

БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ МОНИТОРИНГ ОБЕСПЕЧИВАЕТ ВОЗМОЖНОСТЬ РЕГИСТРАЦИИ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ СОБЫТИЙ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ БЕЗ РАЗРУШЕНИЯ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ

© 2017 г. С.В. Маркова* ** ***, Н.П. Маликова* **, Е.С. Высоцкий* **, Л.А. Франк* ** ***, И.И. Гительзон* ** ***

*Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН, 660036, Красноярск, Академгородок, 50/50

**Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

***Сибирский федеральный университет, 660041, Красноярск, просп. Свободный, 79

E-mail: smarkova@mail.ru

Поступила в редакцию 27.12.16 г.

После доработки 07.02.17 г.

Секретируемые репортеры обеспечивают мониторинг внутриклеточных событий в реальном времени без разрушения клеток. Для создания клеточных линий меланомы человека с возможностью неинвазивного биолюминесцентного мониторинга метаболической активности проведено сравнение эффективности изоформ и мутантных вариантов люциферазы из *Metridia longa* в качестве секретируемых репортеров в клетках линии меланомы человека Mel IL. Из исследованных двух изоформ и двух делеционных мутантов секретируемой люциферазы *M. longa* при трансфекции клеток меланомы Mel IL наибольшую активность в среде обнаружил делеционный мутант MLM3. Установлено, что оптимизация структуры гена выбранного варианта MLM3 для экспрессии в клетках человека еще почти на порядок увеличивает уровень биолюминесцентной активности в клетках Mel IL. Стабильная клеточная линия меланомы Mel IL с конститутивной экспрессией гуманизированного репортера hMLM3 получена и охарактеризована. Линейный диапазон идентификации живых клеток по активности hMLM3 репортера составлял более трех порядков с чувствительностью детекции, достигающей 10 клеток.

Ключевые слова: меланома, биолюминесцентный репортер, люцифераза, целентеразин, жизнеспособность клеток.

Секретируемые репортеры являются удобным аналитическим инструментом, поскольку обеспечивают возможность мониторинга внутриклеточных событий в реальном времени без разрушения клеток или тканей. Использование в качестве таких репортеров биолюминесцентных белков обеспечивает широкий динамический диапазон измерений и чувствительность, ограничиваемую детекторами света, самые совершенные из которых уже доведены до физического предела – счета отдельных фотонов. Одним из перспективных биолюминесцентных репортеров является целентеразин-зависимая люцифераза MLuc из копепоид *Metridia longa* – небольшой секретируемый в морскую воду белок, катализирующий реакцию окисления субстрата целентеразина, что сопровождается излучением света с максимумом при $\lambda = 480$ нм [1]. На сегодняшний день для люциферазы *M. longa* клонированы четыре неаллельных изоформы различной длины ~18,4–24,2 кДа с совпадением аминокислотных последовательно-

стей ~60–80% [2–5]. Три изоформы были успешно использованы в качестве высокочувствительных биолюминесцентных репортеров в *in vitro* анализе [3] и *in vivo* в клетках млекопитающих [2,4,6].

Все изоформы люциферазы *M. longa* содержат на N-конце сигнальную последовательность из 17 аминокислотных остатков, которая обеспечивает эффективную секрецию рекомбинантных люцифераз при их экспрессии в клетках млекопитающих и насекомых [2,4,7]. Сравнение последовательностей изоформ выявляет переменный N-конец, размером около 1/3 последовательности наибольшей изоформы MLuc164, и консервативный C-конец, отвечающий за каталитическую активность. Три мутанта изоформы MLuc164 (24,2 кДа), укороченные с N-конца до размеров 17,9, 16,0 и 15,1 кДа, при экспрессии в *E. coli* выявили даже большую биолюминесцентную активность, чем люцифераза дикого типа [8]. Укороченный вариант люцифе-

разы с молекулярной массой 15,1 кДа соответствует консервативной С-концевой последовательности, состоящей в основном из двух неидентичных повторяющихся доменов [5]. Каждый из повторов содержит пять высококонсервативных цистеиновых остатков, что предполагает наличие до пяти дисульфидных связей на маленькую молекулу белка. Вероятнее всего, множественные S-S-связи обеспечивают экстремально высокую термостабильность люциферазы *M. longa*, сохраняющую активность даже при нагреве до 100°C [4,5]. Еще одним достоинством люциферазы *M. longa* как репортера является широкий линейный диапазон зависимости интенсивности биолюминесценции от концентрации белка, составляющий около шести порядков, с нижним пределом обнаружения до ~1 фмоля [3–5]. При этом нижний предел обнаружения люциферазы скорее ограничен чувствительностью детектора, используемого для регистрации биолюминесцентного сигнала, чем свойствами белка.

