

## НАУЧНЫЙ ОБЗОР

УДК 577.32

### ЦЕЛЕНТЕРАЗИН-ЗАВИСИМЫЕ ЛЮЦИФЕРАЗЫ: СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ В МОЛЕКУЛЯРНОМ АНАЛИЗЕ

Людмила Алексеевна Франк, Василиса Валерьевна Красицкая

Институт биофизики СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН

**Автор, ответственный за переписку:** Людмила Алексеевна Франк, lfrank@yandex.ru

**Аннотация.** Обзор содержит данные о строении биolumинесцентных систем морских животных, использующих в качестве светоизлучающих белков целентеразин-зависимые люциферазы. Показано, что благодаря доступности, стабильности и высокому квантовому выходу реакций эти люциферазы, а также их генетические варианты с новыми полезными свойствами успешно используются как репортерные молекулы в разнообразных аналитических системах *in vitro* и *in vivo*. Их применение обеспечивает высокую чувствительность, простой дизайн и быстрое выполнение анализа.

**Ключевые слова:** биolumинесценция, целентеразин, люцифераза,  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемый фотопроtein, аналитические системы

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2024-65-3-245-254

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания № 0287-2022-0002.

**Для цитирования:** Франк Л.А., Красицкая В.В. Целентеразин-зависимые люциферазы: свойства и применение в молекулярном анализе // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2024. Т. 65. № 3. С. 245–254.

## SCIENTIFIC REVIEW

### COELENTERAZINE-DEPENDENT LUCIFERASES: PROPERTIES AND APPLICATION

Ludmila A. Frank, Vasilisa V. Krasitskaya

Institute of Biophysics, SB RAS, FRC KSC SB RAS

**Corresponding author:** Ludmila A. Frank, lfrank@yandex.ru

**Abstract.** The review presents data on the structure of bioluminescent systems of marine animals that use coelenterazine-dependent luciferases as light-emitting proteins. It has been shown that due to the availability, stability and high quantum yield of reactions, these luciferases, as well as their genetic variants with new useful properties, are successfully applied as reporter molecules in a variety of analytical systems *in vitro* and *in vivo*. Their use provides high sensitivity, simple design and fast analysis.

**Keywords:** bioluminescence, coelenterazine, luciferase,  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated photoprotein, analytical systems

**Financial Support.** The work was carried out within the framework of the state task No. № 0287-2022-0002.

**For citation:** Frank L.A., Krasitskaya V.V. Coelenterazine-dependent luciferases: properties and application // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Chemistry. 2024. T. 65. № 3. S. 245–254.

Подавляющее число известных на сегодняшний день светящихся организмов являются морскими обитателями. Ключевой элемент биолюминесцентных систем – ферменты-оксигеназы (люциферазы), катализирующие окисление субстрата (люциферина) с выделением света в видимой области спектра. Несмотря на то, что морские светящиеся животные принадлежат к самым разным таксонам, обладают биолюминесцентными системами разной сложности, разным строением люцифераз и механизмом реакции, все они используют в качестве люциферина соединение с одинаковой структурой, содержащей имидазопиразиноновый скелет – целентеразин (CTZ) или его близкие аналоги. Экспериментально показано, что биосинтез CTZ осуществляется копеподами [1] и, очевидно, попадает в другие организмы по трофическим цепям [2].

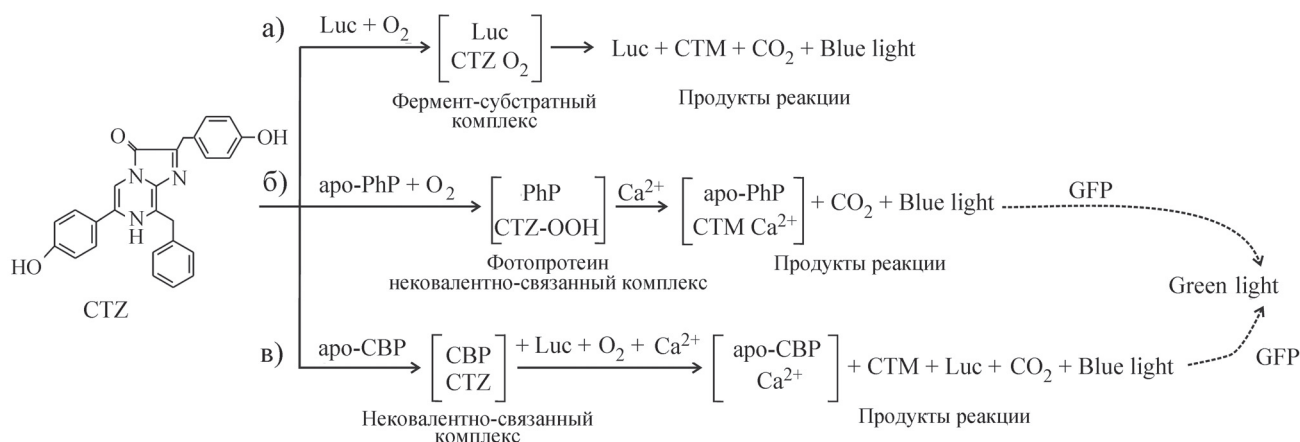
Среди целентеразин-зависимых люцифераз выделяют 2 различных по организации типа (рисунок): а) люциферазы, катализирующие окисление CTZ по кинетике Михаэлиса–Ментен с образованием целентерамида (СТМ) – декарбоксилированного производного целентеразина, а также  $\text{CO}_2$  и кванта голубого цвета; б)  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемые фотопротеины, которые представляют собой устойчивый нековалентный комплекс из апобелка и окисленного субстрата в виде гидропероксицелентеразина. Белок включает кальцийсвязывающие сайты классического EF-hand-типа, и присоединение  $\text{Ca}^{2+}$  вызывает декарбоксилирование CTZ с образованием комплекса белок–СТМ– $3\text{Ca}^{2+}$  с испусканием кванта голубого цвета. Таким образом, биолюминесценция фотопротеинов имеет характер яркой

