. Matthews, K. Hori, M.J. Cormier // Biochemistry. – 1977. – V. 16. – P. 85–91.

104. Mezzanottea, L. Evaluating reporter genes of different luciferases for optimized *in vivo* bioluminescence imaging of transplanted neural stem cells in the brain / L. Mezzanotte, M. Aswendt, A. Tennstaedt, R. Hoeben, M. Hoehn, C. Löwik // Contrast Media Mol Imaging. – 2013. – V. 8, N. 6. – P. 505–513.

105. Michelini, E. Combining intracellular and secreted bioluminescent reporter proteins for multicolor cell-based assays / E. Michelini, L. Cevenini, L. Mezzanotte, D. Ablamsky, T. Southworth, B.R. Branchini, A. Roda // Photochem Photobiol Sci. – 2008. – V. 7, N. 2. – P. 212–217.

106. Moriyama, E.H. The influence of hypoxia on bioluminescence in luciferase-transfected gliosarcoma tumor cells *in vitro* / E.H. Moriyama, M. J. Niedre, M. T. Jarvi, J. D. Mocanu, Y. Moriyama, P. Subarsky, B. Li, L. D. Lilge, B. C. Wilson // Photochem Photobiol Sci. – 2008. – V. 7. – P. 675–680.

107. Murakami, G. Chemical library screening identifies a small molecule that downregulates Sod1 transcription for drugs to treat amyotrophic lateral sclerosis / G. Murakami, Inoue H., Tsukito K., Asai Y., Amagai Y., Aiba K., Shimogawa H., Uesugi M., Nakatsuji N., R. Takanashi // J Biomol Screen. – 2011. – V. 16. – P. 405–414.

108. Neveu, G., Comparative analysis of virus-host interactomes with a mammalian high-throughput protein complementation assay based on *Gaussia princeps* luciferase / G. Neveu, P. Cassonnet, P.O. Vidalain, C. Rolloy, J. Mendoza, L. Jones, F. Tangy, M. Muller, C. Demeret, L. Tafforeau // Methods. – 2012. – V. 58. – P. 349–359.

109. Oba, Y. Biosynthesis of coelenterazine in the deep-sea copepod, *Metridia pacifica* / Y. Oba, S. Kato, M. Ojika, S. Inouye // BBRC. – 2009. – V. 390. – P. 684–688.

110. Oba, Y., Identification of the luciferin-luciferase system and quantification of coelenterazine by mass spectrometry in the deep sea luminous ostracod *Conchoecia pseudodiscophora* / Y. Oba, H. Tsuduki, S. Kato, M. Ojika, S. Inouye // Chembiochem. – 2004. – V. 5. – P. 1495–1499.

111. Omachi, K. A split-luciferase-based trimer formation assay as a high-throughput screening platform for therapeutics in alport syndrome / K. Omachi, M. Kamura, K.

Teramoto, H. Kojima, T. Yokota, S. Kaseda, J. Kuwazuru, R. Fukuda, K. Koyama, S. Matsuyama, K. Motomura, T. Shuto, M.A. Suico, H. Kai // Cell Chem Biol. – 2018. doi: 10.1016/j.chembiol.2018.02.003.

112. Oyama, H. Gaussia luciferase as a genetic fusion partner with antibody fragments for sensitive immunoassay monitoring of clinical biomarkers / H. Oyama, I. Morita, Y. Kiguchi, S. Miyake, A. Moriuchi, T. Akisada, T. Niwa, N. Kobayashi // Anal Chem. – 2015. – V. 87, N. 24. – P. 12387–12395.

113. Paley, M.A., Prescher, J.A. Bioluminescence: a versatile technique for imaging cellular and molecular features / M.A. Paley, J.A. Prescher // Med Chem Commun. – 2014. – V. 5. – P. 255–267.

114. Park, S.Y. Novel luciferase-opsin combinations for improved luminopsins / S.Y. Park, Song S.H., Palmateer B., Pal A., Petersen E., Shall G.P., Welchko R.M., Ibata K., Miyawaki A., Augustine G.J., Hochgeschwender U. // J Neurosci Res. – 2017. doi: 10.1002/jnr.24152.

115. Pelletier, J.N. Oligomerization domain-directed reassembly of active dihydrofolate reductase from rationally designed fragments / J.N. Pelletier, F.X. Campbell-Valois, S. Michnick // PNAS USA. – 1998. – V. 95. – P. 12141–12146.

