

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук**

На правах рукописи

Котлобай Алексей Анатольевич

Поиск, клонирование и экспрессия гена люциферазы грибов

специальность – 03.01.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2019

Работа выполнена в лаборатории химии метаболических путей Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Научный руководитель:

Доктор химических наук Илья Викторович Ямпольский

Официальные оппоненты:

Демидкина Татьяна Викторовна, доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник, и.о. заведующего лабораторией химических основ биокатализа ФГБУН Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

Катруха Алексей Генрихович, доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник кафедры биохимии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Ведущая организация:

ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

Защита состоится 20 марта 2019 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, ГСП-7, Москва В-437, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН и на сайте института www.ibch.ru.

Автореферат разослан « » 20__ г.

**Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор физико-математических наук
В.А. Олейников**



ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Биолюминесценция – это явление обусловленное способностью некоторых живых организмов испускать свет. В процессе химической реакции молекула субстрата, люциферина, окисляется кислородом воздуха. Процесс катализируется белком люциферазой, которая способствует превращению люциферина с помощью кислорода в молекулу оксилуциферина в возбужденном состоянии, которая затем переходит в нормальное состояние, испуская при этом квант видимого света.

На данный момент виды, обладающие биолюминесценцией, обнаружены во всех царствах живых организмов, кроме царства растений, и среди этих видов выявлено около 30 различных механизмов данного явления. Эти факты говорят о том, что биолюминесценция, как явление, весьма распространено в природе. Однако, не смотря на это, в настоящее время известны структуры всего десяти природных люциферинов, а так же определены структуры нескольких десятков люцифераз.

Методы биологических и медицинских исследований, различные анализы и технологии, основанные на люциферин-люциферазных реакциях, играют существенную роль в современной науке. Такое распространение обусловлено в первую очередь высоким квантовым выходом реакции биолюминесценции, а также возможностью использовать биолюминесцентные системы и их компоненты в не инвазивных методах анализа. Спектр применения биолюминесцентных систем огромен. От аналитических методов *in vitro* и *in vivo*, включающих тесты на различные вещества, до биоимиджинга живых систем в режиме реального времени.

Однако, наличие различных недостатков и ограничений, сужающих возможности использования и применения этих методик, стимулирует дальнейшее изучение природных биолюминесцентных систем с целью поиска новых люциферинов и люцифераз, для расширения спектра методов и улучшения уже существующих инструментов анализа.

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы был поиск и клонирование гена люциферазы грибов - нового неизвестного белка, возможно, имеющего лучшие характеристики, по сравнению с уже известными люциферазами, с целью его дальнейшего изучения и оптимизации работы для последующего применения в практических приложениях для различных направлений науки.

В рамках поставленной цели были сформулированы задачи:

- Установить нуклеотидную последовательность генов люцифераз различных видов грибов.
- Получить функциональную люциферазу грибов в гетерологической системе экспрессии.
- Применить люциферазу грибов в практических приложениях, традиционных для люцифераз.

- Получить функциональные укороченные варианты люциферазы *Neonothopanus nambi*.

Научная новизна и практическая ценность работы. Впервые установлены нуклеотидные последовательности генов люцифераз грибов *Neonothopanus nambi*, *Armillaria gallica*, *Armillaria mellea*, *Armillaria ostoyae*, *Mycena chlorophos*, *Omphalotus olearius*, *Panellus stipticus* и *Mycena citricolor*. Данные гены были клонированы и впервые показана их гетерологическая экспрессия в клетках бактерий, дрожжей и млекопитающих, а также успешное применение в практических приложениях: люминесцентное мечение как отдельных клеток, так и клеток внутри целого организма. Кроме того были впервые получены, клонированы и экспрессированы функциональные укороченные варианты люциферазы гриба *Neonothopanus nambi*. Новые люциферазы грибов, найденные в настоящей работе, могут найти применение в различных методах люминесцентного анализа.

Апробация полученных данных и публикации. Основные материалы диссертации были доложены на 20-м международном симпозиуме по биолюминесценции и хемилюминесценции (20-th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence ISBC-2018) (г. Нант, Франция, 2018) и 21-й Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология наука XXI века» (г. Пушино, Россия, 2017). По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых журналах.

Структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 132 страницах и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов, списка сокращений, трех приложений, а также списка цитируемой литературы, включающего 327 ссылок. Диссертация содержит 43 рисунка и 7 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В качестве объекта исследований был выбран биолюминесцентный гриб *Neonothopanus nambi*, поскольку ранее нами был разработан протокол культивирования его мицелия, что давало нам доступ к неограниченному количеству материала для работы. Для поиска и клонирования люциферазы гриба *N. nambi* были параллельно использованы два подхода. Первый – биохимический подход: «классическое» выделение и очистка искомого белка из природной биомассы гриба с целью получения препарата люциферазы гриба *N. nambi* для проведения масс-спектрометрического секвенирования. Второй – молекулярно биологический подход: выделение РНК из биомассы мицелия для получения библиотеки кДНК, с последующим ее клонированием и анализом в клетках дрожжей с целью поиска клона, содержащего ген люциферазы.

1 Получение очищенного препарата люциферазы гриба *N. nambi* для проведения масс-спектрометрического секвенирования

Биолюминесцентную систему грибов изучают достаточно давно на примере различных видов, однако *N. nambi* является относительно новым объектом исследования, биолюминесцентная система которого ранее не изучалась, а потому требует *de novo* отработки методов работы с ним. Для определения аминокислотной последовательности люциферазы гриба *N. nambi* необходимо было получить очищенный препарат данного фермента, пригодный для проведения процедуры масс-спектрометрического исследования, позволяющей установить аминокислотную последовательность белка и, в конечном итоге, идентифицировать ген, кодирующий данную люциферазу. Для получения такого препарата необходимо было разработать ряд методов и подобрать условия для выделения и очистки искомого белка, а также разработать методику измерения биолюминесцентной активности в препаратах люциферазы. Данные работы проводились в тесном сотрудничестве с сотрудником группы синтеза природных соединений ИБХ РАН Андреем Гороховатским.

1.1 Выделение микросомальной фракции из биомассы гриба *N. nambi*

Вначале необходимо было разработать метод получения препарата неочищенной активной люциферазы из мицелия и подобрать условия хранения этого препарата, позволяющие минимизировать потери биолюминесцентной активности. По результатам наблюдений на предварительных этапах работы с мицелием гриба *N. nambi* нам стало ясно, что люминесцентная активность присуща именно клеточной фракции гриба и не является секретлируемой в среду культивации. Также было известно из литературы, что предварительное вымачивание мицелия в дистиллированной воде приводит к многократному увеличению его биолюминесценции.

Основываясь на этих данных, был разработан метод получения препарата люциферазы из мицелия гриба *N. nambi*. Одной из основных проблем на данном

этапе работы было то, что получение лизата биомассы грибного мицелия требует жестких методов клеточного разрушения, поскольку клеточная стенка грибов характеризуется большой прочностью. Вследствие этого была разработана методика многоступенчатого разрушения мицелия, включающая как этапы механического разрушения, так и воздействие ультразвуком. В конечном итоге была получена микросомальная фракция, содержащая биолюминесцентную активность.

1.2 Подбор условий солюбилизации люциферазы *N. nambí*

Для дальнейшей работы необходимо было подобрать условия солюбилизации микросомальной фракции, что подразумевает, в первую очередь, подбор оптимального детергента. Для этого в буфер (20 mM MOPS pH 7.2, 50 mM NaCl) вносили аликвоту микросом с известной концентрацией белка в ней, и к полученной смеси добавляли различные детергенты. Пробы инкубировали при 4°C с перемешиванием в течение полутора часов. Затем пробы центрифугировали при 210000 g, 4°C, 2 ч. Аликвоты супернатанта использовали для измерения биолюминесценции, причем каждый детергент анализировали при различных его концентрациях в растворе, что обусловлено необходимостью определения оптимального соотношения с микросомальной фракцией.

По результатам экспериментов лучшую способность к солюбилизации изучаемого фермента показал Triton X-100. Однако этот детергент обладает набором свойств (таких как очень большой размер мицелл, к примеру), затрудняющих применение некоторых хроматографических и электрофоретических методов при дальнейшей работе с солюбилизированной фракцией. Поэтому для дальнейших экспериментов был выбран следующий за ним по эффективности солюбилизации додецилмальтозид (DDM), и подобрано его соотношение с микросомальной фракцией для оптимальной солюбилизации люминесцентной активности. Для каждого образца микросомальной фракции необходимо было определять это соотношение индивидуально.

Полученную в результате выделения из мицелия микросомальную фракцию люциферазы использовали далее для хроматографической очистки исследуемого фермента.

1.3 Хроматографическая очистка люциферазы *N. nambí*

На первом этапе хроматографической очистки применяли анионообменный носитель DEAE-Sepharose. Из данных хроматографии следует (Рисунок 1), что биолюминесцентная активность связывается с колонкой и затем элюируется в начале градиента соли.

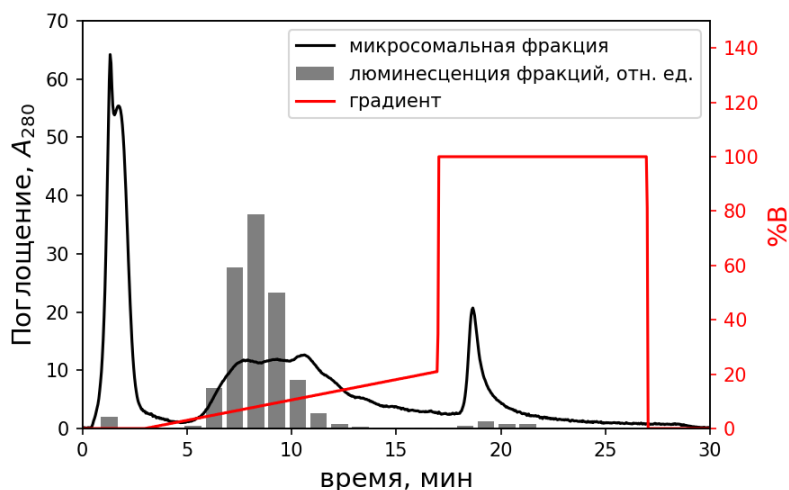


Рисунок 1. Хроматография препарата солюбилизированной микросомальной фракции на колонке DEAE-Sepharose. Люминесцентная активность фракций дана в виде столбчатой диаграммы, наложенной на профиль хроматографии.

