

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

Российской академии наук

Лаборатория химии метаболических путей

Московская школа на Юго-Западе №1543

Гетерологическая экспрессия и очистка каталитического домена люциферазы *Pyrocystis lunula* (Schütt, 1896)

Шевченко Фея, Храмова Дарья

Научный руководитель:

к.б.н. Татьяна Владимировна Чепурных

Москва 2025

Оглавление

Список использованных сокращений	4
Введение	5
Литературный обзор	9
<i>Введение</i>	9
<i>Биология динофлагеллят</i>	9
<i>Механизмы биolumинесценции у динофлагеллят</i>	10
<i>Люцифераза динофлагеллят</i>	14
<i>Химическая структура и свойства люциферина</i>	17
<i>Роль биolumинесценции в коммуникации и размножении</i>	19
<i>Влияние биolumинесценции на экосистему</i>	20
<i>Применение биolumинесцентной системы динофлагеллят</i>	20
Материалы и методы	23
<i>Растворы и буферы</i>	23
<i>Электрофорез в агарозном геле</i>	23
<i>Работа с E. coli</i>	24
Получение электрокомпетентных клеток <i>E. coli</i>	24
Трансформация <i>E. coli</i> и инкубация	24
Скрининг колоний <i>E. coli</i>	25
Выделение плазмид из <i>E. coli</i>	25
<i>Определение нуклеотидных последовательностей</i>	25
<i>Создание генетических конструкций для экспрессии люциферазы P. lunula в клетках E. coli</i>	25
Клонирование гена в экспрессионный вектор	25
Амплификация и отбор экспрессионных векторов в <i>E. coli</i>	26
<i>Гетерологическая экспрессия люциферазы P. lunula в клетках E. coli</i>	26
Аналитическая экспрессия люциферазы <i>P. lunula</i> в клетках <i>E. coli</i>	26
Препаративная экспрессия люциферазы <i>P. lunula</i> в клетках <i>E. coli</i>	27
Лизиса бактериальных клеток лизоцимом с применением ультразвуковой бани	27
Экстракция и очистка люциферазы <i>P. lunula</i> в клетках <i>E. coli</i>	28
Выделение телец включения из клеток <i>E. coli</i> .	28
Электрофорез в полиакриламидном геле по методу Лэммли с SDS	29

Результаты и обсуждение	30
<i>Гетерологическая экспрессия 3D люциферазы P. lunula в клетках E. coli</i>	30
Создание генетических конструкций для экспрессии 3D люциферазы P. lunula в клетках E. coli	30
Подбор условий экспрессии lcf-3D-7090	32
<i>Очистка целевого белка методом металл-хелатной хроматографии</i>	36
Очистка целевого белка методом металл-хелатной хроматографии из лизата клеток E.coli, экспрессирующих Lcf-3D	36
Очистка целевого белка методом металл-хелатной хроматографии из телец включения	39
<i>Проверка работы очищенного ренатурированного Lcf-3D в системе детекции активности редуктазы p47</i>	41
Выводы	43
Список литературы	44
Благодарности	46

Список использованных сокращений

NADH - никотинамидадениндинуклеотид восстановленный

NADPH - никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный

PMSF - фенилметилсульфонилфторид

SDS - додецилсульфат натрия

AA - акриламид

ПААГ - полиакриламидный гель

ПЦР - полимеразная цепная реакция

Трис - трис(гидроксиметил)аминометан

ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота

Введение

Биолюминесценция — это удивительное природное явление, заключающееся в испускании света живыми организмами в результате окислительно-восстановительной реакции между субстратом люциферин и ферментом люциферазой с испусканием кванта света. Известно более 30 биолюминесцентных систем, но на сегодняшний день охарактеризованы пары люциферин–люцифераза только 11 систем, в то время как другие новые системы в настоящее время изучаются. Различные пары люциферин–люцифераза имеют разные длины волн излучения света и, следовательно, подходят для различных применений [Fleiss, A., Sarkisyan, K.S., 2019]. За последнее десятилетие или около того наблюдались большие успехи в белковой инженерии, синтетической химии и физике, которые позволили люциферинам и люциферазам достичь ранее неизведанных применений. Реакция биолюминесценции в настоящее время регулярно используется для генных анализов, обнаружения белок-белковых взаимодействий, высокопроизводительного скрининга (HTS) при поиске лекарств, гигиенического контроля, анализа загрязнения в экосистемах и визуализации *in vivo* у мелких млекопитающих [Syed A.J. *et al*, 2021]. Особое значение в последние годы приобрели автолюминесцентные системы. В отличие от классических люминесцентных моделей, которые требуют добавления субстрата (например, люциферина), автолюминесцентные организмы самостоятельно синтезируют все необходимые компоненты световой реакции. Это делает их полностью автономными и значительно упрощает экспериментальную работу. Такие системы особенно удобны для длительных наблюдений, поскольку позволяют непрерывно регистрировать световой сигнал без внешнего вмешательства [Xu T. *et al*, 2016]. Однако из этих естественных автобиолюминесцентных систем только система бактерий и высших грибов [Kotlobay A.A. *et al*, 2018] были успешно преобразованы в репортерную систему для научных приложений, сохраняя при этом свою автономную функциональность. Остальные системы были ограничены в этом переходе неполным пониманием генетических рамок, лежащих в основе их биохимических путей производства субстрата или ограничениями в способности клеток-хозяев поддерживать эндогенное производство всех компонентов, необходимых для их экспрессии [Xu T. *et al*, 2016]. Поэтому изучение всех стадий синтеза люциферина для разных биолюминесцентных систем является задачей не только научной, направленной на расширение нашего понимания живых систем, но и практической.

Динофлагеллята (Dinoflagellata syn. Dinophyta) — крупная группа протистов. Они существуют, начиная с кембрийского периода, имеют микроскопические размеры порядка 10–100 мкм. Число ныне живущих видов динофлагеллят оценивается в 2000–2500, относящихся примерно к 300 родам [Hoppenrath M. *et al*, 2017]. Для некоторых динофлагеллят, таких как *Pyrocystis lunula*, показано наличие биолюминесценции. У них этот процесс происходит в специализированных органеллах — сцинтиллонах — и отличается сложной регуляцией, связанной с циркадными ритмами и внутриклеточной локализацией компонентов люминесцентной системы [Fajardo C. *et al*, 2020]. Люцифераза *P. lunula* представляет собой белок массой около 137 кДа и состоит из трёх гомологичных каталитических доменов. Было показано, что каждый домен способен катализировать реакцию люминесценции независимо [Morishita H. *et al*, 2002].

Экспрессия люциферазы или ее отдельных доменов в клетках *E. coli* и последующая очистка с использованием гистидинового тэга (His-tag) на колонке с Ni-NTA сефарозой позволяет получать рекомбинантный фермент, пригодный для дальнейших биохимических исследований [Dunuweera A.N. *et al*, 2024; Fajardo C. *et al*, 2023]. В частности, экспрессия активного домена люциферазы *P. lunula* открывает возможности для *in vitro* тестирования предполагаемых ферментов, вовлечённых в биосинтез люциферина — до сих пор не полностью изученного метаболического пути. Согласно современным гипотезам, биосинтез люциферина может происходить различными метаболическими путями, в том числе через фотодеструкцию хлорофилла *a*, глутатион-зависимые превращения или же уникальные редуктивные этапы, которые не наблюдаются в других таксонах [Fajardo C. *et al*, 2020; Lescuyer B. *et al*, 1979].

В 1986 году Fresneau и соавторы показали, что растворимая ферментативная люминесцентная система *Pyrocystis lunula* сопряжена с ферментативной реакцией, зависящей от присутствия NAD(P)H. Фермент представляет собой растворимую гидроксилазу (Mr 47 000), которая в присутствии NAD(P)H катализирует восстановление молекулы, называемой P630 (Blue Compound). При этом сама редуктаза не была охарактеризована. Восстановленный P630 имеет те же спектральные характеристики, что и очищенный люциферин. В присутствии люциферазы это восстановленное соединение окисляется с испусканием света максимальной длины волны в области 480 нм. Окисленная форма, по-видимому, в этих условиях является предшественником люциферина [Fresneau C. *et al*, 1986]. Поиск фермента (p47), способного гидроксилировать предполагаемый

предшественник люциферина до его активной формы, требует надёжной модельной системы для биолюминесцентного скрининга.

В этой работе мы получаем подобную систему с использованием очищенного 3 домена люциферазы *P. lunula* в клетках *E. coli*. Этот белок будет использован для скрининга потенциальной редуктазы p47, способной завершить путь биосинтеза люциферина динофлагеллят *in vitro*.

В соответствии с данной целью нами были поставлены следующие экспериментальные задачи:

1. Получить генетические конструкции для гетерологической экспрессии 3 домена люциферазы *P. lunula* в клетках *E. coli* и подобрать оптимальные условия для экспрессии этого фермента в активной форме.
2. Получить очищенный препарат рекомбинантного 3 домена люциферазы *P. lunula*.
3. Определить оптимальные условия стабильности рекомбинантного 3 домена люциферазы *P. lunula*.
4. Проверить работает ли очищенная люцифераза в системе детекции активности редуктазы p47 в растворе. Такая система должна содержать очищенный 3 домен люциферазы *P. lunula* и очищенный субстрат редуктазы P630 (вероятный предшественник люциферина динофлагеллят).

Литературный обзор

Введение

Динофлагелляты — уникальная группа одноклеточных водорослей, населяющих морские и пресноводные экосистемы. Многие из них — свободноживущие организмы, но известны и паразитические динофлагелляты, а некоторые виды являются симбионтами коралловых полипов [Stover E.L., 1989]. Наиболее интересной особенностью динофлагеллят является их способность к биолюминесценции — процессу, в результате которого испускается видимый свет. Эта способность находит применение в экологических исследованиях, изучении экспрессии генов и медицине [Assunção J. et al, 2017]. Это возможно благодаря изучению механизма люминесценции динофлагеллят, что открывает новые области применения.

Биология динофлагеллят

Класс Dinoflagellata относится к типу Dinophyta, ныне известно 2000-2500 видов динофлагеллят, относящихся к 300 родам [Hoppenrath M. et al, 2017]. Клетки как правило уплощённые, имеют разнообразную форму, размер варьируется от 6 до 200 мМ [Lajeunesse T. et al, 2005] (Рисунок 1). Все виды динофлагеллят имеют фототаксис, даже те виды, у которых не выражен фоточувствительный глазок (стигма). Покровы представлены плазмалеммой и клеточной стенкой, состоящей из целлюлозных пластин. В покровах также находятся трихоцисты, или стрекательные клетки [Lee R. E., 2008]. Динофлагелляты имеют жгутиковый аппарат, состоящий из двух отдельных жгутиков, помогающих им передвигаться [Dodge J. D., 1967]. Один жгутик залегает в поперечной жгутиковой бороздке (цингулюме), а второй — в продольной (сулькусе). Характерной чертой динофлагеллят является их ядро. Хромосомы в нём постоянно конденсированы и не содержат гистонов, вместо них служит вирусный нуклеопротеин динофлагеллят. По типу питания большинство динофлагеллят — автотрофы, у них есть хлоропласты и они способны к фотосинтезу. Встречаются также гетеротрофные и миксотрофные виды [Stoecker D., 1999]. В хлоропластах динофлагеллят содержатся хлорофиллы а и с, а также различные каротиноиды, например, перидинин [Jeffrey S. et al, 1975].



Рисунок 1. Внешний вид *P. lunula*, морской Dinoflagellata (взято из <https://www.nikonsmallworld.com/galleries/2023-photomicrography-competition/marine-organism-ryugocystis-lunula-dinophyceae>).

Динофлагелляты широко распространены в морских и пресноводных экосистемах от тропиков до полярных регионов, занимая важные позиции в пищевых цепях. Они составляют основную часть фитопланктона и являются продуцентами, хищниками, паразитами и коралловыми симбионтами [Hackett J. et al, 2004]. Динофлагелляты часто вступают в симбиотические отношения с коралловыми полипами, в таком взаимодействии динофлагелляты обеспечивают коралл продуктами фотосинтеза, а сами получают защиту и питательные вещества [Davy S., 2012]. Некоторые виды способны вызывать цветение воды, называемое красным приливом. Вода, содержащая пигментированные организмы, окрашивается в красный, бордовый или коричневый цвет [Anderson D, 1995]. Многие виды способны синтезировать токсины, которые накапливаются в тканях водных обитателей, поэтому красные приливы могут быть опасны как для водных обитателей, так и для человека.

