

ЦЕЛЕНТЕРАЗИН-ЗАВИСИМЫЕ ЛЮЦИФЕРАЗЫ

Обзор

© 2015 С.В. Маркова, Е.С. Высоккий*

Институт биофизики СО РАН, лаборатория фотобиологии,
Академгородок, 50, 660036 Красноярск; факс: +7(391)243-3400,
электронная почта: eugene.vysotski@gmail.com

Поступила в редакцию 25.02.15
После доработки 04.03.15

Биолюминесценция – явление, широко представленное в природе. Светящиеся организмы встречаются среди бактерий, грибов, простейших, кишечнорастворимых, червей, моллюсков, насекомых и рыб. Исследования биолюминесцентных систем различных организмов выявили интересную особенность – несмотря на одинаковый конечный результат биохимического процесса – излучение кванта света в видимом диапазоне спектра, механизмы, лежащие в его основе, значительно различаются у представителей различных таксонов. Среди нескольких субстратов биолюминесцентных реакций, идентифицированных в морских светящихся организмах, наиболее часто используются люциферины имидазопиразинового типа – целентеразин и *Cypridina* люциферин. Несмотря на один и тот же субстрат, биолюминесцентные белки, катализирующие светоизлучающие реакции в таксономически далеких друг от друга светящихся организмах, не обнаруживают никакого сходства между собой как по аминокислотным последовательностям, так и по пространственным структурам. В обзоре рассмотрены люциферазы различных светящихся организмов, использующих в качестве субстрата целентеразин или *Cypridina* люциферин, а также модификации этих белков, улучшающие их физико-химические и биолюминесцентные свойства и, следовательно, их возможности для применения в биолюминесцентном биоимиджинге *in vivo*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: биолюминесценция, люцифераза, люциферин, целентеразин.

Биолюминесценция – явление, широко представленное в природе. Светящиеся организмы встречаются среди бактерий, грибов, простейших, кишечнорастворимых, червей, моллюсков, насекомых и рыб. В настоящее время насчитывается несколько тысяч биолюминесцентных видов среди представителей более чем 700 родов. Хотя среди обитателей суши и встречаются светящиеся виды (бактерии, насекомые, черви и грибы), наиболее широко способность к биолюминесценции распространена среди морских организмов (рис. 1). Например, на больших глубинах, куда никогда не проникает свет, более 90% организмов – светящиеся [1, 2]. Предполагается, что биолюминесценция связана со зрительной функцией организмов и часто используется для межвидовой и внутривидовой коммуникации, маскировки от хищников, отпугивания хищников вспышками света и привлечения пищи свечением. Однако во многих случаях функциональная роль биолюминесценции для жизнедеятельности конкретных организмов до сих пор неясна.

Биохимические исследования биолюминесцентных систем различных организмов выявили интересную особенность биолюминесценции – оказалось, что, несмотря на одинаковый конечный результат биохимического процесса – излучение кванта света в видимом диапазоне спектра, механизмы, лежащие в его основе, значительно различаются у представителей различных таксонов. Различными оказались не только субстраты и кофакторы, вовлеченные в реакции биолюминесценции, но и ферменты, катализирующие эти реакции [3]. Поэтому «люцифераза» и «люциферин» – используемые в литературе термины для обозначения ферментов и субстратов биолюминесцентных реакций, – скорее понятие собирательное и функциональное, чем структурно-химическое.

Среди нескольких субстратов светоизлучающих реакций, идентифицированных в морских светящихся организмах, наиболее часто используются люциферины имидазопиразинового типа (рис. 2, а). Целентеразин идентифицирован как субстрат реакции в таких таксономически далеких друг от друга светящихся организмах, как мягкий коралл *Renilla* [4], декаподный

* Адресат для корреспонденции.

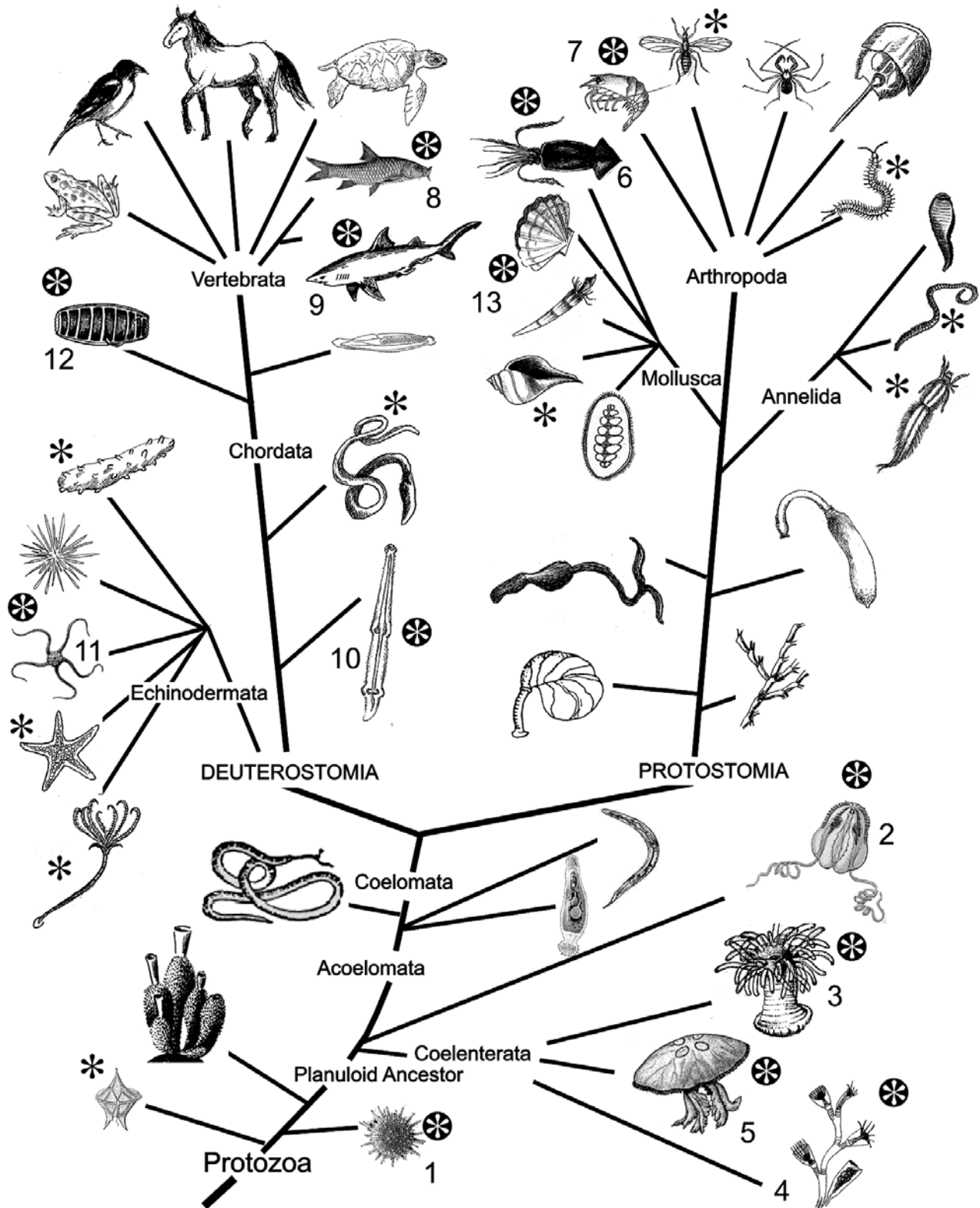
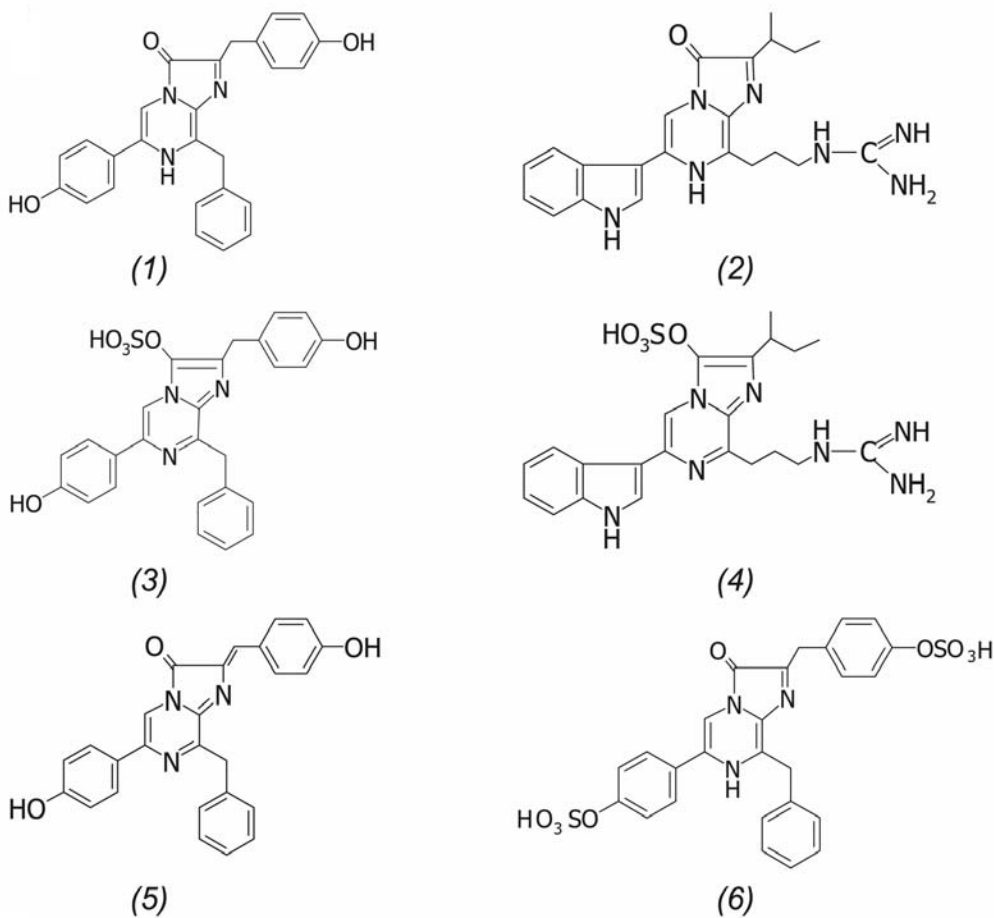


Рис. 1. Филогенетическое древо. Таксоны, включающие светящиеся виды, отмечены звездочкой черного цвета. Идентифицированные филогенетические группы, представители которых используют люциферины имидазопиразинового типа как субстрат биolumинесцентной реакции, отмечены звездочкой белого цвета: радиоларии (1), ктенофоры (2), кишечнополостные (коралловые полипы (3), гидроиды (4), сцифоидные медузы (5)), кальмары (6), ракообразные (7), некоторые костные рыбы (8) и акулы (9), щетинкочелюстные (10), офиуры (11), оболочники (12), моллюски (13)

a



б

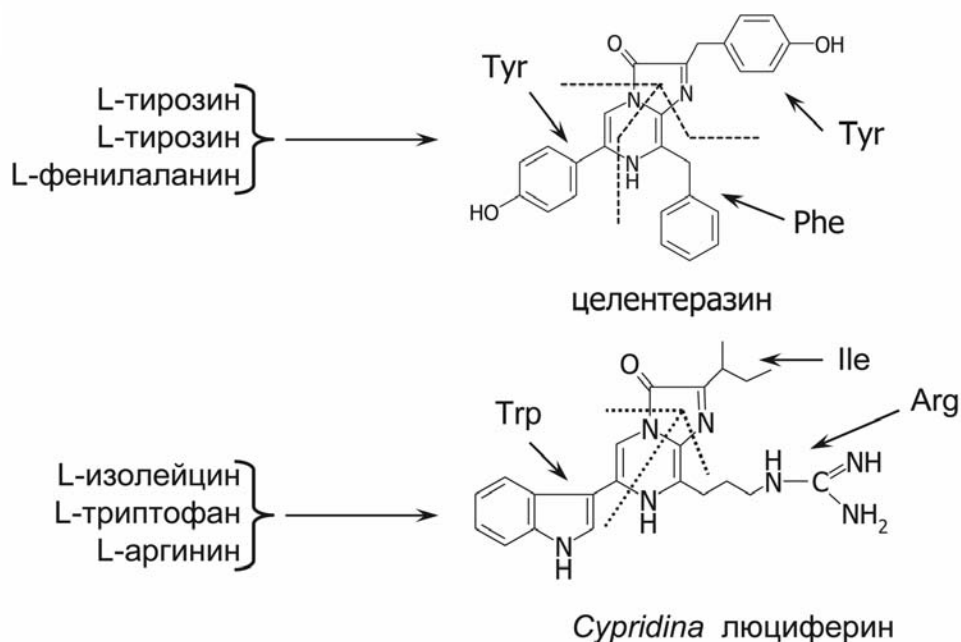


Рис. 2. *a* – Люциферины имидазопиразинового типа. Целентеразин (1), *Cypridina* (*Vargula*) люциферин (2), 3-енолсульфат целентеразина (3), 3-енолсульфат *Cypridina* люциферина (4), дегидроцелентеразин (5) и целентеразин дисульфат (6); *б* – предполагаемая схема биосинтеза целентеразина и *Cypridina* люциферина в копеподах и остракодах из L-аминокислот

рак *Oplophorus* [5, 6], сцифоидная медуза *Periphylla* [7, 8], копеподы [9, 10], остракода *Conchoecia* [11], цефалопода *Vampyroteuthis* [12], рыба *Benthoosema pterotum* [13] и других (рис. 1). Ca^{2+} -регулируемые фотопротеины гидромедуз и ктенофор содержат 2-гидроперокси-производное целентеразина [3]. Кальмары *Watasenia* и *Symplectoteuthis*, а также моллюск *Pholas dactylus* используют производные целентеразина — субстратом биоломинесцентной реакции кальмара *Watasenia* является целентеразиндисульфат [14], а кальмара *Symplectoteuthis* [15] и моллюска *Pholas dactylus* [16] — дегидроцелентеразин. *Cypridina* люциферин служит субстратом люцифераз остракод [17], а также рыб *Porichthys notatus*, *Apogon* и *Parapriacanthus* [18]. Вполне вероятно, что многие светящиеся организмы, использующие люциферины имидазопиразинового типа для биоломинесценции, получают эти соединения по пищевым цепям, как это показано для светящейся рыбы *Porichthys notatus* (*Cypridina* люциферин) [19, 20] и медузы *Aequorea* (целентеразин) [21].