Фракции, полученные после ионообменной хроматографии, разделяли в денатурирующих восстанавливающих условиях SDS-PAGE, гель окрашивали серебром. Однако данные электрофореза активных фракций в денатурирующих условиях (Рисунок 2) не позволили с достаточной степенью определенности выявить полосу, соответствующую люциферазе.

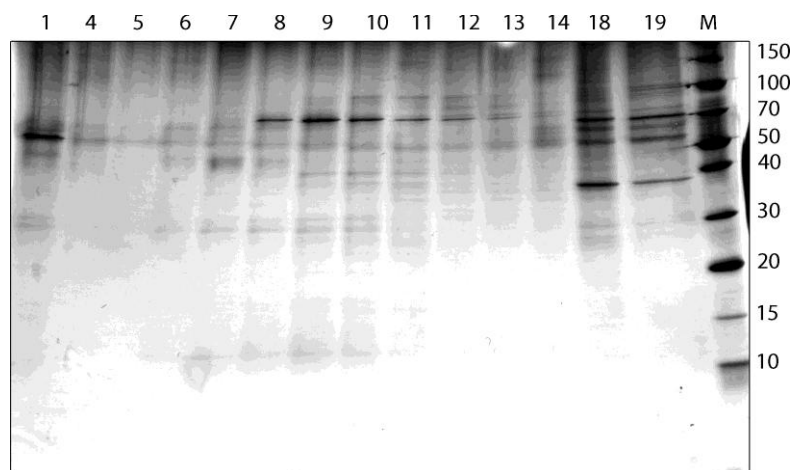


Рисунок 2. SDS-PAGE электрофорез фракций DEAE-Sepharose. Номера дорожек соответствуют номерам фракций. Максимальная биолюминесцентная активность присутствовала во фракциях 6-11. Молекулярный вес соответствующих полос маркера (PageRuler protein ladder (Thermo Scientific, США)) в кДа указан справа. Гель окрашивали серебром.

В связи с этим было принято решение ввести дополнительную стадию очистки люциферазы с помощью гель-фильтрационной хроматографии на колонке Superdex200. Как показано на Рисунке 3, в условиях гель-фильтрационной хроматографии мицеллы DDM элюируются со временем, соответствующим 52.3 кДа. При этом основной пик хроматограммы соответствует 62 кДа, а максимум биолюминесцентной активности – 74.4 кДа. Вероятно, люцифераза солюбилизирована в мицеллах DDM, возможно смешанных с природными липидами мембран гриба.

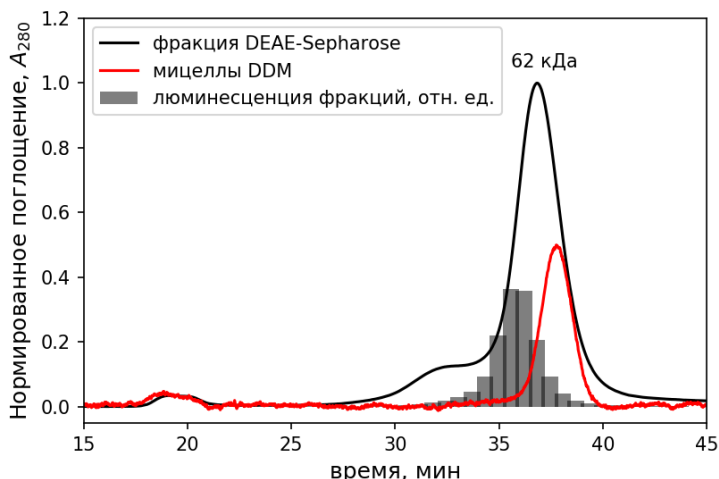


Рисунок 3. Гель-фильтрация фракции 8 DEAE-Sepharose на колонке Superdex200. Черная линия – хроматографический профиль фракции 8 DEAE-Sepharose. Люминесцентная активность фракций дана в виде столбчатой диаграммы, наложенной на профиль хроматографии. Красная линия – хроматографический профиль препарата мицелл DDM.

На смешанный характер мицелл DDM указывает спектр поглощения пика при 62 кДа, содержащий пики, характерные для эргостерола – хорошо известного компонента мембран грибов.

Данные электрофореза активных фракций гель-фильтрационной хроматографии в денатурирующих условиях (Рисунок 4) также не позволяли с достаточной степенью определенности выявить полосу, соответствующую люциферазе.

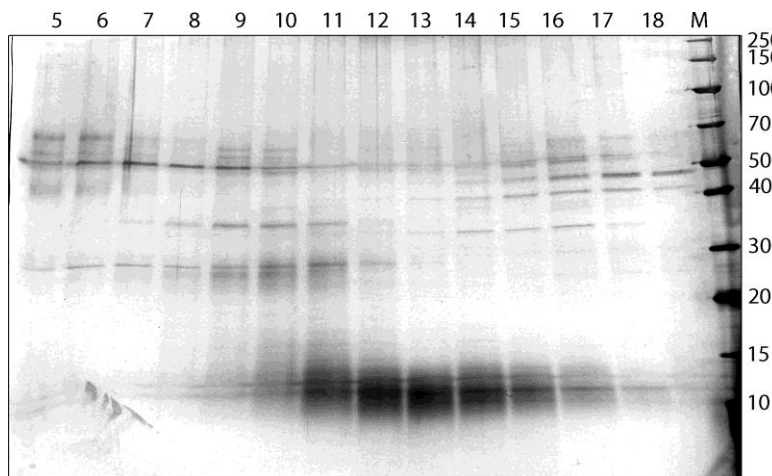


Рисунок 4. SDS-PAGE электрофорез фракций Superdex200. Номера дорожек соответствуют номерам фракций. Максимальная биолуминесцентная активность присутствовала во фракциях 7-15. Молекулярный вес соответствующих полос маркера (PageRuler protein ladder (Thermo Scientific, США)) в кДа указан справа. Гель окрашивали серебром.

1.4 Электрофорез в нативных условиях

В связи с невозможностью выявления полосы, соответствующей люциферазе, по результатам электрофореза в денатурирующих условиях, была отработана методика проведения электрофореза в нативных условиях. Для этого микросомы сольубилизировали в буфере с DDM и хроматографировали на колонке Q-Sepharose в тех же условиях, что и для колонки с DEAE-Sepharose. На электрофорез наносили фракции с наибольшей люминесцентной активностью (Рисунок 5). Проведение гель-электрофореза в нативных условиях позволило, после вымачивания геля в буфере, содержащем люциферин, идентифицировать

полосу люциферазы с помощью гель-документирующей системы, затем гель был окрашен серебром (Рисунок 6).

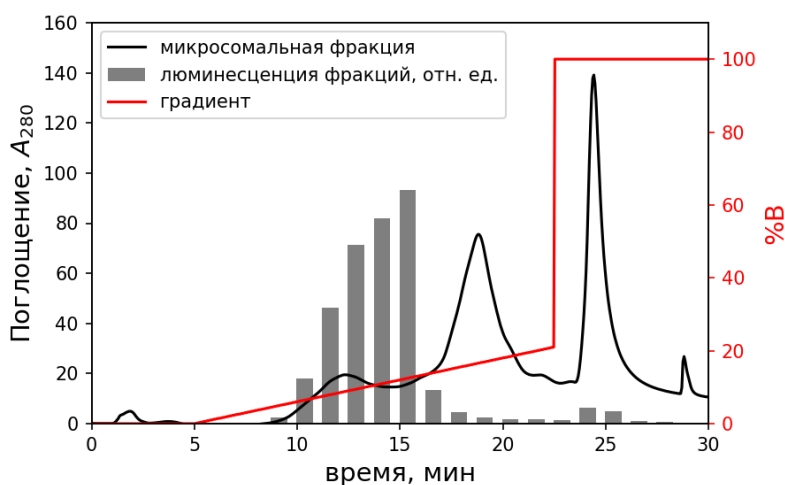


Рисунок 5. Хроматография препарата солюбилизированной микросомальной фракции на колонке Q-Sepharose. Люминесцентная активность фракций дана в виде столбчатой диаграммы, наложенной на профиль хроматографии.

Из данных, представленных на Рисунке 6, следует, что в использованных условиях люцифераза мигрирует одной полосой, а интенсивность люминесценции соответствует профилю активности, измеренному при помощи люминометра. Вместе с тем, при окрашивании геля серебром идентифицировать полосу, соответствующую люциферазе, не удалось.

В связи с этим, был разработан формат двумерного электрофореза в нативных условиях. После проведения электрофореза в первом направлении, дорожка с образцом вырезалась и использовалась для второго направления. Причем, после первого направления параллельно проводились электрофорезы во втором направлении как в нативных, так и в денатурирующих условиях (Рисунок 7, Рисунок 8).

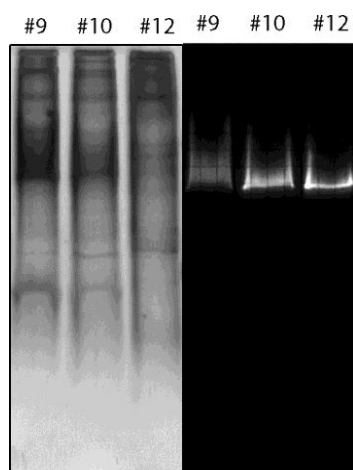


Рисунок 6. Электрофорез в нативных условиях. На электрофорез наносили указанные фракции после хроматографии на колонке Q-Sepharose. Слева: гель окрашен серебром. Справа: биолюминесцентная детекция в геле раствором люциферина.