116. Permyakov, E.A., Burstein, E.A. Some aspects of studies of thermal transitions in proteins by means of their intrinsic fluorescence / E.A. Permyakov, E.A. Burstein // Biophys Chem. – 1984. – V. 19, N. 3. – P. 265–271.

117. Pertzova, N.M., Kosobokova, K.N. Zooplankton of the White Sea. History of investigations and the present state of knowledge e a review / N.M. Pertzova, K.N. Kosobokova // Rep Polar Res. – 2000. – V. 359. – P. 30–41.

118. Picaud, S. 9H-purine scaffold reveals induced-fit pocket plasticity of the BRD9 bromodomain / S. Picaud, M. Strocchia, S. Terracciano, G. Lauro, J. Mendez, D. L. Daniels, R. Riccio, G. Bifulco, I. Bruno, P. Filippakopoulos // J Med Chem. – 2015. – V. 58. – P. 2718–2736.

119. Pichler, A. Imaging reversal of multidrug resistance in living mice with bioluminescence: MDR1 P-glycoprotein transports / A. Pichler, J.L. Prior, D. Piwnica-Worms // PNAS USA. – 2004. – V.101, N. 6. – P. 1702–1707.

120. Puclette, M. Evaluation of Gaussia luciferase and foot-and-mouth disease virus 2A translational interrupter chimeras as polycistronic reporters for transgene expression / M. Puckette, T. Burrage, J.G. Neilan, M. Rasmussen // BMC Biotechnol. – 2017. – V. 17, N. 1. – P. 52–60.

121. Purtov, K.V. The chemical basis of fungal bioluminescence / K.V. Purtov, V.N. Petushkov, M.S. Baranov, K.S. Mineev, N.S. Rodionova, Z.M. Kaskova, A.S. Tsarkova, A.I. Petunin, V.S. Bondar, E.K. Rodisheva, S.E. Medvedeva, Y. Oba, A.S. Arseniev, S. Lukyanov, J.I. Gitelson, I.V. Yampolsky // Angew Chem Int Ed Engl. – 2015. – V. 54, N. 28. – P. 8124–8128.

122. Rathnayaka, T. Biophysical characterization of highly active recombinant Gaussia luciferase expressed in *Escherichia coli* / T. Rathnayaka, M. Tawa, S. Sohya, M. Yohda, Y. Kuroda // Biochimica et Biophysica Acta. – 2010. – V. 1804. – P. 1902–1907.

123. Rathnayaka, T. Solubilization and folding of a fully active recombinant Gaussia luciferase with native disulfide bonds by using a SEP-Tag / T. Rathnayaka, M. Tawa, T. Nakamura, S. Sohya, K. Kuwajima, M. Yohdaa, Y. Kuroda // Biochimica et Biophysica Acta. – 2011. – V. 1814. – P. 1775–1778.

124. Rodrigues, L., Mota, M. Bioinspired materials for medical applications / L. Rodrigues, M. Mota // Woodhead Publishing. – 2016.

125. Saha, D. In vivo bioluminescence imaging of tumor hypoxia dynamics of breast cancer brain metastasis in a mouse model / D. Saha, H. Dunn, H. Zhou, H. Harada, M. Hiraoka, R. P. Mason, D. Zhao // J Vis Exp. – 2011. – V. 56. – e3175.

126. Santos, E.B. Sensitive *in vivo* imaging of T cells using a membrane-bound Gaussia princeps luciferase / E.B. Santos, R. Yeh. J. Lee, Y. Nikhamin, B. Punzalan // Nat Med. –2009. – V. 15. – P. 338–344.

127. Sarmiento, F. Cold and hot extremozymes: industrial relevance and current trends / F. Sarmiento, R. Peralta, J.M. Blamey // Front Bioeng Biotechnol. – 2015. – V. 3. – P. 148.

128. Schnitzler, C.E. Genomic organization, evolution, and expression of photoprotein and opsin genes in *Mnemiopsis leidyi*: a new view of ctenophore

photocytes / C.E. Schnitzler, K. Pang, M.L. Powers, A.M. Reitzel, J.F. Ryan, T. Tada, M. Park, J. Gupta, S.Y. Brooks, R.W. Blakesley, S. Yokoyama, S.H. Haddock, M.Q. Martindale, A.D. Baxevanis // BMC Biology. – 2012. – V. 10. –P. 107.

129. Sharifian, S. Light emission miracle in the sea and preeminent applications of bioluminescence in recent new biotechnology / S. Sharifian, A. Homaei, R. Hemmati, K. Khajeh // J Photochem Photobiol, B. – 2017. – V. 172. – P. 115–128.