В настоящее время синтез *de novo* целентеразина и *Cypridina* люциферина показан только для представителей светящихся ракообразных — копепод и остракод семейства Cypridinidae. С помощью меченых изотопами L-аминокислот для кормления раков *Metridia pacifica* и *Cypridina hilgendorffii* было установлено, что копеподы синтезируют целентеразин из двух молекул тирозина и одной молекулы фенилаланина [22], у *Cypridina* люциферин в остракодах синтезируется из триптофана, изолейцина и аргинина [23] (рис. 2, б). По-видимому, имидазопиразиноновое кольцо образуется либо в результате циклизации трипептида ($\text{H}_2\text{N-Phe-Tyr-Tyr-COOH}$ и $\text{H}_2\text{N-Arg-Trp-Ile-COOH}$ в случае целентеразина и *Cypridina* люциферина соответственно), происходящей аналогично формированию хромофора GFP [3] и включающей дополнительную стадию декарбоксилирования, либо поэтапно в процессе нерибосомального синтеза [24], что, на наш взгляд, наиболее вероятно. Необходимо отметить, что целентеразин в достаточно больших количествах обнаружен и в ряде несветящихся морских животных [3, 25].

Особое место среди люциферинов имидазопиразинового типа занимают 3-енолсульфат-производные (рис. 2, а). В настоящее время эти соединения обнаружены в светящемся морском коралле *Renilla reniformis* [26] и остракодах *Cypridina hilgendorffii* [27]. Фактически 3-енолсульфат-производные целентеразина и *Cypridina* люциферина являются прелюциферинами. Превращение этих соединений в активный субстрат происходит под действием сульфо-

трансферазы, катализирующей перенос сульфатной группы от 3-енолсульфат целентеразина (или 3-енолсульфат *Cypridina* люциферина) на акцептор — фосфоаденазинфосфат (PAP) [26, 27]. В результате образуются целентеразин (или *Cypridina* люциферин) и фосфоаденазин-S-фосфосульфат (PAPS). Эта реакция обратима, т.е. сульфотрансфераза может катализировать и образование 3-енолсульфат-производных имидазопиразинонов [27]. В этом случае донором сульфатной группы служит PAPS. Поскольку 3-енолсульфат-производные имидазопиразинонов значительно более стабильны в водных растворах, предполагается, что эти соединения обеспечивают резервный пул субстрата в светящихся морских организмах, использующих либо целентеразин, либо *Cypridina* люциферин в биоломинесцентной реакции.

ОСНОВНЫЕ ТИПЫ ЦЕЛЕНТЕРАЗИН-ЗАВИСИМЫХ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ СИСТЕМ

Биоломинесцентные системы, использующие имидазопиразиноновые соединения в качестве субстрата реакции, можно разделить на два типа — люциферазный и фотопротеиновый (рис. 3). Биоломинесцентные реакции, катализируемые люциферазами, — это типичные ферментативные реакции, в которых субстрат окисляется кислородом с образованием продукта (оксилюциферина) в возбужденном состоянии, переход которого в основное состояние сопровождается излучением света. Люцифераза как обычный фермент делает несколько оборотов, полностью перерабатывая субстрат. К этому типу относятся биоломинесцентные системы морских копепод, креветки *Oplophorus*, остракод, сцифоидных медуз, а также коралла *Renilla* [3]. В случае биоломинесцентной системы фотопротеинового типа белок формирует с субстратом устойчивый фермент-субстратный комплекс, способный существовать длительное время. Так, наиболее изученные в настоящее время Ca^{2+} -регулируемые фотопротеины гидромедуз и ктенофор [3, 28–30] представляют собой комплекс, состоящий из апобелка, с которым прочно, но нековалентно связан активированный кислородом целентеразин, 2-гидропероксицелентеразин, образующийся при формировании фотопротеина из апобелка, целентеразина и молекулярного кислорода.

Биоломинесцентная реакция инициируется в ответ на связывание ионов кальция с Ca^{2+} -связывающими сайтами на поверхности молекулы белка. Связывание Ca^{2+} вызывает небольшие кон-

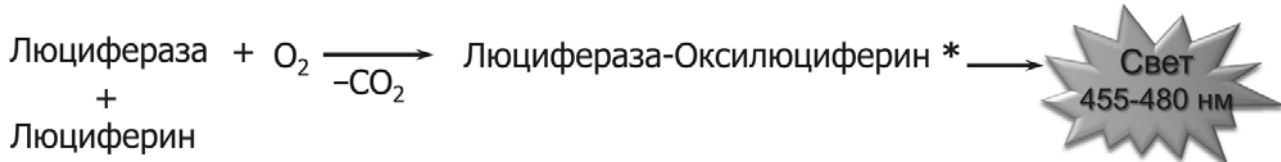
формационные изменения в субстрат-связывающей полости белка, которые нарушают систему водородных связей, стабилизирующую 2-гидропероксицелентеразин, запуская тем самым реакцию окислительного декарбоксилирования, ведущую к образованию продукта в возбужденном состоянии [31]. В отличие от Ca^{2+} -регулируемых фотопротеинов, фотопротеины из кальмара *Symplectoteuthis oualaniensis* [15] и моллюска *Pholas dactylus* [16], симплектин и фолазин, представляют собой комплекс из белка и ковалентно связанного с ним целентеразина, который формируется при связывании дегидроцелентеразина с апобелком. БиOLUMИНЕСЦЕНТНАЯ реакция фотопротеина кальмара инициируется O_2 и K^+ [15], фотопротеина моллюска – активными формами кислорода [16]. Поскольку в фотопротеинах субстрат, окисление которого необходимо для излучения света, уже связан, они, в отличие от люцифераз, могут реагировать только один раз, т.е. не могут совершать несколько оборотов, как обычный фермент. Следует отметить, что, так как в реакции участвует одна молекула, количество излученного света всегда пропорционально количеству белка. Это свойство весьма удобно при использовании фо-

топротеинов в качестве метки в различных типах биOLUMИНЕСЦЕНТНОГО микроанализа [29].

РАЗНООБРАЗИЕ ЦЕЛЕНТЕРАЗИН-ЗАВИСИМЫХ ЛЮЦИФЕРАЗ

Несмотря на большое разнообразие светящихся морских организмов, использующих целентеразин в качестве субстрата биOLUMИНЕСЦЕНТНОЙ реакции, в настоящее время клонированы гены, кодирующие только четыре типа целентеразин-зависимых люцифераз (табл. 1). Еще несколько типов люцифераз из различных таксонов охарактеризованы лишь частично (табл. 2). Все клонированные целентеразин-зависимые люциферазы (табл. 1) относятся к группе кофактор-независимых монооксигеназ, так как катализируют простую реакцию (рис. 3), в которой участвуют только люцифераза, субстрат (целентеразин или *Cypridina* люциферин) и молекулярный кислород. Из них только люцифераза мягкого коралла рода *Renilla* является внутриклеточным белком; остальные люциферазы, клонированные из филогенетически далеких групп морских рачков, – секретлируемые. Люци-

Люциферазный тип



Фотопротеиновый тип (Ca^{2+} -регулируемый фотопротеин)

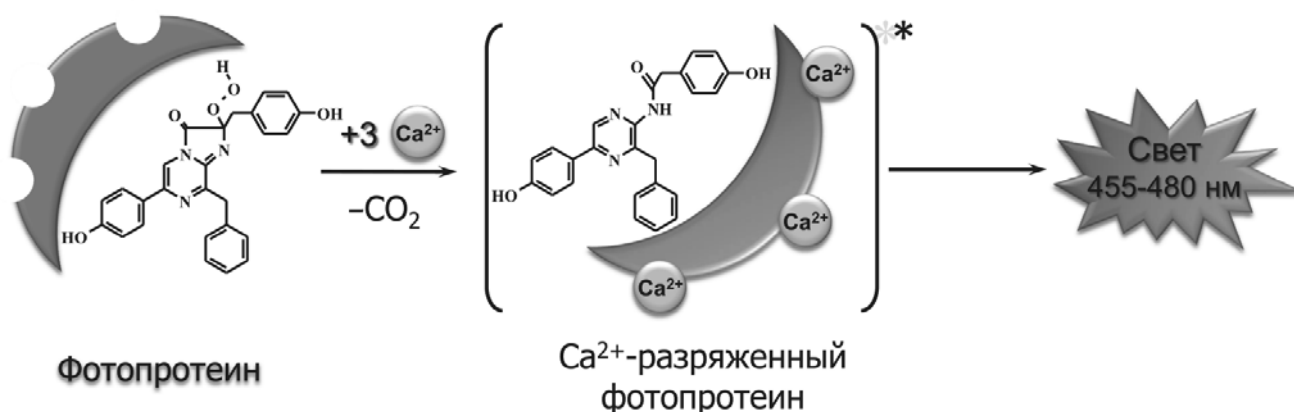


Рис. 3. Общая схема биOLUMИНЕСЦЕНТНЫХ реакций люциферазного и фотопротеинового типов. Фотопротеиновый тип показан на примере реакции Ca^{2+} -регулируемого фотопротеина, который представляет собой устойчивый комплекс белка с активированным кислородом целентеразином, 2-гидропероксицелентеразином. БиOLUMИНЕСЦЕНТНАЯ реакция инициируется связыванием ионов кальция с Ca^{2+} -связывающими сайтами белка

Таблица 1. Клонированные люциферазы, использующие целентеразин или *Cypridina* люциферин как субстрат биолоуминесцентной реакции

Люцифераза, организм-источник, тип	Вид животного (количество клонированных изоформ люциферазы)	M_r , кДа	λ_{\max} , нм	Ссылки
Субстрат целентеразин				
Люцифераза <i>Renilla</i> , мягкий коралл (внутриклеточная)	<i>Renilla reniformis</i> (1) <i>R. muelleri</i> (2)	36	480	[35] [34, 36]
Люциферазы копепод, веслоногие раки суперсемейства Augaptiloidea (секретируемые)	<i>Metridia longa</i> (3), <i>M. curticauda</i> (2), <i>M. asymmetrica</i> (2), <i>M. pacifica</i> (4), <i>M. okhotensis</i> (2)	18–24	485	[10, 37–39, 42, 43]
	<i>Gaussia princeps</i> (1)	20	473	[34]
	<i>Pleuromamma scutullata</i> (2), <i>P. xiphias</i> (3), <i>P. abdominalis</i> (2)	20–23	490–493	[42, 43]
	<i>Lucicutia ovaliformis</i> (3)	24	493	[42, 43]
	<i>Heterorhabdus tanneri</i> (4)	20–21	–	[42, 43]
Люцифераза <i>Oplophorus</i> , раки семейства Oplophoridae (секретируемая)	<i>Heterostylites major</i> (2)	23	–	[42]
	<i>Oplophorus gracilirostris</i> (1) (декаподная креветка)	22*	454	[33]
Субстрат <i>Cypridina</i> люциферин				
Ципридинидные люциферазы, ракушковые раки семейства Cypridinidae (секретируемые)	<i>Vargula hilgendorffii</i> (1)	62	465	[40]
	<i>Cypridina noctiluca</i> (1)			[41]

* Для люциферазы *Oplophorus* приведены характеристики только каталитической субъединицы.

Таблица 2. Частично охарактеризованные люциферазы, использующие целентеразин как субстрат биолоуминесцентной реакции

Люцифераза	Вид морского животного	M_r , кДа	λ_{\max} , нм	Ссылки
Люцифераза <i>Periphylla</i> (внутриклеточная), растворимая и нерастворимая (L)	<i>Periphylla periphylla</i> (сцифоидная медуза отряда Coronatae)	~20 ~32 (L)	465	[8]
Люцифераза <i>Benthoosema</i> (внутриклеточная)	<i>Benthoosema pterotum</i> (анчоус, рыба семейства Myctophidae)	~27	475	[13]

фераза и люциферин, накапливаемые по отдельности в биолоуминесцентной секреторной железе рачка, через специальные поры [32] секретируются в морскую воду, где и происходит реакция окисления субстрата люциферазой растворенным в воде кислородом с излучением света.

Природные люциферазы *Renilla* и ракушковых раков (Ostracoda) семейства Cypridinidae выделены из соответствующих светящихся организмов как мономерные белки. В отличие от

них, природная секретируемая люцифераза декаподной креветки *Oplophorus gracilirostris* изолирована как тетрамер, состоящий из двух типов белков [33], из которых только один обладает каталитической активностью (табл. 1). Природная форма секретируемых люцифераз планктонных морских копепод неизвестна, так как они не выделялись. Первые люциферазы из копепод *Metridia longa* [10] и *Gaussia princeps* [34] были клонированы методом функционального скрининга кДНК библиотек генов, а кДНК ге-

ны, кодирующие остальные гомологичные люциферазы (табл. 1), были изолированы с помощью дегенеративных праймеров, сконструированных по уже известным последовательностям [42, 43].

Анализ последовательностей клонированных целентеразин-зависимых люцифераз однозначно показывает, что люциферазы всех четырех типов, принадлежащих к филогенетически далеким группам организмов, не имеют никакой гомологии между собой и являются принципиально разными белками с различными молекулярными массами (табл. 1) и свойствами, хотя и катализируют окисление одного и того же субстрата с излучением света.

