

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук**

На правах рукописи

Мышкина Надежда Михайловна

**Создание автономно светящихся эукариот,
экспрессирующих гены цикла кофейной кислоты**
специальность 03.01.03 - «Молекулярная биология»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2020

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:

Ямпольский Илья Викторович, доктор химических наук

Официальные оппоненты:

Лось Дмитрий Анатольевич, доктор биологических наук, Член-корреспондент РАН, профессор, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (ИФР РАН)

Остерман Илья Андреевич, доктор химических наук, Главный научный сотрудник Центра Наук о жизни, Сколковский институт науки и технологий

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»

Защита состоится «14» октября 2020 г. в 10:00 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-Макляя, 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 « »

2020 г.

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



Характеристика работы

Актуальность темы исследования

В настоящее время разработано множество разнообразных методов биоимиджинга, значительная часть которых основана либо на флуоресцентных белках, либо на люциферин-люциферазных реакциях. Однако каждый из этих подходов имеет недостатки для применения широким кругом исследователей. В частности, для регистрации флуоресценции необходимо относительно сложное оборудование, обеспечивающее облучение образца возбуждающим светом и спектральное разделение возбуждающего и целевого сигналов, кроме того, фоновые значения флуоресценции биомолекул живых клеток могут замаскировать целевой сигнал. Люциферин-люциферазные реакции лишены этих недостатков, однако для их осуществления необходимо экзогенное добавление субстрата, что не всегда удобно в условиях работы с живыми организмами, особенно эукариотическими. Использование автономно биолюминесцентных систем позволило бы решить перечисленные выше проблемы, однако на данный момент реакции биосинтеза различных люциферинов и отвечающие за эти превращения ферменты остаются слабо изученными.

На данный момент только биолюминесцентная система бактерий может претендовать на звание эффективного инструмента для создания автономно светящихся гетерологических организмов, поэтому расширение палитры (как в спектральном, так и в бытовом смысле) таких инструментов позволит выйти на качественно новый уровень решения задач биоимиджинга.

Степень разработанности области исследования

Люциферин грибов (3-гидроксигиспидин) и его непосредственный предшественник гиспидин были открыты и опубликованы в 2015 году, а через два года были разработаны методики химического синтеза этих соединений и продукта окисления люциферина — оксилюциферина грибов (((2Z,5E)-6-(3,4-дигидроксифенил)-2-гидрокси-4-оксогекса-2,5-диеновой кислоты)).

Люцифераза грибов была открыта и опубликована в 2018 году, её функциональность была подтверждена в основных гетерологических системах, таких как бактерии, дрожжи, культура клеток млекопитающих, зародыш шпорцевой лягушки.

Цель и задачи работы

Целью настоящей работы являлась проверка возможности создания автономно светящихся эукариот с помощью введения гетерологических генов цикла кофейной кислоты, обнаруженных в высших биолюминесцентных грибах.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи: найти гены ферментов биосинтеза люциферина грибов; подтвердить функции продуктов данных генов при гетерологической экспрессии в модельном организме; подобрать

вспомогательные гены, продукты которых способны катализировать превращение первичных метаболитов в предшественники люциферина грибов; создать автономно биолюминесцентные дрожжи, экспрессирующие гены люминесцентной системы грибов; создать автономно биолюминесцентные растения, экспрессирующие гены люминесцентной системы грибов; проанализировать интенсивность свечения различных органов и тканей растения и её изменения во времени и пространстве; создать автономно биолюминесцентные клетки млекопитающих, экспрессирующие гены люминесцентной системы грибов.

Научная новизна и практическая ценность работы

В настоящем исследовании впервые в мире определены последовательности генов, кодирующих ферменты биосинтеза люциферина грибов, и подтверждена их функция в гетерологических хозяевах. Также впервые нам удалось создать автономно биолюминесцентные эукариотические организмы, экспрессирующие гены цикла кофейной кислоты (дрожжи, растения, культура клеток млекопитающих). Подобные организмы и культуры клеток позволят исследовать различные биохимические процессы на клеточном и организменном уровнях, не прибегая к использованию аппаратуры для регистрации флуоресценции или расходуемого субстрата, который необходимо добавлять экзогенно.

Структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 139 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, описания полученных результатов и их обсуждения, выводов, списка сокращений, приложений и списка цитируемой литературы, включающего 252 ссылки. Диссертация содержит 28 рисунков, 2 таблицы и 3 приложения.

Апробация работы и публикации

Основные материалы диссертации были изложены в виде устного доклада на всероссийской конференции XXX Зимняя молодёжная школа ИБХ РАН (Москва, Россия, 2017 г.) и в виде стендовых докладов на двух международных конференциях: 43d FEBS Congress (Иерусалим, Израиль, 2017 г.) и European Biotechnology Congress (Валенсия, Испания, 2019 г.). По теме диссертации опубликовано три статьи в рецензируемых научных журналах.

Основное содержание работы

Определение генов, входящих в кластер цикла кофейной кислоты

Известно, что гены грибов, кодирующих ферменты, которые относятся к одному и тому же метаболическому пути, часто располагаются в одном кластере^{1,2}. Мы предположили, что гены ферментов билюминесцентного каскада грибов также представляют собой единый кластер, поскольку предполагается, что билюминесцентные реакции во всех грибах протекают по единому механизму³. Чтобы проверить это предположение, мы проанализировали области геномов *N. nambí*, *N. gardneri*, *M. citricolor*, и *P. stipticus*, соседствующие с геном люциферазы⁴, и установили, что ген люциферазы входит в состав консервативного кластера генов, в который помимо него входят, как минимум, ещё два гена, названные нами *h3h* и *hisps*.

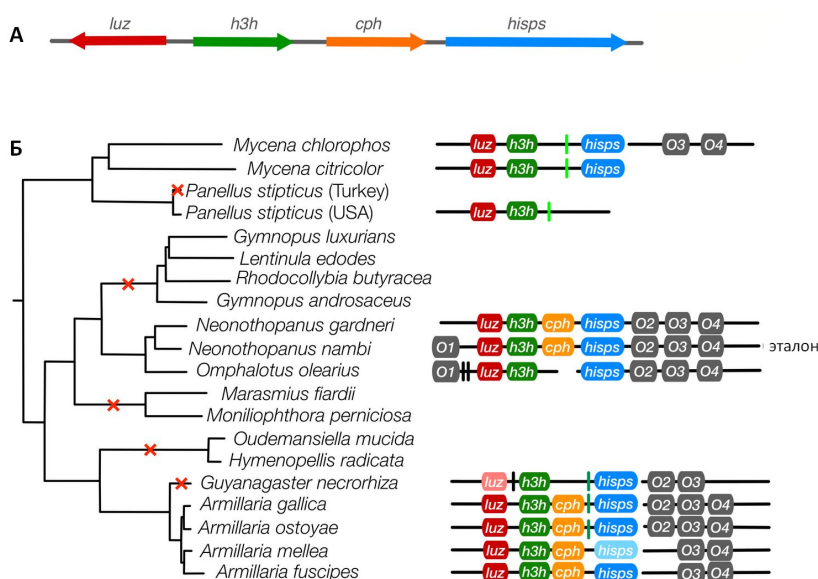


Рисунок 1. Кластер генов цикла кофейной кислоты. А — схема расположения генов люциферазы, гистидин-3-гидроксилазы, кафеоилтируватгидролазы и гистидинсинтазы в геноме гриба *N. nambí*. Б — кластер генов цикла кофейной кислоты билюминесцентных грибов. Эталон — эталонная последовательность кластера *N. nambí*. Красным крестом отмечены те грибы (или те родственные группы грибов), которые потеряли способность к свечению.

Справа отмечены относящиеся к кластеру гены, которые были обнаружены при анализе геномов данных грибов. Гены, кодирующие люциферазу (*luz*), гистидин-3-гидроксилазу (*h3h*), гистидинсинтазу (*hisps*) и кафеоилтируватгидролазу (*cph*) отмечены цветом, более светлый оттенок которого отражает, что была обнаружена только частичная относящаяся к данному гену последовательность. Другие гены, предположительно относящиеся к кластеру, названы O1-4 (помечены серым), зелёными чёрточками отмечены r450-подобный ген, чёрными — остальные гены.

¹Keller N.P., Turner G., Bennett J.W. Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. // Nat Rev Microbiol. 2005. Т. 3. №12. С. 937-947.

²Lazarus C.M., Williams K., Bailey A.M. Reconstructing fungal natural product biosynthetic pathways. // Nat Prod Rep. 2014. Т. 31. №10. С.1339-1347.

³Oliveira A.G., Desjardin D.E., Perry B.A., Stevani C.V. Evidence that a single bioluminescent system is shared by all known bioluminescent fungal lineages. // Photochem Photobiol Sci. 2012. Т. 11. №5. С. 848-852.

⁴Котлобай А.А. Поиск, клонирование и экспрессия гена люциферазы грибов. // Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Москва. 2019.

Данный кластер генов мы назвали кластером генов цикла кофейной кислоты, основываясь на предполагаемой функции продуктов данных генов. Схема кластера генов цикла кофейной кислоты для проанализированных грибов приведена на **Рис. 1**. Данная работа была проведена совместно с Кареном Саркисяном (Группа синтетической биологии, ИБХ РАН).

При поиске гомологов продукта гена *h3h* с помощью алгоритма выравнивания BLASTp были обнаружены 3-гидроксibenзоат-6-монооксигеназы — ферменты, катализирующие окисление 3-гидроксibenзоата молекулярным кислородом с расходом NADH. С химической точки зрения реакция очень похожа на этап превращения гиспидина в 3-гидрокси-гиспидин — люциферин грибов. Общая схема реакций цикла кофейной кислоты, в том числе и непосредственно стадии биосинтеза люциферина грибов приведена на **Рис. 2**.

