

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биорганической химии им. академиков  
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук**

---

На правах рукописи

**ОСИПОВА Зинаида Михайловна**

**Синтез люциферинов, оксилуциферинов и их аналогов  
для изучения механизмов биолюминесценции  
почвенного червя *Fridericia heliota* и высших грибов**

Специальность 02.00.10 – «биоорганическая химия»

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Научный руководитель

к.х.н. Ямпольский Илья Викторович

Москва – 2016

## Содержание

Введение.....	4
ГЛАВА I. Обзор литературы.....	5
1.1    Введение.....	5
1.2    Общие способы применения биолюминесценции.....	6
1.2.1    Определение аналитов.....	6
1.2.1.1    Анализ АТФ.....	6
1.2.1.2    Анализ органических веществ с использованием клеток-репортёров.....	10
1.2.1.3    Биолюминесцентный анализ метаболитов на основе бактериальной люциферазы.....	10
1.2.2    Биолюминесценция в медицине.....	12
1.2.2.1    Биоимиджинг в медицине.....	12
1.2.2.2    Высокопроизводительный скрининг лекарств и исследование белковых взаимодействий.....	18
1.2.2.3    Иммунологические исследования.....	20
1.3    Существующие биолюминесцентные системы и способы их применения.....	22
1.3.1    Биолюминесцентная система D-люциферина светляка.....	23
1.3.2    Биолюминесцентные системы на основе целентеразина.....	30
1.3.3    Фотопротеины.....	36
1.3.4    Биолюминесцентная система бактерий.....	37
1.3.5    Биолюминесцентная система люциферина рачков <i>Cypridina</i> .....	39
1.3.6    Биолюминесцентная система люцифериноров динофлагеллят и рачков криля.....	42
1.3.7    Биолюминесцентная система люциферина моллюска <i>Latia</i> .....	44
1.3.8    Биолюминесцентная система люциферина червя <i>Diplocardia</i> .....	45
1.3.9    Биолюминесцентная система люциферина червя <i>Fridericia heliota</i> .....	46
ГЛАВА II. Результаты и обсуждение.....	48
2.1    Биолюминесцентная система <i>Fridericia heliota</i> .....	48
2.1.1    Оптимизация синтеза люциферина <i>Fridericia heliota</i> .....	48

2.1.2	Изучение структуры природных аналогов люциферина <i>Fridericia heliota</i> .....	51
2.1.3	Изучение механизма реакции биолюминесценции <i>Fridericia heliota</i> .....	53
2.1.4	Заключение.....	57
2.2	Биолюминесцентная система высших грибов .....	59
2.2.1	Синтез люциферина высших грибов .....	60
2.2.2	Синтез аналогов грибного люциферина.....	64
2.2.3	Спектральные характеристики аналогов грибного люциферина .....	65
2.2.4	Синтез предполагаемого оксилуциферина грибов и его аналога для изучения механизма биолюминесцентной реакции грибов.....	70
2.2.5	Заключение.....	78
ГЛАВА III. Экспериментальная часть.....		79
3.1	Материалы и оборудование.....	79
3.2	Синтез .....	80
3.2.1	Модификация синтеза люциферина <i>Fridericia heliota</i> .....	80
3.2.2	Синтез (Z)-CompY и его изомера.....	85
3.2.3	Синтез биолюминесцентных аналогов люциферина <i>Fridericia heliota</i> .....	88
3.2.4	Синтез аналога аденилата люциферина <i>Fridericia heliota</i> .....	93
3.2.5	Синтез люциферина, оксилуциферина высших грибов и их аналогов .....	94
Выводы .....		104
Благодарности.....		106
Список сокращений.....		107
Список литературы.....		109

## Введение

Биолюминесценция – это явление свечения живых организмов. Процесс имеет химическую природу и в общем случае обусловлен взаимодействием между белком-люциферазой и субстратом – молекулой люциферина. Люцифераза катализирует окисление люциферина кислородом воздуха и его последующее превращение в молекулу оксилуциферина в возбужденном состоянии, которая испускает квант видимого света при переходе в нормальное состояние.

На сегодняшний день известно о существовании около 30 различных механизмов биолюминесценции [Shimomura, 2006], однако лишь для восьми природных люциферин-люциферазных систем известны структуры. Помимо люциферин-люциферазных биолюминесцентных систем активно изучаются фотопротеины – необычные биолюминесцентные белки, представляющие собой стабильные фермент-субстратные комплексы. Люминесценция большинства фотопротеинов не требует присутствия кислорода и активируется ионами металлов ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ).

Благодаря высоким квантовым выходам реакций биолюминесценции и относительной нетоксичности люциферин-люциферазных систем, на основе этого явления с использованием возможностей генной инженерии был разработан широкий ряд аналитических методов *in vitro* и *in vivo*, включающий в себя тесты на различные аналиты, иммунологические исследования, изучение экспрессии генов, скрининг лекарств, а также биоимиджинг живых систем в режиме реального времени. Большинство методов на сегодняшний день активно применяется в изучении развития онкологических процессов, инфекционных заболеваний и в экологическом мониторинге.

Каждая из исследованных биолюминесцентных систем обладает своим набором недостатков и ограничений, что провоцирует искать и исследовать новые системы и механизмы их функционирования в качестве альтернативы к существующим. Данная диссертационная работа посвящена изучению двух новых люциферин-люциферазных систем: почвенных кольчатых малощетинковых червей *Fridericia heliota* и системы высших грибов. Целью работы стала оптимизация синтеза новых люциферин-люциферазных систем, получение ряда аналогов люциферин-люциферазных систем с новыми спектральными характеристиками, а также синтез оксилуциферина грибов и его аналога для изучения механизмов биолюминесценции.

## ГЛАВА I. Обзор литературы

### 1.1 Введение

Разнообразие аналитических методов на основе биолюминесценции постоянно расширяется благодаря последним достижениям в химии, молекулярной биологии и разработке новых приборов для измерения света и имиджинга.

Поскольку реакции биолюминесценции не требуют внешнего источника света (в отличие от процессов флуоресценции), то измерения можно проводить на темном фоне. В ходе эксперимента не наблюдается осложнений, связанных с разогревом и дрейфом источника света, помехами от рассеяния света и от возможных флуоресцентных компонентов. И именно поэтому биолюминесцентные методы сверхчувствительны, обеспечивают хорошее пространственное разрешение, широкий динамический диапазон и простую количественную оценку сигнала.

Возможность использовать низкие концентрации реагентов породила набор методов высокопроизводительного скрининга для разработки лекарственных средств. Биолюминесцентный анализ по репортёрным генам позволил совершить значительный прогресс в фундаментальных и прикладных областях науки: от изучения молекулярных взаимодействий до экологического мониторинга. И, наконец, неинвазивный биолюминесцентный имиджинг *in vivo* вырос в мощную альтернативу другим имиджинговым технологиям, трансгенные биолюминесцентные животные становятся удобными моделями для проведения доклинических испытаний и патофизиологических исследований.

Данный обзор призван рассмотреть основные существующие на сегодняшний день способы применения биолюминесценции в контексте многообразия субстратов люцифераз - люциферин-люцифераз. Обзор состоит из двух частей. В первой части изложены общие и наиболее популярные направления применения биолюминесценции, во второй части подробно описаны применения конкретных люциферин-люциферазных и фотопротеиновых систем на основе каждого из восьми известных на сегодняшний день люциферин-люцифераз.

## 1.2 Общие способы применения биолюминесценции

### 1.2.1 Определение аналитов

#### 1.2.1.1 Анализ АТФ

Классическим методом применения люциферин-люциферазной реакции является аналитическое определение аденозинтрифосфата (АТФ). Когда в 1947 году МакЭлрой показал, что в реакции биолюминесценции светляка одним из обязательных компонентов является АТФ [McElroy, 1947], в биохимическом анализе была открыта новая глава. (Подробнее про механизм биолюминесценции светляка см. в 1.3.1 Биолюминесцентная система D-люциферина светляка.) На сегодняшний день светлячковую люциферин-люциферазную систему и ее модификации используют для определения концентрации АТФ в широком ряду различных исследований.

Молекула АТФ является универсальным энергетическим носителем в клетке. Основная масса АТФ синтезируется на мембранах митохондрий. Множество ферментов используют АТФ в катализируемых ими превращениях. Концентрация АТФ внутри клетки всегда поддерживается примерно на одном и том же уровне, поэтому изучение ее варьирования позволяет оценить метаболический потенциал клеток. До тех пор пока клетка здорова и функционирует, она стремится сохранить нормальный уровень АТФ, однако когда клетка умирает, уровень АТФ стремительно падает. Изучение уровня АТФ в клетках позволяет оценить действие различных агентов на их пролиферацию или измерить цитотоксичность [Guardigli, Lundin, Roda, 2010].

Поскольку около 90% АТФ синтезируется в митохондриях, то уровень его содержания в клетке является показателем их функциональной активности. Изменение активности митохондрий часто является индикатором некоторых патологических процессов, например, старения. Точная оценка тканевой функции митохондрий необходима для понимания процесса старения. Также ее проводят при изучении механизмов развития сопутствующих заболеваний. Метод, предложенный в 1990 году для оценки скорости митохондриального синтеза АТФ в скелетных мышцах [Wibom, Hultman, 1990], был использован для демонстрации значительного снижения окислительного потенциала митохондрий у человека с возрастом [Short и др., 2005], а также того, что регулярное выполнение упражнений на выносливость на протяжении жизни позволяет существенно затормозить развитие таких негативных последствий [Lanza и др., 2008]. Современный метод функциональной оценки митохондрий *in vitro* подробно изложен в работе [Lanza, Nair, 2009].