Еще две целентеразин-зависимые люциферазы из различных таксонов выделены и частично охарактеризованы (табл. 2). Следует ожидать, что люцифераза рыб *Benthosema pterotum* [13] в самое ближайшее время будет клонирована, так как уже получен чистый препарат белка, который можно использовать для определения последовательности и последующей идентификации люциферазного гена. Принимая во внимание разнообразие целентеразин-зависимых лю-

цифераз, скорее всего, это будет совершенно новая люциферазная последовательность.

Люцифераза коралла рода *Renilla* (класс Anthozoa) (RLuc) клонирована одной из первых [35] и остается пока единственной клонированной внутриклеточной целентеразин-зависимой люциферазой. RLuc — односубъединичный белок с мол. массой ~36 кДа, состоящий из 311 аминокислот. Кроме люциферазы, в биолуминесценции *Renilla in vivo* участвуют, по меньшей мере, еще два белка — Ca^{2+} -регулируемый целентеразин-связывающий белок (СВР) [44], стабилизирующий субстрат, и зеленый флуоресцентный белок (GFP) [45], являющийся вторичным эмиттером (рис. 4). Биолуминесцентная система *Renilla* достаточно хорошо исследована — все три белка клонированы [34–36], охарактеризованы, их пространственные структуры определены [46–48].

В отличие от Ca^{2+} -регулируемых фотопротеинов, содержащих 2-гидроперокси-производное целентеразина, целентеразин-связывающий белок содержит во внутренней гидрофобной полости прочно, но нековалентно связанную молекулу нативного целентеразина [47]. Связыва-

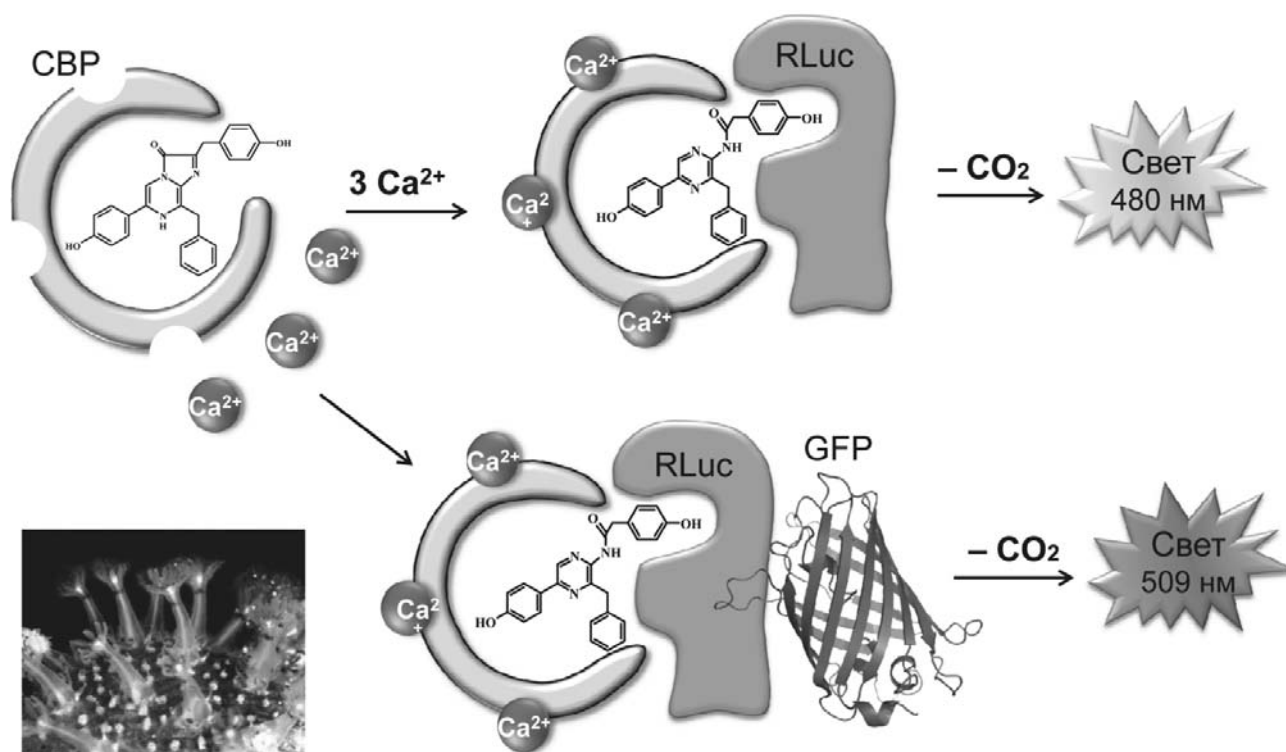


Рис. 4. Схематическое изображение биолуминесцентной реакции люциферазы *Renilla*. После связывания трех ионов кальция конформация СВР меняется так, что целентеразин становится доступным для люциферазы. Реакция в присутствии GFP сопровождается излучением с максимумом при ~509 нм, без GFP — при ~480 нм

ние ионов кальция с Ca^{2+} -связывающими сайтами СВР вызывает небольшие конформационные изменения в белке, которых, тем не менее, достаточно для того, чтобы молекула целентеразина стала доступной для окисления RLuc. В отсутствие GFP окисление целентеразина сопровождается излучением в голубой области спектра с $\lambda_{\text{max}} = \sim 480$ нм (рис. 4). В присутствии GFP билюминесцентная реакция как *in vivo*, так и *in vitro* сопровождается излучением с $\lambda_{\text{max}} = \sim 510$ нм, что обусловлено ферстеровским индуктивно-резонансным безызлучательным переносом энергии (BRET) от билюминесцентного донора (люциферазы) к флуоресцентному акцептору (GFP) в результате образования белок-белкового комплекса. Образование комплекса между RLuc и GFP показано в экспериментах *in vitro* [45]. Необходимо отметить, что присутствие GFP не только смещает спектр излучения в длинноволновую область, но и существенно увеличивает квантовый выход билюминесцентной реакции. Эффективность люциферазной реакции *in vitro* также повышается в несколько раз и при использовании СВР в качестве субстрата вместо свободного целентеразина [36], что может быть обусловлено формированием комплекса СВР-RLuc в процессе реакции [48]. Исходя из этого, можно предположить, что *in vivo* билюминесцентная реакция *Renilla* идет с образованием тройного короткоживущего белок-белкового комплекса СВР-RLuc-GFP, где происходит доставка целентеразина в активный центр люциферазы и эффективный безызлучательный перенос энергии от возбужденного продукта на хромофор GFP с последующим излучением света в «зеленой» области спектра.

Белки, участвующие в билюминесцентной реакции коралла *Renilla*, локализованы в специализированных клетках — фоточитах. Свечение коралла контролируется нервной системой и возникает при повышении концентрации ионов кальция в фоточитах в ответ на различные стимулы [49]. Таким образом, СВР не только предохраняет целентеразин от спонтанного окисления [50], но и выполняет функцию сопряжения нервной системы с билюминесцентной, обеспечивая тем самым быстрый световой ответ животного на раздражение.

Аминокислотная последовательность RLuc не имеет какой-либо гомологии с последовательностями других целентеразин-зависимых люцифераз, включая фотопротеины, но выявляет схожесть с первичными последовательностями клеточных α/β -гидролаз [51]. Наибольшую гомологию RLuc выявляет с аминокислотными последовательностями бактериальных дегалогеназ LinB из семейства α/β -гидролаз —

например, с дегалогеназой галоалкана LinB из *Sphingomonas paucimobilis* степень сходства составляет 64% (идентичность 39%) (рис. 5, а), что явно предполагает эволюцию от общей предковой последовательности. Пространственная структура RLuc также выявляет архитектуру, характерную для α/β -гидролаз (C α RMSD $\sim 1,5$ Å) (рис. 5, б, в) [46]. При этом различие структур люциферазы и α/β -гидролаз даже меньше, чем структур родственных фотопротеинов гидромедуз акворина и обелина (C α RMSD $\sim 2,27$ Å) [52] и функционально идентичных фотопротеинов гидромедуз и ктенофор (C α RMSD $\sim 2,19$ Å) [53].

В настоящее время RLuc является одним из наиболее популярных билюминесцентных репортеров в клеточных и медико-биологических исследованиях, так как легко может быть экспрессирована в нативном состоянии практически в любых типах клеток. Температурный оптимум для билюминесцентной реакции *in vitro*, катализируемой RLuc дикого типа, — $18\text{--}37^\circ$, оптимум pH — $6\text{--}7$. Однако квантовый выход билюминесценции довольно низкий — $\sim 0,07$ при 23° [54]. Свойства RLuc, возможно, оптимальные для функционирования в комплексе с СВР и GFP в фоточитах животных, не всегда могут удовлетворять требованиям, предъявляемым репортерным белкам, например, при использовании в клетках и тканях млекопитающих. Репортеры с улучшенными характеристиками на основе RLuc были сконструированы стандартным способом — случайного мутагенеза с последующей селекцией подходящих вариантов и сайт-направленного мутагенеза. Для выбора аминокислот для сайт-направленного мутагенеза использовалась пространственная структура RLuc. Получены мутанты RLuc с более высокой специфической билюминесцентной активностью и повышенной устойчивостью к инактивации сывороткой крови [51, 55]. Один из оптимизированных вариантов, имеющий 8 мутаций (RLuc8), показал увеличение специфической активности в 4 раза и 200-кратное повышение устойчивости к инактивации сывороткой крови.

Хорошо известно, что ткани млекопитающих интенсивно поглощают свет оптического диапазона. Наименьшее поглощение наблюдается в диапазоне $600\text{--}900$ нм — в так называемом «окне прозрачности» биологических тканей [56]. Поэтому в качестве репортеров люциферазы, генерирующие наибольшее количество фотонов в этой области, будут обеспечивать и более высокую чувствительность при использовании в тканях интактных животных. Сконструированные для этих целей мутанты RLuc-535 и RLuc-547 обладают как повышенной специфич-

ческой биолюминесцентной активностью, так и обеспечивают сдвиг спектра излучения в длинноволновую область до 66 нм [57]. Другой способ изменить спектр – использование модифицированной молекулы целентеразина в качестве субстрата. Так, применение целентеразина в позволило сместить спектр биолюминесценции в длинноволновую область для RLuc и ее мутан-

тов почти на 40 нм [50, 57]. Мутант RM-Y, имеющий максимум излучения с природным целентеразином при 535 нм, с целентеразином в выявил максимум биолюминесценции при 574 нм.

Люциферазы копепоид. Эти небольшие секретируемые белки размером ~18,4–24,3 кДа, включая отщепляемый секреторный пептид, ответственны за биолюминесценцию некоторых

a

RrLuc	1	MTSKVYDPEQRKRMITG	PQWWARCKQMNVLDSFINYYDSEKHAENAVIELHGNAASSYLWRHVVP
LinB	1	-----MSLCAKPFGEK	KFIEIKGRMAYID-EGTGD-PILEQHGNETSSYLWRNIMP
RrLuc	66	HIEPVARCIIPDLIGMCKSK	---SCNGSYRLLDHYKYLTAWFELINLPKKIIEVGHDWGACLAFL
LinB	51	HCAGLGRLLIACDLIGMCD	SDKLDPSPERPYYAEHRDYLDALWEALDLDGDRVVIVVHDWGSALGF
RrLuc	128	HYSYEHQDKIKATVHAES	VVDVIESWDEWPDIEEDI-ALIKSEEKGMVLENNFFVETMLPSKIM
LinB	116	DWARRHRERVQGIAYME	AIA-MPIEWADFPQDRDLFQAFRSQAGEELVLODNVEVEQVLEGLIL
RrLuc	192	RKLEPEEFAAYLEPFKEK	GEVRRPTLSWPREIPLVKGGKPDVVOIVRNYNAYLRASDDLPKMFIE
LinB	180	RPLSEAEMAAYREPFLA	AGEARRPTLSWPROIPIA-GTPADVVAIARDYAGWLSSES-PIPKLFIN
			Идентичность
RrLuc	257	SDPGFFSNA-IVEGAKKE	PNTEFVKVKGLEHFSQEDAPDEMCKYIKSEFVERVLKNEQ 100%
LinB	244	AEPGALTTGRMRDFC	RTPWPNQTEITVAGAHFIQEDSPDEIGAAIAAFVRRRLRPA-- 39%