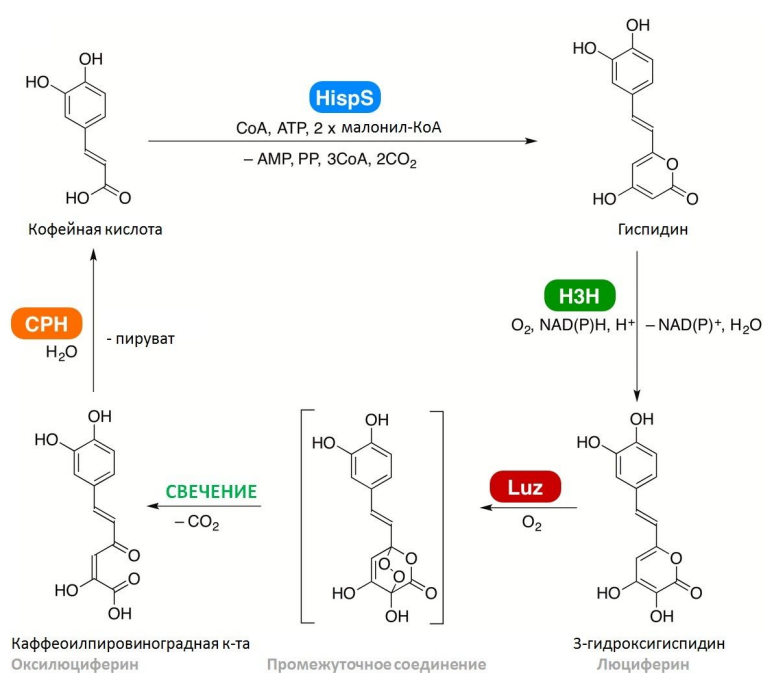


Рисунок 2. Цикл кофейной кислоты — предполагаемый путь биосинтеза и утилизации люциферина грибов. Кофейная кислота превращается в гиспидин с помощью гиспидинсинтазы (*HispS*), затем гиспидин гидроксилируется гиспидин-3-гидроксилазой (*H3H*) с образованием люциферина грибов. Люцифераза грибов (*Luz*) с помощью молекулярного кислорода формирует высокоэффективное промежуточное соединение — эндопероксид, который испускает свет, распадаясь до оксилуциферина (каффеоилпирувата). Оксилуциферин затем разлагается до кофейной кислоты с помощью каффеоилпируватгидролазы (*CPH*).

Гомология аминокислотной последовательности, описанная выше, позволила нам предположить, что продукт гена *h3h* (гиспидин-3-гидроксилаза, hispidin-3-hydroxylase, H3H) катализирует окисление гиспидина до 3-гидрокси-гиспидина. Для проверки этой гипотезы мы амплифицировали последовательность данного гена и клонировали в экспрессионный вектор для дрожжей *Pichia pastoris* GAP-pPic9 (обеспечивает восстановление ауксотрофности дрожжей по гистидину) и трансформировали им дрожжи, уже несущие ген люциферазы *N.nambi*. При добавлении гиспидина к трансформированным дрожжам, те испускали свечение (**Рис. 3**), в отличие от дрожжей, несущих только ген люциферазы грибов. Этот факт подтвердил гипотезу о том, что H3H *N. nambi* (nnH3H) катализирует превращение гиспидина в люциферин. Данные эксперименты проведены совместно с Юлианой Мокрушиной (Лаборатория биокатализа, ИБХ РАН) и Максимом

Абакумовым (РНИМУ им. Пирогова). Химически синтезированный предоставлен Александрой Царьковой и Зинаидой Каськовой (Лаборатория химии метаболических путей, ИБХ РАН).

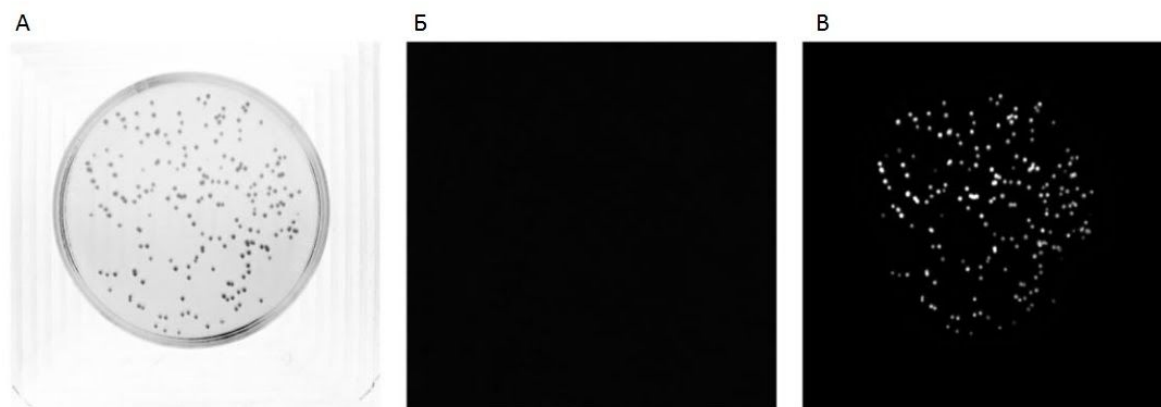


Рисунок 3. Дрожжи *P. pastoris*, несущие геномные копии генов *npluz* и *nnh3h*. А — изображение при естественном освещении, Б — изображение в канале регистрации люминесценции без добавления субстрата, В — изображение в канале регистрации люминесценции после добавления гистидина с концентрацией 0,215 ОЕ/мл в буфере DPBS с 1% ДМСО на Fusion-Pulse.7 (Vilber Lourmat) при экспозиции 2 с.

Биоинформатический анализ показал, что ген *hisps* кодирует белок из семейства поликетидсинтаз (ПКС) — ферментов, катализирующих биосинтез различных вторичных метаболитов в большом количестве живых организмов. ПКС катализируют реакции присоединения малонильного остатка к растущей углеродной цепи. Структура гистидина и наличие в нём α -пиронового кольца позволили нам предположить, что его биосинтез катализируется с помощью ПКС в результате двух циклов присоединения малонильных остатков с последующей лактонизацией (**Рис. 2**).

Большие модульные ПКС для активации требуют посттрансляционной модификации — фосфопантетеинилирования консервативного остатка серина в ацилпереносящем домене¹, поэтому мы ввели в геном *P. pastoris*, уже несущих гены *npluz* и *nnh3h*, одновременно ген *nphisps* в векторе pGar-Z (обеспечивает устойчивость к антибиотику зеоцину) и ген 4-фосфопантетеинилтрансферазы из *Aspergillus nidulans*² (*npgA*) в векторе pGar-Bsd (обеспечивает устойчивость к антибиотику бластицидину S). При добавлении кофейной кислоты к дрожжам, несущим перечисленные 4 гена, как выращенным на твёрдой, так и на жидкой культуре, происходило испускание света (**Рис. 4**), причём в случае жидкой культуры такое свечение было видно невооружённым глазом.

¹Gao L., Cai M., Shen W., Xiao S., Zhou X., Zhang Y. Engineered fungal polyketide biosynthesis in *Pichia pastoris*: a potential excellent host for polyketide production. // *Microb Cell Fact.* 2013. Т. 12. Ст. 77.

²Kim J.M., Song H.Y., Choi H.J., So K.K., Kim D.H., Chae K.S., Han D.M., Jahng K.Y. Characterization of NpgA, a 4'-phosphopantetheinyl transferase of *Aspergillus nidulans*, and evidence of its involvement in fungal growth and formation of conidia and cleistothecia for development. // *J Microbiol.* 2015. Т. 53. №1. С. 21-31.

Дрожжи, которые не несли хотя бы один из генов *nnhisps* или *prgA*, не демонстрировали свечение в ответ на добавление кофейной кислоты. Данные эксперименты проведены совместно с Юлианой Мокрушиной (Лаборатория биокатализа, ИБХ РАН).

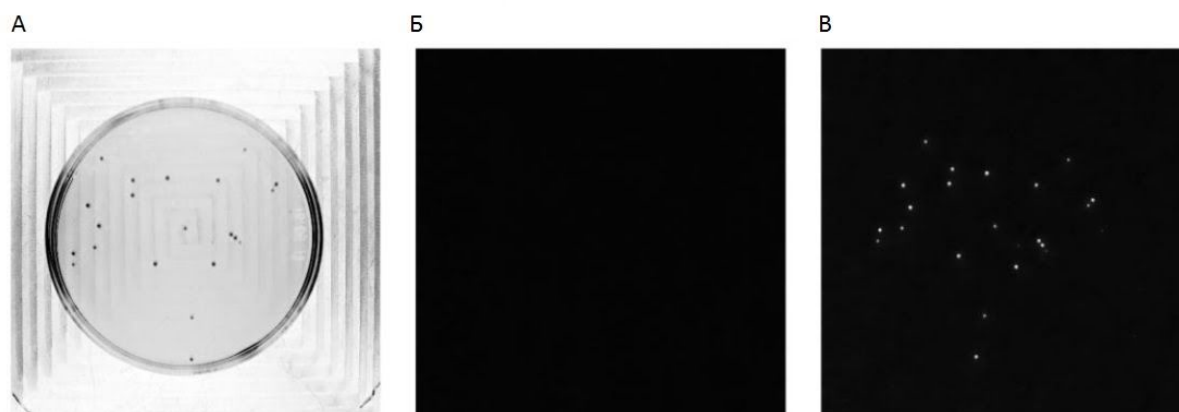


Рисунок 4. Дрожжи *P. pastoris*, несущие геномные копии генов *npluz*, *nnh3h*, *nnhisps* и *prgA*. А — изображение при естественном освещении, Б — изображение в канале регистрации люминесценции без добавления субстрата, В — изображение в канале регистрации люминесценции после добавления раствора кофейной кислоты с концентрацией 0,018 М/мл в буфере DPBS с 1% ДМСО на Fusion-Pulse.7 (Vilber Lourmat) при экспозиции 2 с.