быстрой вспышки и не зависит от присутствия кислорода в среде, а ее интенсивность всегда линейно зависит от концентрации белка.

Биолюминесцентными системами первого типа обладают, например, мягкие кораллы *Renilla*, копеподы *Metridia* и *Gaussia*, креветка *Oplophorus*; второй тип имеют медузы *Aequorea*, *Clytia*, гидроидные полипы *Obelia*, гребневники *Beroe* и другие. Приведенный перечень организмов, обладающих целентеразин-зависимой биолюминесцентной системой, далеко не исчерпывающий, более подробно они описаны в обзоре [3].

Люциферазы многих организмов выделены и изучены: они представляют собой небольшие (17–35 кДа), за редким исключением одноцепочечные белки. Кодированные гены многих из них клонированы, получены рекомбинантные аналоги этих белков, а также их генетически модифицированные аналоги с новыми полезными свойствами, что открывает возможность для их масштабного исследования не только фундаментального, но и прикладного характера.

Как было уже упомянуто, природные CTZ-зависимые люциферазы излучают свет в одном и том же диапазоне с максимумами при 460–480 нм, что можно объяснить одинаковым строением эмиттера, образующегося в результате окисления целентерамида, либо его близких аналогов в возбужденном состоянии [4]. Однако биолюминесцентные системы многих организмов содержат молекулу-переизлучатель, спектр свечения которой сдвинут в длинноволновую область ( $\lambda_{\text{макс.}} = 510$  нм), так называемый зеленый флуоресцентный белок (GFP). Он был открыт О. Шимомурой при



Типы целентеразин-зависимых биолюминесцентных систем. Luc – люцифераза; PhP – фотопроtein; CTZ – целентеразин; СТМ – целентерамид; CBP – целентеразин-связывающий белок; GFP – зеленый флуоресцентный белок

изучении биолюминесценции медузы *Aequorea aequorea* [5], а затем обнаружен в биолюминесцентных системах других организмов (например, *Clytia* и *Renilla*). Ген GFP клонирован, и к настоящему времени получены не только рекомбинантный вариант белка, но и множество его генетических вариантов с новыми полезными свойствами. Это нетоксичные белки со сдвинутыми спектрами флуоресценции и увеличенной яркостью, удлиненные различными биоспецифическими молекулами. Значение этого белка как флуоресцентного репортера в биологических, медицинских и биотехнологических исследованиях трудно переоценить.

Интересно рассмотреть локализацию субстрата в этих биолюминесцентных системах. Молекула целентеразина в силу своей гидрофобности легко проникает через клеточную мембрану и теоретически может распространиться по всему телу животного. Однако само предназначение биолюминесценции как инструмента, призванного обеспечить выживание организма (защиту от хищника, привлечение партнера и др.) предполагает ее постоянную готовность возникать в нужный момент. В  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых фотопротеинах предокисленный субстрат локализован внутри белка, который представляет собой стабильный комплекс «три в одном», и сигнал возникает мгновенно при нервном возбуждении, передаваемом потоком  $\text{Ca}^{2+}$ . В случае копепод целентеразин и люцифераза накапливаются по отдельности в специальных железах рачка и в момент возбуждения секретируются в среду, где мгновенно происходит окисление субстрата с возникновением светящегося облака [6]. В биолюминесцентной системе *Renilla* CTZ прочно, но нековалентно иммобилизован внутри специального  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого белка (СВР) и становится доступным окислению люциферазой при присоединении  $\text{Ca}^{2+}$  [7]. В экспериментах *in vitro* показано, что СВР является в несколько раз более эффективным субстратом, чем свободный целентеразин, очевидно, благодаря образованию межбелкового комплекса [8, 9]. Было обнаружено, что СВР *Renilla* может «работать» как эффективный  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимый субстрат люциферазы копеподы *Metridia longa* [10] и искусственной люциферазы NanoLuc [11], а также образовывать комплексы не только с целентеразином дикого типа, но и с его синтетическими аналогами, например целентеразином-*v* [12] и фуримазином [11].