Меланома кожи человека является наиболее злокачественной формой рака кожи с высокой устойчивостью к апоптозу и к терапии. Механизмы такой устойчивости к целому ряду противоопухолевых препаратов остаются в значительной степени неизвестными [9]. Клеточные линии меланомы человека, полученные из индивидуальных опухолей, широко используются в качестве модельных линий для исследований механизмов развития опухоли, поиска и оценки новых лекарственных препаратов, в том числе для подбора эффективных таргетных препаратов при персонализированной терапии. Проведение подобного типа исследований зачастую требует экспрессной оценки жизнеспособности и метаболической активности клеток, особенно при использовании методов высокопроизводительного скрининга. Большинство современных методов определения жизнеспособности и метаболической активности клеток основано на прямом подсчете доли живых клеток и/или определении активности различных клеточных ферментов или метаболитов. Стандартом здесь является определение активности митохондриальных дегидрогеназ по конвертации солей тетразолия в измеряемый окрашенный продукт [10]. Все эти методы требуют сбора и лизиса клеток, позволяя сделать оценку жизнеспособности и метаболической активности клеток лишь в одной терминальной точке анализа. При этом определение и оптимизация таких конечных точек требуются для каждого отдельного эксперимента. Применение секреторируемо-

го биолюминесцентного репортера позволяет сделать подобный анализ неинвазивным и динамичным без сбора и лизиса клеток, но требует создания трансгенных клеточных линий, экспрессирующих генетически-кодируемый репортер.

В настоящей статье мы описываем создание моноклональной стабильной клеточной линии диссеминированной меланомы человека Mel IL, экспрессирующей оптимизированный репортер на основе мутантного варианта люциферазы *M. longa* для высокопроизводительного неинвазивного мониторинга метаболически активных клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Генетические конструкции. Вектор pcDNA3.1+ (Invitrogen, США) был использован для конститутивной экспрессии в клетках меланомы Mel IL вариантов люциферазы *M. longa* под контролем цитомегаловирусного промотора. Плаزمида pcDNA3m-MLM4, несущая делеционный мутант MLM4, была сконструирована при использовании набора «QuickChange site-directed mutagenesis kit» (Stratagene, США) на матрице pcDNA3m-ML164 [8] праймерами: прямым 5-GCATTGGTTCAGGCAGAGACCGATGCTAACCGTG-3 и комплементарным обратным. Модификация эффективного сайта отщепления сигнального пептида была рассчитана с использованием программы SignalP 4.0 [11]. Синтетический ген кодирующей последовательности MLM3 репортера с гуманизированной структурой был получен путем сборки из перекрывающихся синтетических олигонуклеотидов («Синтол», Россия) и клонирован по сайтам NcoI-XhoI в вектор pcDNA3.1+. Полученные конструкции подтверждены секвенированием в ЦКП «Геномика» СО РАН.

Культивирование клеток. Клеточная линия диссеминированной низкодифференцированной меланомы человека Mel IL [12] была получена из коллекции клеточных культур Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина. Клетки культивировали при 37°C в 5% CO₂ в среде RPMI-1640 без глутамина («ПанЭко», Россия), содержащей 10% инактивированной термообработкой FBS («ПанЭко», Россия), с добавлением GlutaMax и Antibiotic/Antimycotic (Thermo Fisher Scientific, США). Клетки пересеивали один раз в пять суток при достижении плотности ~10⁵ клеток/см² с разведением 1 : 20.