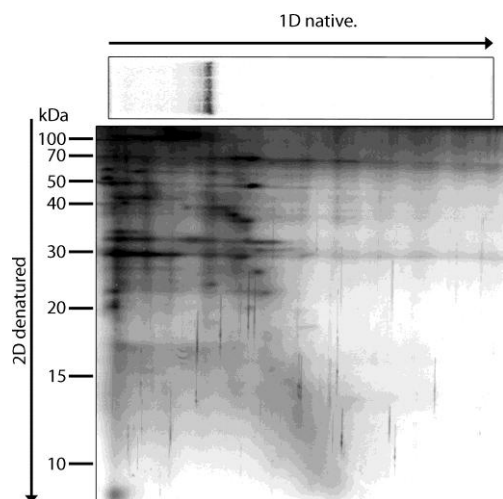


Рисунок 7. Двумерный электрофорез в денатурирующих условиях второго направления. Вверху показана дорожка геля после первого направления (детекция биолюминесценции в геле). Гель окрашивали серебром. Молекулярный вес соответствующих полос маркера (PageRuler protein ladder (Thermo Scientific, США)) в кДа указан слева.

Как показано на Рисунке 8, в результате двумерного электрофореза с детекцией биолюминесценции в геле надежно детектируется светящееся пятно. Последующая окраска геля серебром позволила вырезать пятно, соответствующее биолюминесцентному сигналу.

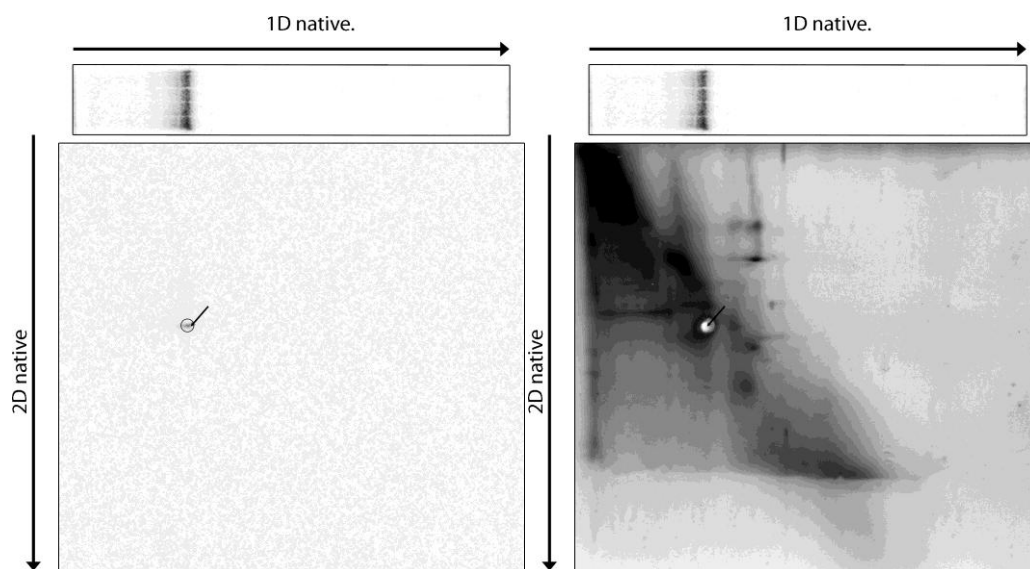


Рисунок 8. Двумерный электрофорез в нативных условиях. Вверху показана дорожка геля после первого направления (детекция биолюминесценции в геле). Слева: второе направление, биолюминесценция в геле. Справа: последующая окраска геля серебром. Стрелками указана зона, вырезанная из геля.

Аналогичные пятна, полученные в результате серии двумерных электрофорезов, были вырезаны из гелей и оказались пригодными для проведения масс-спектрометрического секвенирования.

1.5 Масс-спектрометрическое секвенирование образцов из гелей

Масс-спектрометрические исследование проводились при участии сотрудника лаборатории Протеомики ИБХ РАН Рустама Зиганшина, на приборе Q Exactive™ HF (Thermo Fisher Scientific, США). После обработки результатов с помощью сервиса Mascot (Matrix Science, США) был выполнен поиск соответствующих кандидатов в транскриптоме *N. nambi*, полученном нами ранее.

В результате были идентифицированы несколько возможных генов-кандидатов (Таблица 1), которые были впоследствии клонированы в бактерии *Escherichia coli*. Однако результаты проверки активности дали неоднозначные результаты, не позволяющие с уверенностью идентифицировать люциферазу, что, как выяснилось впоследствии, было связано с неоптимальными условиями экспрессии белков, а также тем фактом, что люцифераза гриба *N. nambí* является мембранным белком, что затрудняет его правильное сворачивание в клетках прокариот. Забегая вперед, стоит отметить, что ген люциферазы грибов присутствовал среди генов кандидатов, но вышеперечисленные обстоятельства не позволили с уверенностью его идентифицировать. В связи с полученными данными, было принято решение создать библиотеку кДНК гриба *N. nambí* и клонировать ее в клетки дрожжей для последующей идентификации клона, экспрессирующего люциферазу.

Номер	Идентификатор транскрипта	Масса, Да	Ранг транскрипта
1	c19665_g2_i1	52592	208
2	c16895_g1_i1	58910	150
3	c20577_g2_i1	42426	119
4	c22554_g1_i1	47175	105
5	c15673_g1_i1	25835	105
6	c23057_g1_i1	55847	105
7	c137_g1_i1	35753	88
8	c29206_g1_i1	132056	72
9	c28205_g1_i1	33193	65
10	c27892_g1_i1	108900	55
11	c24673_g1_i3	247331	53
12	c25482_g1_i1	70800	51

Таблица 1. Результаты масс-спектрометрического анализа образцов, вырезанных из геля после двумерного электрофореза в нативных условиях препарата очищенной люциферазы. Двенадцать наиболее вероятных кандидатов, с наибольшим рангом.

2 Клонирование библиотеки кДНК гриба *N. nambí* и поиск последовательности гена люциферазы

Так как выделение и очистка препарата люциферазы из биомассы гриба *N. nambí* не дали однозначного ответа, какая из найденных с помощью масс-спектрометрического анализа последовательностей соответствует последовательности люциферазы, было принято решение о клонировании люциферазы с помощью библиотеки кДНК. В качестве организма для

клонирования были выбраны дрожжи *Pichia pastoris*, так как они являются эукариотическими организмами, филогенетически наиболее близкими грибам, что давало основания надеяться на успешную экспрессию и правильное сворачивание исследуемой люциферазы. Данная часть работы проводилась в тесном сотрудничестве с Кареном Саркисяном и Екатериной Серебровской (лаб. Биофотоники ИБХ РАН), а также Иваном Смирновым и Юлианой Мокрушиной (лаб. Биокатализа ИБХ РАН).

2.1 Клонирование библиотеки кДНК гриба *N. nambi* в дрожжи *P. pastoris* и определение последовательности гена грибной люциферазы

Для создания библиотеки кДНК из мицелия *N. nambi* была выделена суммарная РНК, и кДНК была амплифицирована с помощью SMART PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech, США). Полученную библиотеку кДНК клонировали в вектор GAP-pPic9K, созданный на основе вектора pPic9K, путем замены последовательностей индуцибельного промотора алкоголь оксидазы (AOX1) и сигнальной последовательности альфа фактора на последовательность промотора глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GAP). После линеаризации по сайту рестрикции *AvrII*, данную библиотеку кДНК использовали для трансформации клеток *P. pastoris*. Трансформированные клетки рассеивали на чашки Петри со средой RDB medium и помещали в термостат, для последующего роста клеток. Разнообразие итоговой библиотеки кДНК *N. nambi* в дрожжах составило порядка одного миллиона клонов. Полученные колонии опрыскивали раствором 3-гидроксигиспидина (предоставлен Зинаидой Осиповой и Александрой Царьковой, гр. Синтеза природных соединений ИБХ РАН), для стимуляции реакции биолюминесценции. Испускаемый колониями свет детектировали с помощью IVIS Spectrum CT (PerkinElmer, США) (Рисунок 9) в сотрудничестве с Максимом Абакумовым (РНИМУ им. Пирогова).

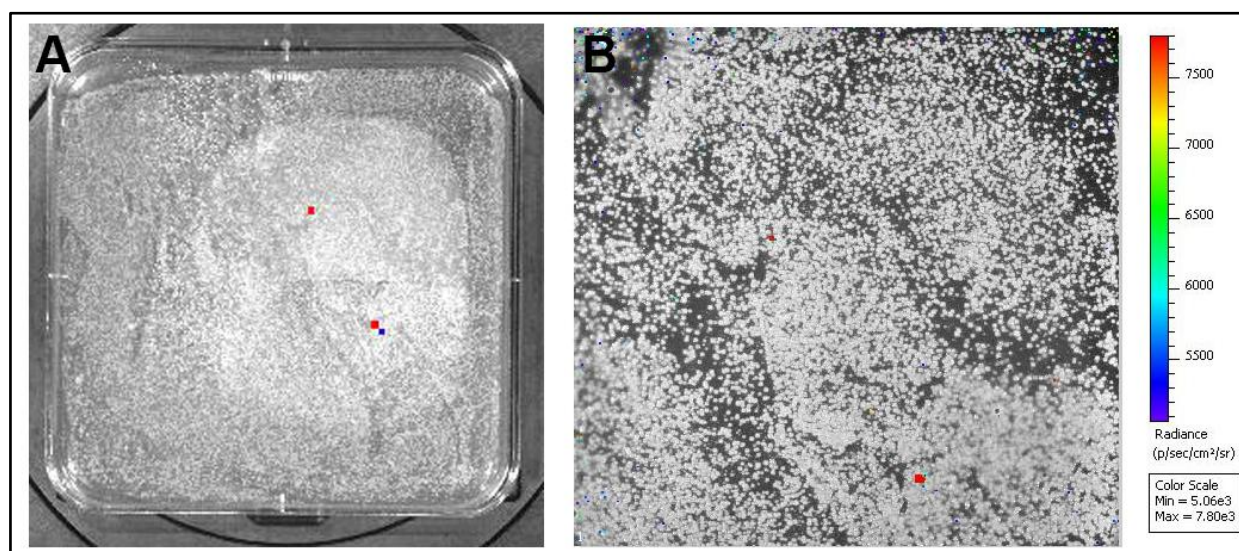


Рисунок 9. Клетки дрожжей *Pichia pastoris*, трансформированные библиотекой кДНК *Neonothopanus nambi* и опрысканные раствором люциферина. Представлено наложение изображений снятых с помощью IVIS Spectrum CT в видимом свете и в биолюминесцентном канале. А – изображение всей чашки. В – увеличенный участок со светящимися клонами.