АТФ активно участвует в развитии опухолей, поэтому знание об изменениях внутриклеточных концентраций АДФ и АТФ, а также их соотношения, имеет колоссальное значение в том числе и для изучения метаболического поведения опухолевых клеток. Раковые клетки, в отличие от здоровых, большую часть синтеза АТФ осуществляют через гликолиз, а не окислительное фосфорилирование – это явление было открыто Отто Варбургом [Warburg, 1925] и сейчас носит название эффекта Варбурга. Оценка доли гликолиза в синтезе АТФ клеткой позволяет более полно изучать особенности онкометаболизма и поможет в будущем развить новые подходы в лечении рака: дисфункция митохондрий является либо следствием, либо причиной развития опухоли, но эти процессы однозначно взаимосвязаны [Chen, Qian, Wu, 2015; Senyilmaz, Telemann, 2015]. Методы оценки уровня АТФ с использованием химерных светляковых люцифераз описаны в работе [Patergnani и др., 2014].

На основе измерения уровня концентрации АТФ в 1990-х годах был разработан метод АТР-ТСА (АТФ-тест хемосенситивности опухолей) [Andreotti и др., 1995], позволяющий оценить воздействие различных лекарственных препаратов и их комбинаций на биопсийные образцы опухолевых клеток. Этот метод используется для подбора препаратов химиотерапии, в том числе индивидуального, при лечении рака яичников [Zhang, Li, 2015], рака шейки матки [Zhang и др., 2013b], рака груди [Fehm и др., 2012; Honig и др., 2014], а также меланомы [Doerler и др., 2007; Neuber, 2003], гепатомы [Gong и др., 2014] и др. Стандартный тест *SartoriTest*® для АТР-ТСА доступен у DCS Innovative Diagnostik Systeme (Гамбург, Германия) [DCS - Innovative Diagnostik-Systeme]. Условия проведения теста подробно описаны в [Glaysher, Cree, 2011].

Помимо своей роли в качестве энергоносителя, АТФ также выступает как аллостерический эффектор для ряда ферментов, используется как сигнальное вещество в межклеточных взаимодействиях и как медиатор в синапсах. Например, в работе [Novak и др., 2003] кратко обзревается исследование роли АТФ в паракринной сигнализации поджелудочной железы: с помощью биолюминесцентного метода анализа АТФ было выявлено, что клетки ацинуса поджелудочной железы запасают АТФ в везикулах, высвобождая его в ответ на механическую стимуляцию и гипотонический шок. АТФ связывается с P2-рецепторами клеток протоки поджелудочной железы, активируя её секрецию. Поскольку процессы, активирующиеся в ходе пуринергического способа передачи сигнала с помощью АТФ, изучены еще в недостаточно полном объеме (а это сигналинг в кровеносной, иммунной, нервной системах и др.), то очень вероятно, что метод АТФ-микроскопии в реальном времени, предложенный в статье [Furuya, Sokabe,

Grygorczyk, 2014], найдет широкое применение. С помощью ПЗС-камеры<sup>1</sup> авторы могли наблюдать выделение АТФ эпителиальными клетками человека и мыши в ответ на механические воздействия (прикосновение или растяжение) и гипотонический шок. Выделение и распространение АТФ вокруг клетки можно было наблюдать в непрерывном режиме с определением концентрации АТФ по интенсивности биолюминесценции.

Определение АТФ на поверхности клеток также возможно, если использовать иммобилизованную люциферазу, связанную с мембраной с помощью стрептавидин-биотинового взаимодействия [Nakamura и др., 2006].

Методы биолюминесцентного определения концентрации АТФ в крови *in vivo* (весь АТФ крови, АТФ плазмы крови и скорость высвобождения АТФ), обладающие чувствительностью  $2 \cdot 10^{-10}$  -  $2 \cdot 10^{-7}$  М, описаны в обзоре [Abraham, Salikhova, Hug, 2003]. Эти методы были клинически испытаны для измерения уровней АТФ у пациентов с диагнозами хроническая почечная недостаточность, муковисцидоз, катехсия, рак и др. Авторы статьи надеются, что в будущем измерение АТФ крови пациентов станут рутинными при проведении диагностики и терапии заболеваний.

Так как АТФ можно найти во всех живых организмах, то по его наличию или отсутствию можно делать вывод о загрязненности пробы различными микроорганизмами: бактериями, спорами грибов и т.д. Этот метод часто используют в исследованиях окружающей среды (например, в работе [Björkman, Karl, 2001]) и при анализе чистоты уборки в больницах. Больничная среда способствует распространению бактериальных заболеваний среди пациентов, препятствовать этому может только тщательная уборка помещения. Помимо традиционного визуального контроля, который, к сожалению, не позволяет определить реальный уровень загрязнения патогенами, существует еще несколько [Carling, 2013], например, микробиологическое тестирование и флуоресцентные пробы. Как показано в работе [Huang и др., 2015], одним из самых быстрых и чувствительных методов является именно АТФ-биолюминесценция (АТФ-Б). Использование АТФ-люциферин-люциферазного теста в процессе обучения и подготовки клинингового персонала позволяет существенно улучшить методики уборки помещений и снизить распространение инфекций в отделении интенсивной терапии больницы [Chan и др., 2015].

Определение бактериальных инфекций мочевыводящих путей возможно осуществить в течение нескольких минут, минуя стандартный микробиологический тест, который занимает обычно несколько дней, с помощью анализа мочи АТФ-

---

<sup>1</sup> ПЗС расшифровывается как «прибор с зарядовой связью».



биолюминесцентным методом [Österberg и др., 1991]. В комбинации с иммуносорбентным анализом с использованием антител на 13 самых распространенных уропатогенных бактерий международной группой ученых был разработан метод анализа, позволяющий за 20 минут установить тип инфекции и затем в течение 3-6 часов определить антисептический эффект каждого из восьми предложенных широко применяемых антибиотиков на инфекционный материал пациента [Dong, Zhao, 2015].

Альтернативно, метод АТФ-Б можно применять для быстрого определения бактериального загрязнения корневого канала при лечении зубов [Tan и др., 2015].

Также по изменению уровня АТФ можно оценить восприимчивость бактерий к антибиотикам. В статье [March Rosselló и др., 2015] описана разработка быстрого теста на антибиотическую восприимчивость, опробованного на 43 бактериальных штаммах. Результаты разработанной методики отлично согласуются с данными стандартных методов (E-test, MicroScan и VITEK2). Замечательным свойством данного метода, помимо его исключительной скорости, является то, что молекула АТФ может быть обнаружена в концентрации до  $10 \cdot 10^{-18}$  моль, что в реальности соответствует пяти бактериальным клеткам. Недостатками такого метода являются нестабильность субстратов люциферина и люциферазы и их стоимость – суммарно измерение в планшете на 96 ячеек на данный момент обходится в 125-130 евро. Подобный подход позволит ограничить симптоматическое и ситуативное лечение бактериальных инфекций и, как следствие, быстрое устаревание антибиотических препаратов.

Помимо этого, поскольку АТФ присутствует во всех видах пищи, метод биолюминесцентного определения АТФ незаменим для контроля загрязнения и качества гигиены пищевых продуктов и напитков (подробный обзор про применимость АТФ-Б тестов для индустрии - [Shama, Malik, 2013]). Также уровень АТФ измеряют для контроля качества косметики [Jimenez, 2001]. Ранее использовавшийся микробиологический тест на загрязнение на сегодняшний день устарел, поскольку его результатов надо ждать от 2 до 6 дней, в то время как стандартный АТФ-Б тест занимает лишь 15-20 секунд и при этом является гораздо более чувствительным. На сегодняшний день ряд компаний предлагает различные варианты реагентов (химический состав не раскрывается) и приборов для быстрого определения уровня загрязнения с помощью АТФ-Б: от стандартных наборов для люминометра, например, ENLITEN® для определения АТФ и BacTiter-Glo™ для определения микробиологического загрязнения от Promega [Promega 2015 Life Science Catalog, 2014], различных АТФ-Б тестов для определения АТФ в продуктах питания и напитков от Promicol [Products - Promicol, 2015] и Celsis [Rapid

microbiological testing systems for processed consumer products - Celsis, 2015] до целого спектра карманных приборов различных производителей [Food&Beverage - Comparison Chart - Compare ATP monitoring Systems Side By Side, 2015], например, EnSURE™ и SystemSURE Plus™ от Hygiena, Clean Trace™ от 3M™, NovaLum™ и Firefly 2™ от Charm Sciences, Accupoint™ от Neogen, российский прибор ЛЮМ-1 от ООО «Люмтек», а также Lumitester PD-20™ от Kikkoman, позволяющий дополнительно измерить уровень АМФ, и др. Стоимость мобильных приборов составляет от \$1500 до \$5000, сегодня они используются во всем мире для мониторинга качества производства.

### **1.2.1.2 Анализ органических веществ с использованием клеток-репортёров**

Для определения загрязненности почвы и воды органическими веществами типа бензола, толуола, полициклических ароматических углеводородов, бифенилов, фенола, диоксинов и других загрязнителей традиционно используется комбинация таких аналитических методов, как ВЭЖХ и ГХ-масс-спектрометрия. Эти методы признаны трудоемкими и довольно дорогостоящими. Кроме того, с их помощью невозможно измерить биодоступность веществ и их биологическое воздействие. Поэтому в противовес традиционным методам с помощью генной инженерии были разработаны другие подходы, не обладающие такими недостатками - через создание клеток-биорепортёров. В качестве основы традиционно используются бактериальная и светлячковая биолюминесцентные системы в прокариотических и эукариотических клетках. В качестве генов-репортёров выступают гены, кодирующие как люциферазу *luc* (светлячковая) и *luxAB* (бактериальная), так и всю биолюминесцентную систему *luxCDABE* (бактериальная), и генетические конструкции на их основе. Включение биолюминесцентных систем в биорепортерные клетки дает новые возможности для аналитики органических веществ. Наиболее полные обзоры по существующим применениям биосенсоров можно прочитать в [Xu и др., 2014] и [Su и др., 2011].