Изоформы и мутантные варианты люциферазы *Metridia longa*, использованные для сравнительной оценки репортерной эффективности в клетках Mel II

Люцифераза	Размер секретируемого белка	Описание варианта
ML164	202 ао, ~22,0 кДа	MLuc164 или MLuc [2]
MLM3	165 ао, ~17,9 кДа	ML164M3, N-делеционный мутант MLuc164 [8]
MLM4	148 ао, ~16,0 кДа	ML164M4, N-делеционный мутант MLuc164 [8]
ML7	152 ао, ~16,5 кДа	MLuc7 [4]

Получение трансфицированных клеток.

Трансфекцию проводили в 12-луночном планшете по достижении клетками ~80% конфлюэнтности с использованием Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя. Трансфекцию прерывали через 4–6 ч путем замены смеси с ДНК-комплексами на культуральную среду. Для создания постоянной клеточной линии клетки, не содержащие трансген, удаляли путем селекции пулов трансфицированных клеток при помощи антибиотика генетицина (G418) (Invitrogen, США) в концентрации 1 мг/мл. Клетки выращивали в течение двух недель, меняя среду с антибиотиком каждые двое суток, до формирования отчетливо выраженных колоний стабильных трансфектантов. Затем индивидуальные клеточные клоны переносили под биноклярным микроскопом путем аспирации микропипеткой в лунки 96-луночного планшета для селекции. Перед снятием колоний чашку тщательно промывали средой и осушали. Для лучшего снятия колонии стабильно трансфицированных клеток выращивали на необработанной подложке для суспензионных культур. После отбора индивидуальных клонов при последующем культивировании концентрация G418 была снижена до 600 мкг/мл.

Биолюминесцентный анализ. Анализ уровня экспрессии репортерного гена оценивали по биолюминесцентной активности отбираемых аликвот среды объемом 1–5 мкл, которые разводили в случае очень высокой активности. Измерения проводили в лунках 96-луночного планшета со 100 мкл ML-буфера (0,5 М NaCl, 0,015% желатина, 50 мМ трис-HCl, pH 7,5), содержащего измеряемый образец, на планшетном биолюминометре Mithras LB 940 Multimode Reader (Berthold Technologies, Германия) сразу после впрыска 50 мкл ML-буфера, содержащего свежеприготовленный биолюминесцентный субстрат целентеразин в финальной концентрации $\sim 1,2 \cdot 10^{-6}$ М.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Культуры первичных индивидуальных опухолей, являясь клеточными моделями, широко используются как для выяснения механизмов канцерогенеза и идентификации молекулярных маркеров рака, так и для исследований действия противоопухолевых препаратов и подбора персонализированной терапии. Одной из таких охарактеризованных клеточных культур, полученной от метастаза пациента РОНЦ им. Н.Н. Блохина, является линия диссеминированной меланомы Mel II, относящейся к умеренно дифференцированному типу метастатической меланомы человека [12]. В данной работе для экспрессивной оценки жизнеспособности и метаболической активности в динамике в клетки меланомы Mel II был введен оптимизированный генетически-кодируемый секретируемый репортер на основе люциферазы *M. longa*.

Выбор варианта MLuc репортера. Люцифераза *M. longa* представлена четырьмя неаллельными высокогомологичными изоформами [2–5], для одной из них (MLuc164) получены три делеционных мутанта [8] с активностями более высокими, чем биолюминесцентная активность изоформы дикого типа. На первом этапе были выбраны две изоформы и два делеционных мутанта, обладающих наибольшей активностью, для сравнительной оценки их эффективности при использовании в клетках Mel II в качестве секретируемых репортеров (таблица).

Сравнение проводили при одновременной транзиентной трансфекции клеток меланомы Mel II в трех повторах конструкциями, в которых выбранные изоформы люциферазы и делеционные мутанты присутствовали как полноразмерные кДНК-гены под контролем конститутивного цитомегаловирусного промотора в векторе pcDNA3.1+ (Invitrogen, США). Наилучшие репортерные свойства по результатам сравнения (рис. 1) выявил вариант MLM3, N-делеционный мутант изоформы MLuc164. MLM3 продемонстрировал не только высокую активность на протяжении всего эксперимента, но и практически линейный рост интенсивности

биолюминесцентного сигнала в среде трансфицированных клеток в зависимости от времени. Другой, более короткий делеционный мутант MLM4 демонстрировал наибольшую биолюминесцентную активность в первые часы после трансфекции с максимальной активностью через 16 ч, далее интенсивность сигнала практически не менялась и немного уменьшалась к концу эксперимента. Возможно, это обусловлено нестабильностью или деградацией этого короткого мутанта в культуральной среде. Ранее на рекомбинантных белках, очищенных из *E. coli*, было показано, что мутант MLM4, обладая намного большей активностью, чем MLuc164 и MLM3 люциферазы, проявлял гораздо меньшую стабильность в условиях инкубации при 37°C [8]. Таким образом, из исследованных вариантов оптимальным для использования в качестве секретируемого репортера для мониторинга физиологического состояния клеток меланомы человека является делеционный мутант MLM3.