Механизмы биолюминесценции у динофлагеллят

Морские динофлагелляты способны к биолюминесценции — процессу взаимодействия между ферментом люциферазой и субстратом люциферин, который окисляется кислородом, в результате чего испускается энергия в виде сине-зелёного света (длина волны около 470 нм). Данный процесс происходит в специальных органеллах — сцинтиллонах [DeSa R., 1968], в ответ на механический стресс, например, при разбивании волны или соприкосновении с морским судном [Latz M. et al, 2008]. Протекание реакции зависит от уровня pH [Valiadi M., 2013], так при щелочном уровне pH люциферин связан с

люциферин-связывающим белком (luciferine binding protein), при повышении кислотности он активируется и испускает фотон света.

При приложении напряжения сдвига к клеточной мембране происходит ряд шагов для запуска биолюминесценции. Во-первых, в ответ на этот механический стимул активируется рецептор, связанный с G-белком, обнаруженный на поверхности клеточной мембраны (рисунок 2 (1)) [Valiadi M., 2013]. Рецептор, связанный с G-белком, передает этот внешний механический сигнал внутрь клетки, чтобы затем преобразовать этот сигнал в электрический сигнал [Valiadi M., 2013]. Это приводит к активации каналов транзитного рецепторного потенциала на мембране, что обеспечивает приток ионов кальция внутрь клетки (рисунок 2 (2)). Этот приток положительных зарядов внутрь цитоплазмы вызывает деполяризацию мембраны вакуоли из-за разности потенциалов между цитоплазмой и внутренней частью вакуоли [Valiadi M., 2013]. Это изменение заставляет потенциал действия течь через мембрану вакуоли в мембрану сцинтиллона, прикрепленную к вакуоли [Valiadi M., 2013]. Этот электрический сигнал активирует открытие потенциал-зависимых протонных каналов, обнаруженных поперек мембраны сцинтиллона (рисунок 2(3)). Как только эти каналы открываются, сцинтиллон испытывает приток протонов [Valiadi M., 2013]. Этот избыток протонов вызывает закисление органеллы, снижая ее pH с 8 до 6 (рисунок 2 (4)) [Valiadi M., 2013]. При таком снижении pH сцинтилляция отделяется от вакуоли и теперь готова к проведению химической реакции, которая испускает свет.

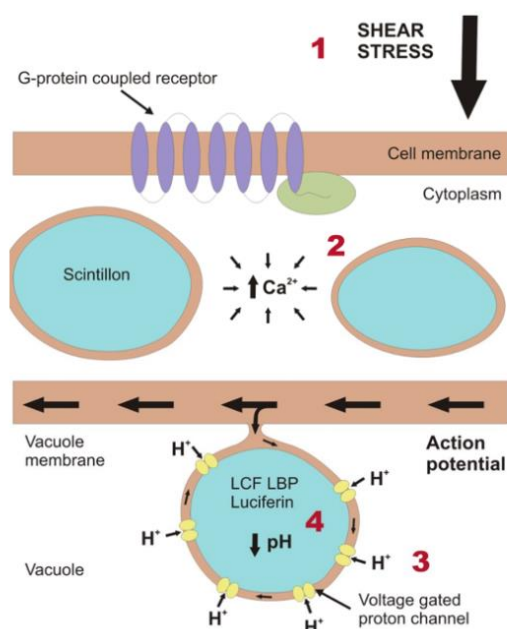


Рисунок 2. Процесс биOLUMИнесценции в клетке: (1) Обнаружение сдвигового напряжения G-белковым рецептором, (2) увеличение концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме, что генерирует потенциал действия, (3) активация потенциал-зависимых ионных каналов на мембране сцинтиллона, (4) понижение pH внутри сцинтиллона [Valiadi M., 2013].

Химическая реакция происходит внутри сцинтиллоновой органеллы между динофлагеллятной люциферазой (Lcf) — ферментом, катализирующим реакцию, — и люциферин (Ln) — субстратом реакции. Люциферин связан с белком, называемым люциферин-связывающим белком (LBP) [Hastings, 2009]. Когда уровень pH сцинтиллона равен 8, люцифераза неактивна, а люциферин связан с LBP. Этот уровень подкисления препятствует протеканию химической реакции, когда в этом нет необходимости. Как только достигается пороговое напряжение сдвига, а затем кислотность органеллы снижается до 6, происходит изменение конформации Lcf, что приводит к ее активации и открытию участков связывания для субстрата люциферина [Valiadi M., 2013] [Fajardo C. *et al*, 2020]. Параллельно с этим LBP также изменяет свою конформацию, освобождая субстрат люциферина [Valiadi M., 2013]. Следовательно, это подкисление является ключевым в создании химической реакции, которая запускает испускание света.

Ген LBP обнаружен не у всех светящихся динофлагеллят — например, у рода *Pyrocystis* этого белка, похоже, нет, — однако в большинстве изученных случаев он присутствует. Молекулярная масса LBP около 150 кДа; у *Lingulodinium polyedrum* (Stein, 1989) он кодируется как белок, состоящий из четырех повторяющихся доменов, слабо похожих

между собой (в отличие от трёх похожих доменов люциферазы). LBP, как и люцифераза, синтезируется в клетке в соответствии с суточным циклом и также накапливается в скинтиллонах. При pH ~7,5–8 LBP плотно связан с люциферинном и тем самым защищает его от разрушения. Однако когда pH вокруг падает ниже ~7, белок подвергается конформационному изменению и отпускает молекулу люциферина. Таким образом, при кислотном сигнале люциферин высвобождается именно тогда и там, где люцифераза уже перешла в активную форму. Эта высоко скоординированная система напоминает спусковой механизм: в обычных условиях субстрат надежно «предохранен» от преждевременной реакции, но по сигналу мгновенно становится доступен для фермента [Valiadi M., 2013].

Циркадные ритмы. Многие биолуминесцентные динофлагелляты – особенно фотосинтезирующие виды – обладают встроенными суточными (циркадными) часами, которые регулируют их способность светиться в зависимости от времени суток [Sweeney & Hastings, 1957]. Как правило, максимальная светимость клеток приходится на глубокую ночь, а днем способность светиться резко снижена или отсутствует, даже если клетку механически стимулировать. Этот ритм поддерживается даже в условиях постоянной темноты за счет внутренних часов, но синхронизируется суточным световым циклом. Молекулярно циркадная регуляция реализуется через контроль количества ключевых компонентов – люциферазы, LBP и скинтиллонов – в течение суток. У *L. polyedrum* показано, что концентрация люциферазы и связывающего белка, а также число скинтиллонов в клетке драматически изменяются: к ночи их становится в ~10 раз больше, чем днем. Ночью, примерно через 4 часа после наступления темноты, содержимое скинтиллонов (люциферин, LBP, люцифераза) достигает пика, поэтому организм способен давать мощные вспышки. К рассвету же лишние скинтиллоны разрушаются, а белки деградируют, к полудню количество люциферазы/LBP минимально. Этот механизм подтвержден на уровне РНК: мРНК люциферазы и LBP у *L. polyedrum* присутствуют постоянно, но их трансляция подавлена днем и активна ночью. В итоге каждый вечер клетка синтезирует новые запасы люциферина, фермента и белка для ночного свечения, а к утру избавляется от них, экономя ресурсы и предотвращая дневное свечение. У других видов стратегия иная. Например, у *P. lunula* суточный ритм света реализуется не за счет синтеза/деградации люциферазы, а путем перераспределения скинтиллонов внутри клетки: ночью скинтиллоны перемещаются к периферии клетки, ближе к поверхности, повышая чувствительность к механическому раздражению, а днем убираются глубже к центру, где

меньше подвергаются случайной стимуляции светом или движением. При этом общее число сцинтилл и количество люциферазы/люциферина в них у *P. lunula* остаётся примерно одинаковым в течение суток. Такой своеобразный «блокировочный» механизм тоже предотвращает ненужное свечение днем [Hastings JW., 2013]. Интересно, что некоторые строго гетеротрофные светящиеся динофлагелляты (например, виды рода *Protoperdinium*) вообще не демонстрируют выраженных циркадных изменений биolumинесценции – видимо, отсутствие фотосинтеза делает суточную регуляцию менее актуальной. Тем не менее почти все виды, и фотосинтезирующие и нет, проявляют фотоподавление биolumинесценции: яркий солнечный свет напрямую угнетает способность светиться. Механизм этого фотоингибирования не до конца ясен, но считается адаптивным: так динофлагелляты «знают», что днем их вспышки были бы бесполезны (на фоне солнечного света их не видно) и только расточительно тратили бы энергию. Действительно, показано, что под действием голубого компонента дневного света чувствительность клеток к механическим стимулам падает на несколько порядков. Фотоингибирование можно рассматривать как защиту: дневное время клетки проводят в «немом» режиме, сохраняя люциферин, пока он действительно не понадобится с наступлением темноты. Таким образом, биolumинесцентная система динофлагеллят интегрирована в общую физиологию клетки и окружающую среду. Мгновенные триггеры (pH-сигналы) обеспечивают молниеносную реакцию на локальные раздражители, а циркадные и световые ритмы задают глобальный «график» работы системы, включающей ее в ночное время и выключающей на день. В сумме это гарантирует, что свет генерируется именно тогда, когда он наиболее полезен для организма [Valiadi M., 2013], Hastings JW., 2013].

Люцифераза динофлагеллят

Люцифераза (Lcf) катализирует окисление люциферина молекулярным кислородом, в результате чего образуется возбужденный оксилуциферин, излучающий синий свет при λ_{max} 480 нм. У всех изученных представителей отряда Gonyaulacales, Lcf (мол. масса 137 кДа) содержит: один N-концевой домен люциферазы/LBP и три каталитических домена (D1, D2, D3) [Schultz L.W., 2005] (Рисунок 3).

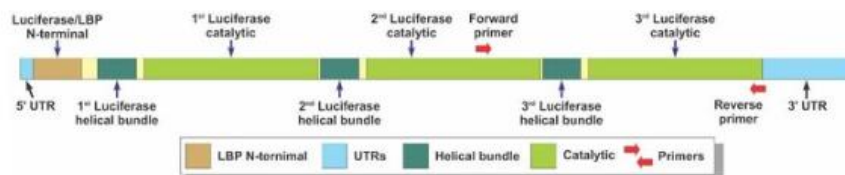
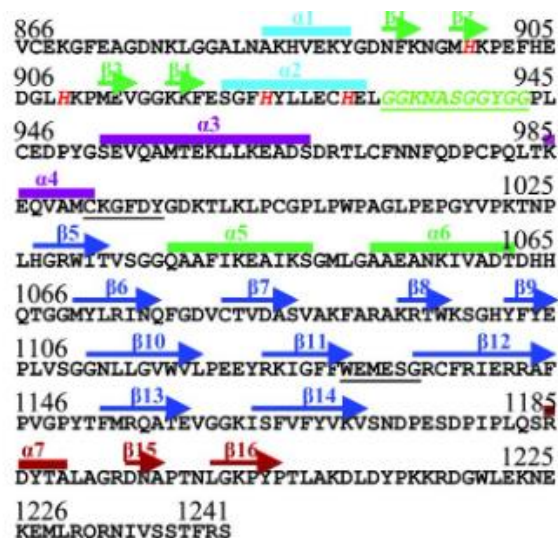


Рисунок 3. Структура мРНК люциферазы *P. lunula* (GenBank AF394060.1), показывающая три каталитических домена (выделены зеленым) и фрагмент, амплифицируемый разработанными праймерами Luci D2-3 F и Luci D2-3 R (показан красными стрелками).