Для подтверждения функции продукта гена *срh* мы ввели в геном *P. pastoris*, уже несущих гены *nnhisps*, *npluz*, *nnh3h* и *prgA*, также ген *срh* в векторе рGap-Кап (обеспечивает устойчивость к антибиотику G418). Полученные дрожжи в результате капельного теста (“drop-test”) демонстрировали свечение в ответ на добавление оксильюциферина, тогда как дрожжи, в которых ген *срh* отсутствовал, не демонстрировали такую реакцию (**Рис. 5**)

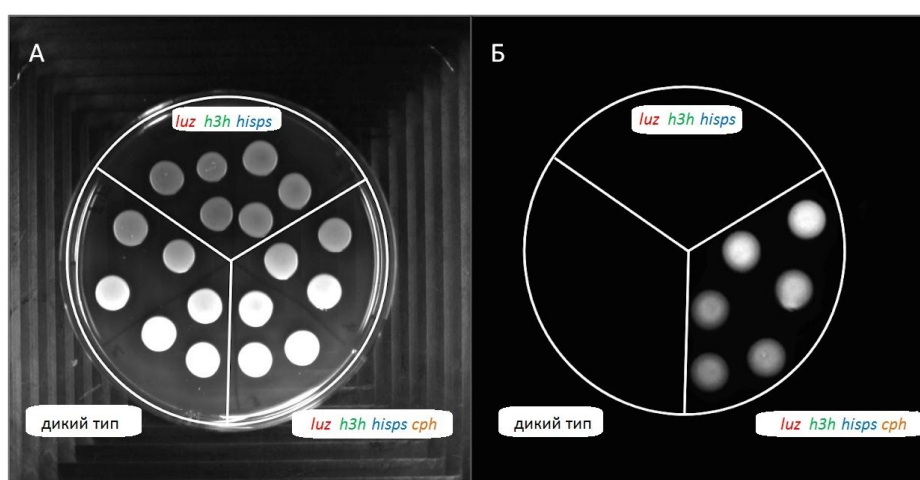


Рисунок 5. Капельный тест на дрожжах *P. pastoris* дикого типа (левая нижняя треть), несущих геномные копии генов *luz*, *h3h*, *hisps* и *prgA* (верхняя треть), несущих геномные копии генов *luz*, *h3h*, *hisps*, *prgA* и *срh* (правая нижняя треть) при добавлении

оксильюциферина растворенного в цитратном буфере (рН 4,5) до конечной концентрации 110 мМ. А — изображение при естественном освещении, Б — изображение в режиме регистрации люминесценции на Fusion-Pulse.7 (Vilber Lourmat) при экспозиции 2 с.

Данные эксперименты проведены совместно с Ксенией Береговой (Лаборатория химии метаболических путей, ИБХ РАН).

Таким образом, мы обнаружили и подтвердили функцию трёх генов (*nnhisps*, *срh*, *nnh3h*), входящих наравне с геном люциферазы в кластер генов кофейной кислоты, изображённый на **Рис. 1**.

Создание автономно биолюминесцентных дрожжей *Pichia pastoris*

Для создания автономно биолюминесцентных дрожжей *P. pastoris* мы одновременно ввели в геном описанных выше дрожжей, несущих гены *nmluz*, *nnhisps*, *срh*, *nnh3h*, *prgA*, дополнительно гены тирозин-аммоний-лиазы *rctal* из *Rhodobacter capsulatus* и гены, кодирующие гетеродимерный фермент кумарат-3-гидроксилазу (СЗН) *hрab* и *hрac* из *E.coli* в векторах рGar-Нуг (обеспечивают устойчивость к антибиотику гигромицину В). Данные ферменты катализируют реакцию последовательного превращения аминокислоты тирозин в *p*-кумаровую, а затем в кофейную кислоту.

При культивации данных дрожжей на среде, содержащей добавленный тирозин, колонии испускали свет без дополнительного внесения каких-либо субстратов (**Рис. 6**). Данные эксперименты проведены совместно с Юлианой Мокрушиной (Лаборатория биокатализа, ИБХ РАН).

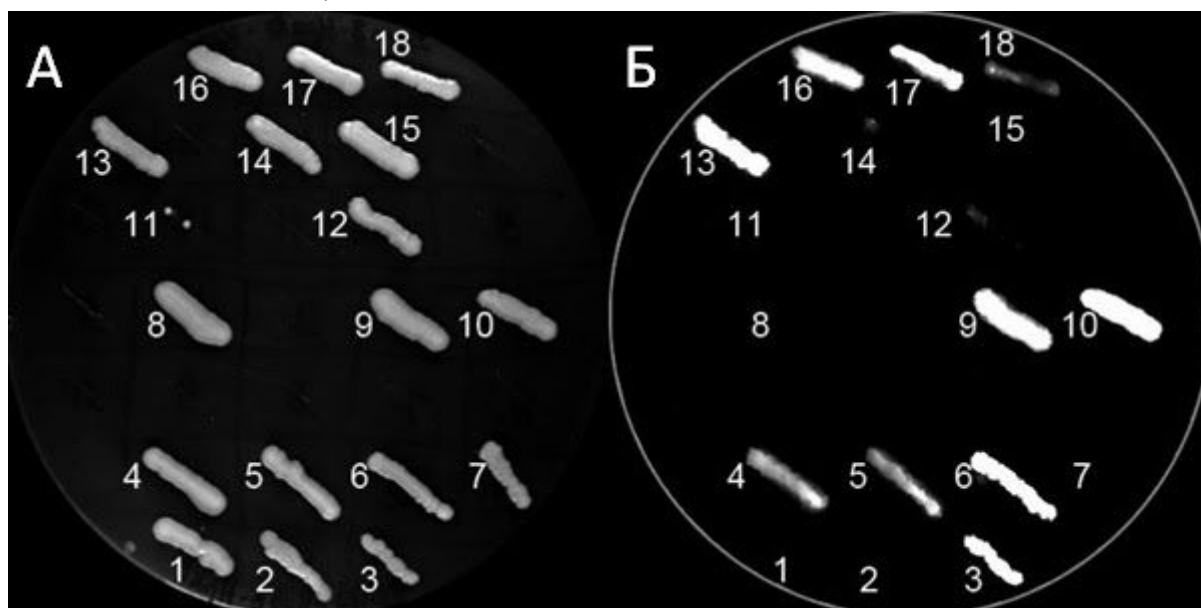


Рисунок 6. Автономная биолюминесценция клонов *Pichia pastoris*, несущих геномные копии генов биосинтеза люциферина (*luz*, *h3h*, *prgA*, *hisps*) и генов биосинтеза кофейной кислоты (*rctal*, *hрab* и *hрac*). А — изображение при естественном освещении, Б — изображение в канале регистрации свечения на Fusion-Pulse.7 (Vilber Lourmat) при экспозиции 30 с.

Создание автономно биолюминесцентных растений *Nicotiana tabacum* и *Nicotiana benthamiana*

Кофейная кислота — один из ключевых метаболитов сосудистых растений, поскольку производными именно этого соединения являются такие важные для функционирования растения вещества, как фенолпропаноиды, в частности, лигнин. Наличие в растениях рода *Nicotiana* кофейной кислоты¹ позволило нам предположить, что введение в геном растения генов цикла кофейной кислоты приведёт к автономному свечению растения (Рис. 7Б). Кроме того, сопоставление спектра биолюминесценции люциферазы грибов² и полученного нами спектра поглощения листьев растения *Nicotiana benthamiana* дало нам основания полагать, что люминесцентное свечение будет минимально поглощаться собственными тканями растения (Рис. 7А).