Для биолюминесцентной реакции CTZ-зависимых люцифераз характерен высокий кван-

товый выход, например, для  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых фотопротеинов гидромедуз он составляет 20–25% [13]. Этот факт в совокупности с доступностью рекомбинантных вариантов люцифераз, простым запуском биолюминесценции (это в особенности касается фотопротеинов), наличием синтетических аналогов люциферина предопределили интерес к практическому использованию этих ферментов в качестве эффективных фоторепортеров в молекулярном анализе *in vitro* и *in vivo*. Три года назад нами был проведен обзор публикаций за последние 10 лет по применению CTZ-зависимых люцифераз как эффективных аналитических инструментов для биомедицинских и биотехнологических исследований [14]. Как показывает самый беглый анализ, интерес к этим исследованиям со стороны международного научного сообщества не ослабевает, однако в рамках настоящего мини-обзора будут в основном представлены результаты многолетних исследований, проводимых в Институте биофизики СО РАН. Исследования морской биолюминесценции в нашем институте были инициированы в 60-е годы прошлого века и долгое время проводились под руководством академика РАН Иосифа Исаевича Гительсона [15].

### ***Ca<sup>2+</sup>-регулируемые фотопротеины – свойства и применение***

В 1995 г. клонировали сДНК, кодирующую  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемый апофотопротейн обелин гидроидного полипа *Obelia longissima* [16], что дало импульс для интенсивного изучения этого белка: был получен его рекомбинантный аналог [17], определена его пространственная структура и предложен механизм функционирования этой системы [18, 19]. В силу высокой гомологии аминокислотных последовательностей молекулы гидроидных фотопротеинов, таких как обелин (PDB 1EL4), акворин (PDB 1EJ3), клитин (PDB 3KPX) и митрокомин (PDB 4NQG), похожи и представляют собой компактную глобулу, образованную восемью  $\alpha$ -спиралями, формирующими N- и C-домены в виде «чашек», краями соединенных друг с другом. Во внутреннюю полость молекулы обращены боковые радикалы гидрофобных аминокислот, которые обеспечивают изоляцию иммобилизованного здесь предокисленного субстрата. Три из четырех межспиральных участка включают  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающие последовательности EF-hand-типа. Аминокислоты, участвующие в локализации субстрата расположены во всех  $\alpha$ -спиралях, и

как правило, являются консервативными. Для выяснения роли отдельных аминокислотных остатков в биолюминесцентной реакции фотопротеинов сайт-направленным мутагенезом было получено и тщательно изучено около двухсот вариантов этих белков. Результаты этих исследований суммированы в недавнем подробном обзоре [20].

Параллельно исследовали возможность использования обелина и его мутантных вариантов в качестве репортеров в микроанализе *in vitro*. Были разработаны условия химического синтеза конъюгатов обелина с различными биоспецифическими молекулами (биотином, стрептавидином, гормонами, антителами и олигонуклеотидами, в том числе с ДНК (РНК) аптамерами), позволяющие максимально сохранить его биолюминесцентную активность. Эти соединения использовали как специфические метки в микроанализе для выявления целого ряда диагностически важных молекулярных мишеней (таблица).

Знание структуры активного сайта белка и ключевых аминокислотных остатков, участвующих в иммобилизации субстрата, позволило с помощью технологии сайт-направленного мутагенеза получить варианты обелина с новыми полезными свойствами – измененными спектральными характеристиками и кинетикой биолюминесцентного сигнала. Среди них были получены два варианта обелина: вариант W92F; H22E с быстрой кинетикой сигнала ( $k_d = 0,6 \text{ с}^{-1}$ ) и сдвинутым в коротковолновую область спектром ( $\lambda_{\text{макс.}} = 387 \text{ нм}$ ); вариант Y138F с замедленной кинетикой и длинноволновым сдвигом спектра ( $k_d = 6,1 \text{ с}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{макс.}} = 498 \text{ нм}$ ). Столь существенные различия сигналов позволяют осуществлять разделение белков с помощью простых широкополосных фотофильтров и временного разрешения [21]. Белки оказались стабильными и яркими, на их основе был разработан способ одновременного выявления двух мишеней в образце: одновременный иммуноанализ гонадотропных гормонов (ЛГ и ФСГ), тотального и иммуноглобулин-связанного (макро-) пролактина [22, 23], а также показаны преимущества этого подхода по сравнению с раздельным анализом мишеней. На основе этих репортеров был разработан способ выявления однонуклеотидных полиморфизмов, пригодный для проведения быстрого локального скрининга распространенности генотипов в популяции, а также выявления взаимосвязи с генетической предрасположенностью к заболеванию. Так, были исследованы полиморфизмы в гене рецептора меланокортина-1

(MC1R), ассоциированные с риском возникновения меланомы кожи [24]; полиморфизмы, связанные с нарушениями системы гемостаза [25]; ряд полиморфизмов, предположительно связанных с риском возникновения нейросенсорной тугоухости [26]; полиморфизм rs9904341 в регуляторной области гена онкомаркера сурвивина с риском возникновения рака мочевого пузыря [27, 28]. Анализ занимает 2 ч (вместе с наработкой матрицы) и существенно проще современных методов генотипирования на основе РТ ПЦР и секвенирования, а различие (более чем на порядок) значений дискриминационного фактора обеспечивает его достоверность. Эти работы проводили в сотрудничестве с медиками НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, Красноярского краевого клинического онкологического диспансера им. А.И. Крыжановского и Сибирского научно-клинического центра ФМБА России, при их проведении в краткие сроки было исследовано статистически значимое (несколько сотен) число клинических образцов ДНК, что позволило сделать достоверные выводы об их взаимосвязи с соответствующим заболеванием.