Филогенетический анализ доменов Lcf (с использованием Lcf из *Noctiluca scintillans* (Kofoid & Swezy, 1921) в качестве внешней группы, содержащей лишь один каталитический домен) показал схожий эволюционный паттерн для всех трех доменов (Рисунок 4). Каждый каталитический домен (≈ 46 кДа) ферментативно активен [Morishita H. *et al*, 2002], а их кодирующая последовательность организована в геноме в виде tandemных повторов. Формирование трёх доменов, вероятно, произошло путём дупликации домена 1. Это подтверждается наличием трёх доменов у всех секвенированных видов порядка Dinophyta [Suzuki-Ogoh, 2008]. Молекулярные филогенетические исследования показывают, что все светящиеся динофлагелляты принадлежат к классу Dinophyceae (на самом деле к нескольким родственным отрядам внутри него). Ген люциферазы (lcf) детально изучен по крайней мере у восьми видов – семи фотосинтетиков из порядка Gonyaulacales (*Alexandrium*, *Lingulodinium*, *Protoceratium*, *Pyrocystis*) и одного гетеротрофа *Noctiluca scintillans*. Во всех случаях структура гена сходна: он состоит из трех повторяющихся сегментов, кодирующих домены D1, D2, D3 люциферазы. Причем соответствующие домены разных видов более сходны между собой, чем домены внутри одной люциферазы. Это означает, что сначала произошла древняя тройная дупликация предкового гена люциферазы, а уже затем три связанных домена эволюционировали совместно, разносясь в различных линиях динофлагеллят. Иными словами, у общего предка светящихся видов уже была однодоменная люцифераза, и последующие виды унаследовали именно такую архитектуру, видоизменяя лишь детали. Например, у распространённого рода *Ceratium* обнаружена люцифераза со значительно дивергировавшей последовательностью, но всё так же состоящая из трех повторов. Это говорит о том, что биолуминесценция, возможно, возникла в эволюции динофлагеллят очень давно, задолго до дивергенции современных родов, и разные линии успели накопить различия в последовательности фермента [Fajardo, C. 2020].

Каждый каталитический домен содержит: β -бочкообразный карман, образованный 10 антипараллельными β -тяжами, который служит активным центром для связывания тетрапиррольного люциферина, регуляторный трёхспиральный пучок, расположенный перед β -бочкой и содержащий критические гистидиновые остатки (например, четыре гистидина 899, 909, 924 и 930 у *Lingulodinium polyedrum*) (Рисунок 4).

A.



B.

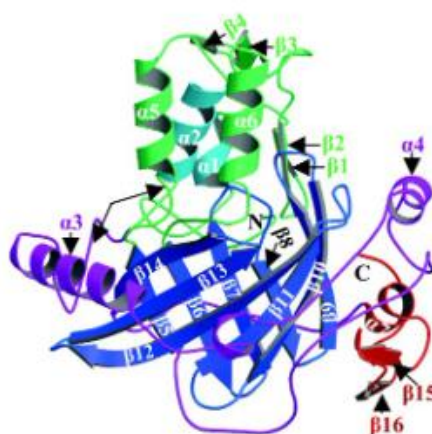


Рисунок 4. (А) Последовательность Lcf D3 с аннотированными областями α -спирали (α) и β -цепи (β). Последовательность, богатая глицином (выделенная курсивом и подчеркнутая), соединяет N-концевой субдомен с β -стволом, включающим цепи $\beta 5$ – $\beta 14$. Четыре N-концевых гистидина (899, 909, 924 и 930) показаны красным и курсивом. Две подчеркнутые последовательности из шести остатков показывают начало и конец высококонсервативной области (991–1136), обнаруженной в LCF всех семи исследованных видов (23). (В) Ленточная диаграмма кристаллической структуры D3 со спиралями и β -тяжами, пронумерованными и закодированными цветом, как в А. Две N-концевые спирали (светло-голубые) и мотив спираль-петля-спираль (зеленый) находятся сверху, а β -бочка (темно-синий) находится внизу [L.W. Schultz, 2005].

При pH 8 эти гистидиновые остатки депротонированы, и водородные связи блокируют доступ люциферина к активному центру люциферазы. При закислении среды до 6.8 эти гистидины протонируются, конформационное изменение открывает карман, и люциферин проникает в β -бочку. Этот переход сопровождается смещением спирального пучка, что подтверждено заменой гистидинов на аланин [L.W. Schultz, 2005] (Рисунок 5).

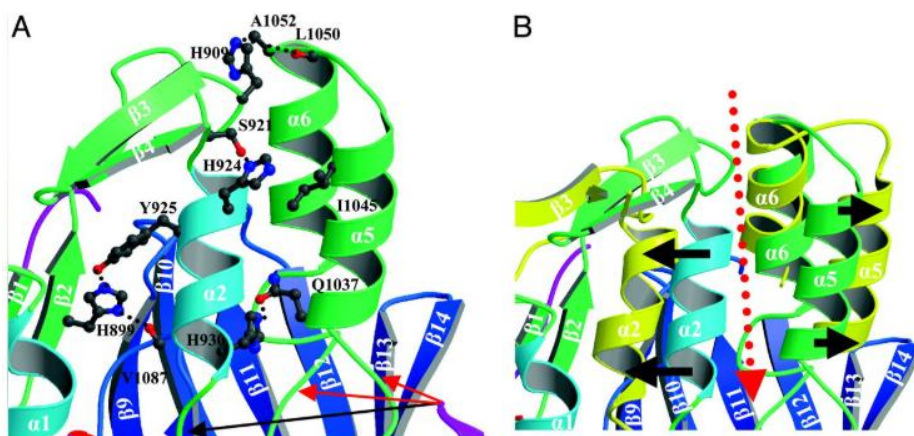


Рисунок 5. Увеличенные изображения гибкого регуляторного трехспирального пучка, повернутого на 90° против часовой стрелки с рис. 4(В). (А) Структура при pH 8, показывающая спиральный пучок и четыре гистидина, участвующих в регуляции pH. Три стрелки указывают на остатки Gly-Gly в D3; более короткие красные стрелки — это пара, отсутствующая в последовательности FABP. Для ясности остатки A1088, A1038 и M1070 не показаны. (В) Структура после молекулярной динамики с четырьмя гистидинами, замененными аланинами, показывающая смещенные положения α2, α5 и α6А (желто-коричневые), наложенные на исходную структуру. Черные стрелки указывают на движение спиралей друг от друга, чтобы открыть канал растворителя (красная стрелка) к активному сайту [L.W. Schultz, 2005].

Каталитические домены люциферазы не имеют гомологии с другими известными люциферазами в базах данных (например, бактериальными или светлячковыми), что указывает на независимую эволюцию у динофлагеллят. Таким образом, люцифераза динофлагеллят демонстрирует сложную модульную архитектуру, где сочетание доменной структуры и pH-зависимого аллостерического контроля обеспечивает высокоспецифичную биолюминесценцию в морских экосистемах.

Химическая структура и свойства люциферина

Люциферин, используемый динофлагеллятами, по структуре представляет собой открытую цепь тетрапиррола (билена) — молекулу, родственную по химическому скелету биологическим пигментам типа билирубина и продуктам распада хлорофилла. Полную структуру этого люциферина удалось выяснить лишь в конце 1980-х: Hideshi Nakamura с соавторами впервые охарактеризовали его строение в 1989 году на материале биолюминесцентной водоросли *Pyrocystis lunula* (Рисунок 6).

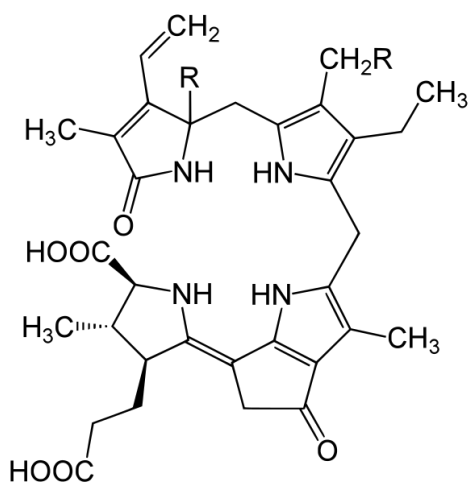


Рисунок 6. Структура люциферина динофлагеллят – это линейный тетрапиррольный хромофор (билиновый пигмент), близкий по строению к продуктам деградации хлорофилла. Он содержит четыре сопряженных циклических фрагмента (пиррола) с различными заместителями, включая несколько карбоксильных групп, что обуславливает кислотные свойства молекулы.

Оказалось, что люциферин – сравнительно крупная органическая молекула (порядка ~590 Да) с системой сопряженных двойных связей, способная при окислении переходить в возбуждённое состояние и испускать фотон видимого света. Интересно, что этот люциферин практически универсален для всех светящихся динофлагеллят: люциферин из *P. lunula* эффективно взаимодействует с люциферазой любых биoluminesцентных динофлагеллят [Valiadi M., 2013]. Более того, люциферин эвфаузиевых рачков (например, антарктического криля *Euphausia superba* (Dana, 1850)) по строению очень близок к люциферину динофлагеллят, отличаясь лишь деталями и вероятно происходя от люциферина динофлагеллят, потребляемых с пищей. Такое сходство предполагает, что ракообразные получают люциферин, поедая светящихся водорослей, вместо синтеза с нуля – пример «диетического» приобретения биoluminesценции. Этот люциферин считается производным хлорофилла или связанных с ним тетрапиррольных метаболитов. Было выдвинуто предположение, что эта молекула образуется в клетке как побочный продукт фотодегradации хлорофилла *in vivo* [Topalov & Kishi, 2001]. Изотопные опыты с *Pyrocystis* (например, меченым по азоту глицином и глутаматом) также подтвердили, что люциферин синтезируется самими клетками из внутренних предшественников, а не обязательно напрямую поступает с пищей [Wu et al., 2003]. Даже строго гетеротрофные светящиеся виды, такие как *Noctiluca scintillans*, способны эндогенно производить люциферин: в эксперименте *N. scintillans* успешно культивировали более года без какой-либо богатой хлорофиллом пищи, однако светимость клеток сохранялась. Это указывает на наличие у

таких организмов собственного метаболического пути синтеза люциферина. Действительно, геномные исследования выявили, что биолуминесцентные динофлагелляты – включая нефотосинтезирующие виды – сохраняют полный набор генов пластидного тетрапиррольного пути. Иными словами, даже потеряв способность к фотосинтезу, эти организмы удержали часть биохимического «инструментария» хлорофиллообразования, по-видимому для синтеза люциферина. Это элегантно подтверждает гипотезу о происхождении люциферина из хлорофилла. Свободная молекула люциферина чрезвычайно неустойчива вне клетки – она легко автоокисляется на воздухе, разрушается под действием света, высоких концентраций солей и при низком pH. Такая лабильность затрудняет выделение и хранение люциферина в чистом виде. В живых динофлагеллятах эта проблема решается с помощью специального белка (LBP), который связывает люциферин и стабилизирует его при нейтральном pH, не давая самопроизвольно окисляться. Благодаря этому запас люциферина сохраняется в клетке до момента вспышки. При переходе же в кислую среду связывающий белок отпускает люциферин, позволяя тому вступить в реакцию с люциферазой [Topalov & Kishi, 2001].

Защитные функции биолуминесценции

Биолуминесценцию динофлагеллят также можно рассматривать как механизм защиты от хищников. Наиболее распространена теория *burglar alarm*, согласно которой световая вспышка, возникающая при атаке копепод или других фильтраторов на динофлагеллят, привлекает более крупных хищников (например, рыб), нападающих на копепод (и др. фильтраторов). Было выявлено, что внезапная световая вспышка пугает поедающих динофлагеллят копепод, изменяя их поведение [Buskey E.J. & Swift E., 1983]. При высокой концентрации динофлагеллят как раз действует *burglar alarm*, а при низкой концентрации – испуг копепод от внезапной световой вспышки или *aposematic warning* – сигнал, который служит предупреждением о том, что динофлагелляты токсичны и есть их не стоит [Hanley K.A. & Widder E.A., 2017]. У некоторых видов динофлагеллят, обладающих способностью продуцировать токсины, свечение может служить визуальной меткой, сигнализирующей потенциальным хищникам об их опасности. Выяснилось, что динофлагелляты могут распознавать полярные липиды копепод (*copepodamides*), как сигнал приближающейся опасности, повышая экспрессию генов, вследствие чего повышается интенсивность свечения [Prevett A., Lindström J. et. al, 2019].