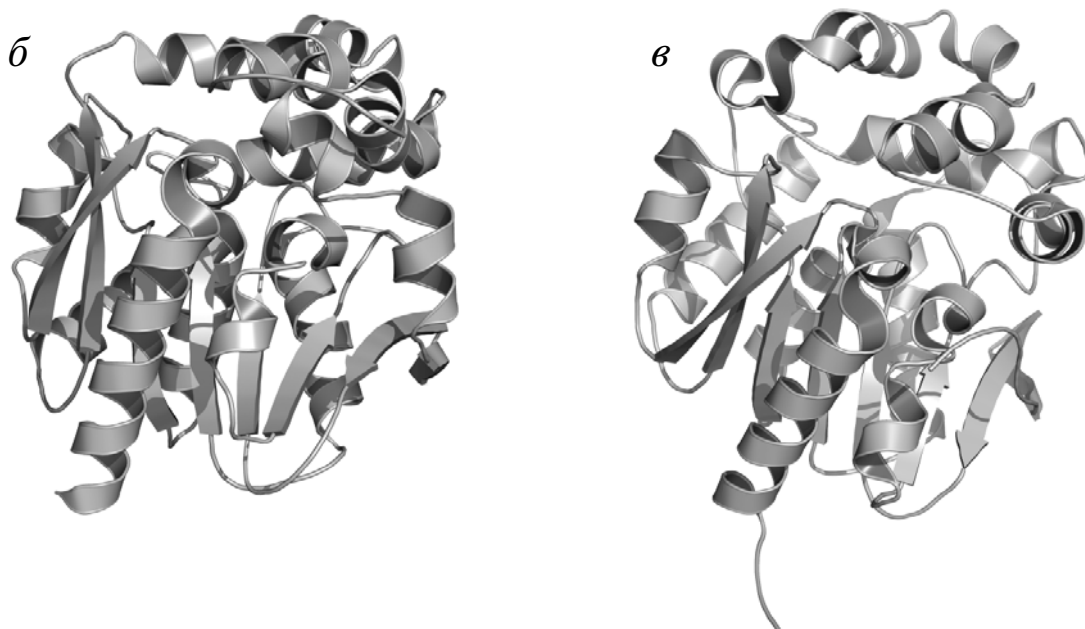
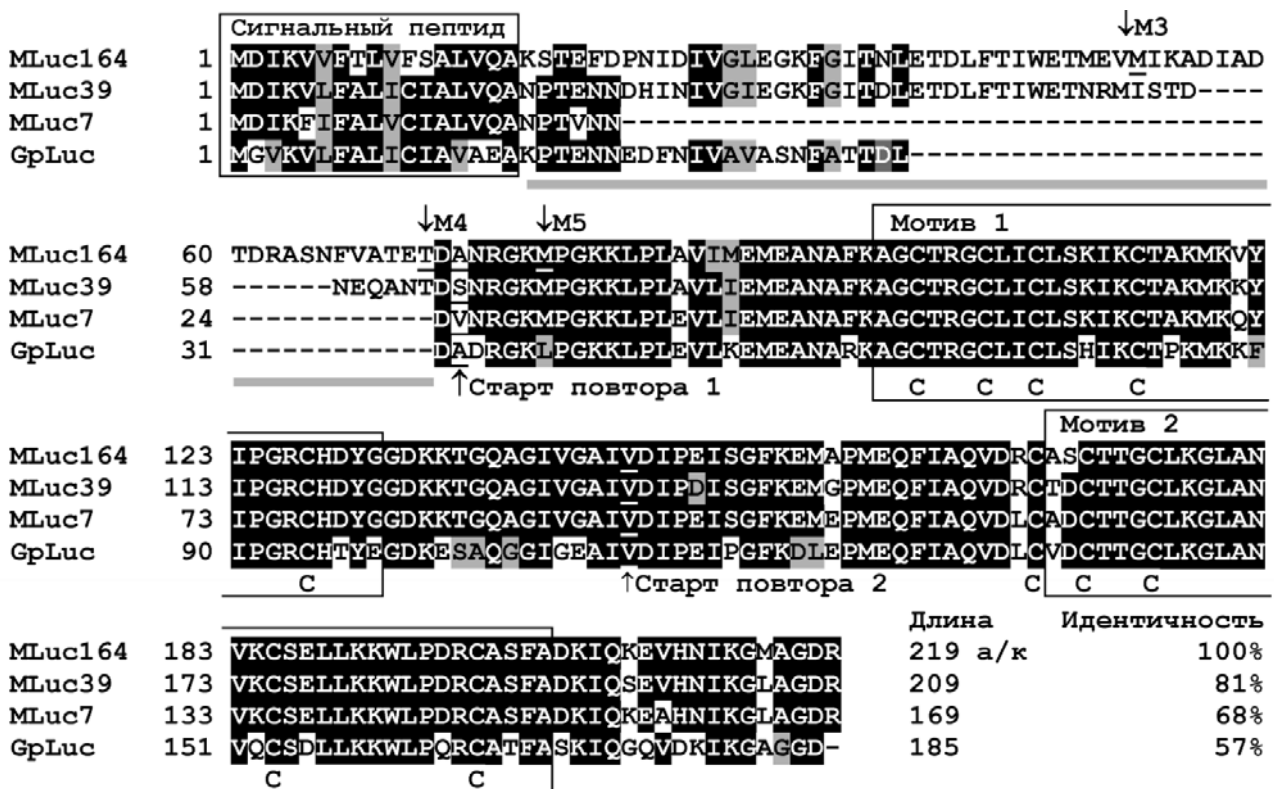


Рис. 5. *a* – Сравнение аминокислотных последовательностей люциферазы *R. reniformis* (RrLuc – AAA29804) с гомологичным клеточным белком дегалогеназой галаоалкана LinB из *S. paucimobilis* (LinB – 34810153). Черным цветом отмечены идентичные аминокислотные остатки, серым – со схожими свойствами; *б, в* – структуры люциферазы *R. reniformis* (PDB файл 2PSF) и дегалогеназы галаоалкана LinB (PDB файл 1MJ5) из *S. paucimobilis* соответственно

видов морских копепоид. Первые клонированные люциферазы GpLuc и MLuc копепоид *G. princeps* и *M. longa*, соответственно, были сразу же успешно применены в качестве биолюминесцентных репортеров *in vivo* [10, 58] и *in vitro* [37, 59], и с тех пор сферы их применения только расширяются.

Хотя биолюминесцентные виды обнаружены среди многих представителей копепоид [32], гены, кодирующие люциферазы, пока клонированы только из копепоид, входящих в суперсемейство Augartiloidea. На сегодняшний день определены последовательности 28 полноразмерных генов люцифераз из 12 видов светящихся копепоид (табл. 1), кодирующих аминокислотные последовательности с довольно высокой степенью сходства. Из нескольких видов светя-

щихся копепоид было изолировано сразу несколько генов, кодирующих 2–3 изоформы люциферазы, причем различия между некоторыми изоформами одного вида оказались сопоставимы с таковыми между люциферазами таксономически далеких видов. Например, идентичность последовательностей изоформ MLuc164 и MLuc7 *M. longa* составляет всего 68%, что близко к 57%-ной идентичности последовательностей MLuc164 и люциферазы GpLuc из *G. princeps* (рис. 6) – вида копепоид из другого рода того же семейства Metridinidae. Такие существенные различия аминокислотных последовательностей трех изоформ из *M. longa* предполагают, что в этих копепоидах люцифераза кодируется как минимум тремя паралогичными (неаллельными) генами.



Сравнение повторов 1 и 2 в MLuc7: длина 70 а/к, идентичность 26%



Рис. 6. Сравнение аминокислотных последовательностей изоформ люциферазы *M. longa* (MLuc164 – AAR17541, MLuc39 – ABW06650 и MLuc7 – AJC98141) и люциферазы *G. princeps* (GpLuc – AAG54095). Черным цветом выделены идентичные аминокислотные остатки, серым – со схожими свойствами. Пептид, обеспечивающий секрецию люциферазы, и консервативные мотивы внутри повторов выделены рамкой, консервативные Cys остатки отмечены под аминокислотными последовательностями. Точки делеции N-концевой вариативной части в «укороченных» мутантах MLuc164 [60] обозначены как M3, M4 и M5

Люциферазы копепод можно условно разделить на три части: отщепляемый сигнальный пептид для секреции, варибельный *N*-конец и *C*-концевую консервативную часть (рис. 6). Варибельная часть, составляющая иногда до трети аминокислотной последовательности, существенно не влияет на биолюминесцентную функцию люциферазы — мутанты с «укороченной» варибельной частью (рис. 6) обладают даже более высокой активностью, чем полноразмерная *MLuc164* [60]. Следует, однако, отметить, что делеция *N*-концевой части влияет на кинетику спада биолюминесцентного сигнала, делая ее более быстрой, чем у исходной *MLuc164*. Консервативная *C*-концевая часть люциферазы формируется двумя неидентичными тандемными повторами длиной около 70 аминокислотных остатков, каждый из которых содержит высоко консервативный мотив из 32 аминокислот [10, 61]. Каждый мотив включает 5 консервативных остатков *Cys* (рис. 6), что предполагает наличие до пяти *S*–*S*-связей на каждую молекулу люциферазы. Имеющиеся в настоящее время данные о наличии биолюминесцентной активности у отдельных тандемных повторов весьма противоречивы. В одной из работ при экспрессии тандемных повторов *GpLuc* в клетках *E. coli* было показано, что каждый из повторов обладает небольшой биолюминесцентной активностью [61]. Исходя из этого, авторы заключили, что люциферазы копепод имеют два каталитических домена. Однако, в другой работе, но при экспрессии тандемных повторов *GpLuc* в клетках млекопитающих, активность аналогичных, отдельно синтезированных повторов *GpLuc*, не обнаружена [62].

Несмотря на широкое и успешное применение люцифераз копепод в качестве репортерных белков, их биохимические и биолюминесцентные свойства изучены недостаточно. Природная люцифераза копепод так и не была выделена и охарактеризована даже частично. Получение рекомбинантного белка в нативной конформации с использованием простых и недорогих бактериальных систем экспрессии оказалось неэффективным из-за наличия многочисленных дисульфидных связей в люциферазах копепод. Так, люцифераза *M. longa*, полученная в клетках *E. coli*, склонна к агрегации, что приводит к значительной гетерогенности образца; доля люциферазы в мономерной форме составляет лишь несколько процентов от общего количества белка [37, 63]. К тому же, некоторые свойства даже мономерной высокоочищенной рекомбинантной люциферазы из бактериальных клеток и люциферазы, полученной в эукариотических системах экспрессии, сильно отличаются. Био-

люминесцентная активность изоформ *MLuc164* и *MLuc7*, например, полученных с помощью бакуловирусной системы экспрессии в клетках насекомых, в несколько раз выше активности этих изоформ, полученных с помощью бактериальной экспрессии [38, 63]. Необходимо отметить, что люциферазы копепод, помимо высокой биолюминесцентной активности, обладают и экстремально высокой термостабильностью [39]; изоформа *MLuc7* сохраняет 50% своей активности даже после часа кипячения [38]. Повидимому, аналогично другим секретиремым белкам, высокая термостабильность люцифераз обусловлена большим количеством *S*–*S*-связей, стабилизирующих их пространственную структуру.

В оптимальных условиях люциферазы копепод выявляют кинетику свечения «flash»-типа с быстрым затуханием в течение нескольких минут [37, 58, 60]. Однако для ряда приложений, использующих люциферазу копепод в качестве репортерного белка, например, для высокопроизводительного скрининга, важно иметь биолюминесцентный сигнал, стабильный в течение десятков минут. Такой сигнал может быть получен за счет изменения условий измерения активности люцифераз, так как кинетика реакции достаточно сильно зависит от состава буфера. Например, добавка 0,1% Triton X-100 в буфер для измерения активности *GpLuc* существенно замедляет скорость спада биолюминесцентного сигнала, но при этом одновременно уменьшает и удельную активность люциферазы, что значительно снижает предел ее обнаружения и, следовательно, чувствительность метода [64]. Проблема была решена с помощью мутагенеза — получен ряд мутантов *GpLuc* и *MLuc*, обладающих как высокой удельной активностью, так и медленным спадом биолюминесцентного сигнала [64–66]. Двойной мутант *GpLuc* (*M60L*–*M127L*) имел приблизительно в 14 раз более медленный спад биолюминесценции, а удельную активность, как у *GpLuc* дикого типа [65].

Поскольку окислительно-восстановительный потенциал в цитоплазме любых клеток не способствует формированию дисульфидных связей, цитоплазматическая экспрессия люцифераз копепод, потенциально содержащих до 5 *S*–*S*-связей, не дает высокой биолюминесцентной активности клеток, по-видимому, из-за неправильного фолдинга люциферазы. Однако интенсивность биолюминесценции клеток можно существенно увеличить, если экспрессировать в клетках секретиремый вариант люциферазы с сигнальным пептидом на *N*-конце и присоединенной на *C*-конец сигнальной последовательностью *KDEL*, обеспечивающей задержку

белка в эндоплазматическом ретикулуме [58]. Секреторный сигнальный пептид направит люциферазу в эндоплазматический ретикулум, где белок будет созревать нормально, а дальнейшая его секреция будет блокирована за счет «удерживающего» пептида KDEL. Следствием будет существенное увеличение интенсивности биолюминесценции клетки.

Люциферазы копепоид — природные секреторируемые белки, и поэтому наиболее эффективны при использовании именно в качестве секреторируемых репортеров, так как это позволяет оценивать внутриклеточные процессы *in vivo* многократно, в реальном времени и без разрушения объекта исследования в случае и клеточных культур, и мелких лабораторных животных. Для GrLuc [58, 67] и MLuc [68] показано, что биолюминесцентная активность в среде культуры клеток или крови животных линейно коррелирует с количеством клеток, секретирующих репортер, в диапазоне ~5 порядков. Это, к примеру, позволяет оценивать функциональное состояние раковой опухоли, скорость ее роста и метастазирования, а также ответ на терапию по уровню биолюминесцентной активности небольшого образца крови (5 μ л) вне зависимости от локализации клеток в организме [67, 68].

Основной фактор, лимитирующий использование люцифераз копепоид в качестве репортерных белков для биоимиджинга *in vivo* непосредственно в тканях и интактных мелких лабораторных животных, — излучение в голубой области спектра, интенсивно поглощаемое тканями млекопитающих. Это ослабляет сигнал, и, следовательно, снижает чувствительность. Как и в случае с люциферазой *Renilla*, для люцифераз копепоид ведется поиск высокоактивных мутантов со сдвинутым в красную область спектра биолюминесценции. Пока одним из лучших вариантов является мутант GrLuc (F89W/I90L/H95E/Y97W), получивший название «Monsta», который по активности почти в 5 раз превышает GrLuc дикого типа при экспрессии в COS-7 клетках и имеет максимум биолюминесценции при 503 нм [66]. Хотя в результате мутагенеза и получен мутант со сдвигом спектра излучения, его спектр биолюминесценции по-прежнему еще далек от «окна прозрачности» (>600 нм) биологических тканей.

Недавно были сконструированы несколько «искусственных» люцифераз (ALuc), обладающих лучшей стабильностью, а также повышенной биолюминесцентной активностью, которая для некоторых вариантов многократно превосходит активность GrLuc дикого типа — наиболее популярного и часто используемого в настоящее время секреторируемого биолюминесцент-

ного репортера [69, 70]. Кроме того, некоторые из «искусственных» люцифераз выявили значительное смещение спектров излучения в красную область (например, для ALuc25 до $\lambda_{\max} = 530$ нм) [69]. Это свойство наряду с высокой биолюминесцентной активностью делает эти люциферазы наиболее привлекательными репортерами среди люцифераз копепоид для использования в биоимиджинге *in vivo* тканей и мелких лабораторных животных. При конструировании «искусственных» люцифераз был использован подход, основанный на предположении, что для стабильной структуры белка часто встречающиеся в одном и том же положении аминокислоты термодинамически более выгодны, чем редко встречающиеся в этом же положении остатки. Таким образом, аминокислотные последовательности «искусственных» люцифераз представляют собой варианты консенсусной последовательности, полученной из сравнения аминокислотных последовательностей люцифераз копепоид [69].