### **1.2.1.3 Биолюминесцентный анализ метаболитов на основе бактериальной люциферазы**

Особенностью бактериальной люциферин-люциферазной системы является участие флавиномононуклеотида (ФМН) и никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) в качестве кофакторов (подробнее см. в 1.3.3). В связи с этим возможна разработка аналитических систем для определения НАД<sup>+</sup>/НАДН, НАДФ<sup>+</sup>/НАДФН, дегидрогеназ, а также этилового спирта, малата, оксалоацетата и др. [Guardigli, Lundin, Roda, 2010].

Аналитическое определение этанола, сорбита и лактата включает в себя окисление этих субстратов с сопутствующим восстановлением НАД<sup>+</sup> в НАДН, который затем может быть заново окислен в НАД<sup>+</sup> бактериальной биолюминесцентной системой. При анализе оксалоацетата происходит одновременное потребление НАД<sup>+</sup> и бактериальной люциферазой, и малатдегидрогеназой.

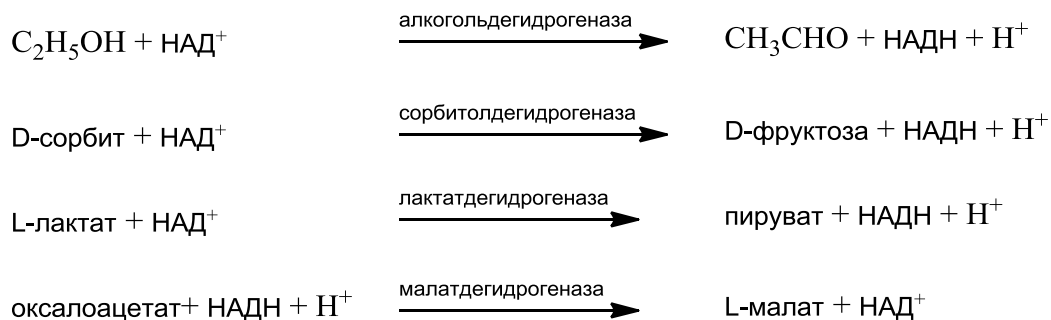


Схема 1.1. Примеры реакций, используемых в бактериальном биолюминесцентном анализе.

Впервые методы биолюминесцентного определения НАДН и ФМН в концентрациях от  $10^{-14}$  М до  $10^{-7}$  М [Stanley, 1971], глюкозы и малата в пикомольных количествах [Brolin и др., 1971], а также НАДН и НАДФН [Brolin, Verne, Isacson, 1972] были разработаны еще в начале 70-х годов XX века. Также существуют методы для косвенного определения концентрации алкогольдегидрогеназы в сыворотке и гистологических образцах [Agarwal и др., 1982], мио-инозитола [Gudermann, Cooper, 1986], желчных кислот [Roda и др., 1982, 1988], этанола [Anderstam и др., 2009] и др., все они основаны в первую очередь на определении НАД(Ф)Н.

В начале 1990-х гг. на основе данных методов была разработана методика по созданию метаболических карт опухолей путем биолюминесцентного измерения уровней лактата, глюкозы и АТФ в срезах быстрозамороженных тканей [Mueller-Klieser, Walenta, 1993]. Это было сделано специально для работы с опухолевыми тканями. Как уже упоминалось выше, в опухолевых клетках наблюдается эффект Варбурга – смещение клеточного метаболизма в сторону анаэробного гликолиза. «Здоровое» соотношение продуктов анаэробного и аэробного гликолиза в клетке лактат:пируват должно быть менее 20:1. В работе [Broggini-Tenzer, Vuong, Pruschy, 2011] описано получение лактатных метаболических карт биолюминесцентным методом и показано, что по уровню клеточного лактата можно судить о воздействии лечения на опухолевые ткани. Метод определения пирувата описан в статье [Sattler, Walenta, Mueller-Klieser, 2007]. Совместная биолюминесцентная оценка уровней лактата и пирувата в работе [Sattler и др., 2010] позволяет увидеть, что лактат концентрируется в опухолевых тканях, устойчивых

к воздействию лучевой терапии, поэтому данная методика может быть использована при подборе лечения.

На сегодняшний день из коммерческих продуктов для билюминесцентного определения НАД(Ф)Н в растворах и клеточных лизатах на рынке существуют наборы NAD(P)H-Glo™ Detection System, NAD/NADH-Glo™ Assay и NADP/NADPH-Glo™ Assay от Promega [Promega 2015 Life Science Catalog, 2014; Vidugiriene и др., 2014], состав которых не разглашается.

Таким образом, бактериальная билюминесцентная система используется в широком ряду методов оценки концентрации различных метаболитов.

## **1.2.2 Билюминесценция в медицине**

Явление билюминесценции нашло обширное применение в медицинских исследованиях различных заболеваний, таких как рак, нейродегенеративные заболевания, инфекционные болезни, болезни сердца, диабет и др. Значительный вклад технологии на основе билюминесценции вносят в разработку лекарственных препаратов. Основным направлением применения билюминесценции в медицине является биоимиджинг – получение изображения тканей или процессов внутри клеток неинвазивным способом. Об этой и других билюминесцентных технологиях в медицине будут приведены данные в текущей главе литературного обзора.

### **1.2.2.1 Биоимиджинг в медицине**

Биоимиджинг – одно из самых популярных направлений применения билюминесценции. Как только становится известна аминокислотная последовательность люциферазы, появляется возможность использовать ее кДНК и поместить ген, кодирующий люциферазу, в организм другого хозяина. Высокая чувствительность обнаружения билюминесценции с помощью люцинометра или ПЗС-камеры, отсутствие помех в виде автофлуоресценции и, как следствие, низкий уровень базовой линии, позволяют изучать различные процессы *in vitro* и *in vivo* с помощью люцифераз с большей чувствительностью по сравнению с флуоресцентными белками [Трой и др., 2004]. Чаще всего для этого применяются D-люциферининовая и целентеразиновая билюминесцентные системы, иногда одновременно, дополняя одна другую (см. обзор [Nakajima, Ohmiya, 2010]). Бактериальная система также применима для биоимиджинга, однако ее использование пока что распространено только в бактериальных клетках. Основные направления биоимиджинга – это проведение исследований путем анализа по генам-репортёрам [Brogan и др., 2012; Ray, Gambhir, 2007], отслеживание развития

и распространения клеток (например, нейродегенеративных, опухолевых или инфекционных), исследование белок-белковых взаимодействий (методом билюминесцентного резонансного переноса энергии (BRET) или методом «сплит»-люциферазы (LCI)) и др. Ряд обзоров описывает общие достижения в области биомиджинга: [Kaijzel и др., 2011; Prescher, Contag, 2010; Welsh, Kay, 2005].

С некоторыми последними разработками из области биомиджинга в медицине автор предлагает ознакомиться в данном разделе обзора.

### ***Биомиджинг в исследовании опухолевых заболеваний***

Подавляющее большинство исследований, использующих билюминесцентный имиджинг, посвящено опухолевым заболеваниям. Эта область настолько разработана, что ее рассмотрение выходит за рамки данного литературного обзора, автор позволит себе ограничиться лишь краткими замечаниями.

Важнейшие процессы в развитии опухолевых заболеваний, такие как ангиогенез, метастазирование и ответ на лечение, зависят от сложных взаимодействий между раковыми клетками и их окружением. Наиболее информативными для их изучения представляются опухолевые модели *in vivo*. Естественно, визуальная оценка опухолей, расположенных в глубоких тканях, невозможна без использования имиджинговых технологий. В этом смысле билюминесценция обладает рядом преимуществ по отношению к другим традиционным методикам (МРТ, ПЭТ, ОФЭКТ, радиография и др.), поскольку обладает беспрецедентной чувствительностью и позволяет определить до 10 отдельных раковых клеток. К устранению некоторых недостатков, например, сложности получения трехмерных изображений, возможно, в свое время будут найдены подходы [Slavine, McColl, 2015]. Помимо неинвазивного изучения развития опухолевых заболеваний биомиджинг используется для оценки эффективности используемой терапии в доклинических испытаниях, опухолевого метаболизма, мониторинга экспрессии генов *in vivo* и других механистических исследований. Некоторые аспекты применения билюминесценции для изучения опухолей были также уже описаны выше (АТФ-хемосенситивность опухолей и создание метаболических карт).

Традиционно применяются гены люцифераз *Photinus pyralis*, *Pyrophorus plagiophtalamus*, *Renilla reniformis*, *Gaussia princeps*, и также NanoLuc<sup>®</sup> ([Germain-Genevois, Garandeau, Couillaud, 2015]), иногда совместно с флуоресцентным белком GFP (одновременно либо в составе химерных белков). Встречаются исследования, где применяются сложные конструкции генов (например, [Ju и др., 2015]). Из недавних

работ можно привести пример применения химерного белка из FLuc и флуоресцентного белка Cherry: благодаря такой комбинации стали доступными и биолюминесцентный, и флуоресцентный имиджинг для изучения лимфомы В-лимфоцитов [Scotto и др., 2012]. Также интересен пример химерных белков из NanoLuc<sup>®</sup> в комбинации с eGFP и LSSmOrange [Schaub и др., 2015]. Белки слияния NanoLuc<sup>®</sup> с флуоресцентными белками в результате BRET генерируют очень яркий и, следовательно, чрезвычайно чувствительный сигнал, позволяют быстро получать изображения, дают возможность отслеживать очень небольшое число опухолевых клеток в естественных условиях и видеть отдельные клетки методом проточной цитофлуориметрии. Также зачастую биолюминесцентный имиджинг применяется в комплексе с другими имиджинговыми технологиями [Hwang и др., 2012].