Помимо химических конъюгатов, генетическим фьюзингом были получены бифункциональные гибридные молекулы обелина со стрептавидином (Stavi-OL) и иммуноглобулин-связывающим фрагментом белка *A Staphylococcus aureus* (ZZ-OL) [29, 30]. При бактериальной экспрессии оба домена независимо формируют свои пространственные структуры и обладают свойствами «родительских» белков – способностью прочно связываться с биотином и иммуноглобулинами класса G соответственно, а также  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой биолюминесценцией. Фактически, благодаря природе полипептида, слитого с обелином, эти белки представляют собой универсальные метки, способные выявлять любые молекулярные комплексы, содержащие биотиновый или иммуноглобулиновый компонент. Кроме того, были получены гибридные белки фотопротеинов, связывающиеся с конкретными мишенями. Недавно были получены гибриды с онкомаркерами (суривин-обелин и меланомингибирующий белок MIA-обелин) как репортеры для выявления этих онкомаркеров в микроанализе конкурентного типа [31].

Уникальная способность фотопротеинов генерировать свет в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  обусловила их применение в качестве специфичного и чувствительного зонда для проведения мониторинга его внутриклеточных потоков [14, 32]. Эти

Биолюминесцентный микроанализ на основе STZ-зависимых репортеров

Группа	Мишень	Заболевание	Репортер	Образцы	LOD / линейный диапазон	Лит.
Кардиомакеры	Тропонин I (сердечная изоформа) (сTnI)*	инфаркт миокарда	NanoLuc ~ анти-сTnI ДНК аптамер	сыворотка крови	5,4 нг/мл	[51]
	Белок, связывающий жирные кислоты, сердечная изоформа (hFABP)	инфаркт миокарда	OL ~ dT <sub>30</sub>	сыворотка крови	0,04–3 нМ	[53]
			NanoLuc ~ анти-hFABP IgG	сыворотка крови	1,2 нг/мл	[51]
			Stavi-OL	буфер	0,67–162 нг/мл 5,6–90 нг/мл 1,6–50 нг/мл	[29]
Белки крови	Гемоглобин (Hb)*	сахарный диабет	бифункциональный РНК аптамер к Hb и OL	буфер	1,6–50 нМ	[54]
	Гликированный гемоглобин (HbA1c)*	сахарный диабет	OL ~ анти-HbA1c IgG	сыворотка крови	3,75–15% от тотального гемоглобина	[55]
	IgG человека, кролика, мыши	рассеянный склероз	ZZ-OL	буфер	4,1–1000 нг/мл	[30]
	Аутоантитела к основному белку миелина*	рассеянный склероз	OL ~ анти-ОБМ РНК аптамер	сыворотка крови	чувствительность 63,7% специфичность 94%	[56]
Гормоны	Лептеинизирующий (ЛГ) и фолликулостимулирующий (ФСГ) гормоны	нарушения функций генеративных органов	OL W92F,H22E ~ анти-ЛГ IgG; OL Y138F ~ анти-ФСГ IgG	сыворотка крови	0,4 и 0,34 мМЕд/мл / 1,25–160 мМЕд/мл	[22]
	Общий и макро пролактин (PRL)	гиперпролактинемия	OL W92F,H22E ~ анти-PRL IgG; OL Y138F ~ анти-hIgG	сыворотка крови	общий PRL: 3,54 ± 0,5 мМЕд/мл / 56–4500 мМЕд/мл макро PRL: 62,5–1000 нг/мл	[23]
	Свободный (FT4) и тотальный тироксин (TT4) тиреотропин ТТГ	гипертиреоз гипотиреоз	OL ~ анти-T4 IgG и OL ~ T4	сыворотка крови	0,25 нМ (FT4) 15 нМ (TT4)	[57]
			OL ~ анти-TTT IgG	сыворотка крови	0,01 мМЕд/л	[57]
Онкомаркеры	Сурвивин (Surv)	рак мочевого пузыря	OL-Surv	моча	0,2–54 нг/мл	[28]
	Белок ингибирующий активность меланомы (MIA)	меланома	OL-MIA	сыворотка крови	0,7–54 нг/мл	[31]
				сыворотка крови	4,5–500 нг/мл	[31]
циркулирующие клетки опухоли*	аденокарцинома (рак легкого)	OL ~ олигонуклеотид комплементарный к ДНК аптамеру	плазма крови	чувствительность 91,5% специфичность 75%	[58]	