Роль биолюминесценции в коммуникации и размножении

Биолюминесценция является не только механизмом отпугивания хищников, но и играет роль в межвидовых и внутривидовых взаимодействиях. Например, в ночное время наблюдается массовое свечение динофлагеллят, обусловленное циркадными ритмами [Fritz L. et. al, 1990]. Такое синхронное свечение может сигнализировать другим организмам, что уже ночь и пора делиться, это является сигналом и для самих динофлагеллят, который помогает координировать жизненные циклы; также такие вспышки служат сигналом плотности популяции, т.е. может означать, что популяция динофлагеллят уже достигла определённых размеров и можно переходить к следующей жизненной стадии. Биолюминесценция может играть роль в привлечении партнёров, свечение иногда используется в брачных ритуалах [Haddock S.H.D. et. al, 2013]. Хотя для динофлагеллят такая функция не до конца доказана, но гипотезу подтверждают световые вспышки в период активного размножения.

Влияние биолюминесценции на экосистему

Биолюминесценция динофлагеллят может оказывать значительное влияние на водные экосистемы. В первую очередь потому, что резкие световые вспышки могут изменять поведение копепод, которые поедают динофлагеллят [Buskey E.J. & Swift E., 1983]. Биолюминесценция динофлагеллят при массовых скоплениях – ночных «светящихся приливах» - может косвенно влиять на пищевые цепочки, привлекая более крупных хищников, также биолюминесценция служит индикатором биомассы и активности фитопланктона, что важно для мониторинга состояния морской среды [Widder E.A. et. al, 2010]. Недавние исследования показали, что биолюминесценция влияет на энергетическую структуру экосистемы: при массовом свечении снижается эффективность копепод при поедании динофлагеллят, чем значительно уменьшает количество энергии, которая переходит от фитопланктона к зоопланктону и далее, вследствие этого большая часть энергии не переходит на следующие уровни в экосистеме; также при этом усиливается и продлевается цветение воды [Park S.A. et. al, 2024]. Таким образом, биолюминесценция динофлагеллят играет значимую роль в регулировании зоопланктона, продлении цветений и изменении структуры экосистемы, особенно во время массовых свечений.

Применение биолюминесцентной системы динофлагеллят

Люциферазная система динофлагеллят используется для создания высокочувствительных биосенсоров, способных определять наличие патогенов в окружающей среде [Kim S. et al, 2021]. Люциферазные гены используются в качестве репортерных генов для отслеживания экспрессии генов в раковых клетках [Lee H. et al, 2020]. Биолюминесценция используется в системах мониторинга качества воды, такие системы выявляют загрязнение воды тяжелыми металлами, пестицидами и другими токсичными веществами. Такое использование связано с изменением интенсивности свечения под воздействием загрязнителей [Perin L. et al, 2022]. Биолюминесцентная визуализация (BLI) – метод, позволяющий наблюдать биологические процессы в живых организмах с использованием света, излучаемого клетками, экспрессирующими люциферазу – даёт возможность отслеживать экспрессию генов и движение клеток в реальном времени, оценивать эффективность препаратов, тестируя их на клетках и тканях в живых организмах, изучать взаимодействие между белками, а особенно, мониторить рост опухолей и динамику заболеваний, оценивать эффективность лечения, что способствует улучшению диагностики и терапии рака [Close D. et. al, 2010].

В фундаментальной науке динофлагелляты давно служат моделью для исследований циркадных ритмов и регуляции генов. В 1980-х годах на *Gonyaulax* был открыт феномен суточной трансляционной регуляции – один из первых примеров пост-транскрипционного контроля биологических часов [Hastings et al., 1985]. До сих пор *Lingulodinium polyedrum* используется в лабораториях для изучения работы циркадного часов у простейших, а биолюминесцентная реакция служит удобным выходным сигналом, по которому фиксируют фазу ритма. Ген люциферазы (*lcf*) и белка LBP также интересны с точки зрения эволюции геномов динофлагеллят, известных своей необычной организацией ДНК.

Что касается прикладной биолюминесцентной оптики, то система динофлагеллят пока уступает по популярности жуковой (люциферин светлячков и его фермент) и бактериальной (Lux). Однако у динофлагеллят есть свои уникальные особенности, которые могут быть востребованы. Например, их люцифераза не требует каких-либо кофакторов (в отличие от бактериальной, нуждающейся в FMNH₂ и альдегиде) – только кислорода и изменения pH. Это делает потенциально возможным создание pH-активируемых биосенсоров на основе доменов люциферазы динофлагеллят. Такой сенсор мог бы излучать

свет при наступлении определенных условий (скажем, при подкислении среды внутри биореактора или в определенных органеллах клетки). Первые шаги в этом направлении – работа с рекомбинантными доменами люциферазы – уже предпринимались [Li & Hastings, 1998], [Valiadi M., 2013]. Также, понимание механизма люциферин-люциферазной реакции может лечь в основу новых хемилюминесцентных реагентов. Хотя сам люциферин динофлагеллят слишком сложен для массового синтеза, его аналоги или фрагменты могли бы использоваться в аналитической химии для обнаружения следов кислорода или pH-изменений (по аналогии с тем, как производные люциферина светлячков используются для измерения АТФ).

Биолюминесценция динофлагеллят также широко используется в искусстве, светящиеся организмы часто используются в выставках фотографий и художественных выставках [Latz M.I., 2017]. В сельском хозяйстве и промышленности может использоваться биолюминесценция динофлагеллят для контроля качества почвы, воды, продуктов, для обнаружения загрязнителей и снижения негативного влияния на окружающую среду [Perin, 2022].

Материалы и методы

Растворы и буферы

Жидкая бактериальная среда **SOB**: 2% бакто-триптон; 0,55% бакто-дрожжевой экстракт; 10 мМ NaCl; 10 мМ KCl; 20 мМ Mg²⁺ (10 мМ MgSO₄ + 10 мМ MgCl₂). Питательную среду автоклавировали один раз в режиме: 1 атм 121°C 20 минут. Хранили среду при +4°C.

Жидкая среда для *E.coli* Luria-Bertani (**LB**): 1% бакто-триптон; 0,5% бакто-дрожжевой экстракт; 1% NaCl. Питательную среду автоклавировали один раз в режиме: 1 атм 121°C 20 минут. Хранили среду при +4°C.

Агаризованная среда для *E.coli* **LB-agar**: жидкая питательная среда LB; 1,5% бакто агар. Питательную среду автоклавировали один раз в режиме: 1 атм 121°C 20 минут. Хранили среду при +4°C.

Электрофорез в агарозном геле

Для разделения и очистки ДНК-фрагментов использовали 1–1,5% агарозный гель (Agarose LE, Helicon). Гель готовили на основе буфера TAE, добавляя бромистый этидий до конечной концентрации 0,5 мкг/мкл. Агарозу растворяли в микроволновой печи в течение 1–1,5 минуты до получения прозрачного однородного раствора. Прежде чем залить гель в кассету с установленными гребенками, раствор охлаждали до 50 °C. После застывания геля извлекали гребенки, переносили гель в электрофоретическую камеру и вносили образцы ДНК, предварительно смешанные с разведенным в 4 раза загрузочным буфером 4X Gel Loading Dye, Blue (Евроген). Для ПЦР-продуктов, полученных с использованием смеси ScreenMix, дополнительный буфер не добавляли, так как он уже входил в состав реакционной смеси. Электрофорез выполняли в буфере TAE при напряжении 150 В для аналитических целей и 100 В — для препаративных разделений. В качестве молекулярного маркера использовали 100 нг 1 Kb Ladder (SibEnzyme). Визуализацию гелей проводили на системе Gel Doc EZ Imager (BioRad) и обрабатывали данные с помощью встроенного ПО. Для вырезания фрагментов ДНК использовали УФ-трансиллюминатор TF20M с длинноволновой лампой ($\lambda = 365$ нм).

Работа с *E. coli*

Получение электрокомпетентных клеток *E. coli*

В 1 л LB-среды вносили 10 мл ночной культуры *E. coli* штамма XL1-Blue и выращивали при 37 °C в шейкере (New Brunswick Scientific Incubator Shaker Series Exella E24). Оптическую плотность при 600 нм (OD₆₀₀) контролировали сначала ежедневно, затем каждые 15–20 минут до достижения OD > 0,2.

При OD₆₀₀ 0,35–0,4 клетки быстро помещали на лед и охлаждали 20–30 минут. Осаждали клетки центрифугированием (1000 g, ~2400 об/мин, ротор Beckman JA-10, 20 мин при 4 °C). Осадок ресуспендировали в 200 мл ледяной H₂O.

Процедуру промывания и центрифугирования повторяли дважды с ресуспендированием в 100 мл ледяной H₂O. После третьего осаждения клетки разводили в 40 мл холодного 10% глицерина, помещали в 50 мл конусные пробирки.

Центрифугировали при 1000 g (~2100 об/мин, ротор Beckman GH-3.8, 20 мин при 4 °C).

Осадок осторожно разводили в 1 мл ледяного 10% глицерина до OD₆₀₀ ~200–250.

Готовые суспензии аликвотировали по 1,5 мл в стерильные микроцентрифужные пробирки и быстро замораживали в жидком азоте для хранения при –80 °C.

Трансформация *E. coli* и инкубация

Электропорацию проводили на установке Bio-Rad MicroPulser с использованием 1 мм кювет (BioRad). Для этого 40 мкл размороженных электрокомпетентных клеток штамма XL1-Blue (Invitrogen) смешивали с 50–100 нг плазмиды или лигазной смеси, затем переносили в кювету. После импульса клетки немедленно дополняли 1 мл среды SOB и инкубировали 1–1,5 ч при 37 °C, 200 об/мин в шейкере (New Brunswick Scientific Incubator Shaker Series Exella E25). По завершении 50–200 мкл суспензии высевали на LB-агаровые чашки с ампициллином (200 мкг/мл) и инкубировали при 37 °C в течение ночи.

Скрининг колоний *E. coli*

Для идентификации рекомбинантных клонов использовали ПЦР с векторными (T7-for: 5'-taatacgaactcactataggg-3') и ген-специфическими обратными праймерами. Скрининговую реакцию выполняли с использованием смеси ScreenMix (Евроген). Типичная реакция включала: 2 мкл 5x ScreenMix, 1 мкл векторного праймера, 1 мкл специфического праймера, бактериальную биомассу и Milli-Q воду до 10 мкл. ПЦР проводили 25–30 циклов, затем амплификаты анализировали методом гель-электрофореза. Клоны с полосами требуемой длины рассматривали как положительные и инокулировали для ночного наращивания.

Выделение плазмид из *E. coli*

Плазмидную ДНК очищали с использованием набора Plasmid Miniprep (Евроген), строго следуя протоколу производителя. Клетки из 2 мл бактериальной культуры осаждали (6000 об/мин, 1 мин), затем лизировали и нейтрализовали поэтапно. Супернатант переносили на спин-колонку, дважды промывали, сушили и элюировали 20–50 мкл элюирующего буфера. Концентрацию выделенных образцов определяли на NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

Определение нуклеотидных последовательностей

Очищенные плазмиды передавали в компанию «Евроген», где секвенирование проводили на автоматическом анализаторе CEQ 2000 DNA Analysis. Полученные данные выравнивали и анализировали с помощью онлайн-платформы Benchling (www.benchling.com).

Создание генетических конструкций для экспрессии люциферазы *P. lunula* в клетках *E. coli*

Клонирование гена в экспрессионный вектор

Для экспрессии люциферазы *P. lunula* lcf в клетках *E. coli* генетические конструкции создавали с использованием подхода модульного клонирования (Weber et al., 2011). Вектор p7085 и p7090, включающий T7-промотор, T7-терминатор и ген устойчивости к ампициллину, а также ген lcf, фланкированный сайтами рестриктазы II типа BsaI,

смешивали в молярном соотношении 1:3. Реакцию рестрикции проводили при 37 °С в течение 30 мин в буфере для T4-лигазы (Thermo Scientific). После этого в реакционную смесь вносили T4-лигазу и выполняли циклы рестрикции/лигирования: по 2 мин при 37 °С и 4 мин при 16 °С (всего 25 циклов), затем дополнительно инкубировали 10 мин при 16 °С для завершения лигирования.

Амплификация и отбор экспрессионных векторов в *E. coli*

Полученные лигазные смеси трансформировали в электрокомпетентные клетки *E. coli* штамма XL1-Blue. После восстановления трансформанты высевали на LB-агар, содержащий ампициллин (200 мкг/мл). Для идентификации клонов, содержащих целевой ген *lcf*, проводили колониальную ПЦР с использованием прямого праймера, комплементарного последовательности T7-промотора, и обратного праймера, нацеленного на участок гена *lcf*. Колонии, для которых при анализе гель-электрофорезом был выявлен ПЦР-продукт ожидаемого размера, переносили в ночную жидкую культуру. Из этих культур выделяли плазмидные конструкции с помощью набора Plasmid Miniprep (Евроген) в соответствии с инструкцией производителя. Достоверность вставок подтверждали методом секвенирования по Сенгеру (Евроген).