Помимо описанных выше примеров, для биоимиджинга могут быть применены конъюгаты люциферазы (в основном *P. pyralis* или *R. reniformis*) и квантовых точек, иногда с флуоресцентными белками. Поскольку тема заслуживает отдельного обзора, автор позволит себе лишь упомянуть избранные публикации оригинальных исследований в качестве примера для дальнейшего чтения: [Alam и др., 2013, 2012; Hasegawa и др., 2013; Feugang и др., 2015; Ma, Marshall, Rao, 2010; Samanta и др., 2015; So и др., 2006]. Первичным источником возбуждающего света для квантовых точек служит люцифераза. Далее происходит передача сигнала по типу BRET, и после активации квантовых точек их флуоресценция может быть использована как непосредственно, так и быть передана дальше на конъюгированные флуоресцентные белки по FRET-механизму (в указанных выше ссылках приведены разные примеры).

В связи с квантовыми точками необходимо упомянуть еще один интересный способ применения биолюминесценции в раковых исследованиях. Явление BRET может быть использовано для фотодинамической терапии глубоких опухолей. Квантовые точки активируются при внешнем облучении, однако в глубоких тканях оно недоступно. Несмотря на то что излучение самой люциферазы не является фототоксичным для опухолевых клеток [Schipper, Patel, Gambhir, 2006], энергии ее излучения достаточно для активации квантовых точек с помощью BRET, которые, в свою очередь, могут активировать молекулы фотосенсибилизатора, имеющего цитотоксический эффект на опухолевые клетки. Например, испытание конъюгата QD-RLuc8, активирующего Foscan<sup>®</sup>, показало гибель 50% клеток аденокарциномы линии A549 [Hsu и др., 2013], конъюгат RLuc с QD-655, активирующий Chlorin e6, показал эффективность в уничтожении отдаленных метастазов в легких [Kim и др., 2015].

В заключение хотелось бы привести относительно недавние обзоры на тему применения БЛИ в опухолевых исследованиях, включая обзоры по изучению отдельных видов рака: [Luwor, Stylli, Kaye, 2015; Thorne, Contag, 2005; Bally, 2012; Salipalli, Singh, Borlak, 2014; Gammon и др., 2014; Klerk и др., 2007; Kung, 2005; O'Farrell и др., 2013; Wang и др., 2015b].

### ***Биоимиджинг в исследовании нейродегенеративных заболеваний***

Биолюминесцентные методы имиджинга также активно применяются и для изучения нейродегенеративных заболеваний, таких как болезни Альцгеймера, Паркинсона, бокового амиотрофического склероза и др. Стоит упомянуть обзор 2013 года, который сполна отражает разнообразные подходы к изучению данных вопросов: [Hochgräfe, Mandelkow, 2013].

Применение находят как относительно простые методы по определению нейротрансмиттеров по сигналу АТФ [Wang, Yeung, 2001], так и более сложные, затрагивающие изучение белок-белковых взаимодействий в нервных клетках методом «сплит»-люциферазного анализа. С помощью биоимиджинга устанавливаются механизмы развития болезни Паркинсона (агрегация олигомеров  $\alpha$ -синуклеина) [Aelvoet и др., 2014; Hsu и др., 2015; Watts и др., 2013]. Химерный вариант FLuc-GFP находит применение для изучения влияния специфических белков на развитие болезни Паркинсона в мышечных моделях [Drouin-Ouellet и др., 2015].

Биолюминесцентные методы применяют для изучения болезни Альцгеймера: например, при определении прионных механизмов развития заболевания [Stöhr и др., 2014; Watts и др., 2014]. BRET-пара CBG и флуоресцентного белка mKate2 позволила отследить взаимодействие между Tau-белком и тирозин-киназой Fyn, которое является патогенным, и разработать метод высокопроизводительного скрининга лекарств на основе его подавления [Cochran и др., 2014]. На основе BRET-пары между RLuc8 и квантовыми точками CdSe или CdTe можно разрабатывать препарат для лечения болезни Альцгеймера путем низкоинтенсивной лазерной терапии для подавления окислительного стресса, вызванного  $\beta$ -амилоидом [Bungart и др., 2014].

Несмотря на обнаруженные недостатки [Auzenberg и др., 2015], биолюминесценция активно применяется для стандартного биоимиджинга нейрогенезиса. С помощью модифицированной люциферазы FLuc можно эффективно наблюдать неинвазивным путем за развитием нервных стволовых клеток после трансплантации [Hwang и др., 2008, 2014].

### ***Биоимиджинг в исследовании инфекционных заболеваний***

Традиционные подходы в исследовании инфекционных заболеваний предполагают эвтаназию подопытных животных на разных стадиях развития болезни. Биолюминесценция позволяет избежать этой затратной и негуманной процедуры.

Изначально для «подсветки» бактериальных клеток использовалась бактериальная люминесцентная система – *lux* оперон из *Photobacterium luminescens*. Такая система не требует добавления экзогенного субстрата (люциферина), поскольку он продуцируется самими бактериями (гены *lux* оперона кодируют и ферменты, катализирующие получение субстрата, подробнее см. в 1.3.4). Однако попытки его трансформации в клетки млекопитающих пока имеют ограниченный успех.

Другая стратегия предполагает использование люцифераз из светляка *Photinus pyralis*, морского моллюска *Renilla reniformis* и копеподы *Gaussia princeps*, подходящих для применения в клетках млекопитающих. Ограничение состоит в том, что субстраты необходимо добавлять извне прямо перед измерением, и они имеют ограниченную биодоступность (время жизни целентеразина, субстрата *Renilla* и *Gaussia*, ограничено вследствие окисления в сыворотке крови [Pichler, Prior, Piwnica-Worms, 2004]).

Первые эксперименты, показавшие возможность применения биоимиджинга для изучения микробного патогенеза, были проведены под руководством Контага и коллег [Contag и др., 1995] – с помощью оперона *luxCDABE* была трансформирована бактерия *Salmonella typhimurium*. Для грамположительных бактерий стандартный бактериальный оперон не подходит, поэтому для них используется либо ген светляковой люциферазы, либо частичный *lux* оперон (*luxAB*), кодирующий только люциферазу. С помощью биоимиджинга изучается развитие патогенов *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pestis* и др. [Kadurugamuwa и др., 2003; Kassem и др., 2014; Leevy, Serazin, Smith, 2007; Warawa, Lawrenz, 2014]. Современные методы позволяют реконструировать даже объемное трехмерное изображение развития инфекции (например, в легких мышей [Kong и др., 2011]).

Биоимиджинг инфекционных заболеваний не ограничивается исследованием бактериальных инфекций. Активно развивается направление по изучению вирусов и даже паразитов (малярии). Чтобы подробнее узнать об истории развития биоимиджинга инфекционных болезней, следует обратиться к обзорам [Hutchens, Luker, 2007; Luker, Luker, 2008, 2010].

При изучении вирусных заболеваний традиционно применяется набор люцифераз, указанных выше, а также люциферазы СВР и СВГ жука-щелкуна *Pyrophorus*



*plagiophtalamus* и уже ставшая популярной инженерная люцифераза NanoLuc<sup>®</sup> из глубоководной креветки *Oplophorus gracilirostris* (см. обзор [Coleman, McGregor, 2015]). Изучаются как ДНК- (HHV-1, HHV-3, поксвирусы и др.), так и РНК-вирусы (Influenza A, Денге, Эбола и др.), разрабатываются методики для скрининга противовирусных препаратов. В рамках разработки комплексных подходов к визуализации ВИЧ-инфекции биоимиджинг был применен для изучения распространения вируса иммунодефицита обезьян на мышинных моделях [Song и др., 2015]. При объединении биолюминесцентных и флуоресцентных систем возможна разработка целого набора векторов для комплексного изучения разных стадий вирусных заболеваний (например, для вируса Influenza A [Tran и др., 2015]).

Биолюминесцентные исследования грибковых инфекций, в основном, ограничены изучением *Candida albicans* и *Aspergillus fumigatis* [Brock, 2012]. Стандартно используются люциферазы FLuc, RLuc и GLuc. Первая биолюминесцентная модель была получена для *C.albicans* [Doyle и др., 2006] и для *A.fumigatis* [Brock и др., 2008] с использованием гена FLuc. Несмотря на ограниченную проницаемость гифов гриба для D-люциферина, эта модель стала успешной. Современное состояние науки в области биоимиджинга различных форм аспергиллезов и кандидозов можно почерпнуть из свежего обзора [Paron и др., 2014], авторы которого входят в круг первопроходцев в этой области. О применении иных, кроме мышей, носителей для биоимиджинговых исследований развития грибковых инфекций краткую справку дает обзор [Kraupmann, 2015].

Чрезвычайно широко биолюминесцентный имиджинг используется при исследовании малярии: практически все этапы сложного жизненного цикла малярийных паразитов были изучены с помощью репортёрных генов люцифераз *P. pyralis*, *P. plagiophtalamus*, *R. reniformis*, также использовались фьюзные белки с GFP [Franke-Fayard и др., 2005; Ploemen и др., 2011] и люцифераза NanoLuc<sup>®</sup> [Azevedo и др., 2014], набор «разноцветных» люцифераз использовался в исследовании [Sevenini и др., 2014]. Модифицированные паразиты применяются при обширном скрининге антималярийных препаратов [Lin и др., 2013; Meister и др., 2011; Ploemen и др., 2009]. Исследования, в основном, проводятся на человеческом паразите *Plasmodium falciparum* и паразите грызунов *Plasmodium berghei* [Braks и др., 2013]. Наиболее полный и современный обзор по этой теме можно найти в статье [Siciliano, Alano, 2015].