130. Sharifian, S. The emerging use of bioluminescence in medical research / S. Sharifian, A. Homaei, R. Hemmati, R. Luwor, K. Khajeh // Biomed Pharmacother. – 2018. – V. 101. – P. 74–86.

131. Shavkunov, A.S. Split-luciferase complementation assay to detect channel-protein interactions in live cells / A.S. Shavkunov, S.R. Ali, N.I. Panova-Elektronova, F. Laezza // Methods Mol Biol. – 2015. – V. 1278. – P. 497-514.

132. Shekhawat, S.S., Ghosh, I. Split-protein systems: beyond binary protein–protein interactions / S.S. Shekhawat, I. Ghosh // Curr Opin Chem Biol. – 2011. – V. 15. – P. 789–797.

133. Shimomura, O. Bioluminescence: chemical principles / O. Shimomura // World Scientific Publishing, Singapore. – 2006.

134. Shimomura, O. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea / O. Shimomura, F.H. Johnson, Y. Sayga // J Cell Comp Physiol. – 1962. – V. 59. – P. 223-239.

135. Shimomura, O. Isolation and properties of the luciferase stored in the ovary of the scyphozoan medusa *Periphylla periphylla* / O. Shimomura, P.R. Flood, S. Inouye, B. Bryan, A. Shimomura // Biol Bull. – 2001. – V. 201. – P. 339–347.

136. Smirnova, D.V., Ugarova, N.N. Firefly luciferase-based fusion proteins and their applications in bioanalysis / D.V. Smirnova, N.N. Ugarova // Photochem Photobiol. –2017. – V. 93, N. 2. – P. 436–447.

137. Stepanyuk, G.A. Expression, purification and characterization of the secreted luciferase of the copepod *Metridia longa* from Sf9 insect cells / G.A. Stepanyuk, H. Xu, C-K. Wu, S.V. Markova, J. Lee, E.S Vysotski, B-C. Wang // Prot Expr Purif. – 2008. – V. 61, N. 2. – P. 142–148.

138. Struvay, C., Feller, G., Optimization to low temperature activity in psychrophilic enzymes / C. Struvay, G. Feller // Int. J. Mol. Sci. –2012. – V. 13. – P. 11643-11665.

139. Takenaka, Y. A light in the dark: ecology, evolution and molecular basis of copepod bioluminescence. Horizons / Y. Takenaka, A. Yamaguchi, Y. Shigeri // J Plankton Res. – 2017. – V. 39, N. 3, 369–378.

140. Takenaka, Y. Computational analysis and functional expression of ancestral copepod luciferase / Y. Takenaka, A. Noda-Ogura, T. Imanishi, A. Yamaguchi, T. Gojobori, Y. Shigeri // Gene. – 2013. – V. 528. – P. 201–205.

141. Takenaka, Y. Evolution of bioluminescence in marine planktonic copepods / Y. Takenaka, A. Yamaguchi, N. Tsuruoka, M. Torimura, T. Gojobori, Y. Shigeri // Mol Biol Evol. – 2012. – V. 29, N. 6. – P. 1669–1681.

142. Takenaka, Y. Two forms of secreted and thermostable luciferases from the marine copepod crustacean, *Metridia pacifica* / Y. Takenaka, H. Masuda, A. Yamaguchi, S. Nishikawa, Y. Shigeri, Y. Yoshida, H. Mizuno // Gene. – 2008. – V. 425. – P. 28–35.

143. Tannous, B.A. Codon-optimized Gaussia luciferase cDNA for mammalian gene expression in culture and *in vivo* / B.A. Tannous, D.E. Kim, J.L. Fernandez, R. Weissleder, X.O. Breakefield // Molecular Therapy. – 2005. – V. 11. – P. 435–443.

144. Tannous, B.A. Gaussia luciferase reporter assay for monitoring biological processes in culture and *in vivo* / B.A. Tannous // Nat. Protoc. – 2009. – V. 4. – P. 582–591.

145. Tannous, B.A., Teng, J. Secreted blood reporters: insights and applications / B.A. Tannous, J. Teng // Biotechnol Adv. – 2011. – V. 29, N. 6. – P. 997–1003.

146. Tarasova, A.S. Bioluminescence as a tool for studying detoxification processes in metal salt solutions involving humic substances / A.S. Tarasova, S.L. Kislan, E.S. Fedorova, A.M. Kuznetsov, O.A. Mogilnaya, D.I. Stom, N.S. Kudryasheva // J Photochem Photobiol B. – 2012. – V. 117, N. 5. – P. 164–170.