Люцифераза *Oplophorus*. Природная секреторируемая люцифераза декалоидной креветки *O. gracilirostris* является тетрамером с молекулярной массой ~106 кДа [71], в котором две молекулы белка имеют молекулярную массу по 19 кДа и две — по 35 кДа. Однако только белок с $M_r = 19$ кДа обладает люциферазной активностью; функция другого белка, входящего в тетрамер, пока достоверно не установлена. Квантовый выход биолюминесцентной реакции, катализируемой природной люциферазой *Oplophorus*, один из самых высоких (0,34 при 22°) среди люцифераз, использующих имидазопиразинового типа. Температурный оптимум биолюминесцентной реакции — 40°, pH оптимум — ~9,0. Клонирование кДНК генов, кодирующих субъединицы люциферазы, выявило, что 19- и 35-кДа белки состоят, соответственно, из 196 и 359 аминокислот, включая предполагаемые сигнальные пептиды для секреции [33]. Рекомбинантный белок с $M_r = 19$ кДа, полученный из клеток как млекопитающих, так и *E. coli*, был мономерным, термолабильным, имел склонность к агрегации и обладал существенно меньшей биолюминесцентной активностью по сравнению с природной люциферазой [72]. Основываясь на этих наблюдениях, авторы предположили, что в природной люциферазе функцией белка с $M_r = 35$ кДа является стабилизация каталитической субъединицы. В отличие от люцифераз копепоид, содержащих 10 Cys остатков и, возможно, 5 S—S-связей, стабилизирующих структуру молекулы и критичных для активности белка, каталитическая субъединица люциферазы *Oplophorus*, имеющая примерно ту же дли-

ну, содержит только один остаток цистеина, не существенный для люциферазной активности [72].

Как и для люцифераз копепод, для люциферазы *Oplophorus* не обнаружено никакого значимого сходства с первичными последовательностями известных или гипотетических белков. Однако при использовании программ, идентифицирующих сходство белков по элементам пространственной структуры (fold-recognition programs), было найдено отдаленное сходство каталитической 19-кДа субъединицы люциферазы *Oplophorus* с хорошо охарактеризованным семейством внутриклеточных липид-связывающих белков iLVPs. Введение мутации N166R в 19-кДа белок, которая, согласно пространственной модели, должна повышать стабильность структуры и увеличивать структурное сходство с iLVP, привело к увеличению его биолюминесцентной активности в ~3 раза и повышению его стабильности на ~50% [73]. Этот мутант затем был использован как матрица для трех раундов случайного мутагенеза с целью получить варианты люциферазы со свойствами, оптимальными для использования их в качестве репортерных белков (высокая удельная активность, медленный спад биолюминесцентного сигнала, повышенная растворимость и стабильность). Лучшие мутации каждого раунда суммировались в матрице для следующего цикла мутагенеза. Кроме того, отобранные мутанты также тестировались с 24 аналогами целентеразина с целью выбрать субстрат, который бы обеспечил максимальную биолюминесцентную активность и минимальный фоновый сигнал по сравнению с целентеразином. В результате был получен термостабильный мутант, названный «NanoLuc» (NLuc), несущий 16 аминокислотных замен и демонстрирующий на порядки большую биолюминесцентную активность и стабильность, чем дикий вариант каталитической субъединицы люциферазы *Oplophorus* [73]. В качестве оптимального субстрата для NanoLuc идентифицирован аналог целентеразина – фуримазин (Furi-mazine), обеспечивающий высокий уровень биолюминесцентной активности и более высокую стабильность в биологических средах (период полураспада больше 4 ч) по сравнению с целентеразином, и, следовательно, более низкий уровень фонового сигнала. По данным авторов, в лизатах клеток HEK293 NanoLuc с фуримазином продуцировала биолюминесцентный сигнал с медленной кинетикой спада (время полужизни более 2 ч) и интенсивностью в ~2,5 млн раз выше, чем в сходных условиях 19-кДа белок с целентеразином дикого типа, и в ~150 раз выше, чем люциферазы *Renilla* и светляков [73].

Необходимо, однако, отметить, что активность NanoLuc, как показано в работе [74], была выше активности 19-кДа белка при их растворимой экспрессии в клетках *E. coli* всего лишь в ~10 раз, а в клетках СНО-К1 всего лишь в ~80 раз. Кроме того, удельная активность NanoLuc с целентеразином h была в ~1,5 раза выше, чем с фуримазином. Существенным ограничением для использования фактически новой искусственной люциферазы в качестве репортера для биоимиджинга *in vivo* в тканях лабораторных животных является спектр излучения ($\lambda_{\max} = 460$ нм), попадающий в область сильного поглощения света тканями млекопитающих.

Ципридинидные люциферазы. Природная форма секретируемой люциферазы остракод *Cypridina (Vargula) hilgendorffii* была первой из используемых в биолюминесцентной реакции люциферин имидазопиразиногового типа, которая была выделена с помощью хроматографических методов в высокоочищенном виде и досконально охарактеризована еще в начале 1960-х гг. [3]. Люцифераза катализирует окислительное декарбоксилирование *Cypridina* люциферина (рис. 2) в простой реакции, включающей только фермент, люциферин и O_2 . В результате реакции образуется продукт в возбужденном состоянии, переход которого в основное состояние сопровождается излучением света с максимумом при 448–463 нм. Длина волны излучения зависит от ионной силы буфера и практически не зависит от pH. Температурный оптимум биолюминесцентной реакции – 30°. Квантовый выход биолюминесцентной реакции, катализируемой люциферазой *Cypridina*, равен 0,3 и является одним из самых высоких среди биолюминесцентных реакций, катализируемых целентеразин-зависимыми биолюминесцентными белками [75].

Люцифераза остракод *Cypridina (Vargula) hilgendorffii* была первой из использующих люциферин имидазопиразиногового типа люциферазой, кДНК ген которой был клонирован (рис. 7) [40]. Позднее была клонирована высокомолекулярная люцифераза из *Cypridina noctiluca* (идентичность аминокислотных последовательностей ~84%) [41]. Люцифераза *Cypridina* – односубъединичный белок с расчетной молекулярной массой 62,2 кДа, состоящий из 552–555 аминокислотных остатков. Люцифераза содержит сигнальный пептид для секреции, 32 консервативных Cys остатка в пределах зрелого белка, формирующих 16 S–S-связей (в природной люциферазе свободных SH-групп не обнаружено [3]), а также два предполагаемых сайта N-гликозилирования (рис. 7). На сегодняшний день это самый большой из известных целентеразин-зависимых биолюминесцентных белков. Биолюми-

несцентная реакция, катализируемая люциферазой *Cypridina*, ингибируется ЭДТА и ЭГТА. Это предполагает влияние Ca^{2+} или других двухвалентных катионов на активность фермента. Однако каких-либо аминокислотных последовательностей, характерных для Ca^{2+} -связывающих сайтов, в люциферазе не обнаружено. Активная рекомбинантная люцифераза может быть получена только при экспрессии в эукари-

отических клетках (дрожжи, клетки млекопитающих) в виде секретируемой формы, что, по видимому, обусловлено наличием большого количества S—S-связей в люциферазе, которые формируются в эндоплазматическом ретикулуме, а также необходимостью посттрансляционного гликозилирования белка. Необходимо отметить, что, несмотря на высокую идентичность аминокислотных последовательностей, при сек-

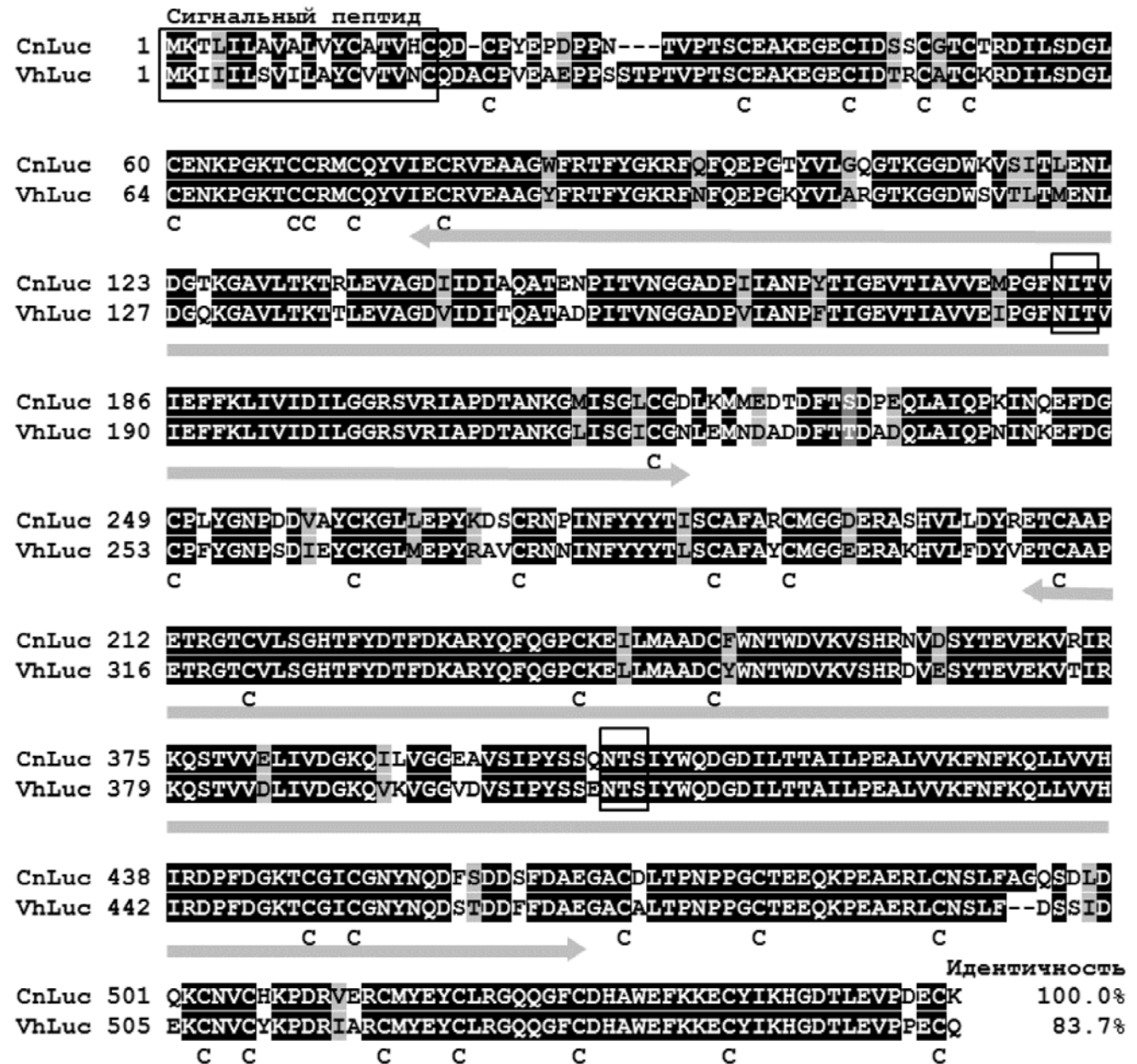


Рис. 7. Сравнение последовательностей люцифераз *C. noctiluca* (CnLuc – BAD08210) и *V. hilgendorffii* (VhLuc – AAB86460). Сигнальные пептиды, обеспечивающие секрецию люцифераз, идентифицированные программой Signal P 4.0 [76], и потенциальные сайты N-гликозилирования выделены рамкой. Консервативные Cys остатки отмечены под аминокислотными последовательностями. Домены типа D фактора Виллебранда (vWF-D), идентифицированные программой BLAST, отмечены серыми линиями

реторной экспрессии в культуре эукариотических клеток люцифераза *Cypridina noctiluca* выявляет намного более высокую активность, чем люцифераза *Cypridina (Vargula) hilgendorffii* [43].

Анализ аминокислотных последовательностей этих люцифераз не выявил никакой существенной гомологии ни с одним из известных белков, включая целентеразин-зависимые белки. Однако в последовательности люцифераз программа BLAST идентифицирует два домена (рис. 7) схожих с доменом D фактора Виллебранда (vWF-D – von Willebrand factor type D domain) секретируемого мультидоменного гликопротеина, играющего основную роль в процессе свертывания крови. Домены семейства vWF-D обнаружены во многих белках, в основном в секретируемых гликопротеинах таких, как интегрины, факторы роста, фибриллярные коллагены, белки системы комплемента, IGF-связывающие белки (аннотация последовательностей в базах данных по белкам Pfam и UniProt). Предполагается, что эти домены отвечают за мультимеризацию белков и их взаимодействие с другими белками [77]. Имеют ли какое-либо значение vWF-D домены для функционирования люцифераз или биолюминесцентной системы остракод, неизвестно.

Интересно, что светящиеся остракоды семейства Halocyprididae, в частности остракодные раки *Conchoecia pseudodiscophora*, используют для биолюминесцентной реакции в качестве субстрата целентеразин, а не *Cypridina* люциферин и, вероятно всего, имеют несекретируемый тип биолюминесценции, обусловленный функционированием внутриклеточной люциферазы, поскольку свечение наблюдается строго в пределах карапакса (спинного щитка) рака [11].