### ***Биоимиджинг в исследовании диабета 1 и 2 типа***

Традиционные методы изучения диабета *in vivo* подразумевают использование опосредованных средств контроля развития заболевания. Развитие надежных неинвазивных методов исследования позволяет количественно оценивать наличие  $\beta$ -островковых клеток *in vivo* и визуализировать распределение, степень их повреждения или развития после трансплантации [Arifin, Bulte, 2011]. По сравнению с традиционными методами имиджинга (МРТ, ПЭТ, ОФЭКТ) биолюминесценция имеет ряд преимуществ и активно применяется [Chan, Raikwar, Zavazava, 2007; Katsumata и др., 2013; Virostko и др., 2013], хотя и не подходит пока для изучения глубоких тканей. Также возможно применение биоимиджинга для подбора терапии [Yin и др., 2013].

Биолюминесцентный имиджинг применяется при изучении белковых взаимодействий методом BRET (на основе RLuc), связанных с функционированием инсулина [Issad и др., 2003] и активации секреции GLP-1 [Cheng и др., 2015], аналоги которого одобрены для лечения диабета 2 типа и находятся в клинической стадии испытаний для лечения нейродегенеративных заболеваний.

### ***Биоимиджинг в исследовании заболеваний сердца***

Применение БЛИ в исследовании заболеваний сердца, в основном, связано с изучением процессов трансплантации стволовых клеток и регенерации сердечных тканей при профилактике и лечении инфарктов и ишемической болезни сердца. Ряд обзоров полностью описывает существующие подходы и современное состояние науки в данной области: [Almeida de, Rappard van, Wu, 2011; Aswendt, Adamczak, Tennstaedt, 2014; Hossain, Chowdhury, Bagul, 2015; Roura, Gálvez-Montón, Bayes-Genis, 2013].

#### **1.2.2.2 Высокопроизводительный скрининг лекарств и исследование белковых взаимодействий**

После публикации результатов в биоимиджинговых исследованиях заболеваний начинается разработка новых технологий высокопроизводительного скрининга лекарств. Самыми популярными в этом направлении являются люциферазы FLuc (позволяет дополнительно оценивать метаболический потенциал изучаемых клеток по уровню АТФ) и RLuc (часто применяется для внутреннего нормирования), а также фотопротеины акворин и обелин (позволяют оценить уровень ионов кальция, не требуют кислорода для реакции биолюминесценции) [Cali и др., 2007; Fan, Wood, 2007]. Ввиду высокой

чувствительности, биоимиджинг можно применять для оценки эффективности лекарства на ранней стадии развития заболевания.

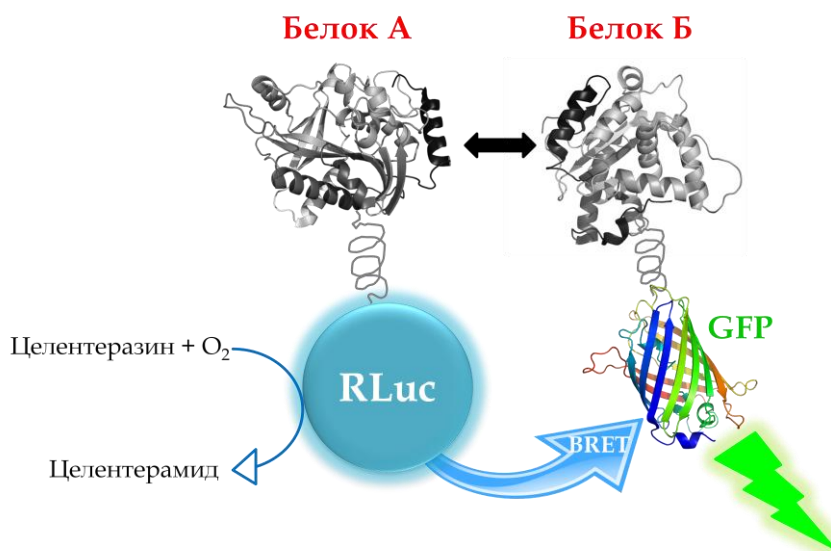


Рисунок 1.1. BRET на примере пары RLuc-GFP.

Многие исследования по скринингу имеют в своей основе изучение белок-белковых взаимодействий. В этой области биолюминесценция может быть применена несколькими способами. Один из них – это биолюминесцентный резонансный перенос энергии (BRET) (См. Рисунок 1.1). В основе явления лежит Фёрстеровский резонансный перенос энергии между хромофорами, донором является люцифераза, а акцептором – флуоресцентный белок. Оба белка присоединены к разным взаимодействующим белкам изучаемой пары. Наблюдаемый сигнал BRET подтверждает наличие взаимодействия между белками. Впервые BRET был реализован в 1999 году, метод был основан на паре RLuc ( $\lambda_{em}$  480 нм) – eYFP (вариант GFP  $\lambda_{em}$  527 нм) [Xu, Piston, Johnson, 1999]. Метод был назван BRET<sup>1</sup>. Второе поколение BRET – BRET<sup>2</sup> - основано на взаимодействии между RLuc и GFP<sup>2</sup>, при этом субстратом для люциферазы является DeepBlueC<sup>TM</sup>, поэтому максимум эмиссии смещен в 395 нм. GFP<sup>2</sup> поглощает свет от донора и испускает в области 410 нм [Bertrand и др., 2002]. Таким образом, спектральная разница более чем в 100 нм значительно улучшает чувствительность метода. Наиболее часто BRET<sup>1</sup>-BRET<sup>2</sup> системы находят применение при изучении взаимодействия рецепторов [Prinz, Diskar, Herberg, 2006], например, GPCR рецепторов (G-белок-сопряженные рецепторы) [Milligan, 2004]. В 2006 году была разработана улучшенная BRET-система, названная eBRET (“extended BRET” или “продолжительный BRET”) [Pfleger и др., 2006]. Для eBRET применяется аналог целентеразина EnduRen<sup>TM</sup>, который под действием эстераз медленно метаболизируется в субстрат люциферазы целентеразин, тем самым продлевая время анализа до нескольких часов. Не так давно была разработана система BRET<sup>3</sup>

с улучшенными спектральными характеристиками (смещение в красную область): донор RLuc8 ( $\lambda_{em}$  480 нм), акцептор mOrange ( $\lambda_{em}$  564 нм) [De и др., 2009]. Те же авторы в 2011 году показали возможность создания систем на основе люциферазы RLuc8.6 ( $\lambda_{em}$  535 нм) и белков TagRFP ( $\lambda_{em}$  584 нм) и TurboFP (635 нм) с еще более значительным смещением спектра эмиссии в красную область, что делает их применимыми для биомиджинга в глубоких тканях (Системы BRET<sup>5</sup> и BRET<sup>6.1</sup> и др.) [Dragulescu-Andrasi и др., 2011].

Существуют примеры BRET-пар на основе светляковой люциферазы, например FLuc-DsRed [Arai и др., 2002], FLuc-mKate [Branchini и др., 2011], FLuc-mCherry [Borghei, Hall, 2014; Iglesias, Costoya, 2009] однако они пока не нашли широкого применения. Некоторые наиболее интересные BRET-пары с другими флуоресцентными белками и люциферазами будут упомянуты далее.



Рисунок 1.2. Метод "сплит"-люциферазы (Источник изображения [Overview of protein interaction assay, 2010]).

Другой подход для изучения белок-белковых взаимодействий, так называемый метод «сплит»-люциферазы, подразумевает, что люциферазу разделяют на две части (при этом происходит потеря ее активности), каждую из которых затем присоединяют к одному из исследуемой пары белков, в результате чего получают два химерных белка. Все операции с белками проводятся на генном уровне. При сближении в пространстве и взаимодействии изучаемой пары белков, присоединенные к ним фрагменты люциферазы тоже сближаются, ее биолуминесцентная активность восстанавливается, и при добавлении люциферина становится возможным зафиксировать репортёрный сигнал. О способах применения метода «сплит»-люциферазы см. обзоры [Awais, Ozawa, 2011; Kafi, Hattori, Ozawa, 2010; Azad, Tashakor, Hosseinkhani, 2014].

### 1.2.2.3 Иммунологические исследования

Разработка новых методов иммунологического анализа также возможна на основе биолуминесценции. В иммунологических исследованиях всегда участвуют антигены, которые необходимо детектировать, и антитела, с помощью которых происходит «захват» антигенов. Обнаружить комплекс «антиген-антитело» можно с помощью биолуминесценции, если использовать люциферазы в качестве маркеров. Наиболее

популярны люциферазы FLuc и RLuc. Химерные конструкции из биотинилированной люциферазы в комплексе со стрептавидином позволили создать ряд чувствительных методов иммуноанализа (подробнее смотри в [Frank, Krasitskaya, 2014]). На основе химерной конструкции из люциферазы RLuc и антигена группа Барбело разработала метод люциферазного иммунопреципитационного анализа, который они смогли применить в ряде исследований инфекционных агентов и раковых антител (см. обзор [Burbelo, Lebovitz, Notkins, 2015]). Для разработки методов иммуноанализа популярно использование фотопротеинов. Последние разработки в этой области отображены в обзоре [Frank, Krasitskaya, 2014].