Колонии, в которых детектировалось свечение в ответ на добавление 3-гидроксииспирина, отбирали и выделяли из клеток геномную ДНК, которая в свою очередь использовалась для установления последовательности приобретенного в результате трансформации гена, методом секвенирования по Сэнгеру. Все отобранные в результате поиска клоны дрожжей несли один и тот же ген, идентифицированный как ген люциферазы *N. nambi*. Полученная нуклеотидная последовательность гена люциферазы *N. nambi* показана на Рисунке 10. Кодированная ею аминокислотная последовательность показана на Рисунке 11. Стоит отметить, что данная нуклеотидная последовательность соответствует последовательности открытой рамки считывания транскрипта c137_g1_i1. Данный транскрипт присутствовал среди тех, которые были выявлены в первой части работы (Таблица 1).

```
ATGCGCATTAACATTAGCCTCTCGTCTCTCTTCGAACGTCTCTCCAACTTAGCAGTCGCA
GCATAGCGATTACATGTGGAGTTGTTCTCGCCTCCGCAATCGCCTTTCCCATCATCCGCAG
AGACTACCAGACTTTCCTAGAAGTGGGACCCTCGTACGCTCCGCAGAACTTTAGAGGATA
CATCATCGTCTGTGTCCTCTCGCTATTCCGCCAAGAGCAGAAAGGGCTCGCCATCTATGAT
CGTCTTCCCGAGAAACGCAGGTGGTTGGCCGACCTTCCCTTTCGTGAAGGAACCAGACCC
AGCATTACCAGCCATATCATTCAGCGACAGCGCACTCAACTGGTTCGATCAGGAGTTTGCC
ACCAGGGAGCTCATAGACAAGGTCATCCCTCGCGTGCAAGCACGACACACCCGACAAAACG
TTCCTCAGCACATCAAAGTTCGAGTTTCATGCGAAGGCCATATTTCTCTTGCCTTCTATCCC
AATCAACGACCCTCTGAATATCCCTAGCCACGACACTGTCCGCCGAACGAAGCGCGAGAT
TGCACATATGCATGATTATCATGATTGCACACTTCATCTTGCTCTCGCTGCGCAGGATGGA
AAGGAGGTGCTGAAGAAAGGTTGGGGACAACGACATCCTTTGGCTGGTCCTGGAGTTCCT
GGTCCACCAACGGAATGGACTTTTCTTTATGCGCCTCGCAACGAAGAAGAGGCTCGAGTA
GTGGAGATGATCGTTGAGGCTTCCATAGGGTATATGACGAACGATCCTGCAGGAAAGATT
GTAGAAAACGCCAAG
```

Рисунок 10. Нуклеотидная последовательность гена люциферазы гриба *N. nambi*.

```
MRINISLSSLFERLSKLSRSIAITCGVVLASAIAPFIIRRDYQTFLEVGPSYAPQNFRGYIIVCVLS
LFRQEQKGLAIYDRLPEKRRWLADLPFREGTRPSITSHIIQRQRTQLVDQEFATRELIDKVIPRV
QARHTDKTFLSTSKFEFHAKAIFLLPSIPINDPLNIPSHDVTVRRTKREIAHMHDYHDCTLHLALA
AQDGKEVLKKGWQQRHPLAGPGVPGPPTTEWTFLYAPRNEEEARVVEMIVEASIGYMTNDPA
GKIVENAK
```

Рисунок 11. Аминокислотная последовательность люциферазы гриба *N. nambi*.

2.2 Экспрессия люциферазы *N. nambi* в клетках *P. pastoris*

После установления последовательности гена люциферазы, необходимо было получить штамм-продуцент люциферазы *N. nambi*, который бы позволил обеспечить достаточное количество белка для проведения дальнейших экспериментов. Для создания такого штамма, ген люциферазы амплифицировали с

помощью ген-специфичных концевых праймеров и клонировали в экспрессионный вектор pGAPZA (Invitrogen) в одну рамку считывания с последовательностью, кодирующей С-концевую гистидиновую метку. Полученную генетическую конструкцию использовали для трансформации в клетки *P. pastoris*. Трансформированные клетки рассеивали на чашки со средой YPD, содержащей селективный антибиотик – зеоцин. Клоны *P. pastoris*, производящие люциферазу, идентифицировали опрыскиванием колоний раствором 3-гидроксигиспидина и визуализацией биолюминесценции (испускаемого света) с помощью IVIS Spectrum CT (PerkinElmer) (Рисунок 12). Были отобраны клоны, для которых интенсивность свечения была наибольшей. Самые яркие клоны изолировали и наращивали биомассу клеток для выделения из них рекомбинантного белка в виде препарата микросомальной фракции.

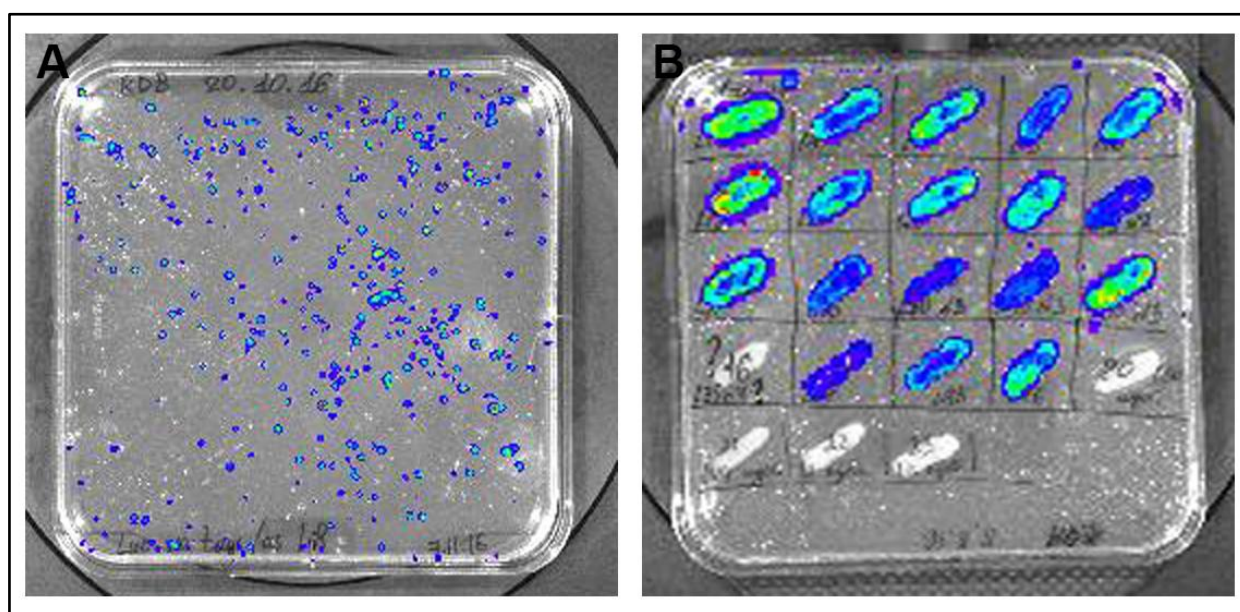


Рисунок 12. Изображения чашек с колониями дрожжей *P. pastoris*, полученные с помощью биоимиджера IVIS Spectrum CT. Представлено наложение изображений снятых в видимом свете и в биолюминесцентном канале. А – изображение чашки с колониями дрожжей, трансформированными вектором GAP-pPicZA, содержащим ген люциферазы *N. nambi*. В – отдельные клоны, содержащие ген люциферазы *N. nambi*, перенесенные на новую чашку, а также контрольные клоны, не содержащие исследуемый ген (не светятся).

Образцы анализировали с помощью денатурирующего электрофореза по Лэмбли в полиакриламидном геле и использовали для вестерн-блота с конъюгатом антител на гистидиновую метку и пероксидазы хрена, с хемилюминесцентной детекцией сигнала. Вестерн-блот продемонстрировал специфическое окрашивание люциферазы, перемещающейся в геле в области белков с массой около 30 кДа, что примерно соответствует ожидаемой молекулярной массе люциферазы *N. nambi*. Также Вестерн-блот показал, что рекомбинантная люцифераза практически полностью находится в микросомальной фракции.