Группа	Мишень	Заболевание	Репортер	Образцы	LOD / линейный диапазон	Лит.	
Инфекционные агенты	Вирус клещевого энцефалита	вирус клещевого энцефалита	14D5a-Rm7	клетки	чувствительность 89,5% специфичность 98,9 %	[44–46]	
	ДНК фрагмент вируса гепатита С	вирус гепатита С	14D5a-MLuc7	буфер	гликопро-теин Е до 45 пг	[48]	
	поверхностный антиген HbsAg	вирус гепатита В	OL ~ Stavi	буфер	$10 \cdot 10^{-7} - 10 \cdot 10^{-11}$ М	[59]	
	<i>Shigella sonnei</i> LPS	шигеллез	OL ~ анти-HbsAg IgG OL ~ анти- S.sonnei IgG	буфер буфер	0,37 нг/мл 0,25 нг/мл	[60]	
Однонуклеотидный полиморфизм	ген BIRC5 -31G>C (rs9904341)	риск развития рака мочевого пузыря	OL W92F, H22E ~dT <sup>30</sup> · OL Y138F ~ анти-FITC IgG	геномная ДНК	ОШ (доверительный интервал), р 1,71(1,01–2,89), 0,02	[27, 28]	
	гены CAT (rs494024), NCL (rs7598759), HSPAL1 (rs2227956), PCDH15 (rs7095441), PON2 (rs7785846)	риск развития нейросенсорной тугоухости				для rs494024, CC генотип: 0,34(0,16–0,72); СТ генотип: 1,96(1,01–3,78), 0,02	[26]
	ген MC1R rs 1805007 (R151C), rs 1805008 (R160W), rs 1805009 (D294H)	риск развития меланомы				2,93(1,29–6,65), 0,01 3,15(1,32–7,5), 0,01	[24]
	ген FV (G1691A)	риск развития венозных тромбозов				популяционных исследований не проводилось	[25]
	ген FII (G20210A)						
	ген FVII (G10976A)						
	ген MTHFR (C677T)						

Обозначения: OL – Ca<sup>2+</sup>-регулируемый фотопротейн обелин; Rm7 – мутантный вариант люциферазы *Renilla mulleri*; MLuc7 – изоформа люциферазы *Metridia longa*; Stavi – стрептавидин; ZZ – иммуноглобулин-связывающий домен белка A *Staphylococcus aureus*; 14D5a – миниантитело мыши к вирионному белку вируса клещевого энцефалита; (–) или (~) – химический конъюгат или гибридный белок соответственно.

\*Анализ на основе аптамерной сенсорики.

белки имеют малый размер, активны в широком диапазоне рН, нетоксичны, а целентеразин легко проникает через клеточные мембраны. Значительный интерес представляет изучение внутриклеточной передачи сигналов ионами кальция, которая регулирует многочисленные клеточные процессы, включая сокращение мышц, нейронные сигналы, экспрессию генов, пролиферацию, апоптоз и т.д. С помощью методов молекулярной биологии конструируют клеточные линии, экспрессирующие фотопротейн, а также гибридные белки, содержащие сигнальные полипептиды, позволяющие адресно направлять репортер в различные компартменты клетки [33]. Поскольку концентрация кальция в цитоплазме и различных клеточных органеллах существенно варьирует, проводятся поиски генетических вариантов фотопротейнов с разной чувствительностью к  $\text{Ca}^{2+}$ , низкой чувствительностью к  $\text{Mg}^{2+}$ , различными спектральными и кинетическими характеристиками биолюминесцентного сигнала. Оказалось, что даже природные фотопротейны, несмотря на схожесть аминокислотных последовательностей, имеют разные диапазоны зависимости биолюминесцентного сигнала от концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  и разную чувствительность к присутствию  $\text{Mg}^{2+}$  [34, 35], однако, в целом они укладываются в диапазон  $10^{-8}$ – $10^{-4}$  М. Варианты фотопротейнов с пониженной чувствительностью, пригодных для измерения  $\text{Ca}^{2+}$ , например в митохондриях (миллимолярный диапазон), получают сайт-направленным мутагенезом и с помощью синтетических аналогов CTZ [36]. Не меньший интерес вызывают и варианты фотопротейнов с повышенной чувствительностью к  $\text{Ca}^{2+}$  и одновременным сдвигом спектра свечения в длинноволновую область [37]. Это перспективные репортеры для мониторинга сигналов в клетках и тканях.

### **CTZ-зависимые люциферазы – свойства и применение**

Биолюминесцентная система мягкого коралла *Renilla reniformis* имеет самую длительную историю изучения: первая публикация появилась в 1961 г. [4]. Было показано, что люцифераза является односубъединичным белком ( $M_r = 35$  кДа), с температурным оптимумом 32 °С и максимумом биолюминесценции при 480 нм. Информация о гене, кодирующем этот белок и получении его рекомбинантного варианта была опубликована в 1991 г. [38]. Позднее были получены рекомбинантные белки биолюминесцентной системы *Renilla muelleri* [8].

Как уже упоминалось выше, биолюминесцентная система *Renilla* включает три белка: люциферазу,  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимый целентеразин-связывающий белок (СВР) и зеленый флюоресцентный белок. Благодаря этому составу биолюминесценция животного контролируется нервной системой и *in vivo* имеет сдвинутый в длинноволновую область спектр с максимумом сигнала при 509 нм. Зеленое свечение возникает благодаря безызлучательному переносу энергии возбужденного продукта окисления (целентерамида) на GFP, причем его интенсивность в несколько раз превосходит интенсивность голубого свечения (в отсутствие GFP). Этот процесс используется в различных аналитических системах на основе BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer), которые широко применяют для фундаментальных и прикладных исследований. К настоящему времени получено множество генетических вариантов как люциферазы, так и GFP, с новыми полезными свойствами: нетоксичностью, расширенным диапазоном спектра флюоресценции и т.д. [14].