Гетерологическая экспрессия люциферазы *P. lunula* в клетках *E. coli*

Аналитическая экспрессия люциферазы *P. lunula* в клетках *E. coli*

Для оценки экспрессии люциферазы *P. lunula* в бактериальной системе проводили индукцию в 15 различных условиях, варьируя варианты штаммов *E. coli* (BL21 DE3, Rosetta, Star, Shuttle), температуру культивирования и концентрацию IPTG. Ночную культуру *E. coli* выращивали до достижения оптической плотности при 600 нм, равной 0,6, после чего вносили IPTG в концентрационном диапазоне от 0 до 2 мМ. Культивирование продолжалось в течение 16 часов при одной из температур: 18 °С, 30 °С или 37 °С, с аэрацией на шейкере (220 об/мин).

После индукции клетки растили от 24 часов (при 30С и 37С) до 48 часов при 18С, осаждали центрифугированием (10 мин, 10000g, 4 °С, Eppendorf 5425 R).

Препаративная экспрессия люциферазы *P. lunula* в клетках *E. coli*

Для масштабной экспрессии в 10 колбах объёмом 1 л готовили по 200 мл LB с добавлением 20 мг ампициллина. Каждую колбу инокулировали 2 мл ночной культуры. При достижении $OD_{600} = 0,6$ вносили IPTG до 1 мМ, после чего культивировали в течение 48 часов при 18 °C на шейкере Exella E25 (200 об/мин).

Лизис бактериальных клеток лизоцимом с применением ультразвуковой бани

Буфер для лизиса (50 mM Tris-HCl, pH 7.5–8.0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA (опционально, для ингибирования металлопротеаз), 0.1% Triton X-100 (опционально, для усиления лизиса)).

1. Подготовка бактериальных клеток. Центрифугировали 100 мкл суспензии *E. coli* (5000 g, 10 мин, 4°C) и удаляли супернатант. Ресуспендировали осадок в 100 мкл буфера для лизиса.
2. Лизис лизоцимом. Добавляли лизоцим до конечной концентрации 0.2–1 мг/мл (например, 10 мкл 10 мг/мл раствора на 1 мл клеточной суспензии). Инкубировали 30–60 минут на льду или при комнатной температуре с перемешиванием. Добавляли 1 мМ PMSF (или другой ингибитор протеаз) перед ультразвуковой обработкой. (Опционально) Добавляли ДНКазу I (10 мкг/мл) и 5 mM $MgCl_2$, если требовалось снижение вязкости.
3. Ультразвуковой лизис. Размещали пробирки с клетками в ультразвуковую баню, заполненную льдом или холодной водой. Обработывали ультразвуком 5–10 мин с интервалами 10 с включено / 30 с выключено для предотвращения перегрева. Визуально контролировали степень прозрачности раствора (прозрачность увеличивается при разрушении клеток).
4. Очистка лизата. Центрифугировали при 12 000–15 000 g, 15 мин, 4°C. Собирали супернатант (растворимые белки) или ресуспендировали осадок при необходимости. Хранили супернатант на льду (если использовался сразу) или при -80°C для долгосрочного хранения. Образец был готов для последующего анализа (SDS-PAGE, очистка белков, спектрофотометрия и т. д.).

Экстракция и очистка люциферазы *P. lunula* в клетках *E. coli*

Клетки, полученные после культивирования, осаждали центрифугированием (30 мин, 3800g, 4 °C, Sigma 2-16KL). Осадок растворяли в 20 мл буфера (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8.0), добавляли ингибитор протеаз PMSF до 2 mM и разрушали клетки ультразвуком (30 мин, 5 с работа / 5 с пауза, 30% амплитуда, на льду; соникатор SONICS VUBRA CELL).

Лизат последовательно очищали центрифугированием: 30 мин при 8000 об/мин, затем 30 мин при 18000 об/мин (Beckman J2-21C), собирая супернатант на каждом этапе. Полученный фильтрат (примерно 200 мл) пропускали через 0,22 мкм фильтр. Часть лизата использовали для анализа методом ПААГ-электрофореза (SDS-PAGE).

Выделение телец включения из клеток *E. coli*

1. Культивирование и сбор клеток. Засеивали экспрессионный штамм *E. coli*, содержащий рекомбинантную плазмиду. Индуцировали экспрессию (IPTG, 1 mM, 37 °C, 48 ч). Собирали клетки центрифугированием (5000 g, 25 мин, 4 °C).

2. Лизис клеток. Осадок ресуспендировали в буфере лизиса (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8,0). Добавляли ингибиторы протеаз. Проводили механический лизис (ультразвуковая дезинтеграция). Центрифугировали при 15000 g, 30 мин, 4 °C. Супернатант содержит растворимые белки, а осадок — в том числе тельца включения.

3. Промывание телец включения. Осадок ресуспендировали в буфере промывки (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,5–1% Triton X-100, pH 8,0). Цель: удалить липидные и мембранные примеси, остатки цитоплазматических белков. Повторяли центрифугирование (15000 g, 20 мин, 4 °C). Промывали несколько раз (обычно 2–3 цикла) до осветления супернатанта.

4. В финале промывали буфером без детергента (например, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0).

После промывки осадок, содержащий очищенные тельца включения, собирали центрифугированием и замораживали при -20C.

Препаративная очистка: металл-хелатная хроматография

Хроматографическое разделение проводили на системе AKTA Pure 25M (Cytiva). За процессом следили на длине волны 280 нм.

Суспензию NiNTA Superflow (GE Healthcare) загружали в колонку 15×42 мм. После промывки водой колонку уравнивали буфером А (20 мМ Tris-HCl, pH 8.0, 150 мМ NaCl). Лизат вносили со скоростью 2,5 мл/мин, затем промывали колонку буфером А до стабилизации сигнала. Далее следовала промывка буфером В (тот же Tris-HCl, но с 500 мМ NaCl), затем белки элюировали смесью 60% буфера С (20 мМ Tris-HCl, 800 мМ имидазол, pH 8.0) и 40% буфера А. Элюаты собирали фракциями по 3 мл, отбирая образцы для последующего SDS-PAGE анализа.

Электрофорез в полиакриламидном геле по методу Лэммли с SDS

В работе использовали диск-электрофорез по методу Лэммли в присутствии додецилсульфата натрия (SDS), применяя градиентный разделяющий гель с концентрацией акриламида от 11% до 22% и с добавлением 2,5% ТХЭ. Молярное соотношение акриламид:метиленабисакриламид (АА:МБА) в растворе составляло 30:1. Электрофорез начинали при напряжении 101 мВ; после того как фронт бромфенолового синего достигал разделяющего геля, напряжение повышали до 202 мВ. Электрический ток отключали, когда индикаторный краситель полностью выходил за пределы геля.

После завершения электрофореза гель обрабатывали с применением Stain-Free технологии для визуализации белков, затем в течение 1 часа инкубировали в фиксирующем растворе (2% фосфорная кислота и 50% этанол в воде). Для окрашивания использовали коллоидный раствор Кумасси G-250, также инкубируя гель 1 час. Излишки красителя удаляли промывкой геля бидистиллированной водой. Окончательную визуализацию белков выполняли с помощью системы Gel Doc XR+ (Bio-Rad) в режиме Protein Gels – Coomassie Blue.

Результаты и обсуждение

Гетерологическая экспрессия 3D люциферазы *P. lunula* в клетках *E. coli*

Создание генетических конструкций для экспрессии 3D люциферазы *P. lunula* в клетках *E. coli*

Бактериальная экспрессионная система является наиболее распространенной для получения рекомбинантных белков благодаря простоте манипуляций с культурами бактерий и высокому уровню экспрессии целевого белка. Таким образом, нашей задачей было получение клона с высоким уровнем экспрессии Lcf-3D, обладающей высокой активностью.

Сначала нужно было получить конструкцию, экспрессирующую 3 домен люциферазы *P. lunula* (lcf). Для этого мы использовали метод модульного клонирования, что подразумевает под собой использование стандартных частей (вектор, промотор, терминатор, ген). Вектор p7090 содержал T7-промотор и T7-терминатор и ген устойчивости к ампициллину для последующей селекции трансформированных клеток *E. coli*, а также С-концевой His-tag для последующей очистки наработанного белка (рисунок 7).

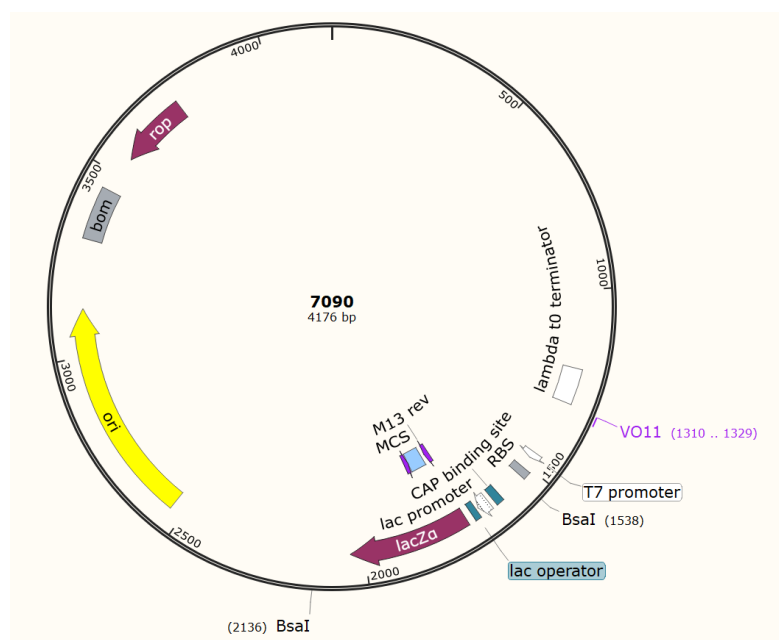


Рисунок 7 - Схема вектора 7090. Клонирование осуществлялось по сайтам рестриктазы BsaI.

Фланкирование гена *lcf-3D* сайтами рестриктазы *BsaI* позволяло направлено встраивать его в вектор. Эта рестриктаза относится к эндонуклеазам рестрикции второго типа и способна распознавать асимметричные последовательности и расщепляет эти последовательности на определенном расстоянии от сайта узнавания. Концы молекулы ДНК можно спроектировать так, чтобы по обе стороны они содержали сайты для ферментов рестрикции II-го типа. После разрезания ферментами эти участки узнавания удаляются, а на концах образуются выступающие одноцепочечные отрезки, способные комплементарно связываться друг с другом. Благодаря этому такие фрагменты легко соединяются при помощи лигазы, и в месте лигирования не остается исходной последовательности сайта рестрикции. Далее важную роль сыграли последовательные циклы рестрикции/лигирования, которые помогли эффективно собрать конструкцию. Для анализа были выбраны восемь отдельных колоний трансформированных клеток, выращенных на среде с плазмидами, несущими гены гидроксилаз из различных грибных организмов. Из этих колоний выделили плазмидную ДНК и провели скрининг методом ПЦР. В качестве праймеров использовали универсальный GAP-for, нацеленный на область промотора T7-for (5'-taagactcactataggg-3') и обратный праймер, комплементарный 3'-концевому участку гена *lcf-3D* (5'-gccgccacctgccttgaagctggtc-3'). Полученные амплификаты разделяли с помощью электрофореза в агарозном геле концентрацией 1,2% (рисунок 8).

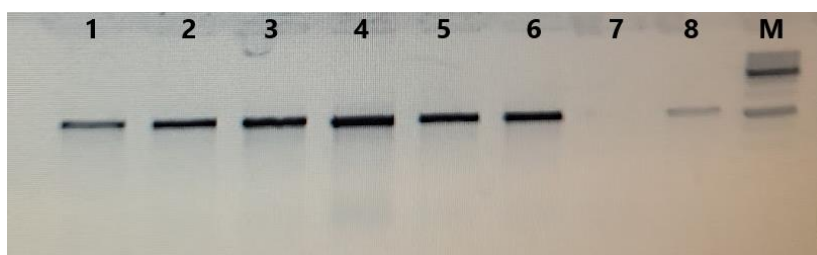


Рисунок 8 - Электрофорез ПЦР-продуктов после скрининга. Дорожки 1-7 – ПРЦ разных клонов *E. coli* после трансформации, 8 - положительный контроль. Маркер 1kb (Евроген), Целевой фрагмент имеет длину 1100 пар оснований, что совпадает с расчетным.