2.3 Определение спектра биолюминесценции рекомбинантной люциферазы и его сравнение со спектром биолюминесценции мицелия гриба *N. nambí*

Для сравнения спектра биолюминесценции рекомбинантной люциферазы со спектром биолюминесценции мицелия гриба *N. nambí*, использовали микросомальную фракцию дрожжей *P. pastoris*, экспрессирующих ген люциферазы, и препарат мицелия гриба *N. nambí*. Биолюминесценцию детектировали с помощью спектрофлуориметра Varian Cary Eclipse Spectrofluorimeter (Agilent, США). Полученный спектр биолюминесценции рекомбинантной люциферазы в целом совпадал со спектром биолюминесценции мицелия *N. nambí* (Рисунок 13)

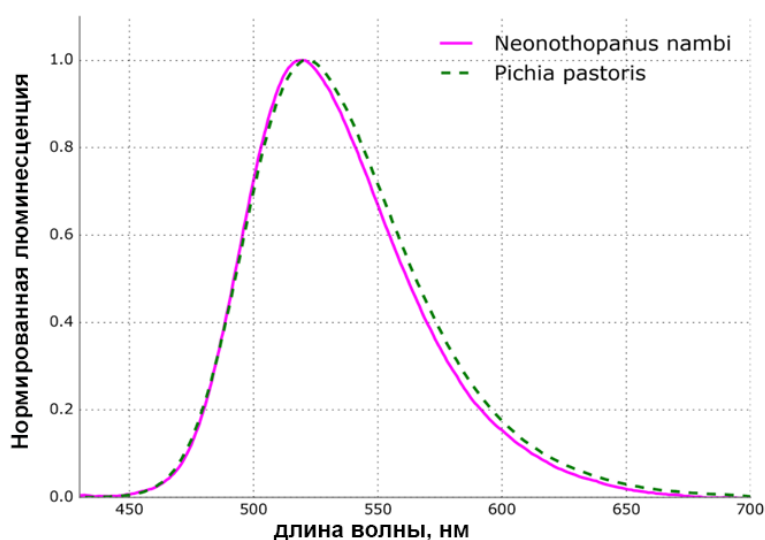


Рисунок 13. Спектры биолюминесценции люциферазы из *Neonothopanus nambí* при экспрессии в естественной и гетерологической системах. Розовая линия – спектр биолюминесценции мицелия *Neonothopanus nambí*. Зеленая пунктирная линия – спектр биолюминесценции препарата люциферазы из клеток *Pichia pastoris*.

2.4 Люциферазы из различных видов грибов

После выяснения нуклеотидной и аминокислотной последовательности люциферазы *N. nambí* была предпринята попытка поиска гомологов среди уже описанных белков с помощью программного обеспечения, предоставляемого National Center for Biotechnology Information. Однако ни одного гомологичного белка с известной функцией таким образом найдено не было, что подтверждает уникальность люциферазы грибов как белка и фермента. Тогда было принято решение проанализировать геномную ДНК из других светящихся видов грибов для поиска в них люциферазы.

Геномы грибов *Armillaria gallica*, *Armillaria mellea*, *Armillaria ostoyae*, *Mycena chlorophos*, *Omphalotus olearius* и *Panellus stipticus* были получены из базы данных U.S. Department of Energy Joint Genome Institute (DOE JGI), a DOE Office of Science User Facility. Из гриба *Mycena citricolor* ранее была выделена геномная ДНК и проведено полногеномное секвенирование по технологии Illumina HiSeq (Illumina, США). Результаты секвенирования были использованы для предсказания аминокислотных последовательностей гипотетических белков и

использованы для поиска гомологов люциферазы из *N. nambi*. Поиск гомологов осуществлялся с помощью алгоритма для анализа последовательности, описанного ранее¹, и программного обеспечения, предоставляемого National Center for Biotechnology Information. Был также проведен поиск аминокислотных последовательностей в результатах геномного секвенирования грибов в базе данных NCBI Genbank. При поиске использовали стандартные параметры поиска blastp.

В результате были идентифицированы последовательности гипотетических белков – гомологов люциферазы из *Noeonothopanus nambi* в *Armillaria gallica*, *Armillaria mellea*, *Armillaria ostoyae*, *Mycena chlorophos*, *Omphalotus olearius*, *Panellus stipticus* и *Mycena citricolor*. Результаты выравнивания аминокислотных последовательностей показаны на Рисунке 14. На основании множественного выравнивания были синтезированы гены кандидаты люцифераз грибов *Armillaria gallica*, *Armillaria mellea*, *Armillaria ostoyae*, *Mycena chlorophos*, *Mycena citricolor*, *Omphalotus olearius*, и *Panellus stipticus*. Кодированные последовательности кандидатов люцифераз оптимизировали для экспрессии в клетках млекопитающих (гуманизировали). Гуманизированные нуклеиновые кислоты получали методом олигонуклеотидного синтеза по стандартным методикам. Полученные последовательности генов клонировали в вектор pmKate2-keratin (Евроген, Россия), используя сайты рестрикции *NheI* и *NotI* вместо последовательности, кодирующей белок слияния mKate2-keratin. Плазмидную ДНК очищали и трансфицировали в клетки НЕК293NT и HeLa. Спустя 24 часа после трансфекции в среду добавляли 3-гидроксигиспидин, а свечение клеток детектировали с помощью IVIS Spectrum CT (PerkinElmer, США). Все проанализированные образцы испускали свет с интенсивностью на порядок и более превышающей сигнал, исходящий от нетрансфицированных контрольных клеток. Таким образом, было показано наличие гомологичных генов люциферазы у различных видов грибов и показана функциональная активность этих люцифераз в реакции с люциферинном грибов.

¹ Altschul S.F. и др. Basic local alignment search tool. // J. Mol. Biol. 1990. Т. 215. № 3. С. 403–10.

A.gallica	1	MSFIDSMKLDLVGH LFGIRNRGLAAACCALAVASTIAFPYIRRDYQTF LSGGPSYAPQNI RGYF
A.mellea	1	MSFFDSVKLDLVGR LFGIRNRGLAVTCCAVAVASIAFPYIRRDYQTF LSGGPSYAPQNI RGYL
A.ostoyae	1	MSFIDSMKLDLVGH LFGIRNRGLATACCAVAVASIAFPYIRRDYQTF LSGGPSYAPQNI KGYL
M.chlorophos	1	MVQLTRTSGFI.....AAAIVAAIAFPYIRRDYQTF LRGGPSYAPQNI RGYI
M.citricolor	1	MAYQLTWIQLV.....L GALVAMAVAFPYIKKDYETFLKGGPSYAPQNI RGYI
N.nambi	1	MRINISLSSLFERLSKLSSRSIAIT.CGVVLSASIAFPYIRRDYQTF LVEGPSYAPQNI RGYI
N.gardneri	1	MNLPSFVQRLSTASSRSIAIT.CVVVLSASIAFPYIRRDYQTF LVEGPSYAPQNI RGYI
O.olearius	1	MLPAFIYK.....PRLVIT.CVFFVLSALAFPYIRKDYQTF LVEGPSYAPQNI LQGYI
P.stipticus	1	MNINLKALIGV.....CAVLITAAV.FPFVVKDYHTF LVEGPSYAPQNI LQGYI
A.gallica	65	IVCVLALFRQE QKGLAIYDR LPEKRRWLPDLPPRNGPRPIT TSHIIQRQ RNOAPDPKFALEELK
A.mellea	65	IVCVLALFRQE QKGLAIYDR LPEKRRWLPDLPPRNGPRPIT TSHIIQRQ RNOAPDLKFALEELK
A.ostoyae	65	IVCVLALFRQE QKGLAIYDR LPEKRRWLPDLPPRNGPRPIT TSHIIQRQ RNOAPDSKFALEELK
M.chlorophos	49	IVLVLSLFRGEEKGLAIYEP LPEKRTWLPDLPPRAGDRPKT TSHIIQRQLDQYDPDPVFKALK
M.citricolor	50	IVLVLALFRQE QGLIYDR LPEKRRWLANLPQREGPRPKT TSHIIQRQLS QHTDPAFGAAYLK
N.nambi	63	IVCVLSLFRQE QKGLAIYDR LPEKRRWLADLPFREGTRPSIT TSHIIQRQRTQLVDQEFATRELI
N.gardneri	59	IVCVLSLFRQE QKGLIYDR LPEKRRWLDLPFRDGRPSIT TSHIIQRQRTQLVDPDFATQELI
O.olearius	52	IVCVLSLFRQE QKDVAIYDR LPEKRRWLDLPFREGPRPSIT TSHIIQRQRTQLADAEFATKELI
P.stipticus	48	IVLVLSLFRGEE TGLIYDR LPEKRRWLEELPREGPRPKT TSHIIQRQLNQHVDPDFGMNSLK
A.gallica	129	ATVIPRVQARHTDL THLSLSKFEFHAE AIFLLPSVPIDDPK NVP SHD TVRRTKREIAHMHDYHD
A.mellea	129	ATVIPRVQARHTDL THLSLSKFEFHAE AIFLLPSVPIDDPK NVP SHD TVRRTKREIAHMHDYHD
A.ostoyae	129	ATVIPRVQARHTDL THLSLSKFEFHAE AIFLLPSVPIDDPK NVP SHD TVRRTKREIAHMHDYHD
M.chlorophos	113	ATVIPRVQARHTDK THLALS KFEFHAE AIFVVRPEIAIDDPKH IPSHD TVRRTKREIAHMHDYHD
M.citricolor	114	DTVIPRVQARHAA NTHIARSTFEFHAA AIFLNADVPL..PEGLPASE TVRRTKGEIAHMHDYHD
N.nambi	127	DKVIPRVQARHTDK TFLSTSKFEFHAE AIFLLPSIPINDP LNIPSHD TVRRTKREIAHMHDYHD
N.gardneri	123	GKVIPRVQARHTDK TFLSTSKFEFHAE AIFLLPSIPINDP LNVP SHD TVRRTKREIAHMHDYHD
O.olearius	116	GKIPRVQARHTNT TFLSTSKFEFHAE AIFLLPSIPINDP QNIPSHD TVRRTKREIAHMHDYHD
P.stipticus	112	GSVIRRLQSRHQDI TQLALS KFEFHAE AIFLRPDVAINDPKHVPSHD TVRRTKREIAHMHDYHD
A.gallica	193	FTLHLALAAQDGKE VVSKGWGQRHPLAGPGVPGPPT EWTFLYAPRNEEELA VVEMIEASIGYM
A.mellea	193	YTLHLALAAQDGKE VVSKGWGQRHPLAGPGVPGPPT EWTFLYAPRNEEELA VVEMIEASIGYM
A.ostoyae	193	FTLHLALAAQDGKE VVAKGWGQRHPLAGPGVPGPPT EWTFLYAPRNEEELA VVEMIEASIGYM
M.chlorophos	177	CTLHLALAAQDAKQ V LQKGWGQRHPLAGPGMPGPPT EWTFLYAPRTEEEVKVVE TIVEASIAM
M.citricolor	176	FTLHLALAAADGKE VVKGWGQRHPLAGPGVPGPPNEWT FVYAPRNEEEMGVVEQIVEAAIGYM
N.nambi	191	CTLHLALAAQDGKE V LKKGWGQRHPLAGPGVPGPPT EWTFLYAPRNEEEAR VVEMIVEASIGYM
N.gardneri	187	CTLHIALAAQDGKE V LKKGWGQRHPLAGPGVPGPPT EWTFLYAPRNEEEV R VVEMIEAAIGYM
O.olearius	180	CTLHLALAAQDGKE VLEKGWGQRHPLAGPGVPGPPT EWTFLYAPRSEEEV R VVEMIVEASVVM
P.stipticus	176	YTLHLALAAQDGKQ V IAKGWGQRHPLAGPGMPGPPT EWTFLYAPRNEAEVQVLE TIEASIGYM
A.gallica	257	TN.DPAGVVIA
A.mellea	257	TN.DPAGKTIA
A.ostoyae	257	TN.DPAGTVIV
M.chlorophos	241	TNAEKPV ELVQ
M.citricolor	240	SN.VPALE
N.nambi	255	TN.DPAGKIVENAK
N.gardneri	251	TN.DPAGKVVEATGK
O.olearius	244	TN.DPADKIVEATVQGTEE
P.stipticus	240	SN.APALGGSE