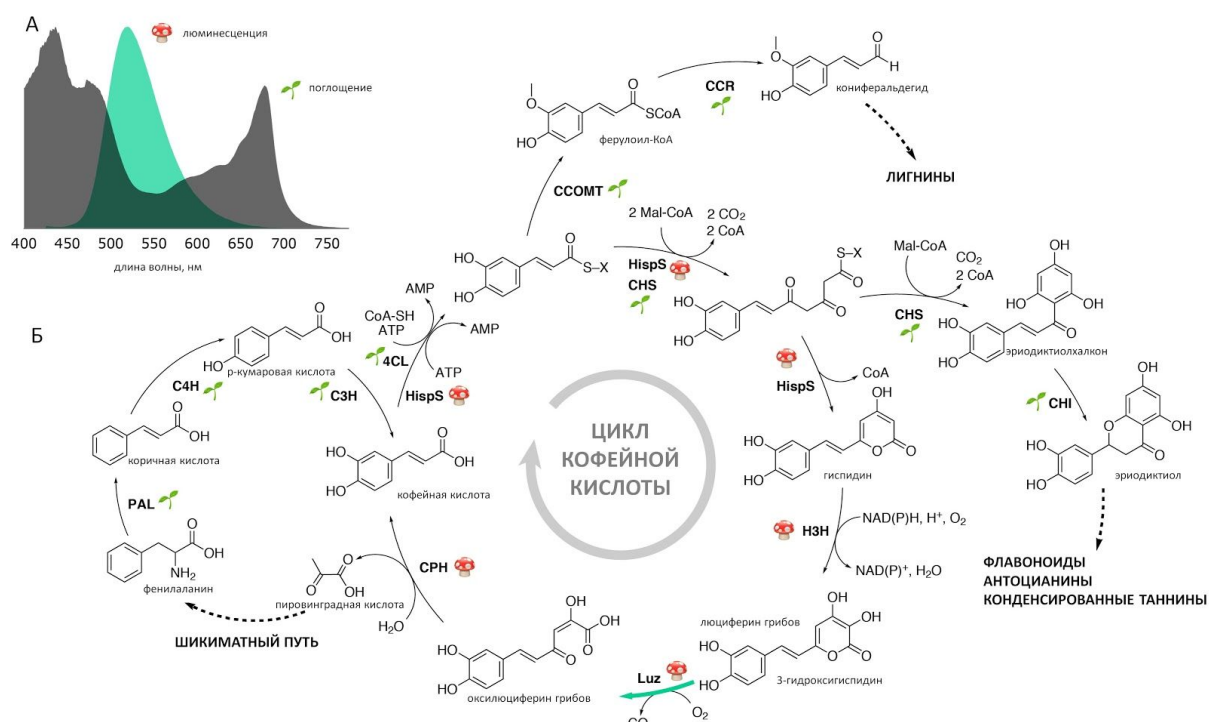


Рисунок 7. Обоснование возможности создания светящихся растений с помощью генов цикла кофейной кислоты. А — наложение спектров биолюминесценции гриба *N. patib* (зелёный) и поглощения листа *N. tabacum* (серый); Б — ряд метаболитов цикла кофейной кислоты является вторичными метаболитами сосудистых растений. Происхождение ферментов из растений или из грибов отмечено соответствующими символами. Обозначения: 4CL — 4-кумарат:КоА лигаза; C3H — кумарат-3-гидроксилаза; C4H — циннамат-4-гидроксилаза; CCOMT — кафеоил-КоА-3-О-метилтрансфераза; CCR — циннамоил-КоА-редуктаза; CSH — халконизомераза; CSH — халконсинтаза; CPN — кафеоилтируватгидролаза; H3H — гиспидин-3-гидроксилаза; HispS — гиспидинсинтаза; Luz — люцифераза грибов; PAL — фенилаланин-аммоний-лиаза.

¹Li L., Zhao J., Zhao Y., Lu X., Zhou Z., Zhao C., Xu G. Comprehensive investigation of tobacco leaves during natural early senescence via multi-platform metabolomics analyses. // *Sci Rep.* 2016. Т. 6. Ст. 37976.

²Котлобай А.А. Поиск, клонирование и экспрессия гена люциферазы грибов. // Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Москва. 2019.

Данная работа проведена совместно с Александрой Царьковой (Лаборатория химии метаболических путей, ИБХ РАН) и Кареном Саркисяном (Группа синтетической биологии, ИБХ РАН).

Гиспидинсинтаза грибов нуждается в посттрансляционной модификации — фосфопантетеинилировании, однако по литературным данным известно, что в растениях табака существуют соответствующие ферменты¹. Таким образом, мы предположили, что для автономного свечения растений *N. tabacum* и *N. benthamiana* достаточно введения в геном четырёх основных генов цикла кофейной кислоты (*nnhisps*, *nnh3h*, *nnluz*, *nnscrh*).

Для введения данных генов в геном растений мы выбрали метод агробактериальной трансформации и создали с помощью технологии модульного клонирования конструкцию, несущую оптимизированные гены цикла кофейной кислоты (исходные кодоны были заменены на более эффективные для экспрессии в растениях рода *Nicotiana* с помощью алгоритма IDT-Codon Optimization) под сильными конститутивными вирусными промоторами p35s, а также ген устойчивости к антибиотику и последовательности для встройки в геном.

С помощью агробактериальной трансформации данная конструкция была перенесена в растения *N. tabacum* и *N. benthamiana* и встройка подтверждена выделением геномной ДНК из этих растений и амплификацией фрагментов встраиваемых генов. Данная работа была проведена совместно с Кареном Саркисяном (Группа синтетической биологии, ИБХ РАН), Татьяной Митюшкиной и Лилией Фахрануровой (Лаборатория экспрессионных систем и модификации генома растений, ФИБХ РАН).

Полученные трансформированные растения выращивали до разных возрастных стадий и проверяли их свечение с помощью различных методов имиджинга. Свечение демонстрировали все возрастные группы растений, однако наиболее яркое свечение наблюдалось у молодых тканей. Также в период цветения происходило затухание свечения вегетативных тканей и, наоборот, ярче светились цветки.

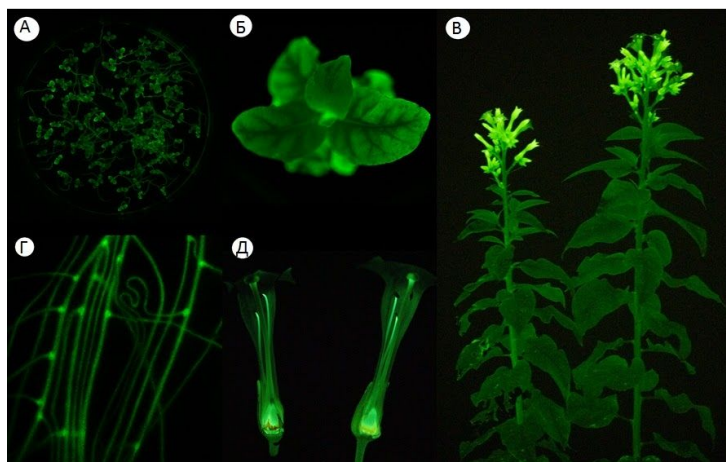


Рисунок 8. Билюминесценция растений *N. tabacum* и их частей в различном возрасте. А — проростки, Б — молодые растения (возраст 3 недели), В — взрослые растения (возраст 2 месяца), Г — корни, Д — срез цветков. Фото сделаны с помощью Sony Alpha ILCE-7M3.

¹Sierro N., Battey J.N., Ouadi S., Bakaher N., Bovet L., Willig A., Goepfert S., Peitsch M.C., Ivanov N.V. The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. // Nat Commun. 2014. Т. 5. Ст. 3833.

На **Рис. 8** приведены примеры свечения разных возрастных групп растений *N. tabacum* со введёнными генами цикла кофейной кислоты. Данная работа была проведена совместно с Александром Мишиным (Группа молекулярных меток для оптической наноскопии, ИБХ РАН).

Биолюминесценция растений была настолько яркой, что после 3-5-минутного пребывания в тёмном помещении возможно было различить её невооружённым глазом, причём было заметно, что различные части растений светятся с разной интенсивностью. Для определения наиболее ярких частей растения мы отобрали типичные листья и типичные цветки с цветущих растений *N. tabacum* и *N. benthamiana*, а также каллусы *N. tabacum* и *N. benthamiana*. Свечение данных частей мы зарегистрировали с помощью IVIS Spectrum CT и вычислили среднюю интенсивность свечения в фотонах в секунду на квадратный сантиметр с помощью собственного ПО IVIS Spectrum CT. Типичные фотографии светящихся частей приведены на **Рис. 9-10**, количественные результаты анализа свечения приведены в **Таблице 1**. Данные эксперименты проведены совместно с Александром Мишиным (Группа молекулярных меток для оптической наноскопии, ИБХ РАН) и Татьяной Чепурных (Лаборатория химии метаболических путей, ИБХ РАН).

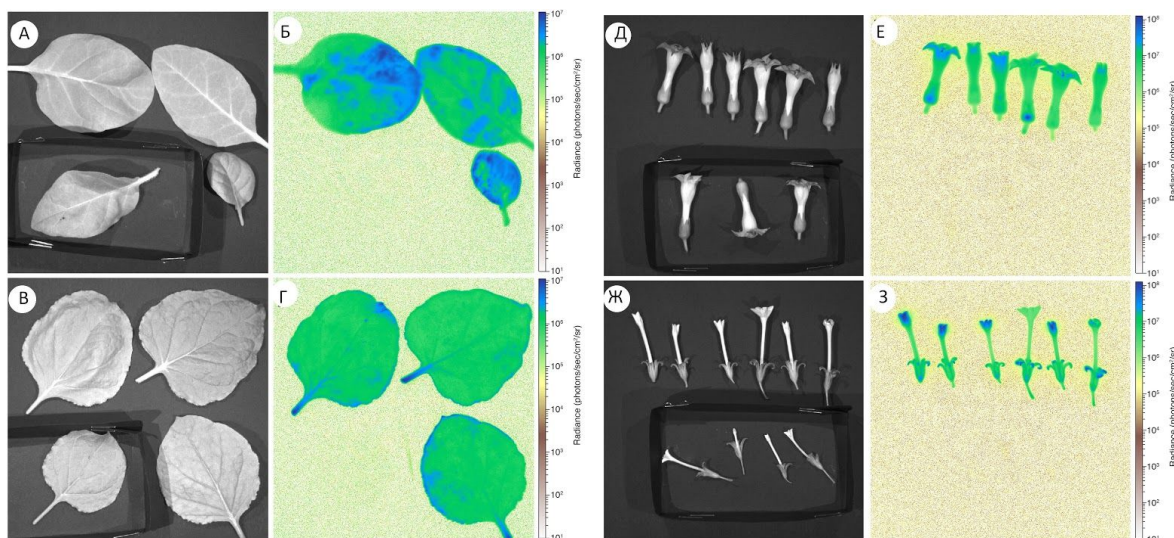


Рисунок 9. Фото частей растений *N. tabacum* и *N. benthamiana*. А — листья *N. tabacum*, внешний источник света; Б — листья *N. tabacum*, режим регистрации люминесценции, binning 1, выдержка 30 с; В — листья *N. benthamiana*, внешний источник света; Г — листья *N. benthamiana*, режим регистрации люминесценции, binning 1, выдержка 30 с; Д — цветки *N. tabacum*, внешний источник света; Е — цветки *N. tabacum*, режим регистрации люминесценции, binning 1, выдержка 30 с; Ж — цветки *N. benthamiana*, внешний источник света; З — цветки *N. benthamiana*, режим регистрации люминесценции, binning 1, выдержка 30 с. В каждом случае в чёрной бумажной коробочке располагаются соответствующие органы контрольных не светящихся растений. Псевдоцветами обозначена интенсивность свечения (логарифмическая шкала расположена справа на изображениях Б, Г, Е, З, минимум отображаемого свечения — 10 фотонов).