147. Tian, W. High-throughput functional microRNAs profiling by recombinant AAV-based microRNA sensor arrays / W. Tian, Dong X, Liu X., Wang G., Dong Z., Shen W., Chen J., Wang Y., Wu Z., X. Wu // PLoS ONE. – 2012. – V. 7. – e29551.

148. Titushin, M.S. Coelenterazine-binding protein of *Renilla muelleri*: cDNA cloning, overexpression, and characterization as a substrate of luciferase / M.S. Titushin, S.V. Markova, L.A. Frank, N.P. Malikova, G.A. Stepanyuk, J. Lee, E.S. Vysotski // Photochem Photobiol Sci. – 2008. – V. **7**. – P. 189–196.

149. Tsekhanovskaya, N.A. Epitope analysis of tick-borne encephalitis (TBE) complex viruses using monoclonal antibodies to envelope glycoprotein of TBE virus (persulcatus subtype) / N.A. Tsekhanovskaya, L.E. Matveev, S.G. Rubin, A.S. Karavanov, E.K. Pressman // Virus Res. – 1993. – V. 30, N. 1. – P. 1–16.

150. Tsien, R.Y. Constructing and exploiting the fluorescent protein paintbox / Tsien, R.Y. // Angewandte Chemie International Edition. – 2009. – V. 48. – P. 5612–5626.

151. Tsuji, F.I. Bioluminescence in the marine teleost, *Porichthys notatus*, and its induction in a nonluminous form by *Cypridina* (ostracod) luciferin / F.I. Tsuji, A.T. Barnes, J.F. Case // Nature. – 1972. – V. 237. – P. 515–516.

152. Tsuji, F.I., Spectral characteristics of the bioluminescence induced in the marine fish, *Porichthys notatus* by Cypridina (ostracod) luciferin / F.I. Tsuji, Nafpaktitis, B.G., Goto, T., Cormier, M.J., Wampler, J.E., J.M. Anderson // Mol Cell Biochem. – 1975. – V. 9. – P. 3–8.

153. Tsuji, S. A cytoplasmic form of Gaussia luciferase provides a highly tensitive test for cytotoxicity / S. Tsuji, T. Ohbayashi, K. Yamakage, M. Oshimura, M. Tada / PLoS ONE. – 2016. – V. 11, N. 5. – e0156202.

154. Tsujita, T. Hypoxia-sensitive reporter system for high-throughput screening / T. Tsujita, S. Kawaguchi, T. Dan, L. Baird, T. Miyata, M. Yamamoto // Tohoku J Exp Med. – 2015. – V. 235, N. 2. – P. 151–159.

155. Tung, J.K. Inhibitory luminopsins: genetically-encoded bioluminescent opsins for versatile, scalable, and hardware-independent optogenetic inhibition / Tung J.K., Gutekunst C.A., Gross R.E. // Sci Rep. – 2015. – V. 5. – P. 14366.

156. Uebelhoer, L.S. High-throughput, luciferase-based reverse genetics systems for identifying inhibitors of Marburg and Ebola viruses / L.S. Uebelhoer, C.G. Albarino, L.K. McMullan, A.K. Chakrabarti, J.P. Vincent, S.T. Nichol, J.S. Towner // Antivir Res. – 2014. – V. 106. – P. 86–94.

157. Ustinova, J. Development of a luciferase-based system for the detection of ZnT8 autoantibodies / J. Ustinova, E. Zusinaite, M. Utt, K. Metsküla, K. Reimand, V. Huchaiah, A. Merits, R. Uibo // J Immunol Methods. – 2014. – V. 405. – P. 67–73.

158. Valencia, A., Pazos, F. Computational methods for the prediction of protein interactions / A. Valencia, F. Pazos // Curr Opin Struct Biol. – 2002. – V. 12. – P. 368–373.

159. Verhaegen, M., Christopoulos, T. Recombinant Gaussia luciferase. Overexpression, purification, and analytical application of a bioluminescent reporter for DNA hybridization / M. Verhaegen, T. Christopoulos // Analytical Chemistry. – 2002. – V. 74. – P. 4378–4385.

160. Villalobos, V. Current state of imaging protein-protein interactions *in vivo* with genetically encoded reporters / V. Villalobos, S. Naik, D. Piwnica-Worms // Annu Rev Biomed Eng. – 2007. – V. 9. – P. 321–349.