Рисунок 14. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей люцифераз различных видов грибов. На рисунке представлены люциферазы из следующего списка видов: *Neonothopanus nambi*, *Neonothopanus gardneri*, *Armillaria gallica*, *Armillaria mellea*, *Armillaria ostoyae*, *Mycena chlorophos*, *Omphalotus olearius*, *Mycena citricolor*, *Panellus stipticus*.

2.5 Получение функциональных фрагментов люциферазы *N. nambi* в клетках *E. coli*

Попытки клонировать полноразмерную грибную люциферазу в бактериальных клетках показали довольно низкую активность последней в лизатах бактерий экспрессионного штамма. Было сделано предположение, что синтез белка и его правильное сворачивание затруднены вследствие того, что грибная люцифераза является мембранным белком. Также этот факт затрудняет очистку данного белка, имеющего гистидиновую метку, поскольку белок находится в микросомальной фракции в нерастворимом виде и для перевода его в

раствор требуется солюбилизация в присутствии детергентов, образующих смешанные мицеллы с липидами мембран и другими белками, присутствующими в микросомальной фракции.

Анализ аминокислотной последовательности люциферазы из *N. nambi* с помощью программного обеспечения ТМНММ-server, приведенного в [<http://www.cbs.dtu.dk/services/ТМНММ/>] показал, что в состав первых 40 аминокислот предположительно входит трансмембранный домен. Было решено удалить трансмембранный домен, полностью или частично, постаравшись предотвратить потерю функциональной активности люциферазы. Открытые рамки считывания, кодирующие укороченные фрагменты люциферазы из *N. nambi*, получали с помощью ПЦР со специфических праймеров. Нуклеиновые кислоты, кодирующие фрагменты люциферазы с удаленными N-концевыми 6, 9, 12, 15, 21, 25, 31, 33, 35, 37 и 40 аминокислотными остатками, клонировали в вектор рЕТ-23b. Вектор использовали для трансформации клеток *E. coli* штамма BL21-CodonPlus. Клетки высевали на чашки Петри с агаризованной средой LB, содержащей ампициллин и хлорамфеникол, и инкубировали в течение ночи при 37°C. Колонии *E. coli* затем опрыскивали раствором люциферина и визуализировали в биоимиджере IVIS Spectrum CT (PerkinElmer, США) для определения функциональности экспрессируемых фрагментов люцифераз. Было обнаружено, что колонии, содержащие фрагменты люцифераз с удаленными N-концевыми 6, 9, 12, 15, 21, 25, 31, 33, 35, 37 аминокислотными остатками, испускают свет при опрыскивании раствором люциферина.

На основании полученных данных был сделан вывод, что удаление последовательности, содержащей гипотетический трансмембранный домен, не влияет на способность люциферазы *N. nambi* катализировать реакцию окисления 3-гидроксигиспидина, сопровождающуюся испусканием света.

2.6 Экспрессия рекомбинантной люциферазы *N. nambi* в клетках *E. coli*

Нуклеиновые кислоты, кодирующие фрагменты люциферазы с удаленными N-концевыми 6, 9, 12, 15, 21, 25, 31, 33, 35, 37 и 40 аминокислотными остатками, клонировали в вектор рЕТ-23b, который затем использовался для трансформации клеток бактерий штамма BL21-CodonPlus. Наличие ожидаемого рекомбинантного продукта в клетках подтверждали с помощью электрофореза. Пример подобного анализа для фрагмента люциферазы *N. nambi* с удаленными N-концевыми 37 аминокислотными остатками показан на Рисунке 15. Не смотря на удаление участка предсказанного трансмембранного домена, экспрессия гена люциферазы грибов в клетках бактерий приводила к накоплению рекомбинантного белка в нерастворимой фракции – тельцах включения.

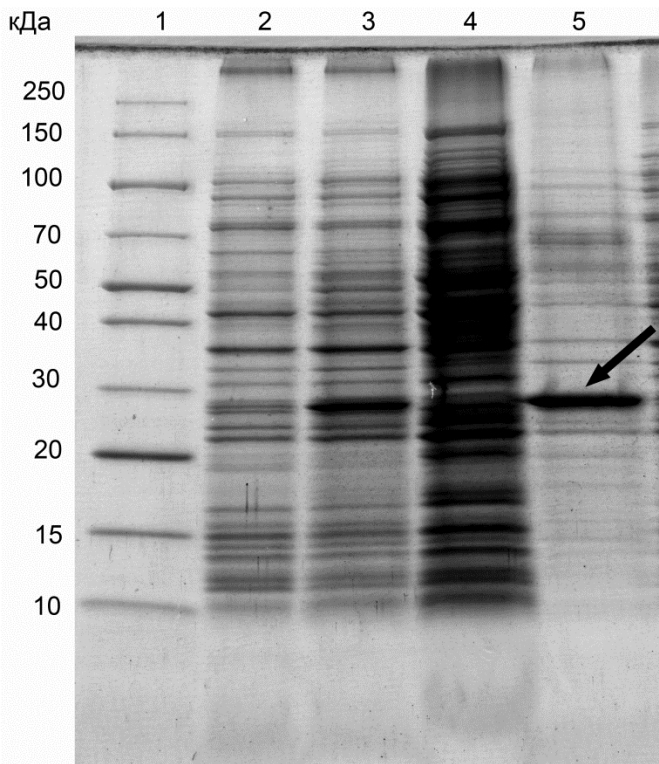


Рисунок 15. Гель-электрофорез клеточных лизатов бактерий *E. coli*, трансформированных вектором PET-23b, содержащим нуклеотидную последовательность люциферазы *Neonothopanus nambi* с удаленными N-концевыми 37 аминокислотными остатками. Дорожка 1 – белковый маркер Page Ruller Broad Range Stained Protein Ladder, (Thermo Scientific, #26630). Дорожка 2 – лизат клеток до индукции IPTG экспрессии гена люциферазы. Дорожка 3 – лизат клеток после индукции IPTG и культивации в течение ночи при 25°C и интенсивном перемешивании. Дорожка 4 – лизат клеток после индукции IPTG и культивации в течение ночи при 25°C и интенсивном перемешивании. Супернатант после центрифугирования в течение часа при 140,000 x g. Дорожка 5 – тельца включения, растворенные в буфере с мочевиной. Гель окрашивали Coomassie Blue G-250. Полоса, соответствующая люциферазе, обозначена стрелкой.

На гель-электрофорезе на дорожках 3 и 5 хорошо заметна полоса в области 28 кДа, примерно соответствующая ожидаемой молекулярной массе люциферазы грибов. Соответствие данной полосы именно люциферазе подтверждено данными масс-спектрометрии. Однако, несмотря на наличие активной люциферазы в растворимой фракции (что подтверждается наличием биOLUMИнесцентной активности в ней, детектируемой приборами), большая часть рекомбинантного белка находится в тельцах включения, что указывает на наличие проблем с правильным сворачиванием белковой глобулы данного фермента в прокариотических клетках.

2.7 Ренатурация рекомбинантной люциферазы *N. nambi*

Поскольку при экспрессии люциферазы в клетках *E. coli* большая часть рекомбинантного белка находится в тельцах включения, было принято решение разработать метод ренатурации люциферазы. Оптимизированный метод содержал следующие стадии: растворение телец включения в денатурирующем буфере в течение ночи; металл-аффинная хроматография в денатурирующих условиях; непосредственно ренатурация фермента методом разбавления буфером, не содержащем денатурирующих агентов; и концентрирование препарата ренатурированной люциферазы. Полученные при помощи люминометра данные показали, что ренатурированная люцифераза обладает способностью к люминесценции в присутствии люциферина, и полностью функциональна, что дало возможность использовать препарат ренатурированной люциферазы в

последующих экспериментах. Например, данный препарат был использован для экспериментов по определению зависимости активности люциферазы *N. nambi* от различных значений pH и температуры.