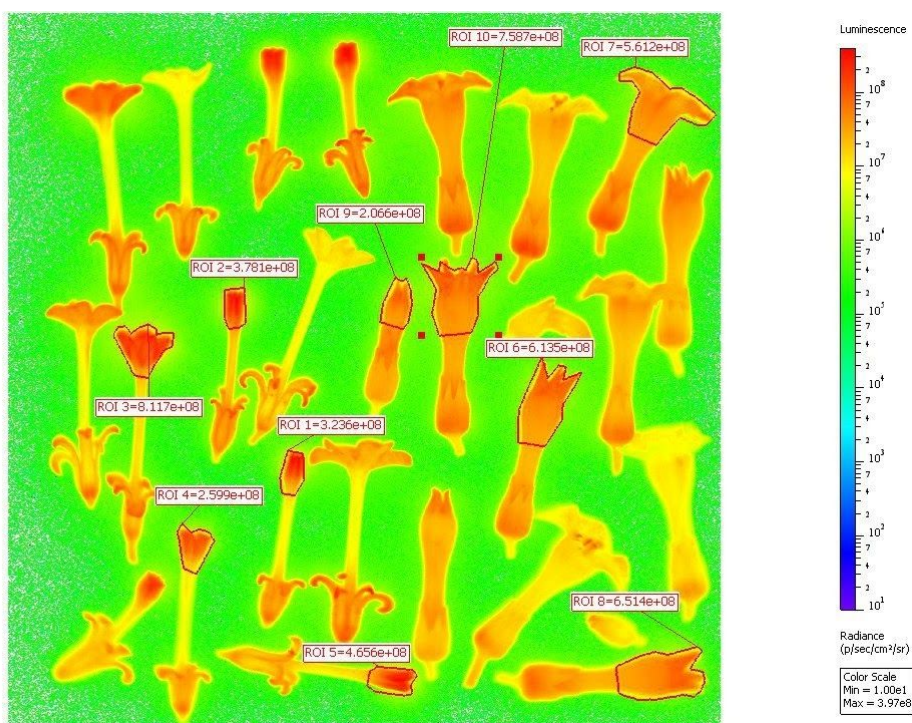


Рисунок 10.

Цветки *N. benthamiana* (слева) и *N. tabacum* (справа), использованные для определения среднего свечения. На типичных цветках выделены области интереса (ROI). Значения, отображаемые для ROI — общий фотонный поток для этой области.

Таблица 1. Интенсивность люминесценции листьев, цветков и каллусов *N. benthamiana* и *N. tabacum*, экспрессирующих гены цикла кофейной кислоты.

Вид	Генотип	Тип ткани	Средняя интенсивность излучения фотон/мин/см2	Стандартное отклонение	Число образцов
<i>Nicotiana benthamiana</i>	<i>nnhisps, nnh3h, nnluz, nncph, KanR</i>	лист	5.58×10^9	1.40×10^9	19
		цветок	6.47×10^{10}	1.60×10^{10}	5
		каллус	3.90×10^{10}	1.60×10^{10}	24
<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>nnhisps, nnh3h, nnluz, nncph, KanR</i>	лист	4.31×10^9	8.44×10^8	33
		цветок	3.17×10^{10}	4.76×10^9	5
		каллус	1.97×10^{10}	6.21×10^9	6

Из Таблицы 1 видно что различные биологические ткани растений светятся с различной интенсивностью и наиболее яркими как для *N. benthamiana*, так и для *N. tabacum* являются цветки. Также достаточно яркими являются каллусы, которые представляют из себя малодифференцированные и быстро делящиеся ткани растений. Возможным объяснением различий в яркости является то, что, во-первых, в быстрорастущих тканях растений (к которым относятся каллусы, бутоны и расцветающие цветки) в целом более интенсивный метаболизм, следовательно, и относительное содержание кофейной кислоты выше, а во-вторых, кофейная кислота является одним из предшественников антоцианов (см. Рис. 7Б), которые отвечают за окраску цветков, следовательно, можно ожидать её повышенный уровень в цветках.

Яркость цветков дополнительно можно объяснить тем, что кофейная кислота может транспортироваться из других органов растения, а не синтезируется непосредственно в цветках, поэтому такой отток также, возможно, вызывает снижение яркости листьев и увеличение яркости цветков. Кроме того, распределение ярких областей по растению в целом (Рис. 8) совпадало с описанным в литературе распределением активности фенилаланин-аммоний-лиазы — одного из ферментов, отвечающего за биосинтез предшественника кофейной кислоты (коричную кислоту).

При наблюдении растений в течение дня мы обнаружили, что их собственное свечение изменяется: когда мы регистрировали люминесценцию в течение светового дня, она была менее интенсивной, чем для тех же растений в течение ночи (Рис. 11). Данные для иллюстрации получены совместно с Александром Мишиным (Группа молекулярных меток для оптической наноскопии, ИБХ РАН).

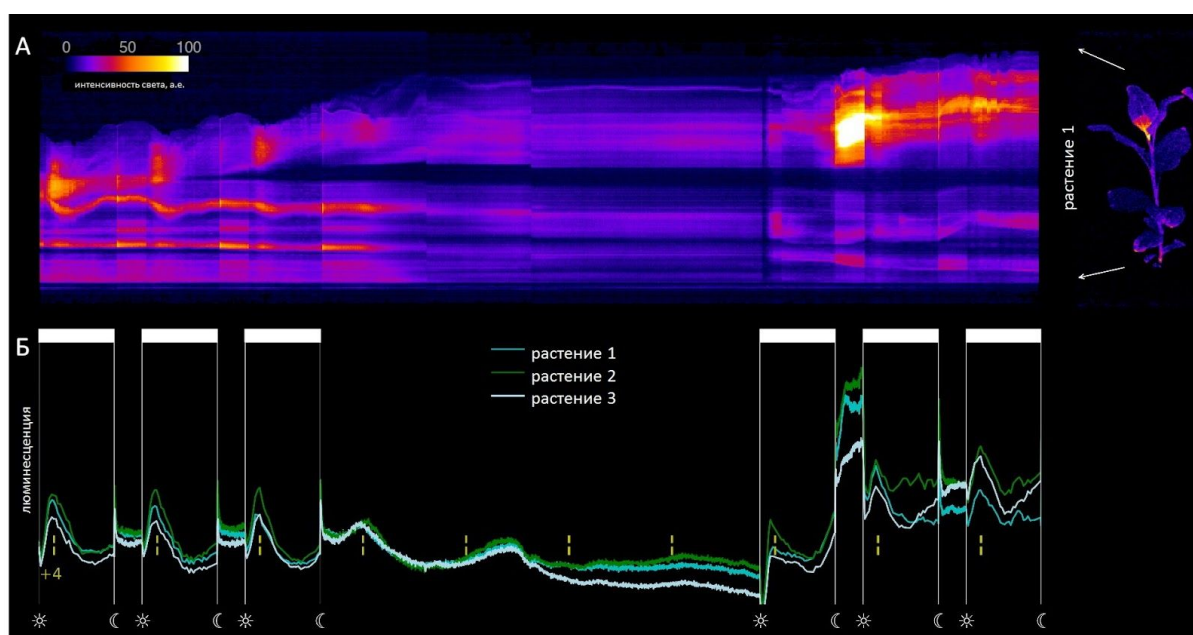


Рисунок 11. Динамика люминесценции автономно светящегося растения *N. tabacum* в течение суток. А — циркадные колебания люминесценции: фото трёх растений регистрировались в течение 10 суток при нормальном световом дне (17,5 ч — освещённое время суток для дней 1-3 и 8-10) или в постоянной темноте (дни 4-7), каждая фотография растения 1 представлена в виде единой вертикальной линии пикселей для создания целой кимограммы; Б — средняя яркость каждого из трёх растений представлена в виде графика.

Несмотря на то, что гены цикла кофейной кислоты были введены под конститутивным вирусным промотором 35s, экспрессионная активность даже конститутивных промоторов может быть переменной в течение суток. Для поиска возможной корреляции между яркостью свечения растений и уровнем экспрессии гена люциферазы мы решили проанализировать экспрессию гена люциферазы в течение суток. Для этого мы отобрали листья в течение суток с интервалом 3 часа с 27 растений *N. tabacum*, экспрессирующих гены цикла кофейной кислоты, возрастом 25 дней (одновременно отбирали листья с трёх растений, с каждого из них брали третий лист, считая от апикальной почки), выделили из них суммарную РНК, синтезировали

первую цепь кДНК и с помощью ПЦР в реальном времени проанализировали уровень транскрипции гена люциферазы (**Рис. 12**).

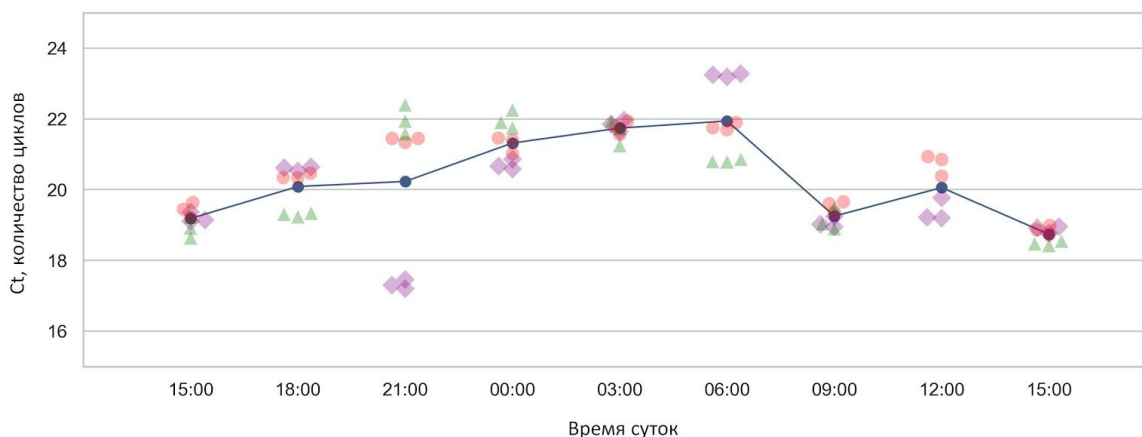


Рисунок 12. Экспрессия гена *nnluz* в *N. tabacum* в течение суток. По оси ординат отмечено значение *Ct* (*cycle threshold*, пороговое значение циклов) для ПЦР в реальном времени при амплификации фрагмента ДНК-копии транскрипта *nnluz*. Все экспериментальные точки отмечены на графике, одним цветом обозначены технические реплики, разными цветами — различные биологические образцы. Синими точками отмечено среднее значение *Ct* для каждой временной точки.