Оптимизация нуклеотидной последовательности репортера. Для успешной экспрессии целевого гена в новом окружении часто необходима оптимизация его нуклеотидной последовательности с учетом частот используемых кодонов в новой клетке-хозяине. Такая оптимизация, кроме прочего, включает удаление различных потенциальных регуляторных последовательностей, например, потенциальных сайтов связывания транскрипционных факторов. Хотя анализ нуклеотидной последовательности исходного гена MLM3 не выявил очень редких для клеток человека кодонов, некоторые его короткие фрагменты имели очень низкое GC-содержание вплоть до 20,8% (средний GC-состав рассчитан с движущейся рамкой в 24 нуклеотидных основания). Такие короткие AT-богатые последовательности могут играть роль неспецифических терминаторов транскрипции и блокировать синтез люциферазы. Для эффективной экспрессии в клетках меланомы человека биолюминесцентного репортера MLM3 был осуществлен дизайн и синтез новой нуклеотидной последовательности с оптимизированной частотой использования кодонов для экспрессии в клетках человека. Программу OPTIMIZER (<http://genomes.urv.cat/OPTIMIZER/>) использовали для написания первичного проекта последовательности, которую затем корректировали вручную с учетом равномерности GC-состава, отсутствия протяженных гомополимерных последовательностей и жестких шпильчатых вторичных структур в мРНК. Начало

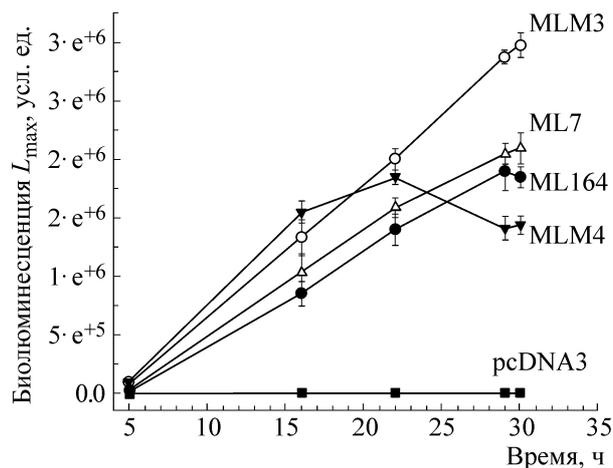


Рис. 1. Временная динамика биолюминесцентного сигнала в среде клеток Mel II, транзигентно трансфицированных различными вариантами люциферазы *M. longa*, клонированных в векторе pcDNA3.1+. Вектор без вставки – отрицательный контроль. Каждая точка – среднее значение измерений в трех независимых трансфекциях.

гена было оптимизировано с учетом консенсусной последовательности Козак. Новая кодирующая последовательность hMLM3 гена с оптимизированной структурой (рис. 2) была получена путем сборки из перекрывающихся синтетических олигонуклеотидов и клонирована в тот же самый pcDNA3.1+ вектор.

Использование нового гуманизированного варианта гена hMLM3 позволило примерно на порядок увеличить уровень репортерной биолюминесцентной активности в культуральной среде при транзигентной трансфекции клеток Mel II (данные не представлены).