Особый интерес представляют варианты природной секретируемой биолюминесцентной системы, найденные, например, в морских копеподах *Metridia* и *Gaussia*, креветках *Oplophorus gracilirostris* и др. [6]. Были клонированы сДНК люцифераз 12 видов копепод, получены их рекомбинантные варианты дикого типа [39, 40] и ряд мутантных вариантов. На N-конце всех этих люцифераз расположен лидерный пептид, обеспечивающий их секрецию во внеклеточное пространство. Аминокислотная последовательность люцифераз содержит относительно большое число высоко консервативных цистеиновых остатков (в *Metridia longa* и *Gaussia princeps* по 10 остатков цистеина), образующих несколько Cys-Cys мостиков, что, очевидно, определяет высокую стабильность белков. Применение секретируемых люцифераз в качестве внутриклеточного репортера позволяет проводить высокопроизводительный неинвазивный мониторинг метаболически активных клеток в режиме реального времени без их лизиса. Так, в работе [41] была получена клеточная линия меланомы человека Mel IL-hMLM3, стабильно экспрессирующая гуманизированный вариант люциферазы *Metridia longa* и показана возможность неинвазивного биолюминесцентного мониторинга числа метаболически активных клеток по биолюминесценции аликвот среды в образцах, содержащих от 23 000 до 10 клеток. Клетки могут быть использованы для

мониторинга их жизнеспособности, оценки цитотоксичности различных соединений, а также для высокопроизводительного неинвазивного скрининга противоопухолевых препаратов.

Большое число цистеиновых остатков усложняет получение этих белков с помощью бактериальной экспрессии, однако найденные эмпирически условия фолдинга открывают возможность для использования их в качестве репортеров в анализе *in vitro* [10, 42].

Несколько лет назад американская фирма «Promega» выпустила на рынок созданную искусственно целентеразин-зависимую люциферазу NanoLuc, а также новый синтетический вариант целентеразина – фуримазин [43]. Название Nano было ей присвоено как наименьшей из известных к тому времени люцифераз (Мм = 19 кДа). Белок представляет собой генетически модифицированную каталитическую субъединицу люциферазы глубоководной креветки *Oplophorus gracilirostris*, нестабильную в отсутствие большой субъединицы (35 кДа). В результате мутагенеза (всего было заменено 16 аминокислот) была получена стабильно функционирующая люцифераза, которая при использовании фуримазина в качестве субстрата обладает в сотни раз более высокой активностью, высокой термостабильностью и уникальной длительностью сигнала ( $t_{1/2} = 2,5$  ч). Наличие коммерчески доступной люциферазы и субстрата, а также готовых наборов для разнообразного применения быстро обеспечили популярность этой системе в качестве эффективного аналитического инструмента [14].

Люциферазы, в отличие от фотопротеинов, чувствительны к химическим модификациям и при попытке синтезировать специфические репортеры теряют значительную часть активности. Поэтому для анализа *in vitro* чаще всего получают гибридные варианты люцифераз, генетически-слитых с адресными полипептидами [6, 44–49], или конструируют варианты, содержащие уникальные аминокислоты, обеспечивающие сайт-направленную химическую модификацию, которая практически не затрагивает биолюминесцентную функцию белка [50, 51].

Востребованным вариантом молекулярного анализа являются однофазные тест-системы, когда все события происходят в одном объеме и исключаются длительные процедуры сорбции-десорбции и промывки. Один из вариантов такой системы основан на использовании так называемых сплит-систем, когда молекула люциферазы представлена в виде двух фрагментов, удлинённых исследуемыми адресными полипептидами и способных комплементировать с восстановлением биолюминесцентной активности при сближении исследуемых биоспецифичных компонентов. Пожалуй, наиболее успешным оказалось применение этой системы в случае люциферазы NanoLuc, где разработана пара фрагментов, способных комплементировать с восстановлением активности и предоставляется в виде коммерческого продукта NanoBiT system [14]. Недавно подобная система была предложена нами для выявления вируса клещевого энцефалита в клещах [52].

Приведенные данные показывают, что целентеразин-зависимые люциферазы являются эффективным аналитическим инструментом, пригодным как для проведения фундаментальных исследований, так и для прикладного использования в современной биотехнологии и биомедицине. Доступность рекомбинантных аналогов люцифераз дикого типа, а также их генетически модифицированных вариантов с новыми полезными свойствами, стабильность при получении специфичных меток с помощью химического конъюгирования или генетического фьюзинга, а также при длительном хранении в растворе, в замороженном и лиофилизированном виде, высокая чувствительность анализа, часто сравнимая с чувствительностью радиоизотопного анализа, определяют перспективность разработки различных аналитических систем на их основе.

К сожалению, объем настоящего обзора не позволяет рассказать подробнее о глубоких фундаментальных исследованиях, направленных на установление структурных закономерностей и механизма реакции CTZ-зависимых люцифераз и других белков этих биолюминесцентных систем. Однако авторы надеются, что смогли пробудить интерес читателя к такому уникальному природному явлению, как биолюминесценция, и научным исследованиям в этой области.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Oba Y., Kato S., Ojika M., Inouye S. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2009. Vol. 390. P. 684.
2. Takenaka Y., Yamaguchi A., Shigeri Y. // J. Plankton Res. 2017. Vol. 39. Iss. 3. P. 369.