Для проверки встраивания гена *lcf-3D* мы определили первичную нуклеотидную последовательность плазмидной ДНК из трех положительных клонов (кл. 1, 2, 3) по методу Сенгера в компании Евроген, где подтвердилось, что ген *lcf-3D* встроился в плазмиду во всех изученных клонах и не содержит замен нуклеотидов.

Подбор условий экспрессии lcf-3D-7090

После этого нужно было оптимизировать условия для максимальной экспрессии люциферазы. Мы использовали разные штаммы *E. coli* (BL21 DE3, Rosetta, Star, Shuttle), что позволило учесть разные особенности штаммов, влияющие на экспрессию (например, наличие шаперонов, стабильность мРНК). Также нам нужно было подобрать оптимальную концентрацию IPTG – индуктора T7-промотора, который используется для включения экспрессии гена lcf-3D. Вариация концентрации IPTG позволяет найти оптимальную концентрацию для экспрессии (мы использовали две основные концентрации 0 и 1 mM). Температура влияет на скорость роста, фолдинг белка и активность протеаз, поэтому выбор нужной температуры важен для получения активного фермента (были проверены 18C, 30C и 37C). Таким образом, мы рассмотрели 24 варианта экспрессии lcf-3D. Были отобраны аликвоты всех проверяемых вариантов условий. Клетки каждого варианта были лизированы лизоцимом с использованием ультразвуковой бани. Эта методика позволил нам разделить фракции растворимого белка lcf-3D и оставшегося в осадке (в виде телец включения). Полученные фракции мы разделили с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с SDS (SDS-PAGE) (Рисунки 8 и 9).

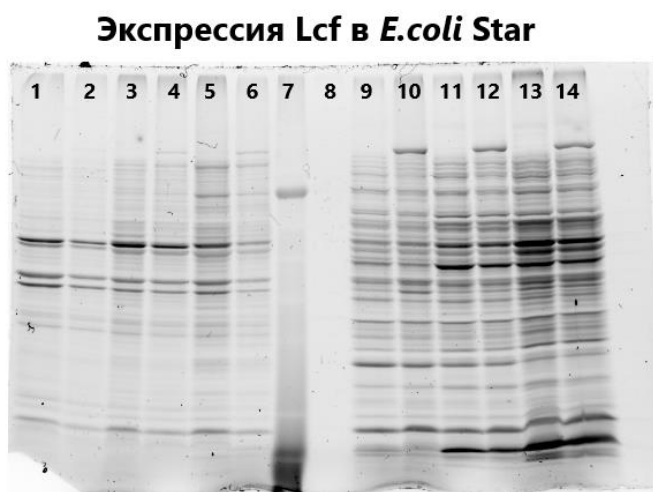


Рисунок 8 – Так и осталось два рисунка с номером 8 Электрофорез растворимых и нерастворимых фракций их клеток *E. coli*, штамма Star, экспрессирующих Lcf-3D в разных штаммах при некоторых условиях ферментации. 1. 18-0 mM-осадок, 2. 18-1 mM-осадок, 3. 30-0 mM-осадок, 4. 30-1 mM-осадок, 5. 37-0 mM-осадок, 6. 37-1 mM-осадок, 7. PageRuler prestained, 9. 18-0 mM-растворимые, 10. 18-1 mM -растворимые, 11. 30-0 mM-растворимые, 12. 30-1 mM-растворимые, 13. 37-0 mM-растворимые, 14. 37-1 mM-растворимые. Окраска StainFree.

Эксперсия Lcf в *E.coli* Rosetta

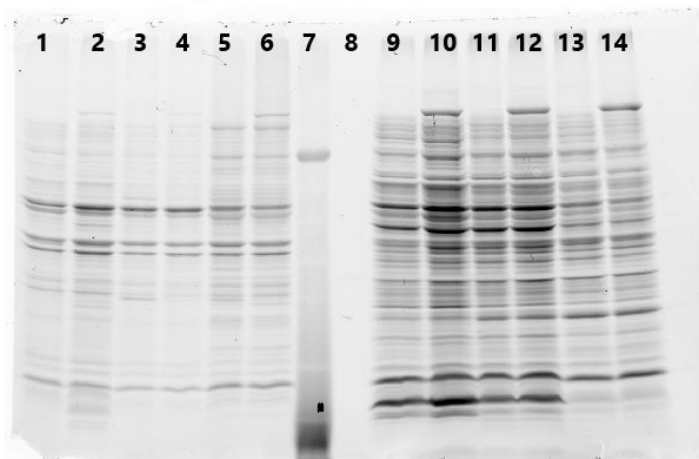


Рисунок 9 - Электрофорез растворимых и нерастворимых фракций их клеток *E. coli* штамма Rosetta, экспрессирующих Lcf-3D в разных штаммах при некоторых условиях ферментации. 1. 18-0 mM-осадок, 2. 18-1 mM-осадок, 3. 30-0 mM-осадок, 4. 30-1 mM-осадок, 5. 37-0 mM-осадок, 6. 37-1 mM-осадок, 7. PageRuler prestained, 9. 18-0 mM-растворимые, 10. 18-1 mM -растворимые, 11. 30-0 mM-растворимые, 12. 30-1 mM-растворимые, 13. 37-0 mM-растворимые, 14. 37-1 mM-растворимые. Окраска StainFree.

Лучшую экспрессию по результатам электрофореза показали варианты Star при 37°C и 0 mM IPTG, длительность ферментации 24 часа и Rosetta при 18°C и 1mM IPTG, длительность ферментации 48 часов.

Кроме того, во фракциях растворимых белков была исследована люциферазная активность. Для этого использовался PBS, pH 7, 4. К 100 мкл фосфатного буфера мы добавляли 4 мкл фракции и 1 мкл горячего экстракта *P. lunula*, после чего быстро перемешивали на Вортексе и измеряли люминесцентную активность с помощью люминометра BLM-530 M (Oberon-K, Russia). Горячий экстракт — раствор полученный после нагревания клеток или тканей до 80-100°C. При нагревании белки денатурируют и теряют активность, но низкомолекулярные соединения (такие как люциферин) остаются в активной форме. Поэтому горячий экстракт используют для отделения фермента от субстрата, проверки, в какой фракции находится активное вещество. Результаты измерения люминесцентной активности представлены на рисунке 10.



Рисунок 10 - Результаты измерения люминесцентной активности растворимой белковой фракции при разных условиях ферментации. Указана температура и концентрация IPTG.

Лучшая активность экспрессированного lcf-3D была показана для штамма Rosetta, 1mM IPTG, 48 часов при температуре 18°C.

Также мы провели аналитическое выделение целевого белка на NiNTA для вариантов показавших наиболее высокую люминесцентную активность: Star при 37°C и 0 mM IPTG, длительность ферментации 24 часа и Rosetta при 18°C и 1 mM IPTG, длительность ферментации 48 часов, используя самотечные колонки и буфер TBS (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl). Промывка осуществлялась 10 объемами буфера (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl). Элюция проводилась 20 mM Tris-HCl, 800 mM имидазол, pH 8.0. Лизат, проток и элюат были разделены с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с SDS (SDS-PAGE) (Рисунок 11).

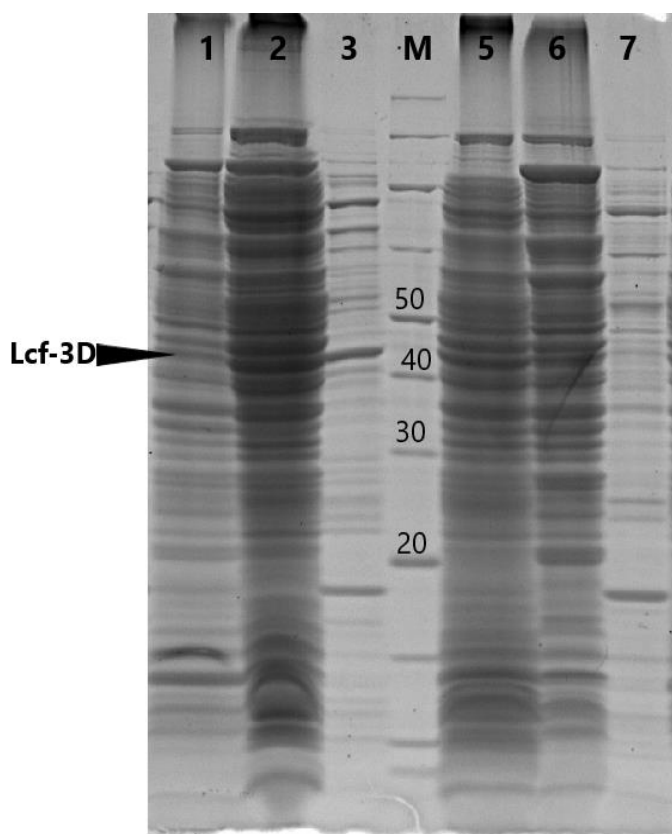


Рисунок 11 - Результаты электрофореза лизата, проскока и элюата после аналитического выделения Lcf-3D на NiNTA. Штамм Rosetta, 1мМ IPTG, 48 часов при температуре 18°C: 1- лизат, 2- проскок, 3 - элюат. Штамм Star при 37C и 0 мМ IPTG, длительность ферментации 24 часа: 5 - лизат, 6- проскок, 7- элюат. Стрелкой отмечен Lcf-3D.

На дорожке 3 рисунка 11 можно увидеть яркую полосу, соответствующую молекулярному весу около 44 кДа, что совпадает с расчетным. Таким образом, по результатам аналитического выделения Lcf-3D и по данным измерения люминесцентной активности, мы выбрали вариант ферментации штамма Rosetta, 1мМ IPTG, 48 часов ферментации при температуре 18°C.

Далее нужно было нарастить большое количество *E. coli* для очистки и анализа с использованием подобранных ранее условий (штамм Rosetta, 1мМ IPTG, 48 часов при температуре 18°C). После наращивания мы центрифугировали бактерии для осаждения клеток, растворяли осадок в буфере, добавляли ингибитор сериновых протеаз (PMSF) для предотвращения разрушения люциферазы клеточными протеазами, после чего разрушали клетки с помощью ультразвука для освобождения внутриклеточного содержимого.

В данной работе был разработан протокол очистки целевого белка из бактериального лизата с помощью металл-аффинной хроматографии (NiNTA). Эффективность каждого

этапа очистки оценивалась с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с SDS (SDS-PAGE).

Очистка целевого белка методом металл-хелатной хроматографии

Очистка целевого белка методом металл-хелатной хроматографии из лизата клеток *E.coli*, экспрессирующих Lcf-3D

Хроматографическое разделение проводилось на системе AKTA Pure 25M с использованием колонки, заполненной NiNTA смолой. Ионы никеля на смоле обладают способностью притягивать к себе гистидиновую метку на целевом белке.

Проводили промывку буфером А (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl) для удаления неспецифически связанных белков. Дополнительная промывка буфером В (тот же Tris-HCl, но с 500 mM NaCl) позволила удалить белки, слабо связывающиеся с NiNTA смолой из-за ионных взаимодействий.

Элюция целевого белка осуществлялась с использованием буфера С с имидазолом (20 mM Tris-HCl, 800 mM имидазол, pH 8.0) в градиенте с буфером А. Имидазол конкурирует с полигистидиновой меткой за связывание с ионами никеля, что приводит к элюции целевого белка. Фракции по 3 мл, полученные в процессе элюции, были собраны и проанализированы методом SDS-PAGE. Результаты хроматографии приведены на рисунке 12.