Как было сказано выше, все гены цикла кофейной кислоты, введенные в геном *N. tabacum*, находились под контролем конститутивного вирусного промотора 35s, поэтому одной из гипотез было, что мы не сможем зарегистрировать значительное изменение в экспрессии какого-либо из этих генов. При проверке уровня экспрессии генов *nnh3h*, *nnhisps* и *nnscrh* это предположение подтвердилось: значения *Ct* для разных временных точек практически не отличались (данные не приведены). Однако в случае гена *nnluz* наблюдалась следующая закономерность: в течение ночных часов уровень транскрипции снижался (значения *Ct* являются обратно пропорциональными уровню транскрипции) и резко повышался после рассвета (в день сбора листьев рассвет был между 6:00 и 9:00). Свечение растений, наоборот, было интенсивнее в ночные часы (**Рис. 11**).

Таким образом, несмотря на явные суточные колебания экспрессии гена люциферазы, мы не обнаружили однозначной связи между уровнем экспрессии гена *nnluz* и увеличением свечения растений. Повышение экспрессии гена *nnluz* в дневные часы скорее является отражением общего увеличения метаболической активности растения в светлое время суток. Причины же увеличения яркости люминесценции растений в темное время ещё необходимо изучить.

Создание автономно биолюминесцентных клеток млекопитающих HEK293NT

Вдохновляющий успех по созданию автономно светящихся организмов из столь разных филогенетических групп, как дрожжи и цветковые растения дал нам возможность предполагать, что ферменты цикла кофейной кислоты также будут функциональны и в условиях другой модельной системы — культуры клеток млекопитающих. В качестве объекта исследований мы выбрали модифицированную культуру клеток почки эмбриона человека HEK293NT. Данная культура легко и быстро размножается в лабораторных условиях, хорошо трансфицируется ДНК-конструкциями и демонстрирует относительно высокий уровень экспрессии гетерологических генов¹, дополнительным обоснованием выбора этого объекта послужило то, что данная культура клеток при экспрессии гена люциферазы грибов и экзогенном добавлении люциферина грибов демонстрировала биолюминесцентное свечение².

Все эксперименты с культурами клеток млекопитающих выполнены соискателем лично.

Все ДНК-конструкции для экспрессии в культуре клеток млекопитающих были созданы по единой схеме: в плазмиду pC-Katushka2S (Евроген) вместо кодирующей последовательности флуоресцентного белка Katushka2S были введены копии генов *nnh3h*, *nnhispS*, *nncpH*, *npgA*, *rctal*, *hpaB* или *hpaC* под контроль промотора pCMV. Плазмиды, получившиеся в результате, были названы pC-H3H, pC-HispS, pC-CPH, pC-npgA, pC-RcTAL, pC-HpaB, pC-HpaC, соответственно. Плазида pC-Luz предоставлена Алексеем Котлобаем (Лаборатория химии метаболических путей, ИБХ РАН).

Для создания автономно биолюминесцентной культуры клеток млекопитающих мы провели одновременную трансфекцию плазмидами pC-Luz, pC-H3H, pC-HispS, pC-CPH, pC-npgA, pC-RcTAL, pC-HpaB и pC-HpaC и через сутки после трансфекции мы проанализировали состояние клеток (**Рис. 13А-Б**) и провели регистрацию люминесценции с помощью IVIS Spectrum CT (**Рис. 13В**). В качестве контрольных клеток мы использовали линию HEK293NT, трансфицированную всеми перечисленными выше плазмидами, кроме pC-RcTAL.

В целом, физиологическое состояние трансфицированных клеток было несколько хуже, чем у контрольных клеток, что может быть связано с токсическим влиянием основных или побочных продуктов введённого биохимического пути.

¹Graham F.L., Smiley J., Russell W.C., Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. // J Gen Virol. 1977. Т. 36. №1. С. 59-74.

²Котлобай А.А. Поиск, клонирование и экспрессия гена люциферазы грибов. // Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Москва. 2019.

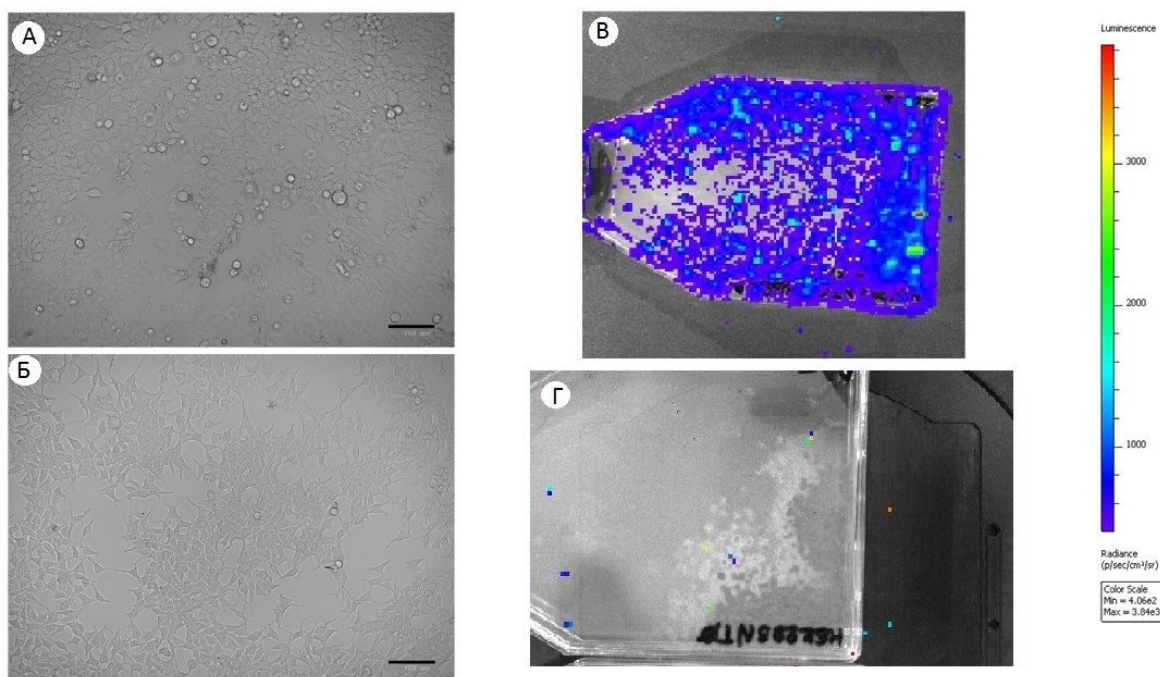


Рисунок 13. Изображения клеток HEK293NT, полученных с помощью микроскопа ZOE Fluorescent Cell Imager (масштабный отрезок — 100 мкм) и IVIS Spectrum CT. А — клетки через 24 часа после трансфекции плазидами pC-Luz, pC-H3H, pC-HispS, pC-CPH, pC-nrgA, pC-RcTAL, pC-HpaB и pC-HpaC, Б — клетки через 24 часа после трансфекции плазидами pC-Luz, pC-H3H, pC-HispS, pC-CPH, pC-nrgA, pC-HpaB и pC-HpaC, В — те же клетки, что и (А) при регистрации люминесцентного сигнала в течение 10 минут, binning 16 с помощью IVIS Spectrum CT (псевдоцветами отмечена яркость свечения в фотонах/см²/стерадиан), Г — те же клетки, что и (Б) при регистрации люминесцентного сигнала в течение 10 минут, binning 16 с помощью IVIS Spectrum CT.

Полученные с помощью IVIS Spectrum CT изображения демонстрировали, что нам удалось достичь автономной люминесценции культуры клеток HEK293NT, однако последующие попытки зарегистрировать люминесценцию тех же клеток спустя 10-20 минут после первого эксперимента при тех же настройках были неудачными: клетки не испускали свечение, которое можно было бы зарегистрировать с помощью IVIS Spectrum CT. Мы предположили, что это связано с изменением параметров окружающей среды, таких как температура и наличие CO₂. В CO₂-инкубаторе клетки находятся при температуре 37°C и 5% CO₂, тогда как температура столика IVIS Spectrum CT, будучи заявленной 37°C, при проверке с помощью термометра на самом деле представляла собой 28-30°C. Дополнительного насыщения углекислым газом камеры IVIS Spectrum CT не происходило, следовательно, уровень CO₂ был приблизительно таким же, как и в атмосферном воздухе, то есть не превышал 0,1%. Количественного измерения уровня CO₂ в камере IVIS Spectrum CT мы не производили.

Поскольку для свечения культуры клеток необходима слаженная работа сразу целого метаболического пути, включающего в себя не менее 5 стадий, то вероятность, что условия работы окажутся оптимальными для каждой из них (учитывая факт, что часть ферментов имеют происхождение из грибов *N. nambi* и *A. nidulans*, часть — из бактерий *R. capsulatus* и *E. coli*), невелика. Тем не менее, такое сочетание условий было

достигнуто, как минимум, при начале съёмки люминесценции трансфицированной культуры. У нас не было простого способа отрегулировать температуру и содержание CO₂ в IVIS Spectrum CT, поэтому мы начали с того, что стабилизировали pH в среде для измерений люминесценции с помощью добавления HEPES до 20 mM (далее - IMEM). Кроме того, для получения более интенсивного сигнала люминесценции мы решили сконцентрировать клетки перед измерением.