Люциферазы сцифоидной медузы *P. periphylla* и рыб *B. pterotum*. Сцифоидная медуза *P. periphylla* содержит две формы люцифераз – растворимую (L-форма) и нерастворимую, которая выделяется в виде частиц [7, 8]. Растворимая форма люциферазы с мол. массой 32 кДа отвечает за биолюминесценцию медузы и выделена из мезоглеи купола и радиальных складок медузы. Нерастворимая форма в виде агрегатов складирована в яичнике медузы, причем ее содержание, исходя из оценок активности, в 100 раз превышает количество растворимой формы [8]. В присутствии высоких концентраций β-меркаптоэтанола нерастворимые агрегаты люциферазы образуют смесь активных олигомеров с молекулярными массами 20, 40 и 80 кДа (люциферазы А, В и С соответственно). На основании данных электрофореза авторы сделали заключение, что люциферазы с молекулярными массами 40 и 80 кДа являются димером и тетрамером люциферазы А [8].

Растворимая люцифераза L также является комплексом – добавка β-меркаптоэтанола приводит к образованию двух белков с молекулярными массами 20 и ~12 кДа. Из этих двух белков только белок с мол. массой 20 кДа обладает люциферазной активностью. Все люциферазы имели одинаковые спектры биолюминесценции с λ_{\max} при 465 нм, но различались биохимическими свойствами (оптимумом температуры, термостабильностью и K_m). Люциферазы А, В и С, полученные из нерастворимых частиц, выявили удельную активность выше, чем у растворимой люциферазы L. Удельная биолюминесцентная активность этих люцифераз, по данным авторов, оказалась наибольшей среди люцифераз, использующих целентеразин в качестве субстрата. Люциферазы А, В и С чрезвычайно устойчивы к денатурации – их биолюминесцентная активность только слегка уменьшается при pH 1 и pH 11 и даже усиливается в 1–2 М гуанидин гидрохлориде. Однако эти люциферазы менее устойчивы к нагреванию, чем люцифераза L (32 кДа), активность которой практически не меняется при кипячении в течение нескольких минут. Отличаются эти люциферазы и оптимумом температуры. Если биолюминесцентная активность люциферазы L максимальна при 0° и практически линейно снижается при повышении температуры, приближаясь к нулю при 60°, то люциферазы А, В и С имеют оптимум при ~30°. Кроме того, значение константы Михаэлиса ($K_m = \sim 0,2 \mu\text{M}$) для люцифераз А, В и С в ~6 раз меньше, чем для люциферазы L. Чем обусловлены различия в свойствах нерастворимой и растворимой форм люцифераз медузы *P. periphylla*, пока неясно. Несмотря на привлекательные свойства (термостабильность и высокую удельную активность) этой люциферазы для использования в качестве репортерного белка и доступность биологического материала (сцифоидная медуза *P. periphylla* массово встречается во фьордах Норвегии), ген (или гены), кодирующий эту люциферазу, пока не клонирован.

Недавно новая целентеразин-зависимая люцифераза, ответственная за биолюминесценцию рыб *Benthosema pterotum*, была выделена из фотофоров этих рыб, очищена с помощью хроматографических методов и частично охарактеризована [13]. Авторы установили, что люцифераза имеет молекулярную массу ~27 кДа, константу Михаэлиса (0,4 μM), близкую по значению для других целентеразин-зависимых люцифераз, спектр биолюминесценции с максимумом при 475 нм и температурный оптимум биолюминесцентной реакции – 40°. Люцифераза *B. pterotum* оказалась ферментом достаточно термостабильным (сохраняет более 50% активности в те-

чение часа при 65°) и устойчивым к экстремальным значениям pH. Интересной особенностью этой люциферазы является то, что ионы кальция и особенно магния значительно повышают ее активность [13]. Принимая во внимание то, что авторам удалось получить достаточно высокоочищенный образец люциферазы *V. pterotum*, а также современный уровень развития технологий секвенирования белков и методов молекулярной биологии, следует ожидать, что в ближайшее время ген, кодирующий эту люциферазу, будет клонирован.

Таким образом, известные на сегодняшний день целентеразин-зависимые люциферазы, несмотря на использование одного и того же субстрата для биолюминесценции и один и тот же химический механизм его окислительного декарбоксилирования [3], являются различающимися негомологичными белками, не имеющими никакого сходства между собой, а также с другими известными белками. Исключением является только люцифераза *Renilla*, попадающая в группу α/β -гидролаз.

НЕЗАВИСИМАЯ ЭВОЛЮЦИЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ СИСТЕМ – ИСТОЧНИК МНОГООБРАЗИЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ

Общие клеточные функции для всех организмов, обитающих на Земле, как правило, обеспечиваются практически одинаковыми или очень сходными биохимическими процессами с участием белков, являющихся гомологичными, иногда в очень значительной степени, вплоть до полного совпадения аминокислотных последовательностей. Необычным свойством биолюминесценции как функции живого организма является то, что в свечение организмов, принадлежащих различным таксонам, вовлечены различные белки, катализирующие к тому же различные реакции. Особенно явственно это стало после клонирования генов и определения первичных последовательностей ряда белков, а также механизмов биолюминесцентных реакций различных организмов. У клонированных к настоящему времени биолюминесцентных ферментов, принадлежащих таксономически далеким организмам, не обнаружено никакого сходства между их аминокислотными последовательностями, даже в случае использования одного и того же субстрата для биолюминесцентной реакции. Не выявлено какого-либо сходства и между пространственными структурами таких биолюминесцентных белков, несмотря на то, что пространственные структуры белков бо-

лее консервативны, чем их первичные последовательности. Однако неожиданно для некоторых биолюминесцентных белков найдены близкие гомологи среди обычных клеточных ферментов, обеспечивающих базовую жизнедеятельность клетки [51, 78]. Принимая во внимание такое различие биолюминесцентных систем и их компонентов в различных организмах, следует предположить, что способность к биолюминесценции у представителей различных таксонов возникла независимо друг от друга много раз в ходе эволюции, вовлекая для этого подходящие предковые белки.

В настоящее время насчитывается более 40 вариантов биолюминесцентных систем, возникших в эволюции независимо, и в ряде случаев, по-видимому, совсем недавно. О недавнем происхождении отдельных вариантов свидетельствует «пятнистое» распределение биолюминесценции среди таксонов (рис. 1), то есть наличие в одном и том же таксоне организмов с разной биохимией свечения, а также присутствие в одном таксоне светящихся и несветящихся видов, иногда даже близкородственных. Так, у колониальных гидроидов рода *Obelia* из четырех видов, обитающих в Белом море, только два вида светящиеся, несмотря на схожие условия обитания для всех четырех. В некоторых таксонах, например, среди сифонофор и гребневиков, несветящиеся представители единичны, а в некоторых единичны как раз светящиеся организмы, например, среди щетинкочелюстных (тип Chaetognatha) [1].

Сама же природа свечения иногда существенно различается даже у близких родичей, к примеру, у различных видов кальмаров, а также планктонных ракушковых рачков, использующих как различные модификации целентеразина для свечения, так и различные типы биолюминесценции: секретлируемую и внутриклеточную.

Поскольку способность продуцировать свет возникла много раз в ходе эволюции (рис. 1), можно обоснованно предположить, что, во-первых, биолюминесценция очень важна для организмов и, во-вторых, ее возникновение должно происходить относительно легко. Как упомянуто выше, люциферины имидазопиразинового типа обнаружены во многих как светящихся, так и несветящихся морских организмах и могут к тому же передаваться от одного организма другому по пищевым цепям [3, 25], то есть биолюминесцентный субстрат более консервативен, чем другие компоненты биолюминесцентных систем. Возможно, это справедливо и для других люциферинных. Таким образом, имея доступную органическую молекулу, которая способна обеспечить светоизлучающую функцию, организ-

мам остается «приспособить» только подходящий белок, чтобы возникла биолюминесценция. И, похоже, часто на роль люциферазы рекрутировались различные клеточные белки, мутации в которых приводили к возникновению способности катализировать имеющийся биолюминесцентный субстрат с излучением света, порождая все это наблюдаемое разнообразие биолюминесцентных систем.

Наличие такого разнообразия организмов (рис. 1), использующих люциферины имидазопиразиногового типа как субстрат биолюминесцентной реакции и разнообразие белков, катализирующих эти реакции, позволяет предположить существование множества других светящихся организмов, которые еще не исследованы и у которых субстратом биолюминесцентной реакции также являются эти люциферины, но функцию люцифераз выполняют совершенно другие белки. Почему люциферины имидазопиразиногового типа являются субстратами биолюминесцентных реакций у столь разнообразных светящихся организмов, пока остается загадкой.

КЛОНИРОВАНИЕ НОВЫХ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ

Фактически, при клонировании генов, кодирующих биолюминесцентные белки из новых светящихся организмов, могут быть использованы только два подхода. Традиционный способ включает определение необходимых для биолюминесценции компонентов, прежде всего, субстрата и возможных кофакторов. Если субстрат биолюминесцентной реакции известен и имеется в наличии, обычно постановка биолюминесцентной реакции *in vitro* затруднений не вызывает. (На сегодняшний день, по-видимому, этому в полной мере соответствуют только биолюминесцентные белки, использующие для биолюминесцентной реакции люциферины имидазопиразиногового типа.) На следующем этапе из светящихся организмов выделяют биолюминесцентный белок в количествах, достаточных для определения хотя бы небольшого фрагмента аминокислотной последовательности. Затем конструируются вырожденные олигонуклеотиды к известной белковой последовательности, с помощью которых посредством гибридизации или ПЦР проводится скрининг кДНК библиотеки для поиска клонов с новыми генами. С использованием такого подхода были клонированы кДНК гены, кодирующие несколько целентеразин-зависимых биолюминесцентных белков: Ca^{2+} -регулируемый фотопротейин акворин из гидромедузы *Aequorea victoria* [79, 80], люци-

феразу из остракод *Cypridina (Vargula) hilgendorffii* [40], люциферазу из мягкого коралла *Renilla reniformis* [35] и *Renilla muelleri* [36], люциферазу из декаподной креветки *Oplophorus gracilirostris* [33] и Ca^{2+} -зависимый целентеразин-связывающий белок из *Renilla muelleri* [36]. Очевидно, что такой способ применим только в том случае, если светящиеся организмы могут быть собраны в достаточно большом количестве.

Однако, как правило, большинство морских светящихся организмов одного вида не образуют значительных скоплений и могут быть пойманы в единичных экземплярах. Кроме того, многие из биолюминесцентных животных обитают на больших глубинах и поэтому их сбор достаточно сложен и трудоемок. Эти обстоятельства делают практически невозможным выделение достаточного количества природного белка для его характеристики и определения аминокислотной последовательности, и, следовательно, не позволяют использовать традиционный подход для клонирования кДНК генов. Эти препятствия позволяют обойти метод функционального скрининга клонов экспрессионной кДНК библиотеки (рис. 8). Современными методами, основанными на ПЦР, экспрессионную кДНК библиотеку генов можно приготовить из очень малых количеств исходного материала – всего лишь нескольких мг ткани. Для применения функционального скрининга необходимо только воспроизвести биолюминесцентную реакцию *in vitro* и иметь достаточное количество субстрата для скрининга. Высокая чувствительность, с которой детектируется свет, генерируемый в ходе биолюминесцентной реакции, позволяет зарегистрировать индивидуальный положительный сигнал от единичного клона, находящегося в большой группе отрицательных клонов. С помощью функционального скрининга были клонированы кДНК гены, кодирующие Ca^{2+} -регулируемые фотопротейины гидридов *Obelia longissima* [81] и *Obelia geniculata* [82], гидромедуз *Clytia gregaria* [83] и *Mitrocoma cellularia* [84], ктенофор *Beroe abyssicola* [30], а также люциферазы копепод *Metridia longa* [10, 37, 38] и *Gaussia princeps* [34], и GFP гидромедузы *C. gregaria* [83]. Необходимо отметить, что большинство из клонированных с помощью функционального скрининга кДНК генов содержат стоп-кодон (или даже несколько стоп-кодонов) в 5'-нетранслируемой области. Однако, это не помешало изолировать индивидуальные колонии по биолюминесцентной активности, наглядно демонстрируя тем самым высокую эффективность функционального скрининга при клонировании генов, кодирующих биолюминесцентные и флуоресцентные белки.