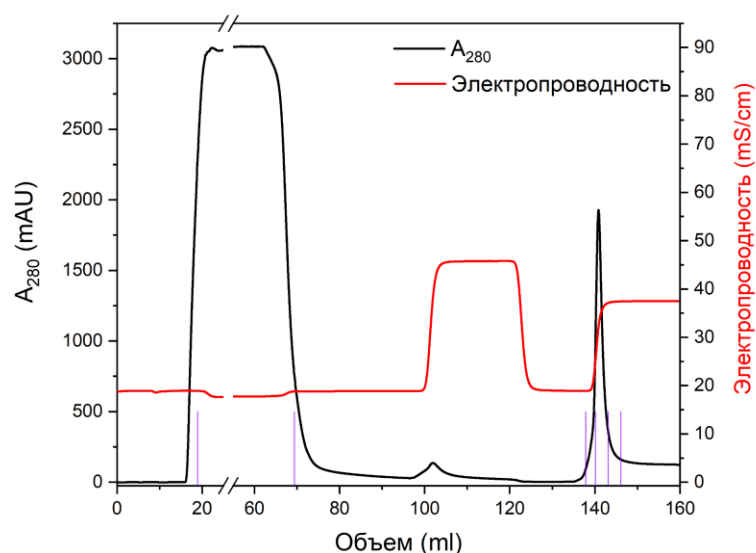


Рисунок 12 - Хроматография Lcf-3D на сорбенте NiNTA (ABBI-flow) в системе буферов Tris-HCl, pH 8.0. Черная кривая показывает интенсивность поглощения при длине волны 280 нм.

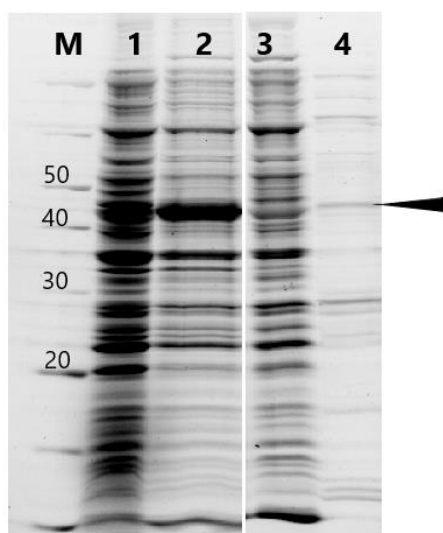


Рисунок 13 - Результаты электрофореза тотального лизата клеток экспрессирующих Lcf-3D *E. coli*, осветлённого лизата этих клеток, проскока и элюата после выделения Lcf-3D на NiNTA. 1- лизат, 2- осветлённый лизат, 3 - проскок, 4 - элюат. Стрелкой отмечен Lcf-3D.

На электрофорезе (Рисунок 13) тотального лизата клеток экспрессирующих Lcf-3D *E. coli*, осветлённого лизата этих клеток, проскока и элюата после выделения Lcf-3D на NiNTA мы видим с одной стороны низкую степень очистки целевого белка, с другой стороны - крайне низкий выход. При измерении биолуминесцентной активности было показано, что она падает приблизительно в 1000 раз. Поэтому было решено провести очистку в другой

буферной системе, используя фосфатный буфер, согласно одному из литературных источников [Fajardo C. , 2023].

Хроматографическое разделение также проводилось на системе AKTA Pure 25M с использованием колонки, заполненной NiNTA смолой. Колонку уравнивали в буфере 20 mM фосфата натрия (pH = 7,4), 150 mM NaCl, после чего наносили осветлённый лизат. Промывали колонку буфером 100 мл 20 mM фосфата натрия (pH = 7,4), 500 mM NaCl; элюировали белок 20 mM фосфата натрия (pH = 7,4), 150 mM NaCl, 0,4 М имидазола. Результаты хроматографии приведены на рисунке 14.

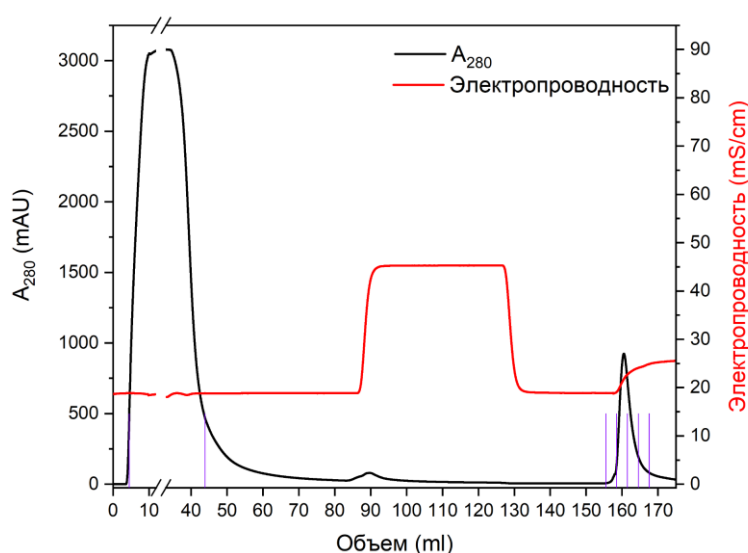


Рисунок 14 - Хроматография Lcf-3D на сорбенте NiNTA (ABBI-flow) в системе фосфатных буферов, pH 7.4. Черная кривая показывает интенсивность поглощения при длине волны 280 нм.

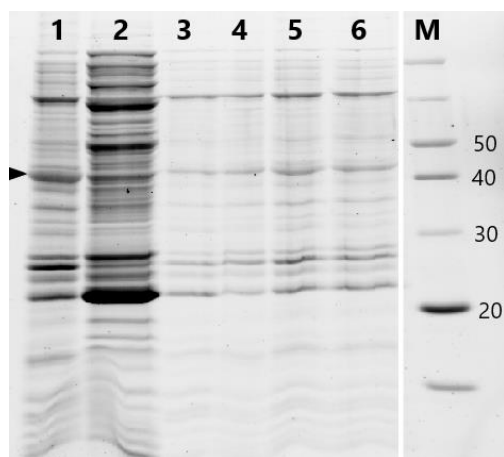


Рисунок 15 - Результаты электрофореза тотального лизата клеток экспрессирующих Lcf-3D *E. coli*, осветлённого лизата этих клеток, проскока и элюата после выделения Lcf-3D на NiNTA. 1- лизат, 2- осветлённый лизат, 3 - проскок, 4-6 - фракции элюата. Стрелкой отмечен Lcf-3D.

На рисунке 15 видно, что при выделении Lcf-3D в системе фосфатных буферов сохраняются все проблемы, обозначенные выше (низкий выход и большое количество посторонних примесей). Нами было принято решение почистить Lcf-3D из телец включения, которые образуются при ферментации штамма Rosetta, 1мМ IPTG, 48 часов при температуре 37°C.

Очистка целевого белка методом металл-хелатной хроматографии из телец включения

Тельца включения были растворены в буфере, содержащем 6 М гуанидин-хлорид и 50 мМ Tris-HCl, pH 8.0, после чего наносились на уравновешенную этим же буфером колонку NiNTA (ABBI-Flow) через петлю 10 мл. Промывали колонку буфером 6 М мочевины, 20 мМ Tris-HCl, pH 8.0, 500 мМ NaCl. Элюировали в буфере 6 М мочевины, 50 мМ ацетата натрия, 500 мМ хлорида натрия, 400 мМ имидазола, 1 мМ ТСЕР. Результаты хроматографии приведены на рисунке 16.

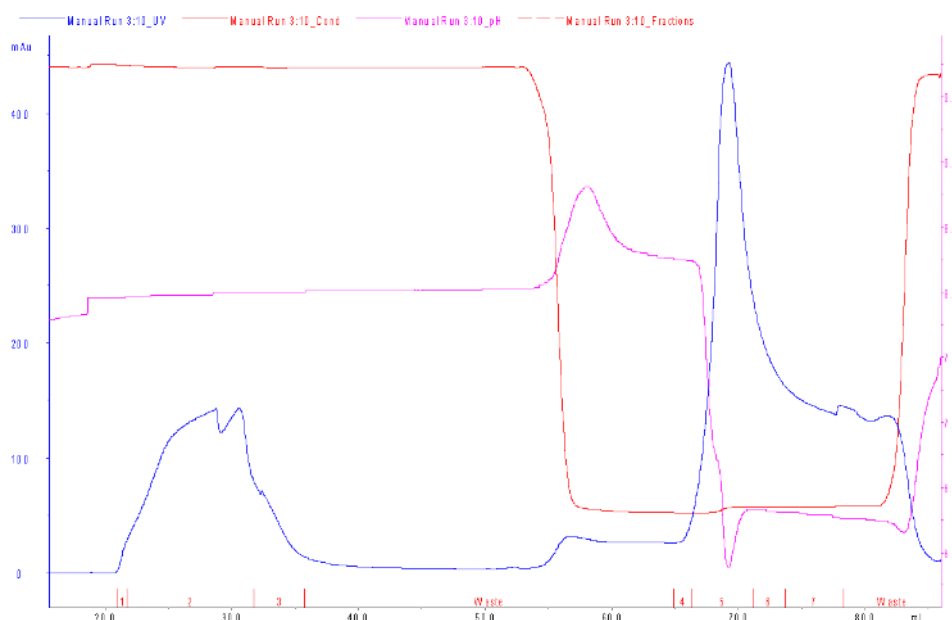


Рисунок 16 - Хроматография белков телец включения в денатурирующих условиях на NiNTA (ABBY-Flow). На оси абсцисс отложено время в минутах, на левой оси ординат — поглощение при длине волны 280 нм, mAu, на правой оси ординат — pH.

На рисунке 17 приведены результаты разделения белков телец юата после выделения Lcf-3D на NiNTA в денатурирующих условиях. Можно заметить, что существенно повысилась как чистота полученного после очистки белка, так и его выход по сравнению с вариантами выделения из тотального лизата клеток *E. coli*.

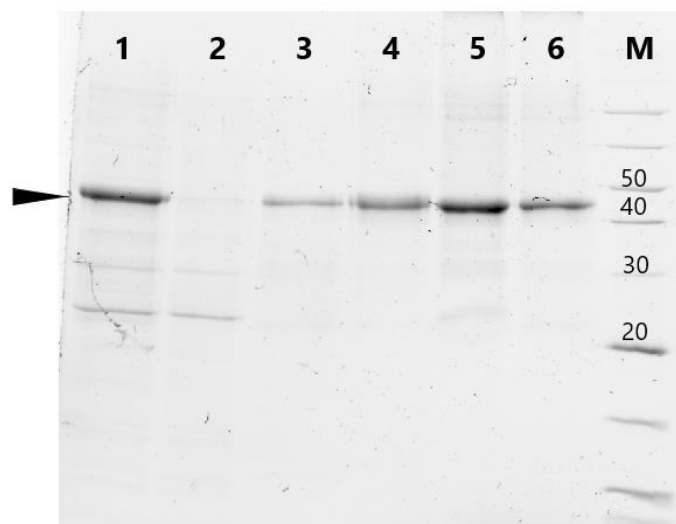


Рисунок 17 - Результаты электрофореза телец включения из клеток, экспрессирующих Lcf-3D *E. coli*, проскока и элюата после выделения Lcf-3D на NiNTA в денатурирующих условиях. 1- тельца включения, 2- проскок, 3-6 - фракции элюата. Стрелкой отмечен Lcf-3D.