Получение стабильной линии Mel II, секретирующей биолюминесцентный репортер. Для получения постоянной клеточной линии меланомы человека Mel II использовали клетки после трансфекции плазмидой pcDNA3.1+hMLM3. К сожалению, методом лимитирующих разведений, несмотря на большое количество образцов, не удалось получить стабильные колонии, экспрессирующие биолюминесцентный репортер. По-видимому, клетки линии Mel II хорошо растут лишь при определенной клеточной плотности, и стандартными методами практически невозможно вырастить культуру из отдельной трансгенной клетки. Выросшие индивидуальные клеточные клоны в количестве не более 20 либо сильно отличались морфологически от исходной культуры, либо не проявляли биолюминесцентной активности, либо быстро ее теряли. Поэтому для получения моноклональной

hMLM3	ATGGACATCAAGGTGGTCTTCACTCTGGTGTCTTCAGCACTGGTTCAGGCTCAGAAGACCGACAT	65	
MLM3	ATGGATATAAAGGTGTCTTTACTCTTGTTTTCTCAGCATTTGGTTCAGGCACAGAAGACCGATAT	65	
	***** ** ***** ***** ***** ** ***** ***** ***** ***** ***** **		
hMLM3	TGCCGACACTGACAGAGCCTCTAACTTCGTTGCTACTGAAACCGATGCTAACCGTGGTAAGATGC	130	
MLM3	TGCAGATACTGATAGAGCCAGCAACTTTGTTGCAACTGAAACCGATGCTAACCGTGGAAAAATGC	130	
	*** ** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****		
hMLM3	CTGGTAAGAAGCTGCCACTGGCTGTTCATCATGGAATGGAGGCTAACGCATTCAAAGCTGGATGC	195	
MLM3	CTGGCAAAAACTGCCACTGGCAGTTATCATGGAATGGAAAGCAATGCTTTCAAAGCTGGCTGC	195	
	**** ** * ***** ***** ** ***** ***** ** * ** ***** ***** **		
hMLM3	ACCAGAGGATGTCTCATCTGTCTGTCCAAGATCAAGTGCCTGCCAAGATGAAGGTGTACATTCC	260	
MLM3	ACCAGGGGATGCCTTATCTGTCTTTCAAAAAATAAGTGTACAGCCAAAATGAAGGTGTACATTCC	260	
	***** ***** ** ***** ** * ** * ***** ** ***** ***** ***** *****		
hMLM3	AGGTAGATGTCACGACTACGGTGGAGACAAGAAGACTGGTCAGGCTGGTATCGTCCGAGCTATTG	325	
MLM3	AGGAAGATGTCATGATTATGGTGGTGACAAGAAAAGTGGACAGGCAGGAATAGTTGGTGCATTTG	325	
	*** ***** ** * ** ***** ***** ***** ***** ***** ** * ** * ** *****		
hMLM3	TTGACATTCCTGAGATCTCTGGATTCAAGGAGATGGCTCCTATGGAACAGTTTCATCGCTCAGGTT	390	
MLM3	TTGACATCCCGAAATCTCTGGATTTAAGGAGATGGCACCCATGGAACAGTTTCATGCTCAAGTT	390	
	***** ** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****		
hMLM3	GATCGTTGCGCTTCCTGCACTACTGGATGTCTGAAAGGACTCGCCAACGTCAAGTGTCTGAACT	455	
MLM3	GATCGTTGCGCTTCCTGCACTACTGGATGTCTCAAAGGCTTTGCCAATGTTAAGTGTCTGAACT	455	
	***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****		
hMLM3	GCTGAAGAAGTGGCTGCCTGACAGATGTGCCATTTGCTGACAAGATCCAGAAGGAGGTCCACA	520	
MLM3	CCTGAAGAAATGGCTGCCTGACAGATGTGCAAGTTTTGCTGACAAGATTCAAAAAGAGTTCCACA	520	
	***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****		
	Стоп		
hMLM3	ACATCAAAGGCATGGCTGGAGATCGTTGATAA	552	Идентичность
MLM3	ATATCAAAGGCATGGCTGGAGATCGTTGAATA	552	86.2%
	* ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *		

Рис. 2. Сравнение последовательностей исходного гена MLM3 делеционного мутанта MLuc164 изоформы люциферазы *M. longa* и его синтетического гуманизированного варианта hMLM3. Последовательность отщепляемого сигнального пептида для секреции и стоп-кодона выделены серым цветом.