Подобный протокол не позволил нам достичь длительной автономной люминесценции, однако мы смогли зарегистрировать свечение трансфицированных клеток полуколичественно (**Рис. 14**).

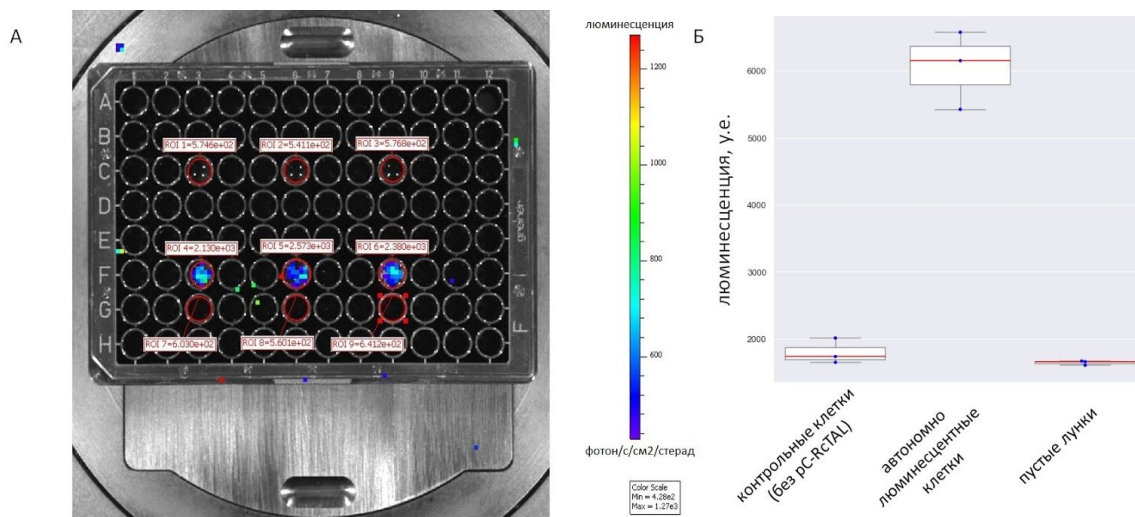


Рисунок 14. Измерение автономной люминесценции клеток HEK293NT, трансфицированных плазмидами pC-Luz, pC-H3H, pC-HispS, pC-CPH, pC-nrgA, pC-RcTAL, pC-HpaB и pC-HpaC и сконцентрированных в среде для имиджинга MEM+HEPES. А — изображение, полученное с помощью IVIS Spectrum CT, выдержка 10 минут, binning 16, лунки C3, C6, C9 — контрольные клетки (трансфекция плазмидами pC-Luz, pC-H3H, pC-HispS, pC-CPH, pC-nrgA, pC-HpaB и pC-HpaC), лунки F3, F6, F9 — автолюминесцентные клетки (трансфекция плазмидами pC-Luz, pC-H3H, pC-HispS, pC-CPH, pC-nrgA, pC-RcTAL, pC-HpaB и pC-HpaC), лунки G3, G6, G9 — пустые; Б — количественное измерение люминесценции (фотоны/с/см²/стерадиан), на графике отмечены все измерения (синие точки) и медианное значение (красная линия).

На **Рис. 14** видно, что автономная люминесценция клеток, трансфицированных плазмидами pC-Luz, pC-H3H, pC-HispS, pC-CPH, pC-nrgA, pC-RcTAL, pC-HpaB и pC-HpaC превышает значения люминесценции как для контрольных клеток, так и для пустых лунок планшета, в котором проводились измерения, однако сигнал от автономно люминесцентных клеток не является высоким. Данные эксперименты стоит воспринимать как полуколичественные, поскольку значения автономной люминесценции в разных экспериментах варьировали, вероятно, в силу проведения экспериментов на временных трансфекциях. Таким образом, сравнение различных образцов можно осуществлять только в пределах одного и того же эксперимента и на данном этапе трудно говорить о строгих количественных измерениях.

Создание автономно люминесцентных клеток млекопитающих, экспрессирующих гены цикла кофейной кислоты, пока находится на начальном этапе и

мы рассчитываем значительно улучшить данную систему введением дополнительных или альтернативных генов, а также за счет создания стабильных линий трансгенных клеток. Для этого мы использовали несколько подходов, включающих как введение альтернативных ферментов, так и подбор оптимальных условий для регистрации люминесценции.

При временной трансфекции культуры клеток млекопитающих несколькими плазмидами одновременно существует вероятность, что не в каждую клетку может попадать хотя бы одна копия каждой из плазмид. Вторым недостатком временной трансфекции является то, что практически невозможно достичь уровня трансфекции 100% клеток даже при использовании единичной плазмиды. В сумме эти недостатки могут приводить к тому, что наблюдаемый эффект от трансфекции будет гораздо ниже ожидаемого, что с высокой вероятностью произошло и в описанных экспериментах по созданию автономно светящейся линии клеток млекопитающих НЕК293NT. К сожалению, нет простых путей решения ни одной из обеих приведённых выше проблем, однако в случае создания автономно люминесцентной культуры НЕК293NT можно снизить вклад первой из описанных проблем с помощью использования альтернативной кумарат-3-гидроксилазы, кодируемой одним геном, а не двумя (как в случае *hpab* и *hpac*). Мы выбрали ген *sec3h* (*sam5*), кодирующий кумарат-3-гидроксилазу *Saccharothrix espanaensis*¹. Данная последовательность была оптимизирована для использования в клетках *H. sapiens*, заказана синтетически и клонирована под контролем рCMV.

Мы трансфицировали клетки НЕК293NT параллельно набором плазмид рC-Luz, рC-НЗН, рC-HispS, рC-CPH, рC-ppgA и рC-RcTAL, а также либо плазмидами рC-НраВ и рC-НраС, либо плазмидой рC-SeC3H. Через 4 часа после трансфекции мы заменяли среду на DMEM, насыщенный тирозином, а через 24 часа концентрировали клетки в среде IMEM, насыщенной тирозином, как описано в разделе 2.4.4.3 главы “Материалы и методы” и проводили имиджинг с помощью IVIS Spectrum СТ. Результаты имиджинга приведены на **Рис. 15**. Несмотря на то, что данный эксперимент также стоит считать полуколичественным, на **Рис. 15Б** видно, что использование для трансфекции плазмиды рC-SeC3H приводит к более высоким значениям автономной люминесценции по сравнению с парой плазмид рC-НраВ и рC-НраС, однако остаётся неизвестным, вклад какого из процессов оказывает большее влияние: более высокая вероятность попадания в трансфицированные клетки одновременно 7 плазмид вместо 8 (при использовании рC-SeC3H вместо пары рC-НраВ и рC-НраС), либо более высокая эффективность кумарат-3-гидроксилазы из *S. espaniensis* по сравнению с кумарат-3-гидроксилазой *E. coli* в гетерологическом хозяине — культуре клеток млекопитающих НЕК293NT. Ответ на этот вопрос ещё предстоит получить.

¹Strobel T., Al-Dilaimi A., Blom J., Gessner A., Kalinowski J., Luzhetska M., Pühler A., Szczepanowski R., Bechthold A., Rückert C. Complete genome sequence of *Saccharothrix espanaensis* DSM 44229(T) and comparison to the other completely sequenced Pseudonocardiaceae. // BMC Genomics. 2012. Т. 13. Ст. 465.

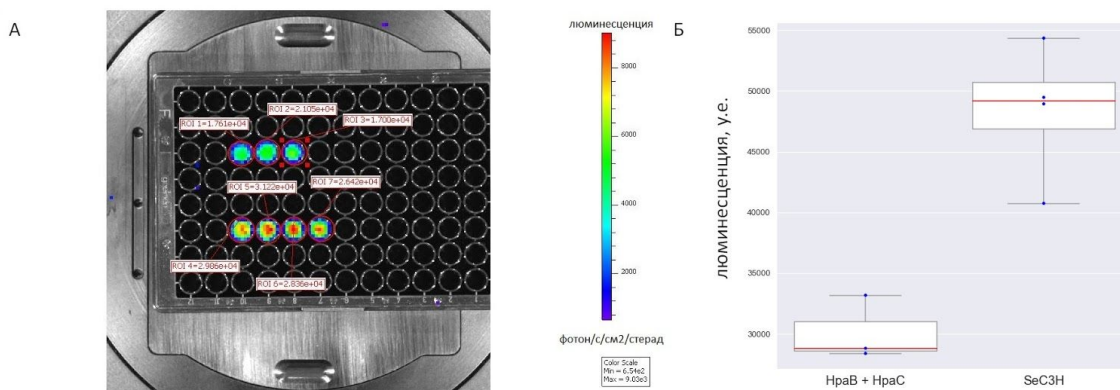


Рисунок 15. Различия в автономном свечении клеток HEK293NT, трансфицированных набором плазмид *pC-Luz*, *pC-H3H*, *pC-HispS*, *pC-CPH*, *pC-nrgA* и *pC-RcTAL* (далее в описании и в панели Б не указываются), а также либо плазмидами *pC-HraB* и *pC-HraC*, либо плазмидой *pC-SeC3H*. А — люминесценция, зарегистрированная с помощью IVIS Spectrum CT, выдержка 10 минут, binning 16, лунки C3, C4, C5 — трансфекция плазмидами *pC-HraB* и *pC-HraC*, лунки F3, F4, F5, F6 — трансфекция плазмидой *pC-SeC3H*; Б — количественное измерение люминесценции (фотоны/с/см²/стерадиан), на графике отмечены все измерения (синие точки) и медианное значение (красная линия).