### 1.3 Существующие биолюминесцентные системы и способы их применения

Как уже было упомянуто во Введении, из тридцати существующих биолюминесцентных систем только для восьми удалось выделить и охарактеризовать субстраты - люциферины, представленные на Рисунок 1.3, и для некоторых из них выделить и секвенировать гены природных люцифераз из разных организмов. Среди восьми описанных люциферин-люциферазных систем широкое применение на сегодняшний день нашли только три: светлячковая, бактериальная и целентеразиновая. Во второй части обзора автор рассмотрит основные химические реакции, приводящие к биолюминесценции (БЛ) для каждого из восьми люциферин-люциферазных систем и опишет существующие способы их применения в контексте доступных генов люцифераз (в основном, природных).

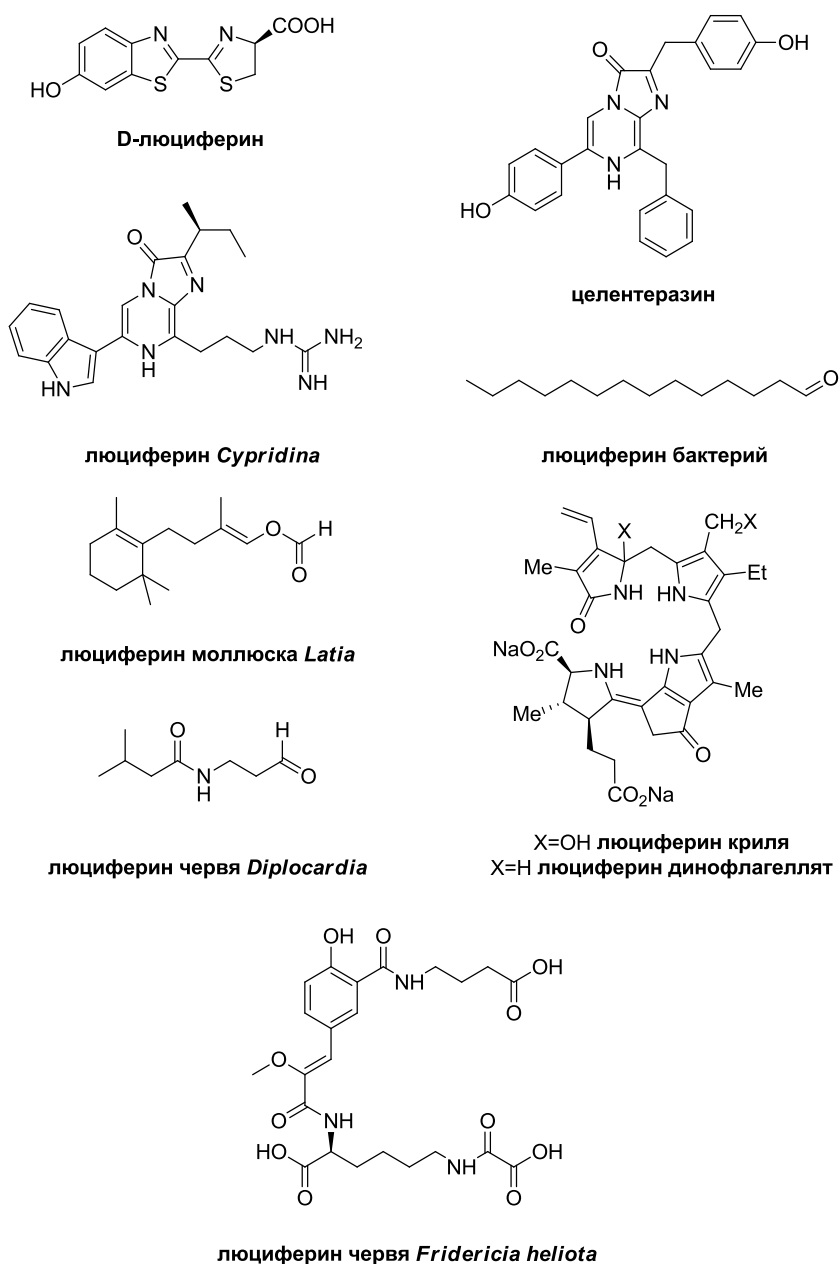


Рисунок 1.3. Восемь люциферин-люциферазных систем.

### 1.3.1 Билюминесцентная система D-люциферина светляка

Люциферин-люциферазная реакция в светлячках была полностью изучена группой ученых под руководством МакЭлроя в середине XX века – это подробно описано в книге Шимомуры [Shimomura, 2006]. В основе лежит взаимодействие между природным субстратом D-люциферином ((S)-2-(6'-гидрокси-2'-бензотиазолил)тиазолин-4-карбоновой кислотой, Рисунок 1.4) и люциферазой светляка.

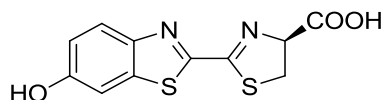


Рисунок 1.4. Структура D-люциферина светляка

Реакция протекает только при участии ионов  $Mg^{2+}$  и молекулы АТФ. Кратко механизм реакции можно представить следующей схемой:

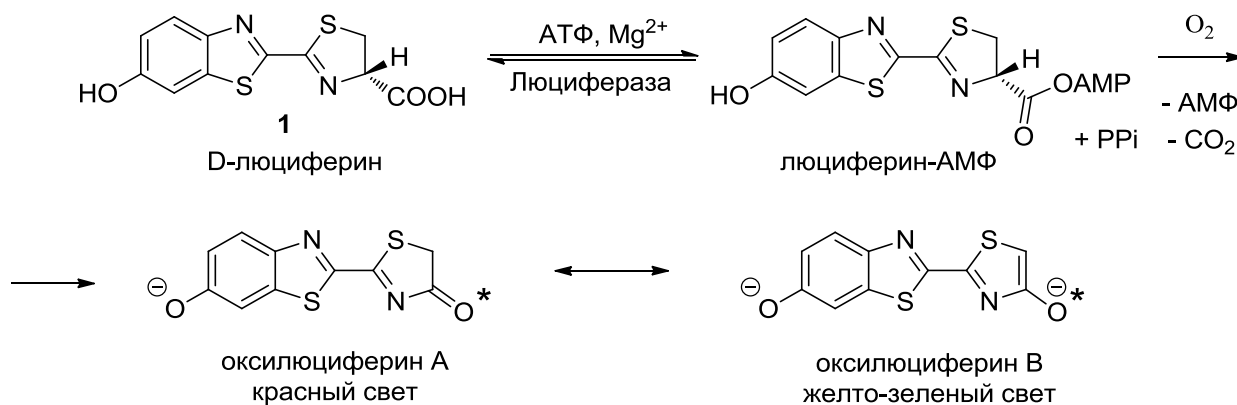


Схема 1.2. Механизм билюминесценции D-люциферина.

Самой первой была изучена люцифераза из североамериканского светляка *Photinus pyralis*, испускающая желто-зеленый свет с максимумом эмиссии при 560 нм. Молекулярная масса люциферазы *P. pyralis* составляет 61 кДа [Shimomura, 2006]. Также на сегодняшний день хорошо изучены люциферазы жука-щелкуна *Pyrophorus plagiophthalmus*, обладающие отличающимся спектром билюминесценции разных цветов от зеленого (546 нм) до оранжевого (593 нм) [Wood, Lam, McElroy, 1989], и люциферазы железнодорожного червя, испускающими свет в желто-зеленом (542-574 нм) и красном (609-639 нм) диапазонах [Viviani, Vecchiaro, Ohmiya, 1999]. Однако разнообразие природных люцифераз, взаимодействующих с D-люциферин, а также методов их искусственной модификации таково, что на сегодняшний день для возможного применения доступен широкий набор естественных и мутантных «разноцветных» люцифераз, обладающих улучшенными свойствами (например, термостабильностью), с максимумами эмиссии в диапазоне от 535 до 630 нм [Nakajima, Ohmiya, 2010].

Информация о некоторых из них приведена в таблице ниже (из природных приведены только те люциферазы, для которых известны генетические последовательности, разнообразие улучшенные мутантные люциферазы не упомянуты в таблице).

Таблица 1.1. Разнообразие природных люцифераз D-люциферина.

Название люциферазы	Вид	$\lambda_{\max}$ (нм)	Источник
Светляковые люциферазы (Firefly), Семейство Lampyridae	<i>Photinus pyralis</i>	560	гены <i>luc+</i> , <i>luc2</i> (Promega)
	<i>Luciola mingrelica</i>	570	[Devine и др., 1993]
	<i>Luciola lateralis</i>	552	[Tatsumi, Kajiyama, Nakano, 1992]
	<i>Luciola cruciata LcLuc1</i>	554	[Tatsumi и др.; Tsutomu, Hiroki, Eiichi, 1989]
	<i>Luciola cruciata LcLuc2</i>	543	[Оба и др., 2010]
	<i>Luciola italica</i>	566/614	[Branchini и др., 2006]
	Малазийская <i>Luciola</i> <sup>2</sup>	580	[Ogo, Akiyoshi, Suzuki, 2014]
	<i>Hotaria unmunzana</i>	-	[Choi и др., 2002]
	<i>Hotaria tsushimana</i>	-	[Choi и др., 2003]
	<i>Hotaria papariensis</i>	-	[Choi и др., 2003]
	<i>Hotaria parvula</i>	568	[Ohmiya и др., 1995]
	<i>Lampyris noctiluca</i>	550	[Sala-Newby, Thomson, Campbell, 1996]
	<i>Lampyris turkestanicus</i>	-	[Alipour и др., 2004]
	<i>Nyctophyla caucasica</i>	-	[Day и др., 2006]
	<i>Pyrocoelia rufa</i>	-	[Lee и др., 2001]
	<i>Pyrocoelia miyako</i>	550	[Ohmiya и др., 1995]
	<i>Diaphanes pectinealis</i>	-	[Xueyan, Shuang, Xingcai, 2006]
	<i>Cratomorphus distinctus</i>	550	[Viviani и др., 2004]
	<i>Photirus pennsylvanica</i>	-	Ген <i>Ppe(LY)</i> [Ye и др., 1997]
		-	Ген <i>PpeJ19</i> [Ye и др., 1997]
	560	Ген <i>PpeI(KW)</i> [Ye и др., 1997]	
	538	Ген <i>Ppe2(KW)</i> [Ye и др., 1997]	
<i>Amydetes vivianii (fanestratus)</i> <sup>3</sup>	538	[Viviani и др., 2011]	
<i>Macrolampis sp</i>	569	[Viviani и др., 2007]	
Люцифераза жука-щелкуна (Click beetle), Семейство Elateridae	<i>Pyrearinus termitilluminans</i>	537	ген ELuc (ТОУОВО)
	<i>Pyrophorus plagiophthalmus</i>	540	ген CBG (Promega)
		615	ген CBR (Promega)
	<i>Pyrophorus plagiophthalmus (dYG)</i>	560	[Wood и др., 1989]
	<i>Pyrophorus plagiophthalmus (dGR)</i>	546	[Wood и др., 1989]
	<i>Pyrophorus plagiophthalmus (vOR)</i>	593	[Wood и др., 1989]
	<i>Pyrophorus plagiophthalmus (vYE)</i>	578	[Wood и др., 1989]