3 Примеры применения рекомбинантной люциферазы *N. nambi*

После установления аминокислотной последовательности люциферазы *N. nambi* был сделан ряд экспериментов по применению данного фермента в традиционных для люцифераз приложениях: в первую очередь таких, как мечение культуры клеток и мечение клеток внутри целого организма. Данные эксперименты были выполнены при участии сотрудницы группы синтеза природных соединений ИБХ РАН Надежды Маркиной, сотрудника РНИМУ им. Пирогова Максима Абакумова, а также сотрудника лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза ИБХ РАН Федора Ерошкина.

3.1 Использование люциферазы *N. nambi* для мечения клеток

Кодирующую последовательность люциферазы оптимизировали для экспрессии в клетках млекопитающих (гуманизировали). Гуманизированную нуклеиновую кислоту получали методом олигонуклеотидного синтеза по стандартным методикам. Полученную нуклеиновую кислоту клонировали в вектор pKatushka2S-C1 (Евроген, Россия), вместо последовательности, кодирующей белок Katushka2S.

Вектор, содержащий люциферазу *N. nambi* под контролем цитомегаловирусного промотора, котрансфицировали с вектором pTurboFP635-N (Евроген, Россия), кодирующим красный флуоресцентный белок, в клетки линии HEK293NT. Спустя 24 ч после трансфекции в среду добавляли 3-гидроксигиспидин, а свечение клеток анализировали с помощью микроскопа Leica DM6000 с объективом 20x. Клетки визуализировали в проходящем свете, в канале для детекции зеленой флуоресценции и в канале для детекции красной флуоресценции (Рисунок 16). Экспрессия гена люциферазы *N. nambi* в клетках человека приводила к появлению отчетливого светового сигнала в зеленой области спектра. Никаких проявлений токсичности экспрессии гена люциферазы для клеток обнаружено не было.

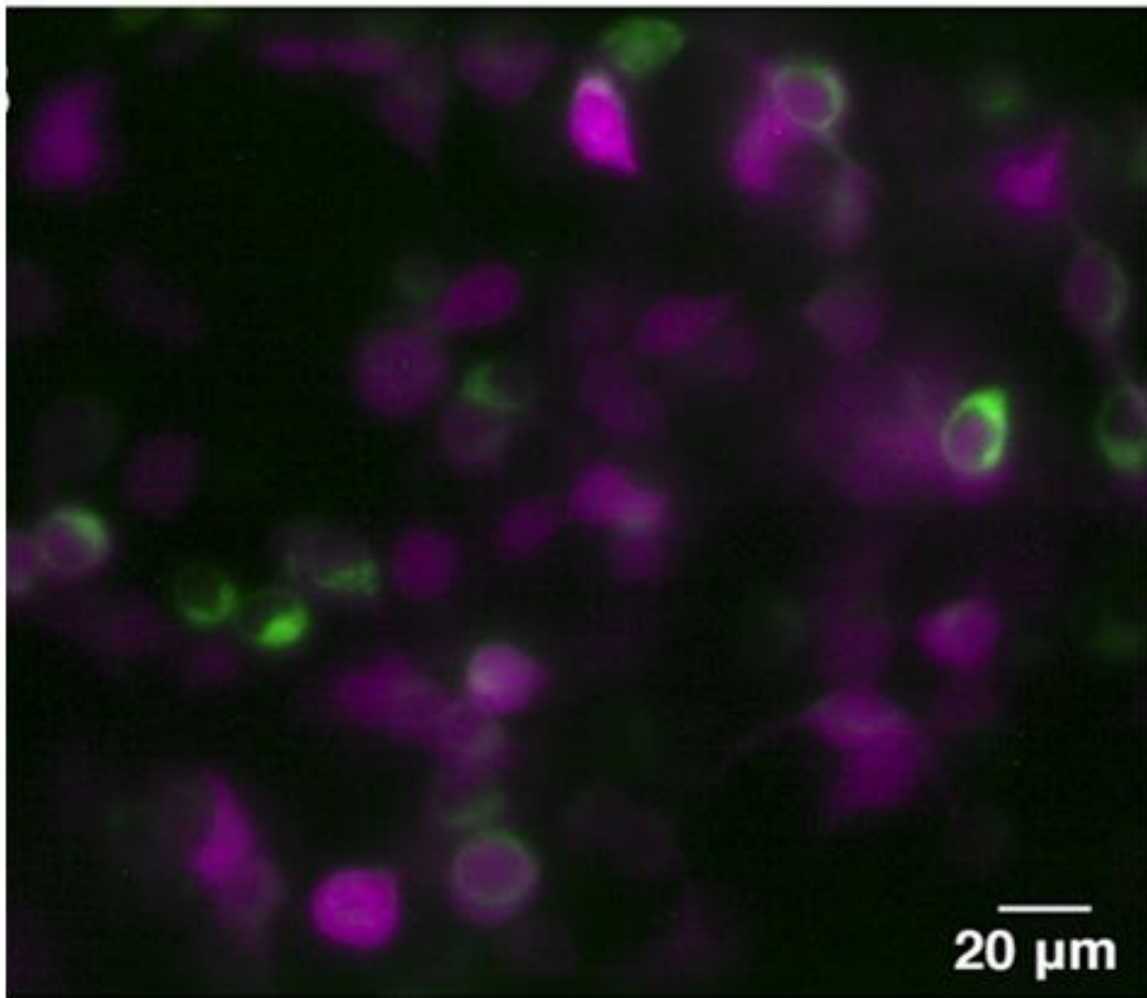


Рисунок 16. Клетки линии HEK293NT, котрансфицированные вектором pTurboFP635-N и вектором, содержащим ген люциферазы, после добавления люциферина. Представлено наложение изображений, полученных в красном канале пропускания (TurboFP635), на изображения в зеленом канале пропускания при отсутствии возбуждающего облучения (люцифераза).

3.2 Использование люциферазы *N. nambi* для мечения клеток внутри целого организма

В качестве модельных организмов при проведении экспериментов по мечению клеток внутри целого организма были выбраны мышь и эмбрионы лягушки *Xenopus laevis*. Для проведения экспериментов на мышах использовался вектор, содержащий кодирующую последовательность люциферазы *N. nambi* под контролем цитомегаловирусного промотора. Дополнительно была синтезирована гуманизированная нуклеотидная последовательность, кодирующая люциферазу светлячка *Photinus pyralis*, и клонирована в такой же вектор. Полученные конструкции использовали для трансфекции клеток линии СТ26 (клетки карциномы *Mus musculus*). Клетки, экспрессирующие ген люциферазы *N. nambi*, были инъецированы подкожно в левую часть спины мыши, в то время, как клетки, экспрессирующие ген люциферазы *P. pyralis*, инъецированы таким же образом в правую половину спины мыши. Спустя 10 минут после инъекции, смесь

люциферина грибов (0.5 мг) и люциферина светлячка (0.5 мг) была введена мышам внутривенно. Билюминесценция была затем визуализирована с помощью биоимиджера IVIS Spectrum CT (PerkinElmer). Интенсивность светового сигнала от обеих опухолей была практически идентична (Рисунок 17). Данный факт свидетельствует о том, что люцифераза грибов не уступает по эффективности люциферазе светлячка в данном типе приложений.

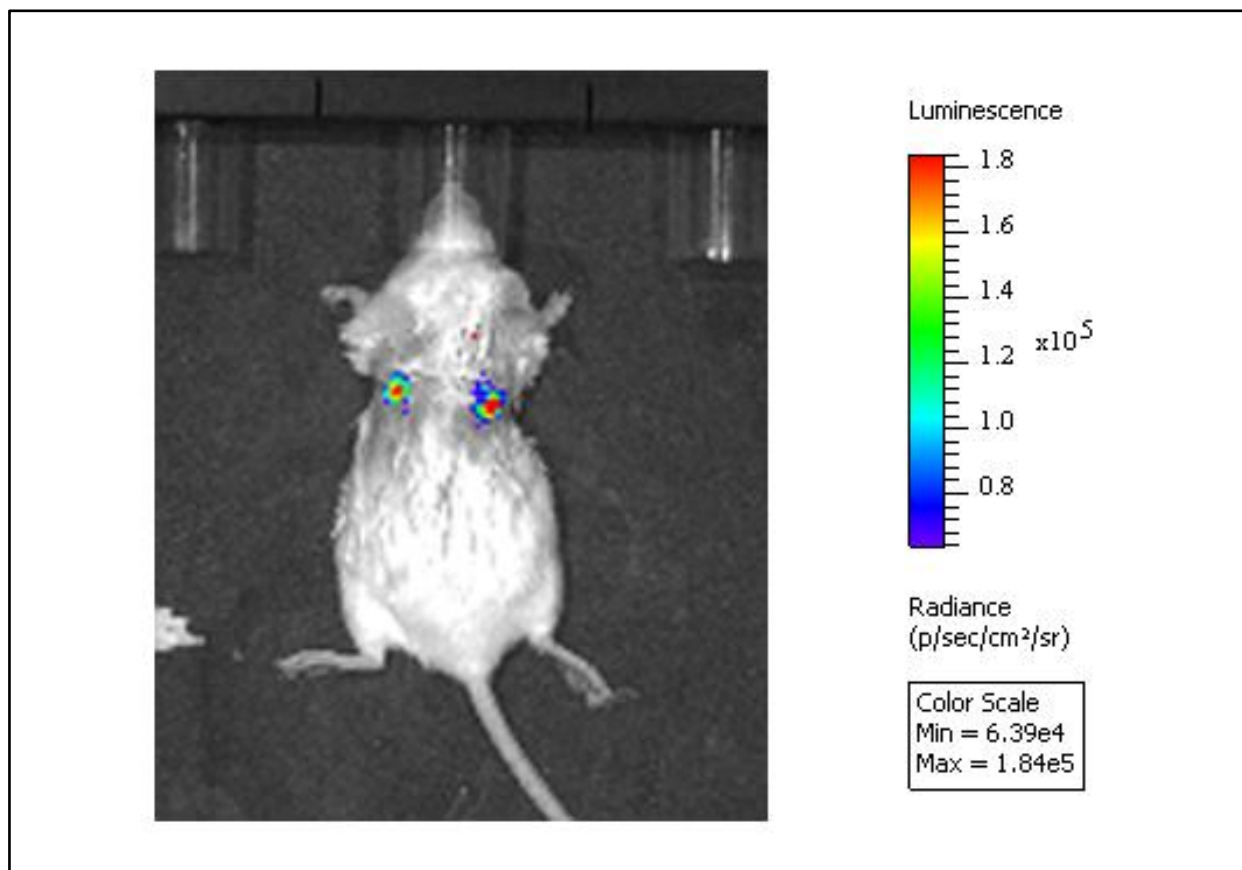


Рисунок. 17. Мышь с вживленными под кожу спины клетками линии СТ26, экспрессирующими ген люциферазы *N. nambi* (левая сторона) и ген люциферазы *Photinus pyralis* (правая сторона) после интраперитонеального введения раствора, содержащего смесь люциферин грибов и светлячка. Представлено наложение фотографий мыши при дневном свете и зарегистрированного светового сигнала от вживленных опухолей, полученных с помощью биоимиджера IVIS Spectrum CT. Цветовая шкала справа показывает интенсивность сигналов.