Согласно описанию производителя, в составе сред DMEM¹ и MEM M3024 присутствует добавленный тирозин в концентрациях 0,1 г/л и 0,05 г/л, соответственно. Предельная растворимость тирозина в воде при этом составляет 0,45 г/л в условиях физиологических значений pH (по описанию продукта T 3754 - порошок тирозина, Sigma Aldrich). Таким образом, содержание тирозина в питательных средах для клеток млекопитающих достаточно высоко, однако не достигает предельных значений растворимости этого вещества. Для оценки влияния добавленного тирозина на яркость свечения автономно люминесцентных клеток HEK293NT мы провели следующий эксперимент: трансфицировали клетки в одинаковых условиях набором плазмид *pC-Luz*, *pC-H3H*, *pC-HispS*, *pC-CPH*, *pC-nrgA*, *pC-RcTAL* и *pC-SeC3H*, через 4 часа после трансфекции части трансфицированных клеток мы заменили среду на fullDMEM, а части — на fullDMEM с тирозином, добавленным до насыщения. Через 24 часа после трансфекции мы сконцентрировали клетки и ресуспендировали часть образцов в среде IMEM, а часть — в среде IMEM с тирозином, добавленным до насыщения. Таким образом, мы получили 4 категории образцов, описание которых представлено в **Таблице 2**.

¹<https://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/learning-center/media-formulations/dme.html>

²<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Formulation/m3024for.pdf>

Таблица 2. Присутствие дополнительного тирозина в культуральной среде клеток HEK293NT после трансфекции набором плазмид *pC-Luz*, *pC-H3H*, *pC-HispS*, *pC-CPH*, *pC-nrgA*, *pC-RcTAL* и *pC-SeC3H*.

DMEM	— тирозин	+ тирозин
IMEM		
— тирозин	Образец 1	Образец 2
+ тирозин	Образец 3	Образец 4

Имиджинг образцов, описанных в **Таблице 2**, мы провели с помощью IVIS Spectrum CT. Результаты приведены на **Рис. 16**.

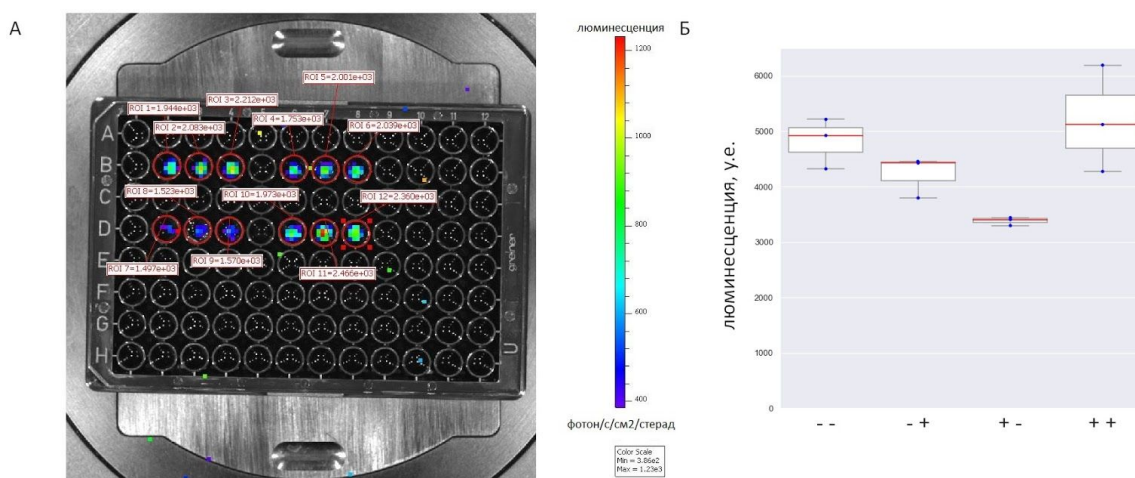


Рисунок 16. Имиджинг клеток HEK293NT, трансфицированных плазмидами *pC-Luz*, *pC-H3H*, *pC-HispS*, *pC-CPH*, *pC-nrgA*, *pC-RcTAL* и *pC-SeC3H* при последующей инкубации в культуральной среде со стандартным количеством тирозина либо с тирозином, добавленным до насыщения. А — люминесценция, зарегистрированная с помощью IVIS Spectrum CT, выдержка 10 минут, binning 16, лунки B2, B3, B4 — без добавления дополнительного тирозина, лунки B6, B7, B8 — дополнительный тирозин добавлен только в среду для имиджинга (IMEM), лунки D2, D3, D4 — дополнительный тирозин добавлен только в среду, которую добавили после трансфекции (DMEM), лунки D6, D7, D8 — дополнительный тирозин добавлен и в DMEM, и в IMEM; Б — количественное измерение люминесценции (фотоны/с/см²/стерадиан), на графике отмечены все измерения (синие точки) и медианное значение (красная линия), знаками - и + отмечено отсутствие или наличие дополнительного тирозина в среде после трансфекции (первый знак) и в среде для имиджинга (второй знак).

Видно, что добавление дополнительного тирозина не оказывает значительного влияния на яркость автономно люминесцентных клеток, поэтому предпочтение можно отдать более простому протоколу, при котором добавление тирозина в культуральные среды не производится.

Выводы

1. Найдены гены ферментов биосинтеза люциферина грибов: гиспидинсинтазы *hisps*, гиспидин-3-гидроксилазы *h3h* и каффеоилпируватгидролазы *срh*. В геномах люминесцентных видов высших грибов указанные гены образуют консервативный кластер, также содержащий ген люциферазы грибов *luz*.
2. Подтверждены функции продуктов данных генов при гетерологической экспрессии в модельном организме — дрожжах *Pichia pastoris*. Таким образом, найденные гены кодируют систему ферментов, необходимых и достаточных для обеспечения люминесценции грибов. Найденный биохимический каскад назван нами “цикл кофейной кислоты”.
3. Подобраны вспомогательные гены *tal*, *с3h*, *hpab* и *hpac*, продукты которых — тирозин-аммоний-лиаза (TAL) и кумарат-3-гидроксилаза (СЗН или гетеродимер НраВ/НраС) — способны катализировать превращение аминокислоты тирозина в предшественники люциферина грибов — кумаровую и кофейную кислоты, соответственно.
4. Созданы автономно биолюминесцентные дрожжи *P. pastoris*, экспрессирующие гены цикла кофейной кислоты и вспомогательные гены — *tal*, *hpab* и *hpac*.
5. Созданы автономно биолюминесцентные трансгенные растения *Nicotiana tabacum* и *N. benthamiana*, экспрессирующие гены цикла кофейной кислоты.
6. Проанализирована интенсивность свечения различных органов и тканей *N. tabacum* и *N. benthamiana* и её изменения во времени и пространстве; максимальным свечением обладают цветки, в целом интенсивность свечения растения выше в тёмное время суток.
7. С помощью временной трансфекции созданы автономно биолюминесцентные клетки млекопитающих НЕК293NT, экспрессирующие гены цикла кофейной кислоты и вспомогательные гены *rctal*, *hpab* и *hpac* или *rctal* и *sec3h*.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи

1. Mitiouchkina T*, Mishin A.S.*, Somermeyer L.G.*, **Markina N.M.***, Chepurnyh T.V., Guglya E.B., Karataeva T.A., Palkina K.A., Shakhova E.S., Fakhranurova L.I., Chekova S.V., Tsarkova A.S., Golubev Y.V., Negrebetsky V.V., Dolgushin S.A., Shalaev P.V., Shlykov D., Melnik O.A., Shipunova V.O., Deyev S.M., Bubyrev A.I., Pushin A.S., Choob V.V., Dolgov S.V., Kondrashov F.A., Yampolsky I.V., Sarkisyan K.S. Plants with genetically encoded autoluminescence. // Nat Biotechnol. 2020 Apr 27. doi: 10.1038/s41587-020-0500-9.

* равный вклад авторов

2. **Markina N.M.**, Kotlobay A.A., Tsarkova A.S. Heterologous metabolic pathways: Strategies for optimal expression in eukaryotic hosts. // Acta Naturae. 2020. Т. 12. № 2 (45). С. 28-39. doi: 10.32607/actanaturae.10966

3. Kotlobay A.A., Sarkisyan K.S., Mokrushina Y.A., Marcet-Houben M., Serebrovskaya E.O., **Markina N.M.**, Gonzalez Somermeyer L., 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 E.P., Waldenmaier H.E., Oliveira A.G., Oba Y., Barsova E., Bogdanova E.A., Gabaldón T., Stevani C.V., Lukyanov S., Smirnov I.V., Gitelson J.I., Kondrashov F.A., Yampolsky I.V. Genetically encodable bioluminescent system from fungi. // Proc Natl Acad Sci U S A. 2018 Dec 11. Т. 115(50). С. 12728-12732. doi: 10.1073/pnas.1803615115.

Тезисы докладов на конференциях

1. **Н.М. Маркина**, А.А. Котлобай, Ю.А. Мокрушина, М.А. Абакумов, К.С. Саркисян, И.В. Смирнов, И.В. Ямпольский. Гиспидин-3-гидроксилаза: фермент биосинтеза люциферина высших люминесцентных грибов, XXX Зимняя школа ИБХ РАН, 2017, устный доклад

2. **N. Markina**, A. Gorokhovatsky, A. Kotlobay, K. Sarkisyan, Y. Mokrushina, I. Yampolsky. Hispidin-3-hydroxylase: a luciferin biosynthesis enzyme of glowing fungi. 43d FEBS Congress, 2017, стендовый доклад

3. **Markina N.M.**, Palkina K.A., Sarkisyan K.S., Yampolsky I.V. Development of BRET-sensors based on the luciferase from bioluminescent fungus *Neonothopanus nambi*. European Biotechnology Congress, 2019, стендовый доклад

Для заметок