<sup>2</sup> Авторы патента не предоставили более точной информации по виду организма.

<sup>3</sup> Изначально вид организма ошибочно был определен авторами: [Viviani и др., 2015].



	<i>Pyrophorus plagiophthalmus</i> (vYG)	563	[Stolz и др., 2003]
	<i>Pyrophorus mellifluus</i> (dGR)	549	[Stolz и др., 2003]
	<i>Pyrophorus mellifluus</i> (vGR)	554	[Stolz и др., 2003]
	<i>Pyrophorus angustus</i> (vYG)	566	[Oba, Kumazaki, Inouye, 2010]
	<i>Pyrophorus angustus</i> (vYG)	536	[Oba, Kumazaki, Inouye, 2010]
	<i>Fulgeochlizus bruchi</i>	540	[Amaral, Prado, Viviani, 2012]
	<i>Photophorus jansonii</i>	559	[Mitani и др., 2013]
Люцифераза железнодорожного червя ( <i>Railroad worm</i> ), Семейство <i>Phengodidae</i>	<i>Rhagophthalmus ohbai</i>	550	ген SLG (TOYOBO)
		580	ген SLO (TOYOBO)
	<i>Phrixotrix hirtus</i>	630	ген SLR (TOYOBO)
	<i>Phrixothrix vivianii</i>	542	[Viviani, Ohmiya, 2007]
	<i>Diplocladon</i> <sup>4</sup>	557-562	[Akiyoshi, Ogo, Suzuki, 2014]

Основная проблема при применении природных люцифераз связана с их ограниченной термостабильностью: большинство из них уже значительно деактивируется при повышении температуры выше 30°C. Различные подходы к созданию термостабильных люцифераз и люцифераз (в основном, через направленную мутацию), устойчивых к действию реагентов, а также люцифераз с укороченным периодом полураспада в клетке достаточно подробно описаны в обзоре [Koksharov, Ugarova, 2012].

Исторически сложилось, что самой популярной является первая открытая люцифераза *Photinus pyralis* и биолюминесцентная реакция на ее основе. Эта люцифераза нашла самое широкое применение: анализ бактериальной загрязненности в образцах почвы, пищевых продуктов, мочи, и АТФ в различных образцах, исследование метаболических процессов (на основе фосфорилирования), изучение активности различных АТФ-использующих ферментов, биоимиджинг и т.д. [Wannlund, 1983]. В основном, большая часть методов, описанных в первой части данного обзора, так или иначе создавались на основе данной люциферазы, иногда в комплексе с другими (например, Rluc), поэтому здесь способы ее применения обсуждаться не будут.

Ген люциферазы *Photinus pyralis* и она сама являются коммерческими продуктами. Самым известным распространителем гена является корпорация Promega: в каталоге указаны гены *luc+* и ряд *luc2* (*luc2*, *luc2P*, *luc2CP*), отличающиеся периодом полураспада в клетке (для *luc2* – 3 часа, для *luc2CP* – 0.4 часа) [Promega 2015 Life Science Catalog, 2014, Bioluminescent Reporters, 2015].

Вторым по популярности является ряд люцифераз жука-щелкуна *Pyrophorus plagiophthalmus*, отличающихся цветом биолюминесценции [Wood, Lam, McElroy, 1989].

<sup>4</sup> Авторы патента не предоставили более точной информации по виду организма.

У Promega есть коммерчески доступные люциферазы жука-щелкуна и их гены CBG и CBR (люциферазы G-зеленого и R-красного цвета).

Описаны примеры применения люциферазы жука-щелкуна *P. plagiophthalmus* в исследованиях опухолевых заболеваний. Инженерные клетки, содержащие гены люцифераз *Firefly* и *Clicke beetle*, были разработаны для исследования роста и метастазирования почечной карциномы мышей *in vivo* и скрининга противоопухолевых препаратов *in vitro* [Kobayashi и др., 2010]. Для исследования рака яичников на моделях мышей *in vivo* группой авторов [Salomonsson и др., 2013] были созданы химерные конструкции, содержащие гены С- и N-концевые фрагменты CBR (*Promega*). Исследование утверждает роль хемокинов CXCL12-CXCR4 в развитии опухоли и показывает, что сочетание терапии основе AMD3100 (ингибитора CXCR4) и цисплатина значительно уменьшает развитие опухоли. Прямой мониторинг  $\beta$ -катенина, белка, регулирующего межклеточную адгезию, пролиферацию и дифференциацию клеток, чьи мутации и избыточная экспрессия ассоциируется со многими видами рака, был осуществлен с помощью создания химерных белков катенин-люцифераза на основе люцифераз FLuc и CBG [Naik, Piwnicka-Worms, 2007].

Также люцифераза *Pyrophorus* часто применяется при исследованиях инфекционных заболеваний. Например, белковые конструкции на основе *P. plagiophthalmus* участвовали в ряде исследований с использованием вирусных инфекций для реализации анализа по генам-репортёрам при изучении бакуловирусов [Karp и др., 1992, 1996; Oker-Blom и др., 1993].

Пригодность биолюминесцентного метода для анализа цитотоксичности антибактериальных препаратов по отношению к бактериальным клеткам, экспрессирующим люциферазу *P. plagiophthalmus*, была показана в статье [Virta, Karp, Vuorinen, 1994], аналогичная работа была проведена для исследования влияния мембранолитиков на проницаемость мембран бактериальных клеток [Virta и др., 1995, 1997]. Авторы использовали ген *lucGR*. Также ген люциферазы *P. plagiophthalmus* наряду с генами *luxA* и *luxB* бактериальных люцифераз *Photobacterium luminescens* и *Vibrio harveyi* был использован для создания биолюминесцентной тест-системы для скрининга химических соединений с ингибирующим действием на синтез белка [Lampinen, Virta, Karp, 1995]. Биосенсор для определения токсичности веществ по уровню биолюминесценции на основе биоинженерных бактерий, содержащих CBR ген, описан в публикации [Roda и др., 2013].

Развитие инфекции ЦНС, вызываемой простейшими *Trypanosoma brucei* и приводящей к сонной болезни, было исследовано на мышах *in vivo* [Reet Van и др., 2014] с использованием красной люциферазы CBR и мутантной красной *P. pyralis* RE9 (PpyRE9) [Branchini и др., 2010]. Авторы сравнивают D-люцифериновые биолюминесцентные системы и целентеразиновую систему *Renilla* (RLuc), и полагают, что в их случае использование генов люцифераз светляка и жука-шелкуна в качестве репортерных предпочтительнее по причинам меньшей стоимости, лучшей биодоступности люциферинового субстрата (целентеразин не может эффективно преодолевать гемато-энцефалический барьер) и др.

Использование лактобактерий *Lactobacillus plantarum* и *Lactococcus lactis*, экспрессирующих люциферазу, для биоимиджинга ЖКТ мышей и исследования местонахождения лактобактерий в кишечнике показано в работе [Daniel и др., 2013]. Авторы применяли сразу несколько люцифераз – CBR, GLuc и бактериальную *lux*. Бактерии были заселены в организм мышей перорально. Недавно те же авторы предложили одновременный двухцветный анализ лактобактерий по люциферазам CBR и CBG *in vivo* и *in vitro* [Daniel и др., 2015].

Двухцветная люцифераза жука-шелкуна может быть использована для исследований белок-белковых взаимодействий. Разработка методов для различных видов анализа на основе CBR и CBG описана в работе [Villalobos и др., 2010].

Для изучения каспазной активности была сконструирована оптимальная (по данным расчетов) BRET-пара из люциферазы CBG и флуоресцентного белка tdTomato, соединенная DEVD-линкером [Gammon и др., 2009]. Конструкция позволяет отслеживать активность протеаз по падению интенсивности сигнала BRET (580 нм при BRET и 540 нм от CBG при разрушении пары) в коротких и продолжительных по времени экспериментах.

На основе рекомбинантной люциферазы *Luciola mingrelica* был разработан метод измерения бактериальной загрязненности питьевой воды [Frundzhyan, Ugarova, 2007], та же группа авторов разработала BRET-пару на основе красного ( $\lambda_{em}$  590 нм) и зеленого ( $\lambda_{em}$  560 нм) мутантов *L. mingrelica* и Alexa Fluor 610 [Smirnova, Samsonova, Ugarova, 2016] для иммунологического анализа прогестерона.