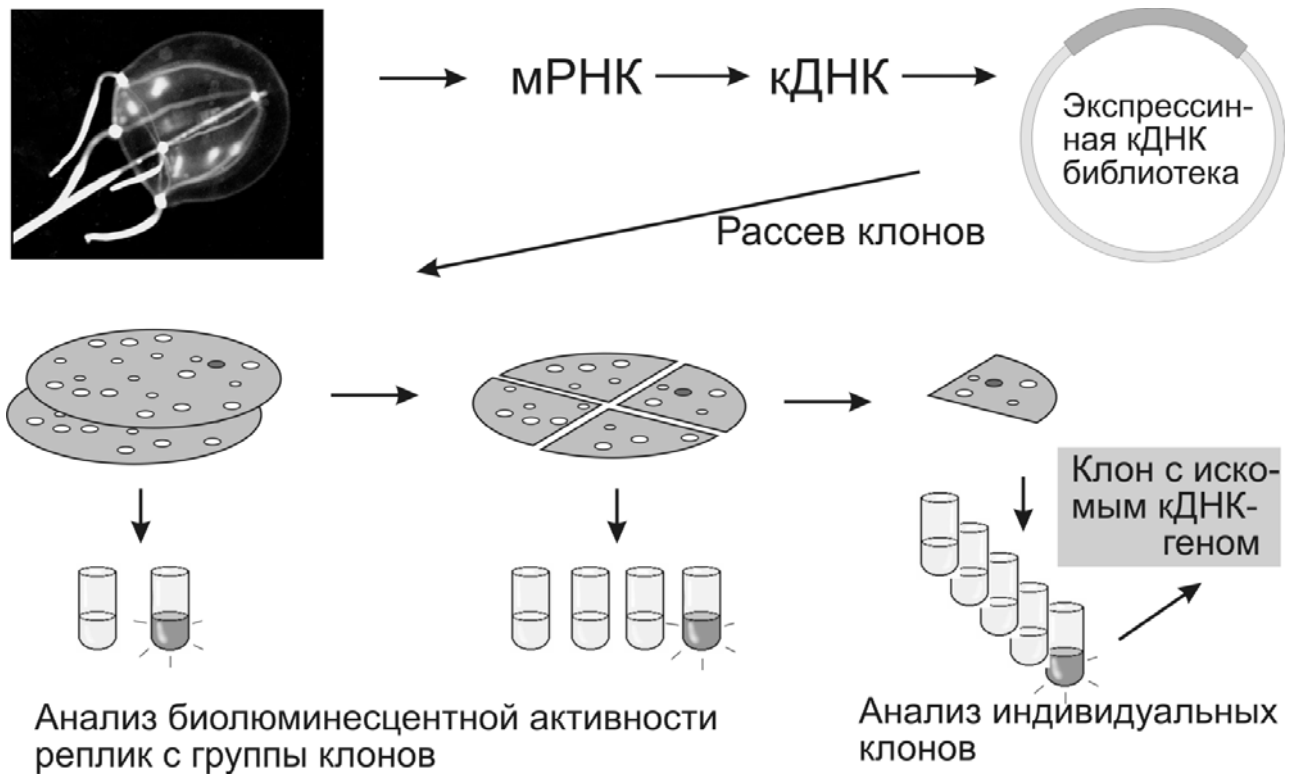


Рис. 8. Схема функционального скрининга

Очевидно, что существуют некоторые ограничения для применения функционального скрининга. Этот подход может быть реализован при клонировании новых белков, используя уже известные и доступные субстраты биоломинесцентных реакций, например, люциферины имидазопиразинового типа, так как определение структуры нового биоломинесцентного субстрата еще более трудная задача, чем получение высокоочищенного белка для секвенирования. Кроме того, желательно, чтобы биоломинесцентный белок был односубъединичным, так как наличие еще одной субъединицы значительно усложнит поиск соответствующих генов, а также не требовал посттрансляционных модификаций, необходимых для его биоломинесцентной активности. Вполне вероятно, что последнее из упомянутых ограничений может быть преодолено использованием эукариотических клеток для скрининга экспрессионных кДНК библиотек.

Хотя, вне всякого сомнения, изучение биоломинесцентных систем различных организмов имеет фундаментальное значение, все-таки основной движущей силой, определяющей интерес к исследованию биоломинесценции, явля-

ется ее полезность в качестве аналитического инструмента. В наши дни не найдется области биологии, медицины и фармакологии, где бы биоломинесцентные методы или уже широко не применялись, или не были бы опробованы, показав их пригодность. Развитие фундаментальных и прикладных исследований в этих областях требует создания эффективных неинвазивных технологий визуализации молекулярных процессов *in vivo* (технологий биоимиджинга) как в отдельной живой клетке, так и на уровне целого живого организма. Спектр задач, решаемых с помощью таких технологий, чрезвычайно широк. Однако, прежде всего, эти технологии направлены на прижизненное исследование динамических процессов в клетке и организме, позволяя изучать рост опухолей и их метастатическую активность, а также ответ опухолевых клеток на терапию, миграцию иммуннокомпетентных клеток в организме, белок-белковые взаимодействия в клетке; метаболическую активность и ее регуляцию на уровне как отдельных клеток, так и целого организма, пути миграции и распределения белков в клетке и целом организме, регуляцию экспрессии генов и многое другое. Для разработки таких технологий репортеры на основе люцифераз и фотопротеинов

оказались чрезвычайно полезны. Поскольку биолюминесцентные реакции протекают с высоким квантовым выходом, а фоновое свечение отсутствует, биолюминесцентные технологии, использующие люциферазы и фотопротеины в качестве репортерных белков, обеспечивают высокую чувствительность при визуализации и широкий линейный динамический диапазон измерений. Биолюминесцентные белки и их субстраты являются компонентами биолюминесцентных систем светящихся организмов и поэтому не токсичны для живых клеток. До недавнего времени применение биолюминесцентного биоимиджинга ограничивалось несовершенством методов регистрации и обработки слабых световых сигналов. Однако данные проблемы были решены с появлением высокочувствительных охлаждаемых ССД камер, и сейчас уже созданы микроскопы, способные регистрировать изменение свечения отдельной клетки в реальном времени.

Практически все имеющиеся в распоряжении исследователей биолюминесцентные белки уже опробованы для мониторинга клеточных процессов в качестве генетически-кодируемых репортеров. Наиболее популярными биолюминесцентными репортерами на сегодняшний день являются люцифераза светляков, Ca^{2+} -регулируемые фотопротеины и целентеразин-зависимые люциферазы *Renilla*, копепод *Gaussia* и *Metridia*, а также их мутантные варианты с улучшенными характеристиками. Одной из основных сфер применения люцифераз является мониторинг экспрессии генов и отслеживание отдельных меченых клеток в организме. Активность люциферазы используют для оценки жизнеспособности клеток, апоптоза и различных процессов, связанных с клеточным метаболизмом. Люциферазы, слитые с исследуемыми белками, используются для мониторинга метаболизма целевых белков и их взаимодействия с другими белками. Эффективным способом

оценки белок-белковых взаимодействий *in vivo* является метод комплементации, основанный на способности люцифераз, расщепленных на фрагменты, восстанавливать свою активность при пространственном сближении этих фрагментов, слитых с исследуемыми взаимодействующими белками. Другим способом оценки белок-белковых взаимодействий *in vivo* при помощи люциферазных репортеров являются BRET технологии. В основе данного метода лежит явление резонансного безызлучательного переноса энергии от биолюминесцентного донора на флуоресцентный белок-акцептор, который происходит только при пространственном сближении взаимодействующих целевых белков, слитых с репортерами, и сопровождается изменением спектра излучения.

Наличие биолюминесцентных белков с различными свойствами, в том числе мутантных с улучшенными характеристиками, предоставляет больше возможностей для оптимального дизайна экспериментов. Кроме того, различия в субстрате, кинетике биолюминесцентной реакции или спектре биолюминесценции позволяют использовать до трех биолюминесцентных репортеров для одновременной регистрации нескольких различных процессов. Принимая во внимание уже имеющееся разнообразие биолюминесцентных белков, использующих люциферины имидазопиразинового типа, следует ожидать, по мере исследования новых светящихся организмов, появления новых люцифераз и фотопротеинов, которые могут быть использованы для разработки новых биолюминесцентных технологий биоимиджинга *in vivo*.

Работа выполнена за счет средств государственного задания на проведение фундаментальных исследований РАН (проект № 01201351504) и Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Haddock, S.H., Moline, M.A., and Case, J.F. (2010) Bioluminescence in the sea, *Ann. Rev. Mar. Sci.*, **2**, 443–493.
2. Widder, E.A. (2010) Bioluminescence in the ocean: origins of biological, chemical, and ecological diversity, *Science*, **328**, 704–708.
3. Shimomura, O. (2006) *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods*, World Scientific Publishing, Singapore.
4. Hori, K., Charbonneau, H., Hart, R.C., and Cormier, M.J. (1977) Structure of native *Renilla reniformis* luciferin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 4285–4287.
5. Shimomura, O., Masugi, T., Johnson, F.H., and Haneda, Y. (1978) Properties and reaction mechanism of the bioluminescence system of the deep-sea shrimp *Oplophorus gracilirostris*, *Biochemistry*, **17**, 994–998.
6. Inouye, S., and Shimomura, O. (1997) The use of *Renilla* luciferase, *Oplophorus* luciferase, and apoaequorin as bioluminescent reporter protein in the presence of coelenterazine analogues as substrate, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **233**, 349–353.
7. Shimomura, O., and Flood, P.R. (1998) Luciferase of the scyphozoan medusa *Periphylla periphylla*, *Biol. Bull.*, **194**, 244–252.
8. Shimomura, O., Flood, P.R., Inouye, S., Bryan, B., and Shimomura, A. (2001) Isolation and properties of the luciferase stored in the ovary of the scyphozoan medusa *Periphylla periphylla*, *Biol. Bull.*, **201**, 339–347.

9. Campbell, A.K., and Herring, P.J. (1990) Imidazolopyrazine bioluminescence in copepods and other marine organisms, *Mar. Biol.*, **104**, 219–225.
10. Markova, S.V., Golz, S., Frank, L.A., Kalthof, B., and Vysotski, E.S. (2004) Cloning and expression of cDNA for a luciferase from the marine copepod *Metridia longa*. A novel secreted bioluminescent reporter enzyme, *J. Biol. Chem.*, **279**, 3212–3217.
11. Oba, Y., Tsuduki, H., Kato, S., Ojika, M., and Inouye, S. (2004) Identification of the luciferin-luciferase system and quantification of coelenterazine by mass spectrometry in the deep-sea luminous ostracod *Conchoecia pseudodiscophora*, *Chembiochem*, **5**, 1495–1499.
12. Robison, B.H., Reisenbichler, K.R., Hunt, J.C., and Haddock, S.H. (2003) Light production by the arm tips of the deep-sea cephalopod *Vampyroteuthis infernalis*, *Biol. Bull.*, **205**, 102–109.
13. Homaei, A.A., Mymandi, A.B., Sariri, R., Kamrani, E., Stevanato, R., Etehad, S.M., and Khajeh, K. (2013) Purification and characterization of a novel thermostable luciferase from *Benthosema pterotum*, *J. Photochem. Photobiol. B.*, **125**, 131–136.
14. Tsuji, F.I. (2002) Bioluminescence reaction catalyzed by membrane-bound luciferase in the “firefly squid”, *Watasenia scintillans*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1564**, 189–197.
15. Chou, C.M., Tung, Y.W., and Isobe, M. (2014) Molecular mechanism of *Symplectoteuthis* bioluminescence – part 4: chromophore exchange and oxidation of the cysteine residue, *Bioorg. Med. Chem.*, **22**, 4177–4188.
16. Tanaka, E., Kuse, M., and Nishikawa, T. (2009) Dehydrocoelenterazine is the organic substance constituting the prosthetic group of pholasin, *Chembiochem*, **10**, 2725–2729.
17. Kishi, Y., Goto, T., Hirata, Y., Shimomura, O., and Johnson, F.H. (1966) *Cypridina* bioluminescence. I. Structure of *Cypridina* luciferin, *Tetrahedron Lett.*, **29**, 3427–3436.
18. Cormier, M.J. (1978) Comparative biochemistry of animal systems, in *Bioluminescence in Action* (Herring, P.J., ed.), Academic Press, N.Y., pp. 75–108.
19. Tsuji, F.I., Barnes, A.T., and Case, J.F. (1972) Bioluminescence in the marine teleost, *Porichthys notatus*, and its induction in a non-luminous form by *Cypridina* (ostracod) luciferin, *Nature*, **237**, 515–516.
20. Tsuji, F.I., Nafpaktitis, B.G., Goto, T., Cormier, M.J., Wampler, J.E., and Anderson, J.M. (1975) Spectral characteristics of the bioluminescence induced in the marine fish, *Porichthys notatus* by *Cypridina* (ostracod) luciferin, *Mol. Cell. Biochem.*, **9**, 3–8.
21. Haddock, S.H., Rivers, T.J., and Robison, B.H. (2001) Can coelenterates make coelenterazine? Dietary requirement for luciferin in cnidarian bioluminescence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 11148–11151.
22. Oba, Y., Kato, S., Ojika, M., and Inouye, S. (2009) Biosynthesis of coelenterazine in the deep-sea copepod, *Metridia pacifica*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **390**, 684–688.
23. Kato, S., Oba, Y., Ojika, M., and Inouye, S. (2007) Biosynthesis of *Cypridina* luciferin in *Cypridina noctiluca*, *Heterocycles*, **72**, 673–676.
24. Hur, G.H., Vickery, C.R., and Burkart, M.D. (2012) Explorations of catalytic domains in non-ribosomal peptide synthetase enzymology, *Nat. Prod. Rep.*, **29**, 1074–1098.
25. Thomson, C.M., Herring, P.J., and Campbell, A.K. (1997) The widespread occurrence and tissue distribution of the imidazolopyrazine luciferins, *J. Biolumin. Chemilumin.*, **12**, 87–91.
26. Anderson, J.M., Hori, K., and Cormier, M.J. (1978) A bioluminescence assay for PAP (3',5'-diphosphoadenosine) and PAPS (3'-phosphoadenylyl sulfate), *Methods Enzymol.*, **57**, 244–257.
27. Nakamura, M., Suzuki, T., Ishizaka, N., Sato, J., and Inouye, S. (2014) Identification of 3-enol sulfate of *Cypridina* luciferin, *Cypridina* luciferin sulfate, in the sea-firefly *Cypridina (Vargula) hilgendorffii*, *Tetrahedron*, **70**, 2161–2168.
28. Vysotski, E.S., and Lee, J. (2004) Ca²⁺-regulated photoproteins: structural insight into the bioluminescence mechanism, *Acc. Chem. Res.*, **37**, 405–415.
29. Высоцкий Е.С., Маркова С.В., Франк Л.А. (2006) Кальций-регулируемые фотопротеины морских кишечнополостных, *Молекулярная биология*, **40**, 404–417.
30. Markova, S.V., Burakova, L.P., Golz, S., Malikova, N.P., Frank, L.A., and Vysotski, E.S. (2012) The light-sensitive photoprotein berovin from the bioluminescent ctenophore *Beroe abyssicola*: a novel type of Ca²⁺-regulated photoprotein, *FEBS J.*, **279**, 856–870.
31. Liu, Z.J., Stepanyuk, G.A., Vysotski, E.S., Lee, J., Markova, S.V., Malikova, N.P., and Wang, B.C. (2006) Crystal structure of obelin after Ca²⁺-triggered bioluminescence suggests neutral coelenteramide as the primary excited state, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 2570–2575.
32. Евстигнеев П.В., Битюков Э.П. (1990) Биоломинесценция морских копепоид, Наукова думка, Киев.
33. Inouye, S., Watanabe, K., Nakamura, H., and Shimomura, O. (2000) Secretional luciferase of the luminous shrimp *Oplophorus gracilirostris*: cDNA cloning of a novel imidazolopyrazinone luciferase, *FEBS Lett.*, **481**, 19–25.
34. Bryan, B., and Szent-Gyorgyi, C. (1999) Luciferases, fluorescent proteins, nucleic acids encoding the luciferases and fluorescent proteins and the use thereof in diagnostics, WO9949019A2.
35. Lorenz, W.W., McCann, R.O., Longiaru, M., and Cormier, M.J. (1991) Isolation and expression of a cDNA encoding *Renilla reniformis* luciferase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 4438–4442.
36. Titushin, M.S., Markova, S.V., Frank, L.A., Malikova, N.P., Stepanyuk, G.A., Lee, J., and Vysotski, E.S. (2008) Coelenterazine-binding protein of *Renilla muelleri*: cDNA cloning, overexpression, and characterization as a substrate of luciferase, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **7**, 189–196.
37. Borisova, V.V., Frank, L.A., Markova, S.V., Burakova, L.P., and Vysotski, E.S. (2008) Recombinant *Metridia* luciferase isoforms: expression, refolding and applicability for *in vitro* assay, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **7**, 1025–1031.
38. Markova, S.V., Larionova, M.D., Burakova, L.P., and Vysotski, E.S. (2015) The smallest natural high-active luciferase: Cloning and characterization of novel 16.5-kDa luciferase from copepod *Metridia longa*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **457**, 77–82.
39. Takenaka, Y., Masuda, H., Yamaguchi, A., Nishikawa, S., Shigeri, Y., Yoshida, Y., and Mizuno, H. (2008) Two forms of secreted and thermostable luciferases from the marine copepod crustacean, *Metridia pacifica*, *Gene*, **425**, 28–35.
40. Thompson, E.M., Nagata, S., and Tsuji, F.I. (1989) Cloning and expression of cDNA for the luciferase from the marine ostracod *Vargula hilgendorffii*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6567–6571.
41. Nakajima, Y., Kobayashi, K., Yamagishi, K., Enomoto, T., and Ohmiya, Y. (2004) cDNA cloning and characterization of a secreted luciferase from the luminous Japanese ostracod, *Cypridina noctiluca*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 565–570.
42. Takenaka, Y., Yamaguchi, A., Tsuruoka, N., Torimura, M., Gojobori, T., and Shigeri, Y. (2012) Evolution of bioluminescence in marine planktonic copepods, *Mol. Biol. Evol.*, **29**, 1669–1681.