Для проведения эксперимента на эмбрионах лягушки *Xenopus laevis* получали мРНК люциферазы *N. nambi* методом транскрипции *in vitro* и инъецировали ее в эмбрионы *Xenopus laevis* на двухклеточной стадии в оба бластомера. Для визуализации на стадии ранней гаструлы (стадия 10.5) в эмбрионы инъецировали раствор люциферина в бластоцель. Свечение эмбриона после окрашивания родамином детектировали при помощи микроскопа Leica DM6000, в каналах микроскопа для детекции зеленой и красной флуоресценции (Рисунок 18).

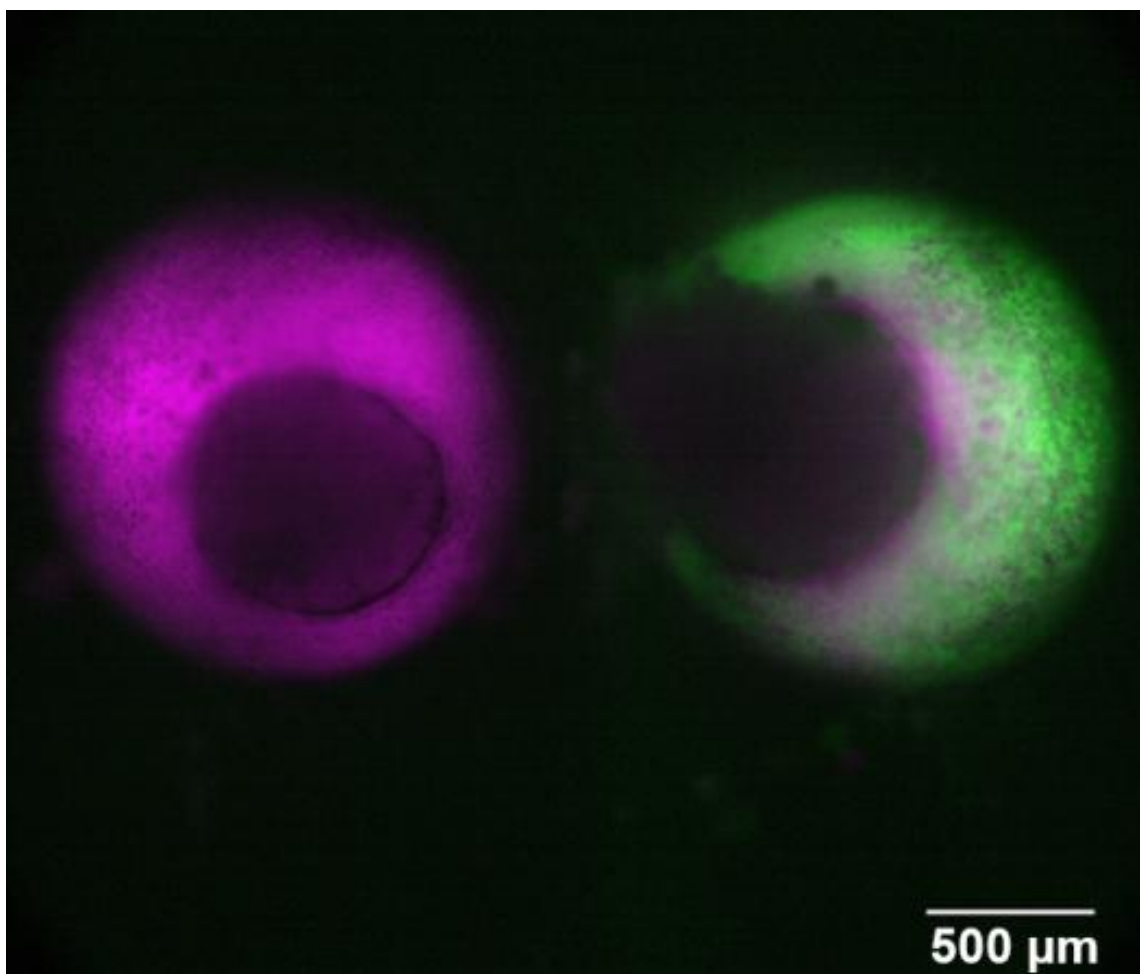


Рисунок 18. Экспрессия гена люциферазы *N. nambi* в эмбрионе *Xenopus laevis*. Правый эмбрион был инъецирован смесью родамин лизин декстрана и мРНК люциферазы *N. nambi* на двухклеточной стадии развития, затем на стадии гастрюлы в бластоцель вводили раствор люциферина. Левый эмбрион инъецировали только родамин лизин декстраном и использовали в качестве негативного контроля. Флуоресценция родамина показана розовым цветом, биолюминесценция – зеленым. Представлено наложение изображений эмбрионов в каналах микроскопа для детекции зеленой и красной флуоресценции, полученных с использованием микроскопа Leica DM6000.

ВЫВОДЫ

1. Впервые установлены нуклеотидные последовательности генов люцифераз люминесцентных грибов на примере видов *Neonothopanus nambi*, *Armillaria gallica*, *Armillaria mellea*, *Armillaria ostoyae*, *Mycena chlorophos*, *Mycena citricolor*, *Omphalotus olearius* и *Panellus stipticus*.
2. Впервые показана люминесцентная активность люцифераз грибов при гетерологической экспрессии в клетках бактерий, дрожжей и млекопитающих. Таким образом, найдено новое семейство белков – люциферазы грибов.
3. Люцифераза грибов впервые успешно применена в практических приложениях: люминесцентное мечение как отдельных клеток, так и клеток внутри целого организма (мышь, эмбрионы шпорцевой лягушки).
4. Методами генной инженерии получены, клонированы и экспрессированы функциональные укороченные варианты люциферазы *Neonothopanus nambi*.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи

1. **Kotlobay A.A.**, Sarkisyan K.S., Mokrushina Y.A., Marcet-Houben M., Serebrovskaya E.O., Markina N.M., Somermeyer L.G., Gorokhovatsky A.Y., Vvedensky A., Purtov K.V., Petushkov V.N., Rodionova N.S., Chepurnyh T.V., Fakhranurova L.I., Guglya E.B., Ziganshin R., Tsarkova A.S., Kaskova Z.M., Shender V., Abakumov M., Abakumova T.O., Povolotskaya I.S., Eroshkin F.M., Zaraisky A.G., Mishin A.S., Dolgov S.V., Mitiouchkina T.Y., Kopantzev Y.P., Waldenmaierm H.E., Oliveira A.G., Oba Y., Barsova E., Bogdanova E.A., Gabaldón T., Stevani C.V., Lukyanov S.A., Smirnov I.V., Gitelson J.I., Kondrashov F.A., Yampolsky I.V. Genetically encodable bioluminescent system from fungi. // *PNAS* 2018, том 115, № 50, с. 12728-12732

2. Kaskova Z.M., Dörr F.A., Petushkov V.N., Purtov K.V., Tsarkova A.S., Rodionova N.S., Mineev K.S., Guglya E.B., **Kotlobay A.**, Baleeva N.S., Baranov M.S., Arseniev A.S., Gitelson J.I., Lukyanov S., Suzuki Y., Kanie S., Pinto E., Di Mascio P., Waldenmaier H.E., Pereira T.A., Carvalho R.P., Oliveira A.G., Oba Y., Bastos E.L., Stevani C.V., Yampolsky I.V. Mechanism and color modulation of fungal bioluminescence. // *Sci Adv.* 2017, 3(4):e1602847.

3. Пуртов К. В., Гороховатский А. Ю., **Котлобай А. А.**, Осипова З. М., Петушков В. Н., Родионова Н. С., Царькова А. С., Чепурных Т. В., Ямпольский И. В., Гительзон И. И. Люцифераза гриба *Neonothopanus nambi*: выделение и очистка. // *Доклады академии наук*, 2018, том 480, № 6, с. 747–750

Тезисы докладов на конференциях

1. **Alexey Kotlobay**, Karen Sarkisyan, Yuliana Mokrushina, Ekaterina Serebrovskaya, Nadezhda Markina, Andrey Gorokhovatsky, Maxim Abakumov, Ilya Yampolsky. Fungal luciferase: search, cloning and biochemical properties. 20-th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence ISBC-2018, Nantes, France, 2018 (oral presentation)

2. **Котлобай А. А.**, Маркина Н. М., Мокрушина Ю. А., Ямпольский И. В. Клонирование люциферазы гриба *Neonothopanus nambi*. 21-я Международная Пуцинская школа-конференция молодых ученых «Биология наука XXI века». Пушино, Россия, 2017

Для заметок