161. Walker, C.L. Fluorescence imaging using synthetic GFP chromophores / C.L. Walker, K.A. Lukyanov, I.V. Yampolsky, A.S. Mishin, A.S. Bommarius, A.M. Duraj-Thatte, B. Azizi, L.M. Tolbert, K.M. Solntsev // Curr Opin Chem Biol. – 2015. – V. 27. – P. 64–74.

162. Wang, B.J. Establishment of a bioluminescence-based bioassay for the detection of dioxin-like compounds / B.J. Wang, Y.F. Liao, Y.T. Tung, L.H. Yih, C.C. Hu, H. Lee // Toxicol Mech Methods. – 2013. – V. 23, N. 4. – P. 247–254.

163. Wehr, M.C. Monitoring regulated protein–protein interactions using split TEV / M.C. Wehr, R. Laage, U. Bolz, T.M. Fischer, S. Grunewald, S. Scheek, A. Bach, K.A. Nave, M.J. Rossner // Nat Methods. – 2006. – V. 3. – P. 985–993.

164. Widder, E.A. Bioluminescence in the ocean: origins of biological, chemical, and ecological diversity / E.A. Widder // Science. – 2010. – V. 328. – P. 704–708.

165. Wider, D., Picard, D. Secreted dual reporter assay with *Gaussia* luciferase and the red fluorescent protein mCherry / D. Picard, D. Wider // PLoS ONE. – 2017. – V. 12, N. 12. – e0189403.

166. Wille, T. *Gaussia princeps* luciferase as a reporter for transcriptional activity, protein secretion, and protein-protein interactions in *Salmonella enterica* serovar

typhimurium / T. Wille, K. Blank, C. Schmidt, V. Vogt., R.G. Gerlach // Appl Environ Microbiol. – 2012. – V. 78, N. 1. – P. 250–257.

167. Wu, N. Bacterial expressionand re-engineering of *Gaussia princeps* luciferase and its use as a reporter protein / N. Wu, T. Rathnayaka, Y. Kuroda // Biochim Biophys Acta. – 2015. – V. 1854. – P. 1392–1399.

168. Wu, P. A novel approach for detecting viable and tissue-specific circulating tumor cells through an adenovirus-based reporter vector / P. Wu, L.J. Sokoll, T.A. Kudrolli, W.H. Chowdhury, R. Ma, M.M. Liu, R. Rodriguez, S.E. Lupold // Prostate. – 2014. – V. 74, N. 13. – P. 1286–1296.

169. Xu, L.L. Development of a stable Gaussia luciferase enterovirus 71 reporter virus / L.L. Xu, C. Shan, C.L. Deng, X.D. Li, S.Q. Liu, Z.M. Yuan, Q.Y. Wang, P.Y. Shi, B. Zhang // J Virol Methods. – 2015. – V. 219. – P. 62–66.

170. Yamashita, H. Blood-based assay with secreted Gaussia luciferase to monitor tumor metastasis / H. Yamashita, D.T. Nguyen, E. Chung // Methods Mol Biol. – 2014. – V. 1098. – P. 145–151.

171. Zamay, T.N. Current and prospective protein biomarkers of lung cancer / T.N. Zamay, G.S. Zamay, O.S. Kolovskaya, R.A. Zukov, M.M. Petrova, A. Gargaun, M.V. Berezovski, A.S. Kichkailo // Cancers (Basel). – 2017. – V. 9, N. 11. – P. 155.

172. Zenchak, J.R. Bioluminescence-driven optogenetic activation of transplanted neural precursor cells improves motor deficits in a Parkinson's disease mouse model / J.R. Zenchak, B. Palmateer, N. Dorka, T.M. Brown, L.M. Wagner, W.E. Medendorp, E.D. Petersen, M. Prakash, U. Hochgeschwender // J Neurosci Res. – 2018. – doi: 10.1002/jnr.24237.

173. Zheng, Z. Hydrazide d-luciferin for in vitro selective detection and intratumoral imaging of Cu^{2+} / Z. Zheng, L. Wang, W. Tang, P. Chen, H. Zhu, Y. Yuan, G. Li, H. Zhang, G. Liang // Biosens Bioelectron. – 2016. – V. 83. – P. 200–204.

174. Бондарь, В.С. Физика и химия биолюминесценции: учеб. пособие / В.С. Бондарь, Е.С. Высоцкий, Е.Н. Есимбекова [и др.], под ред. О. Шимомуры, И.И. Гительзона. – Красноярск: СФУ. – 2012.