43. Takenaka, Y., Noda-Ogura, A., Imanishi, T., Yamaguchi, A., Gojobori, T., and Shigeri, Y. (2013) Computational analysis and functional expression of ancestral copepod luciferase, *Gene*, **528**, 201–205.
44. Charbonneau, H., and Cormier, M.J. (1979) Ca²⁺-induced bioluminescence in *Renilla reniformis*. Purification and characterization of calcium triggered luciferin-binding protein, *J. Biol. Chem.*, **254**, 769–780.
45. Ward, W.W., and Cormier, M.J. (1979) An energy transfer protein in coelenterate bioluminescence. Characterization of the *Renilla* green fluorescent protein, *J. Biol. Chem.*, **254**, 781–788.
46. Loening, A.M., Fenn, T.D., and Gambhir, S.S. (2007) Crystal structures of the luciferase and green fluorescent protein from *Renilla reniformis*, *J. Mol. Biol.*, **374**, 1017–1028.
47. Stepanyuk, G.A., Liu, Z.J., Markova, S.V., Frank, L.A., Lee, J., Vysotski, E.S., Wang, B.C. (2008) Crystal structure of coelenterazine-binding protein from *Renilla muelleri* at 1.7 Å: why it is not a calcium-regulated photoprotein, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **7**, 442–447.
48. Stepanyuk, G.A., Liu, Z.J., Vysotski, E.S., Lee, J., Rose, J.P., and Wang, B.C. (2009) Structure based mechanism of the Ca²⁺-induced release of coelenterazine from the *Renilla* binding protein, *Proteins*, **74**, 583–593.
49. Cormier, M.J. (1978) Application of *Renilla* bioluminescence: an introduction, *Methods Enzymol.*, **57**, 237–244.
50. Stepanyuk, G.A., Unch, J., Malikova, N.P., Markova, S.V., Lee, J., and Vysotski, E.S. (2010) Coelenterazine-*v* ligated to Ca²⁺-triggered coelenterazine-binding protein is a stable and efficient substrate of the red-shifted mutant of *Renilla muelleri* luciferase, *Anal. Bioanal. Chem.*, **398**, 1809–18017.
51. Loening, A.M., Fenn, T.D., Wu, A.M., and Gambhir, S.S. (2006) Consensus guided mutagenesis of *Renilla* luciferase yields enhanced stability and light output, *Protein Eng. Des. Sel.*, **19**, 391–400.
52. Deng, L., Vysotski, E.S., Markova, S.V., Liu, Z.J., Lee, J., Rose, J., and Wang, B.C. (2005) All three Ca²⁺-binding loops of photoproteins bind calcium ions: the crystal structures of calcium-loaded apo-aequorin and apo-obelin, *Protein Sci.*, **14**, 663–675.
53. Stepanyuk, G.A., Liu, Z.J., Burakova, L.P., Lee, J., Rose, J., Vysotski, E.S., and Wang, B.C. (2013) Spatial structure of the novel light-sensitive photoprotein berovin from the ctenophore *Beroë abyssicola* in the Ca²⁺-loaded apoprotein conformation state, *Biochim. Biophys. Acta*, **1834**, 2139–2146.
54. Matthews, J.C., Hori, K., and Cormier, M.J. (1977) Purification and properties of *Renilla reniformis* luciferase, *Biochemistry*, **16**, 85–91.
55. Woo, J., and von Arnim, A.G. (2008) Mutational optimization of the coelenterazine-dependent luciferase from *Renilla*, *Plant Methods*, **4**, 23.
56. Weissleder, R. (2001) A clearer vision for *in vivo* imaging, *Nature Biotechnol.*, **19**, 316–317.
57. Loening, A.M., Wu, A.M., and Gambhir, S.S. (2007) Red-shifted *Renilla reniformis* luciferase variants for imaging in living subjects, *Nature Methods*, **4**, 641–643.
58. Tannous, B.A., Kim, D.E., Fernandez, J.L., Weissleder, R., and Breakefield, X.O. (2005) Codon-optimized *Gaussia* luciferase cDNA for mammalian gene expression in culture and *in vivo*, *Mol. Ther.*, **11**, 435–443.
59. Verhaegent, M., and Christopoulos, T.K. (2002) Recombinant *Gaussia* luciferase. Overexpression, purification, and analytical application of a bioluminescent reporter for DNA hybridization, *Anal. Chem.*, **74**, 4378–4385.
60. Markova, S.V., Burakova, L.P., and Vysotski, E.S. (2012) High-active truncated luciferase of copepod *Metridia longa*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **417**, 98–103.
61. Inouye, S., and Sahara, Y. (2008) Identification of two catalytic domains in a luciferase secreted by the copepod *Gaussia princeps*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **365**, 96–101.
62. Remy, I., and Michnick, S.W. (2006) A highly sensitive protein-protein interaction assay based on *Gaussia* luciferase, *Nature Methods*, **3**, 977–979.
63. Stepanyuk, G.A., Xu, H., Wu, C.K., Markova, S.V., Lee, J., Vysotski, E.S., and Wang, B.C. (2008) Expression, purification and characterization of the secreted luciferase of the copepod *Metridia longa* from Sf9 insect cells, *Protein Expr. Purif.*, **61**, 142–148.
64. Degeling, M.H., Bovenberg, M.S., Lewandrowski, G.K., de Gooijer, M.C., Vleggeert-Lankamp, C.L., Tannous, M., Maguire, C.A., and Tannous, B.A. (2013) Directed molecular evolution reveals *Gaussia* luciferase variants with enhanced light output stability, *Anal. Chem.*, **85**, 3006–3012.
65. Welsh, J.P., Patel, K.G., Manthiram, K., and Swartz, J.R. (2009) Multiply mutated *Gaussia* luciferases provide prolonged and intense bioluminescence, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **389**, 563–568.
66. Kim, S.B., Suzuki, H., Sato, M., and Tao, H. (2011) Superluminescent variants of marine luciferases for bioassays, *Anal. Chem.*, **83**, 8732–8740.
67. Chung, E., Yamashita, H., Au, P., Tannous, B.A., Fukumura, D., and Jain, R.K. (2009) Secreted *Gaussia* luciferase as a biomarker for monitoring tumor progression and treatment response of systemic metastases, *PLoS One*, **4**, e8316.
68. Lupold, S.E., Johnson, T., Chowdhury, W.H., and Rodriguez, R. (2012) A real time *Metridia* luciferase based non-invasive reporter assay of mammalian cell viability and cytotoxicity via the β-actin promoter and enhancer, *PLoS One*, **7**, e36535.
69. Kim, S.B., Torimura, M., and Tao, H. (2013) Creation of artificial luciferases for bioassays, *Bioconjug. Chem.*, **24**, 2067–2075.
70. Kim, S.B., and Izumi, H. (2014) Functional artificial luciferases as an optical readout for bioassays, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **448**, 418–423.
71. Shimomura, O., Masugi, T., Johnson, F.H., and Haneda, Y. (1978) Properties and reaction mechanism of the bioluminescence system of the deep-sea shrimp *Oplophorus graciliorostris*, *Biochemistry*, **17**, 994–998.
72. Inouye, S., and Sasaki, S. (2007) Overexpression, purification and characterization of the catalytic component of *Oplophorus* luciferase in the deep-sea shrimp, *Oplophorus graciliorostris*, *Protein Expr. Purif.*, **56**, 261–268.
73. 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., and Wood, K.V. (2012) Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate, *ACS Chem. Biol.*, **7**, 1848–1857.
74. Inouye, S., Sato, J., Sahara-Miura, Y., Yoshida, S., and Hosoya, T. (2014) Luminescence enhancement of the catalytic 19 kDa protein (KAZ) of *Oplophorus* luciferase by three amino acid substitutions, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **445**, 157–162.
75. Shimomura, O., and Johnson, F.H. (1970) Mechanisms in the quantum yield of *Cypridina* bioluminescence, *Photochem. Photobiol.*, **12**, 291–295.
76. Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H. (2011) Signal P 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions, *Nature Methods*, **8**, 785–786.
77. Zhou, Y.F., Eng, E.T., Zhu, J., Lu, C., Walz, T., and Springer, T.A. (2012) Sequence and structure relationships within von Willebrand factor, *Blood*, **120**, 449–458.

78. Viviani, V.R. (2002) The origin, diversity, and structure function relationships of insect luciferases, *Cell. Mol. Life Sci.*, **59**, 1833–1850.
79. Prasher, D., McCann, R.O., and Cormier, M.J. (1985) Cloning and expression of the cDNA coding for aequorin, a bioluminescent calcium-binding protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **126**, 1259–1268.
80. Inouye, S., Noguchi, M., Sakaki, Y., Takagi, Y., Miyata, T., Iwanaga, S., Miyata, T., and Tsuji, F.I. (1985) Cloning and sequence analysis of cDNA for the luminescent protein aequorin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 3154–3158.
81. Илларионов Б.А., Маркова С.В., Бондарь В.С., Высоцкий Е.С., Гительзон И.И. (1992) Клонирование и экспрессия кДНК кальций-активируемого фотопро-теина обелина из гидроидного полипа *Obelia longissima*, *Доклады АН*, **326**, 911–913.
82. Markova, S.V., Vysotski, E.S., Blinks, J.R., Burakova, L.P., Wang, B.C., and Lee, J. (2002) Obelin from the biolumi-nescent marine hydroid *Obelia geniculata*: cloning, expres- sion, and comparison of some properties with those of other Ca²⁺-regulated photoproteins, *Biochemistry*, **41**, 2227–2236.
83. Markova, S.V., Burakova, L.P., Frank, L.A., Golz, S., Korostileva, K.A., and Vysotski, E.S. (2010) Green-fluo- rescent protein from the bioluminescent jellyfish *Clytia gre- garia*: cDNA cloning, expression, and characterization of novel recombinant protein, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **9**, 757–765.
84. Burakova, L., Natashin, P., Markova, S., Ereemeeva, E., and Vysotsky, E. (2014) The C-terminal tyrosine deletion in mitrocomin increases its bioluminescent activity, *Luminescence*, **29**, 84.

COELENTERAZINE-DEPENDENT LUCIFERASES

S. V. Markova, E. S. Vysotski*

*Institute of Biophysics, Russian Academy of Sciences,
Siberian Branch, Photobiology Laboratory, Akademgorodok 50,
bldg. 50, Krasnoyarsk 660036, Russia; fax: +7(391)243-3400,
E-mail: eugene.vysotski@gmail.com*

Received February 25, 2015

Revision received March 4, 2015

Bioluminescence is a widespread natural phenomenon. Luminous organisms are found among bacteria, fungi, protozoa, coelenterates, worms, molluscs, insects, and fish. Studies on bioluminescent systems of various organisms have revealed a very interesting feature – the mechanisms underlying light emission in the visible range of the spectrum are considerably different in representatives of different taxa despite the same final result of the biochemical process. Among the several substrates of bioluminescent reactions identified in marine luminous organisms, the most commonly used are coelenterazine and *Cypridina* luciferin, the imidazopyrazinone-type luciferins. Although the used substrate is the same, bioluminescent proteins that catalyze light-emitting reactions in taxonomically remote luminescent organisms do not show similarity in amino acid sequences or in spatial structures. The review considers luciferases of various luminescent organisms that use coelenterazine or *Cypridina* luciferin as a substrate, as well as modifications of these proteins that improve their physicochemical and bioluminescent properties and therefore their applicability in bioluminescence *in vivo* imaging.

Key words: bioluminescence, luciferase, luciferin, coelenterazine