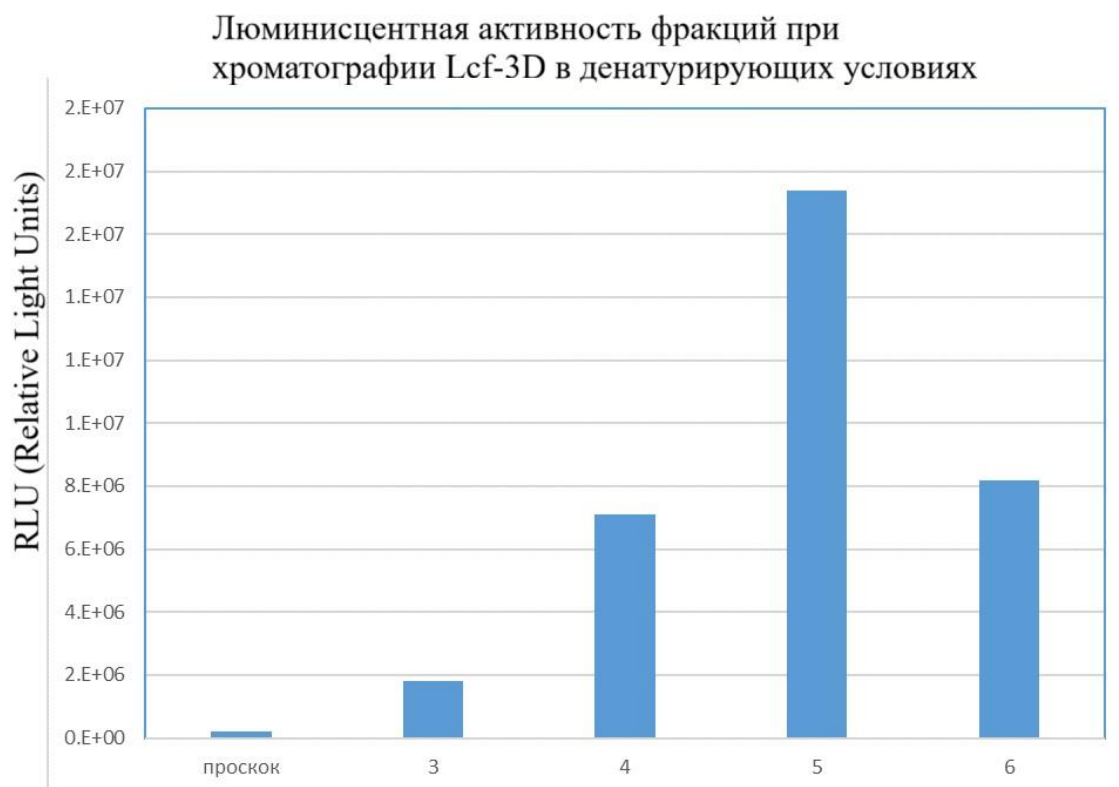


Рисунок 18 - Люминисцентная активность фракций при хроматографии Lcf-3D в денатурирующих условиях. Номера фракций соответствуют номерам дорожек на рисунке 17.

При измерении люминесцентной активности в буфер добавляли 1 мкл денатурированного Lcf-3D при быстром перемешивании, после чего добавляли 1 мкл горячего экстракта *P. lunula*, после чего быстро перемешивали на Вортексе и измеряли люминесцентную активность с помощью люминометра BLM-530 М (Oberon-K, Russia). Результаты измерения люминесцентной активности представлены на рисунке 18. Таким образом ренатурация Lcf-3D происходила прямо в реакционной смеси. Заметно существенное возрастание активности ренатурированного рекомбинантного белка, по сравнению с очищенным из нативного состояния. Было показано отсутствие уменьшения люминесцентной активности Lcf-3D при хранении в очищенном денатурированном состоянии на протяжении 10 дней.

Проверка работы очищенного ренатурированного Lcf-3D в системе детекции активности редуктазы p47

Для проверки активности сопряженной системы, содержащей редуктазу p47, очищенный ренатурированный Lcf-3D и субстрат редуктазы P630 был выбран буфер HEPES 20 mM, pH 7.2, поскольку он является наиболее подходящим с точки зрения активности p47. К реакционной смеси, включающей буфер, 4 мкл очищенной фракции p47 и 5 мAU P630, добавляли мкл денатурированного очищенного Lcf-3D, после чего быстро перемешивали на Вортексе и измеряли люминесцентную активность с помощью люминометра BLM-530 М (Oberon-K, Russia). Результаты измерения биolumинесценции смеси представлены на рисунке 19.



Рисунок 19 - Результаты измерения биolumинесценции очищенного ренатурированного Lcf-3D в системе детекции активности редуктазы p47.

На рисунке 19 видно, что Lcf-3D в системе детекции активности редуктазы p47 показывает значительную активность, причем кинетика реакции соответствует кинетике для сопряженных систем. Сопряжённые системы — процессы, тесно связанные между собой, в данном случае это сопряжение ферментативных реакций, когда продукт одной реакции

является субстратом для другой. На начальном участке наблюдается резкий рост интенсивности сигнала, что соответствует быстрому образованию люциферина в результате первичной ферментативной реакции. Достигнув максимума, график выходит на плато: скорость образования люциферина уравнивается его расходом во второй реакции — окисления с участием люциферазы и генерацией квантов света. На завершающем этапе наблюдается постепенное снижение сигнала, что связано с истощением субстрата и уменьшением эффективности второй реакции.

Выводы

1. Получены генетические конструкции для гетерологической экспрессии 3 домена люциферазы *P. lunula* в клетках *E. coli* в векторе p7090 и подобраны оптимальные условия для экспрессии этого фермента.
2. Получен очищенный препарат рекомбинантного 3 домена люциферазы *P. lunula* и определены условия его хранения в стабильном состоянии.
3. Полученный препарат Lcf-3D в системе детекции активности редуктазы p47 показывает значительную активность, причем кинетика реакции соответствует кинетике для сопряженных систем.

Список литературы

1. Anderson D.M. Identification of harmful algal species using molecular probes: an emerging perspective. *Harmful Marine Algal Blooms*, edited by Lassus P., Arzul G., Erand-Le Denn E., Gentien P., Marcaillou-Le Baut C. Paris: Lavoisier, 1995; 1995:3–14.
2. Assunção J., Gandour C., Rocha R. Deforestation slowdown in the Brazilian Amazon: prices or policies? *Environment and Development Economics*, 2015; 20(6):697-722.
3. Buskey E.J., Swift E. Behavioral responses of the coastal copepod *Acartia hudsonica* to simulated dinoflagellate bioluminescence. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1983; 72(1):43–58.
4. Close D.M., Patterson S.S., Ripp S., Baek S.J., Sanseverino J., Sayler G.S. Autonomous bioluminescent expression of the bacterial luciferase gene cassette (lux) in a mammalian cell line. *PLOS ONE*, 2010; 5(8):e12441.
5. Davy S.K., Allemand D., Weis V.M. Cell biology of cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2012; 76(2):229-261.
6. DeSa R., Hastings J.W. The characterization of scintillons: bioluminescent particles from the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Journal of General Physiology*, 1968; 51(1):105-122.
7. Dodge J.D. Fine structure of the dinoflagellate *Aureodinium pigmentosum* gen. et sp. nov. *British Phycological Bulletin*, 1967; 3(2):327-336.
8. Dunuweera A.N., Dunuweera S.P., Ranganathan K. A comprehensive exploration of bioluminescence systems, mechanisms, and advanced assays for versatile applications. *Biochemistry Research International*, 2024; 2024:8273237.
9. Fajardo C., González M., Peña P., et al. New insights on expression and purification of a recombinant luciferase protein from the bioluminescence marine dinoflagellate *Pyrocystis lunula*. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 2023; 51(4):610-616.
10. Fajardo C., De Donato M., Rodulfo H., et al. New perspectives related to the bioluminescent system in dinoflagellates: *Pyrocystis lunula*, a case study. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020; 21(5):1784.
11. Fritz L., Morse D., Hastings J.W. The circadian bioluminescence rhythm of *Gonyaulax* is related to daily variations in the number of light-emitting organelles. *Journal of Cell Science*, 1990; 95:321–328.
12. Hackett J.D., Anderson D.M., Erdner D.L., Bhattacharya D. Dinoflagellates: a remarkable evolutionary experiment. *American Journal of Botany*, 2004; 91(10):1523-1534.

13. Haddock S.H.D., Moline M.A., Case J.F. Bioluminescence in the sea. *Annual Review of Marine Science*, 2010; 2:443-493.
14. Hastings J.W. Circadian rhythms in dinoflagellates: what is the purpose of synthesis and destruction of proteins? *Microorganisms*, 2013; 1(1):26-32.
15. Hastings J.W., Schultz W., Liu L. Dinoflagellate bioluminescence and its circadian regulation. Harvard University & SUNY Buffalo; 2009.
16. Hastings J.W., Sweeney B.M. The luminescent reaction in extracts of the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 1957; 49(2):209-225.
17. Hoppenrath M., Yubuki N., Stern R., Leander B.S. Ultrastructure and molecular phylogenetic position of a new marine sand-dwelling dinoflagellate from British Columbia, Canada: *Pseudadenoides polypyrenoides* sp. nov. (Dinophyceae). *European Journal of Phycology*, 2017; 52(2):208-224.
18. Huang Y., Zhang X., Li J., et al. Revisiting the burglar alarm hypothesis: a behavioural cascade mediated by dinoflagellate bioluminescence. *Functional Ecology*, 2024; 38(1):60-70.
19. Jeffrey S.W., Sielicki M., Haxo F.T. Chloroplast pigment patterns in dinoflagellates. *Journal of Phycology*, 1975; 11:374-384.
20. Latz M.I., Bovard M., VanDelinder V., Segre E., Rohr J., Groisman A. Bioluminescent response of individual dinoflagellate cells to hydrodynamic stress measured with millisecond resolution in a microfluidic device. *Journal of Experimental Biology*, 2008; 211:2865-2875.
21. Latz M.I. The artistry of dinoflagellate bioluminescence. *Materials Today: Proceedings*, 2017; 4:4959–4968.
22. Latz M.I., Rohr J. Glowing with the flow: ecology and applications of flow-stimulated bioluminescence. *Optics & Photonics News*, 2005; 16:40–45.
23. LaJeunesse T.C. “Species” radiations of symbiotic dinoflagellates in the Atlantic and Indo-Pacific since the Miocene-Pliocene transition. *Molecular Biology and Evolution*, 2005; 22(3):570–581.
24. Lecuyer B., Arrio B., Fresneau C., Volfin P. Dinoflagellate luciferases: purification of luciferases from *Gonyaulax polyedra*, *Pyrocystis lunula*, and *Pyrocystis fusiformis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1979; 196(2):371–384.
25. Lee R.E. *Phycology*. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2008. 560 p.
26. Li L., Hastings J.W. The structure and organization of the luciferase gene in the photosynthetic dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Plant Molecular Biology*, 1998; 36(2):275–284.
27. Morishita H., Ohashi S., Oku T., et al. Cloning and characterization of an active fragment of luciferase from a luminescent marine alga, *Pyrocystis lunula*. *Photochemistry and Photobiology*, 2002; 75(3):311–315.

28. Nakamura H., Nakano M., Ohmiya Y., et al. Structure of dinoflagellate luciferin and its enzymic and nonenzymic air-oxidation products. *Journal of the American Chemical Society*, 1989; 111(20):7607–7611.
29. Perin L.S., Moraes G.V., Galeazzo G.A., Oliveira A.G. Bioluminescent dinoflagellates as a bioassay for toxicity assessment. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022; 23:13012.
30. Schultz L.W., et al. Crystal structure of a pH-regulated luciferase catalyzing the bioluminescent oxidation of an open tetrapyrrole. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2005; 102(5):1378–1383.
31. Stover L.E., Graham L.W. Back Matter. *Palynology*, 1989; 13:291–295.
32. Suzuki-Ogoh C., Wu C., Ohmiya Y. C-terminal region of the active domain enhances enzymatic activity in dinoflagellate luciferase. *Photochemistry and Photobiology Sciences*, 2008; 7(2):208–211.
33. Topalov K., Kishi Y. Skeleton of dinoflagellate and krill luciferins: hypothesis and model studies. *Angewandte Chemie International Edition*, 2001; 40:3892–3894.
34. Valiadi M., Iglesias-Rodriguez D. Understanding bioluminescence in dinoflagellates — how far have we come? *Microorganisms*, 2013; 1(1):3–25.
35. Weber E., Engler C., Gruetzner R., Werner S., Marillonnet S. A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. *PLOS ONE*, 2011; 6(2):e16765.
36. Wilson T., Hastings J.W. Bioluminescence: Living lights, lights for living. *Cambridge: Harvard University Press*; 2013.
37. Wu C., Akimoto H., Ohmiya Y. Tracer studies on dinoflagellate luciferin with ¹⁵N-labeled precursors in *Pyrocystis lunula*. *Tetrahedron Letters*, 2003; 44:1263–1266.

Благодарности

Мы выражаем благодарность администрации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, в особенности Илье Викторовичу Ямпольскому, за предоставленную возможность проведения исследований в лаборатории химии метаболических путей. Особую благодарность выражаем Сергею Менделевичу Глаголеву за организацию лабораторной практики, а также Андрею Юрьевичу Гороховатскому и Дарье Александровне Кузнецовой за неоценимый вклад в практическую часть работы.