3. Маркова С.В., Высоцкий Е.С. // Биохимия. 2015. Т. 80. № 6. С. 845.
4. Shimomura O., Yampolsky I. // *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods*, 3rd ed.; World Scientific Publishing: Singapore, 2019.
5. Shimomura O. // *FEBS Letters*. Vol. 104. N 2. P. 220.
6. Markova S.V., Larionova M.D., Vysotski E.S. // *Photochem. Photobiol.* 2019. Vol. 95. P. 705.
7. Stepanyuk G.A., Liu Z.J., Markova S.S., Frank L.A., Lee J., Vysotski E.S., Wang B.C. // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2008. Vol. 7. P. 442.
8. Titushin M.S., Markova S.V., Frank L.A., Malikova N.P., Stepanyuk G.A., Lee J., Vysotski E.S. // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2008. Vol. 7. P. 189.
9. Titushin M.S., Feng Y., Lee J., Vysotski E. S., Liu Z.-J. // *Protein Cell*. 2011. Vol 2. N 12. P. 9572.
10. Borisova V.V., Frank L.A., Markova S.V., Burakova L.P., Vysotski E.S. // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2008. Vol. 7. P. 1025.
11. Kudryavtsev A.N., Krasitskaya V.V., Efremov M.K., Zangeeva S.V., Rogova A.V., Tomilin F.N., Frank L.A. // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. Vol. 24. P. 2144.
12. Stepanyuk G.A., Unch J., Malikova N.P., Markova S.V., Lee J., Vysotski E.S. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2010. Vol. 398. P. 1809.
13. Malikova N.P., Ereemeeva E.V., Gulnov D.V., Natashin P.V., Nemtseva E.V., Vysotski E.S. // *Photochem. Photobiol.* 2022. Vol. 98. P. 276.
14. Krasitskaya V.V., Bashmakova E. E., Frank L.A. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21. P. 7465.
15. Франк Л.А. // *Биофизика для экологии и медицины: К 90-летию академика РАН И.И. Гительсона*. Новосибирск, 2019. С. 72.
16. Illarionov B.A., Bondar V.S., Illarionova V.A., Vysotski E.S. // *Gene*. 1995. Vol. 153. N P. 273.
17. Illarionov B.A., Frank L.A., Illarionova V.A., Bondar V.S., Vysotski E.S., Blinks J.R. // *Methods Enzymol.* 2000. Vol. 305. P. 223.
18. Liu Z.J., Vysotski E.S., Chen C.J., Rose J.P., Lee J., Wang B.C. // *Protein Sci.* 2000 Vol. 9. N 11. P. 2085.
19. Vysotski E.S., Lee J.J. // *Acc. Chem. Res.* 2004. Vol. 37. N 6. P. 405.
20. Ereemeeva E.V., Vysotski E.S. // *Photochem. Photobiol.* 2019. Vol. 95. N 1. P. 8.
21. Frank L.A., Borisova V.V., Markova S.V., Malikova N.P., Stepanyuk G.A., Vysotski E.S. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2008. Vol. 391. P. 2891.
22. Krasitskaya V.V., Kudryavtsev A.N., Shimomura O., Frank L.A. // *Anal. Methods*. 2013. Vol. 5. P. 636.
23. Kudryavtsev A.N., Krasitskaya V.V., Petunin A.I., Burakov A.Y., Frank L.A. // *Anal. Chem.* 2012. Vol. 84. P. 3119.
24. Bashmakova E.E., Krasitskaya V.V., Bondar A.A., Eremina E.N., Slepov E.V., Zukov R.A., Frank L.A. // *Talanta*. 2018. Vol. 189. P. 111.
25. Bashmakova E.E., Krasitskaya V.V., Frank L.A. // *Comb. Chem. High Throughput. Screen.* 2015. Vol. 18. P. 930.
26. Башмакова Е.Е., Красицкая В.В., Юшкова А.Д., Добрецов К.Г., Франк Л.А. // *Вестник оториноларингологии*. 2021 Т. 86. № 1. С. 15.
27. Башмакова Е.Е., Панамарев Н.С., Кудрявцев А.Н., Черняев Д.В., Слепов Е.В., Зуков Р.А., Франк Л.А. // *Сибирский онкологический журнал*. 2022. Т. 21. № 4. С. 64.
28. Панамарев Н.С., Башмакова Е.Е., Кудрявцев А.Н., Черняев Д.В., Мазаев А.В., Слепов Е.В., Зуков Р.А., Франк Л.А. // *Вопросы онкологии*. 2023. Т. 69. № 2. С. 308.
29. Bashmakova E.E., Krasitskaya V.V., Kudryavtsev A.N., Grigorenko V.G., Frank L.A. // *Photochem. Photobiol.* 2017. Vol. 93. N 2. P. 548.
30. Krasitskaya V.V., Bashmakova E.E., Kudryavtsev A.N., Vorobyeva M.A., Shatunova E.A., Frank L.A. // *Rus. J. Bioorgan Chem.* 2020. Vol. 46. N 6. P. 1004.
31. Bashmakova E.E., Panamarev N.S., Kudryavtsev A.N., Frank L.A. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2022. Vol.598. P. 69.
32. Высоцкий Е.С., Маркова С.В., Франк Л.А. // *Молекулярная биология*. 2006. Т. 40. С. 404.
33. Bonora M., Giorgi C., Bononi A., Marchi S., Paternani S., Rimessi A., Rizzuto R., Pinton P. // *Nat. Protoc.* 2013. Vol. 8 P. 2105.
34. Malikova N.P., Burakova L.P., Markova S.V., Vysotski E.S. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2014. Vol. 406. P. 5715–5726.
35. Malikova N.P., Borgdor A.J., Vysotski E.S. // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2015. Vol. 14. P. 2213.
36. De la Fuente S., Fonteriz R.I., de la Cruz P.J., Montero M., Alvarez J. // *Biochem. J.* 2012. Vol. 445. P. 371.
37. Bakayan A., Picaud S., Malikova N.P., Tricoire L., Lambolez B., Vysotski E.S., Peyriéras N. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21. N 21. P. 7846.
38. Lorenz W.W., McCann R.O., Longiaru M., Cormier M.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991. Vol. 88. P. 4438.
39. Markova S.V., Golz S., Frank L.A., Kalthof B., Vysotski E.S. // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. P. 3212.
40. Markova S.V., Larionova M.D., Burakova L.P., Vysotski E.S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015. Vol. 457. P. 77.
41. Маркова С.В., Маликова Н.П., Высоцкий Е.С., Франк Л.А., Гительсон И.И. // *Биофизика*. 2017. Т. 62. № 3. С. 618.
42. Markova S.V., Larionova M.D., Vysotski E.S. // *Methods Mol. Biol.* 2022. Vol. 2524. P. 59.
43. Hall M.P., Unch J., Binkowski B.F., Valley M.P., Butler B.L., Wood M.G., Otto P., Zimmerman K., Vidugiris G., Machleidt T., Robers M.B., Benink H.A., Eggers C.T., Slater M.R., Meisenheimer P.L., Klaubert D.H., Fan F., Encell L.P., Wood K.V. // *ACS Chem. Biol.* 2012. Vol. 7. P. 1848.
44. Burakova L.P., Kudryavtsev A.N., Stepanyuk G.A., Baykov I.K., Morozova V.V., Tikunova N.V., Dubova M.A., Lyapustin V.N., Yakimenko V.V., Frank L.A. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2015. Vol. 407. N 18. P. 5417.