линии Mel IL-hMLM3 был применен метод изоляции целых клонов после совместного выращивания на одной чашке колоний до 50–100 клеток из отдельных стабильно трансфицированных клеток. Группы клеток, с очень большой вероятностью представляющие моноклоны, были изолированы аспирацией микропипеткой под стереомикроскопом. В ходе дальнейшей селекции проводили отбор изолированных клонов на высокий уровень биолюминесцентной активности среды, а также на сохранение морфологии и скорости роста исходной культуры. В результате была получена стабильная клеточная линия Mel IL-hMLM3, постоянно экспрессирующая биолюминесцентный репортер с высокой эффективностью. Скорость роста и морфология клеток новой линии Mel IL-hMLM3 не отличались от исходной культуры. Установлено, что клеточная линия Mel IL-hMLM3 сохраняла все свои свойства как в

течение длительного трехмесячного культивирования, так и после процедур замораживания/оттаивания.

Корреляция репортерной активности с количеством клеток. Полученная моноклональная линия Mel IL-hMLM3, стабильно секретирующая мутантную люциферазу hMLM3, была проверена на корреляцию между количеством жизнеспособных клеток меланомы и репортерной активностью – биолюминесцентным сигналом от аликвот культуральной среды.

Как можно видеть (рис. 3), строгая линейная зависимость величины биолюминесцентного сигнала от количества жизнеспособных клеток Mel IL-hMLM3 наблюдается во всем диапазоне исследованных величин от 10 до 23000 клеток с коэффициентом линейной корреляции $R^2 = 0,993$. При этом сигнал от минимального образца с десятью клетками более чем в пять раз превышал фоновый сигнала от среды контроль-

ных клеток Mel II. Таким образом, в настоящем эксперименте линейный диапазон идентификации живых клеток по биолюминесцентной активности hMLM3 репортера составлял более трех порядков. Также установлено, что величина биолюминесцентного сигнала в аликвотах среды стабильна после отбора и не меняется при хранении образцов при ~4°C в течение как минимум трех суток, что расширяет возможности и условия проведения экспериментов, особенно при использовании методов высокопроизводительного скрининга.

Полученный результат показывает, что репортерная активность hMLM3 может быть надежным и чувствительным детектором для оценки в реальном времени количества жизнеспособных клеток. Поскольку количество секретируемого репортера, если он находится под контролем конститутивного промотора, отражает общую метаболическую активность меченых клеток, биолюминесцентный сигнал репортера hMLM3 в культуральной среде клеток меланомы Mel II-hMLM3 позволяет количественно оценивать в реальном времени физиологическое состояние меченых клеток или их численность, в том числе для оперативной оценки цитотоксичности различных воздействий *in vivo*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из четырех исследованных вариантов люциферазы *Metridia longa* (таблица) был выбран наиболее эффективный биолюминесцентный вариант MLM3, а также синтезирована его гуманизованная ДНК последовательность. Была получена моноклональная стабильная линия клеток меланомы человека Mel II, экспрессирующая оптимизированный репортер hMLM3 и показана возможность неинвазивного биолюминесцентного мониторинга количества метаболически активных клеток по светоизлучающей активности аликвот среды. Активность репортера hMLM3 строго коррелировала с количеством живых клеток в широком линейном диапазоне, позволяя достоверно обнаруживать биолюминесцентный сигнал даже от десяти клеток. Полученная линия Mel II-hMLM3 может быть использована для мониторинга в реальном времени жизнеспособности клеток, оценки цитотоксичности различных соединений, а также для высокопроизводительного неинвазивного скрининга противоопухолевых препаратов.

Настоящая работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда

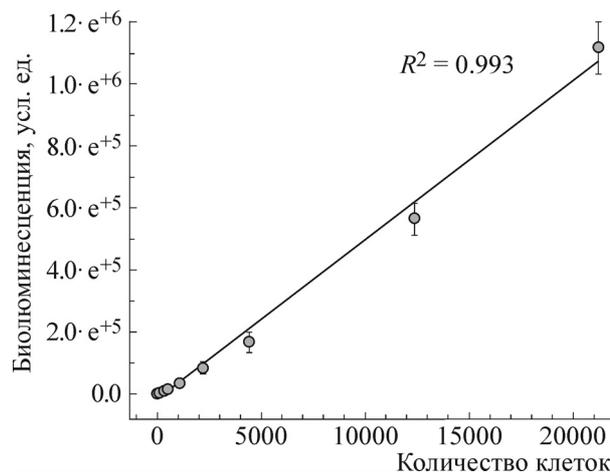


Рис 3. Зависимость интенсивности биолюминесцентного сигнала в аликвотах среды от количества жизнеспособных клеток линии меланомы человека Mel II-hMLM3 через 24 ч после посева клеток в лунки 96-луночного планшета с двукратным серийным разведением. Каждая точка – среднее значение четырех независимых измерений. Минимальная точка – ~10 клеток.