45. Kudryavtsev A.N., Burakova L.P., Frank L.A. // *Anal. Methods*. 2017. Vol. 9. P. 2252.
46. Кудрявцев А.Н., Буракова Л.П., Баринова К.А., Франк Л.А. // *Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология*. 2020. Т. 13. № 3. С. 310.
47. Frank L.A. // *J. Siberian Federal University. Biology*. 2018. Vol. 11. N 2. P. 166.
48. Larionova M.D., Markova S.V., Tikunova N.V., Vysotski E.S. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21. N 14. P. 4971.
49. Патент РФ 2513686.
50. Engelen W., van de Wiel K.M., Meijer L.H.H., Saha B., Merckx M. // *Chem. Commun.* 2017. Vol. 53. P. 2862.
51. Krasitskaya V.V., Efremov M.K., Frank L.A. // *Bioconjug. Chem.* 2023. Vol. 34. N 7. P. 1282.
52. Патент РФ № 2784817.
53. Krasitskaya V.V., Goncharova N.S., Biriukov V.V., Bashmakova E.E., Kabilov M.R., Baykov I.K., Sokolov A.E., Frank L.A. // *Photochem. Photobiol.* 2020. Vol. 96. P. 1041.
54. Davydova A., Krasitskaya V., Vorobjev P., Timoshenko V., Tupikin A., Kabilov M., Frank L., Venyaminova A., Vorobyeva M. // *RSC Adv.* 2020. Vol. 10. P. 32393.
55. Davydova A., Vorobyeva M., Bashmakova E., Vorobjev P., Krasheninina O., Tupikin A., Kabilov M., Krasitskaya V., Frank L., Venyaminova A. // *Anal. Biochemistry*. 2019. Vol. 570. P. 43.
56. Krasitskaya V.V., Chaukina V.V., Abroskina M.V., Vorobyeva M.A., Ilminskaya A.A., Prokopenko S.V., Nevinsky G.A., Venyaminova A.G., Frank L.A. // *Anal. Chim. Acta.* 2019. Vol. 1064. P. 112.
57. Petunin A.I., Vysotski E.S., Frank L.A. // *Anal. Biochem.* 2004. Vol. 305. P. 240.
58. Bashmakova E.E., Krasitskaya V.V., Zamay G.S., Zamay T.N., Frank L.A. // *Talanta.* 2019. Vol. 199. P. 674.
59. Борисова В.В., Пышная И.А., Пышный Д.В., Франк Л.А. // *Биоорганическая химия*. 2008. Т. 34. С. 792.
60. Frank L., Markova S., Rimmel N., Vysotski E., Gitelson I. // *Luminescence.* 2007. Vol. 22. P. 215.

### Информация об авторах

Людмила Алексеевна Франк – гл. науч. сотр. Института биофизики СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН, рук. лаборатории биоллюминесцентных и экологических технологий, доктор биол. наук (lfrank@yandex.ru);

Василиса Валерьевна Красицкая – ст. науч. сотр. Института биофизики СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН, лаборатории биоллюминесцентных и экологических технологий, канд. биол. наук (vasilisa.krasitskaya@gmail.com).

### Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Соблюдение этических стандартов

В данной работе отсутствуют исследования человека и животных.

Статья поступила в редакцию 30.10.2023;  
одобрена после рецензирования 12.11.2023;  
принята к публикации 14.11.2023.