(проект № 14-35-00107) и софинансирования, предоставленного Федеральным агентством научных организаций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. V. Markova and E. S. Vysotski, *Biochemistry (Moscow)* **80**, 714 (2015).
2. S. V. Markova, S. Golz, L. A. Frank, et al., *J. Biol. Chem.* **279**, 3212 (2004).
3. V. V. Borisova, L. A. Frank, S. V. Markova, et al., *Photochem. Photobiol. Sci.* **7**, 1025 (2008).
4. S. V. Markova, M. D. Larionova, L. P. Burakova et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **457**, 77 (2015).
5. S. V. Markova, M. D. Larionova, and E. S. Vysotski, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **483**, 772 (2017). doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.12.067.
6. S. E. Lupold, T. Johnson, W. H. Chowdhury, et al., *PLoS One* **7**, e36535 (2012).
7. G. A. Stepanyuk, H. Xu, C. K. Wu, et al., *Protein Expr. Purif.* **61** 142 (2008).
8. S. V. Markova, L. P. Burakova, and E. S. Vysotski, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **417**, 98 (2012).
9. M. Pons, P. Mancheño-Corvo, P. Martín-Duque, et al., *Adv. Exp. Med. Biol.* **624**, 252 (2008).
10. A. H. Cory, T. C. Owen, J. A. Barltrop, et al., *Cancer Commun.* **3**, 207 (1991).
11. T. N. Petersen, S. Brunak, G. von Heijne, et al., *Nature Methods*, **8**, 785 (2011).
12. И. Н. Михайлова, Д. А. Ковалевский, О. С. Бурова и др. *Сиб. Онкологич. журн.* **1**, 29 (2010).

Bioluminescence-based Real Time Monitoring of Intracellular Events without Disruption of Cells and Tissues

S.V. Markova* ** *, N.P. Malikova* **, E.S. Vysotski* **,
L.A. Frank* ** ***, and I.I. Gitelson* ** *****

**Institute of Biophysics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences,
Akademgorodok 50/50, Krasnoyarsk, 660036 Russia*

***Blokhin Russian Cancer Research Centre, Kashirskoe shosse 24, Moscow, 115478 Russia*

****Siberian Federal University, Svobodny prosp. 79, Krasnoyarsk, 660041 Russia*

The secreted reporters provide a real time monitoring of intracellular events without disruption of cells. To create human melanoma cell lines with a possibility to monitor the metabolic activity noninvasively, the effectiveness of isoforms and mutant variants of the *Metridia longa* luciferase as secreted bioluminescent reporters was compared using human melanoma cell lines Mel IL. Out of the two isoforms and two deletion mutants of the *M. longa* luciferase studied, the deletion mutant MLM3 demonstrated the highest activity during the transfection of melanoma Mel IL cells in the medium. Gene optimization of the selected MLM3 variant for expression in human cells increases the level of bioluminescent activity in Mel IL cells' medium by almost an order. Stable melanoma cell line Mel IL with a constitutive expression of humanized reporter hMLM3 was produced and characterized. A linear range for identification of living cells by the activity of hMLM3 reporter was more than three orders of magnitude with detection sensitivity as few as 10 cells.

Key words: melanoma, bioluminescent reporter, luciferase, coelenterazine, cell viability

Сдано в набор 15.02.2017	Подписано к печати 14.04.2017	Дата выхода в свет 23.05.2017	Формат 60x88 ¹ / ₈
Цифровая печать	Усл. печ. л. 26,0	Усл. кр.-отт. 3,2 тыс.	Уч.-изд. л. 26,0
	Тираж 124 экз.	Зак. 251	Цена свободная

Учредители:
Российская академия наук,
Институт биофизики клетки РАН

Издатель: Российская академия наук. Издательство «Наука»
117997, Москва, Профсоюзная ул., 90

Отпечатано в типографии «Наука», 121099, Москва, Шубинский пер., 6