Две мутантные термостабильные биотинилированные люциферазы *Luciola lateralis* [Tatsumi и др., 1996] с максимумами биолюминесценции 559 нм (желто-зеленый) и 607 нм (красный) и моноклональные антитела были применены для разработки биолюминесцентного метода совместного определения пепсиногенов PGI и PGII

в сыворотке крови [Ohkuma и др.]. Анализ данных маркеров необходим для оценки состояния слизистой желудка при профилактике и лечении гастрита и язвенной болезни.

Интересный метод для контроля распределения одностенных нанотрубок по организму мыши был предложен в работе [El-Sayed и др., 2013]. Конъюгат термостабильной мутантной люциферазы *Luciola cruciata* и одностенных нанотрубок сохраняет биолюминесцентные свойства и позволяет проследить распределение нанотрубок с помощью стандартного метода биоимиджинга. Такие нанотрубки могут быть использованы для таргетированной доставки лекарства: в частности, авторы показали, что загрузка противоопухолевого антибиотика доксорубицина в нанотрубки не влияет на интенсивность биолюминесценции.

На основе стандартной зеленой люциферазы *P. pyralis* дикого типа и термостабильной мутантной красной люциферазы *L. italica* был разработан тройной биолюминесцентный анализ по генам-репортерам для мониторинга двух основных путей биосинтеза желчных кислот (по экспрессии 7- $\alpha$  гидролазы и 27-гидроксилазы) в клетках млекопитающих (третья голубая люцифераза *Gaussia princeps* была использована как внутренний контроль метаболической активности) [Michelini и др., 2008]. Это первый пример трехцветного анализа репортерных генов, использующий секретлируемые и несекретлируемые люциферазы, требующие различных субстратов. Такой подход позволяет исключить взаимовлияние между различными биолюминесцентными сигналами.

Также путем оптимизации кодонов термостабильной люциферазы *Luciola italica* был получен красный вариант (610 нм) для применения в клетках млекопитающих, подходящий для визуализации глубоких тканей [Maguire и др., 2012].

На основе N-домена (остатки 1-439) рекомбинатной люциферазы *P. pyralis* (PpyWT) и C-домена (остатки 442-548) рекомбинатной *Luciola italica* (LitWT) была сконструирована новая химерная люцифераза PpyLit с квантовым выходом биолюминесценции, увеличенным в 1.4 раза [Branchini и др., 2014], максимум биолюминесценции соответствует PpyWT и составляет 560 нм. На основе предложенной химерной люциферазы была разработана новая люцифераза PLG2 с улучшенной pH- и термостабильностью [Branchini и др., 2015]. PLG2 обладает в 3 раза большей чувствительностью в живых клетках по сравнению с традиционно используемой *P. pyralis luc2* от Promega, при этом она дешевле и позволяет обнаруживать фемтомольные количества АТФ. В будущем она сможет стать достойным конкурентом *P. pyralis luc2* в различных биолюминесцентных анализах.

Свойство некоторых люцифераз проявлять красный сдвиг в максимуме билюминесценции при изменении pH было использовано авторами статьи [Gabriel, Viviani, 2014]. Для клонов люцифераз *Macrolampis sp2*, *Cratomorphus distinctus* было показано, что они могут быть использованы для индикации внутриклеточного pH в живых бактериях. Таким образом, данные люциферазы перспективны для разработки методов изучения метаболизма в живой клетке по сразу двум параметрам: концентрации протонов и АТФ.

Возможность использовать люциферазы *Pyrearinus termitilluminans* и *Macrolampis sp* в биосенсорах на токсичность показана в публикации [Gabriel, Lopes, Viviani, 2014].

Применение люцифераз *Pyrearinus termitilluminans* (зеленая) и *Phrixotrix hirtus* (красная) в качестве репортерных генов для исследования циркадных ритмов в тканях надпочечников, щитовидной железы и легких трансгенных мышей было показано в статье [Noguchi и др., 2012].

Фрагменты люцифераз *Gaussia princeps*, *P. pyralis*, и *P. termitilluminans* были использованы для создания химерных белков с круговой перестановкой [Kim, Sato, Тао, 2008]. Метод круговой перестановки позволяет получить инженерные белки, которые могут применяться для изучения различных лиганд-белковых взаимодействий. При изменении конформации химерного белка происходит сближение С- и N-концевых фрагментов люциферазы и восстановление ее билюминесцентной активности, поэтому связывание лиганда и активного центра можно наблюдать в режиме реального времени.

Прекрасным примером использования люциферин-люциферазных реакций является применение *P. termitilluminans* в изучении белок-белковых взаимодействий на примере связывания рецептора, сопряженного с G-белком RF (GPCR), и  $\beta$ -аррестина на поверхности плазматической мембраны [Misawa и др., 2010]. Авторы создали клетки, которые экспрессируют химерные белки, состоящие из  $\beta$ -аррестина с N-концевой частью люциферазы и GPCR с C-концевым фрагментом люциферазы. Их сближение можно наблюдать по увеличению интенсивности билюминесценции *P. termitilluminans*. Такой метод позволяет проводить анализы с высокой скоростью в многопоточном формате и может быть применим для исследования внутриклеточных взаимодействий между другими белками. Эта же группа авторов разработала аналогичные конструкции с использованием генов *P. pyralis* FLuc и *P. plagiophtalamus* CBR [Takakura и др., 2012].

Возможности варьирования структуры D-люциферина для разработки новых и более успешных способов его применения не будут рассмотрены в данном литобзоре, с ними можно ознакомиться в достаточно полных и свежих обзорах и статьях [Li и др., 2013;

Adams, Miller, 2014; Jathoul и др., 2014; Meroni, Rajabi, Santaniello, 2009; Viviani и др., 2014]. Также автор не будет рассматривать разработки, использующие не сам люциферин, а его предшественники [Leipre и др., 2011; Mofford и др., 2015] или «строительные блоки» [Godinat и др., 2014].

### 1.3.2 Билюминесцентные системы на основе целентеразина

В основе билюминесценции большинства морских организмов лежит реакция окисления люциферина, получившего название целентеразин. Имидазопиразин целентеразин – это модифицированный бициклический трипептид, построенный из двух остатков тирозина и одного фенилаланина [Inoue, Kakoi, Goto, 1976].

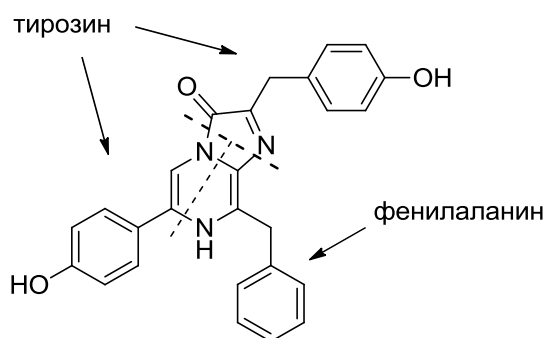


Рисунок 1.5. Структура целентеразина.

Билюминесцентная реакция происходит по классической схеме: люциферин окисляется кислородом при участии люциферазы и переходит в целентерамид (оксилуциферин) [Shimomura, 2006].

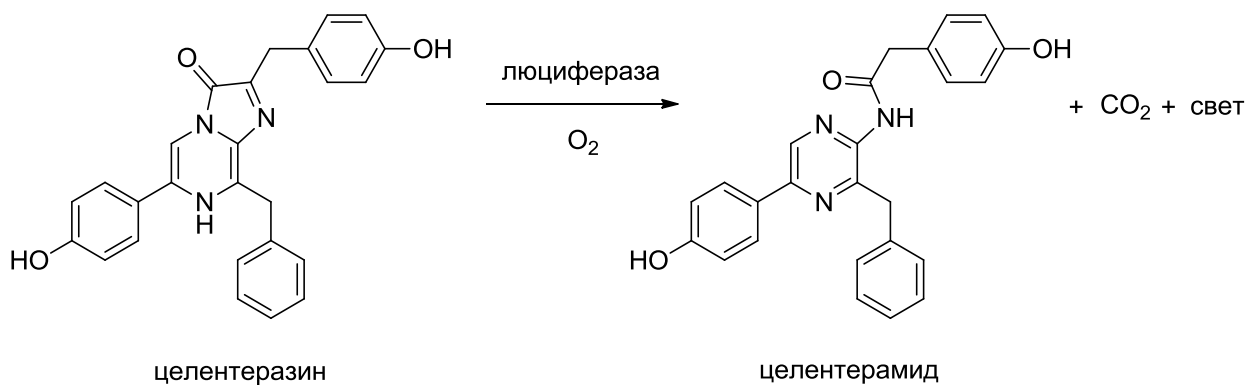


Схема 1.3. Билюминесцентная реакция с участием целентеразина.

Существует набор люцифераз из природных источников, проявляющих активность с целентеразином. Первая из них была выделена в 1978 году Шимомурой из глубоководной креветки *Oplophorus gracilirostris* [Shimomura и др., 1978]. Люцифераза имеет молекулярный вес 106 кДа, однако, как было выяснено позже, ее структура неоднородна. Она состоит из двух одинаковых пар субъединиц (19 кДа и 35 кДа), причем

активность с люциферинном проявляет именно субъединица массой 19 кДа [Inouye и др., 2000]. Этот фрагмент был клонирован отдельно, и его активность доказана [Inouye, Sasaki, 2007]. Максимум билюминесценции для люциферазы *Oplophorus* находится в области 454 нм. Она обладает высокой интенсивностью свечения и высоким квантовым выходом по сравнению с аналогичной *Renilla* и фотопротеином акворином, также примечательна ее обширная субстратная специфичность [Inouye, Shimomura, 1997]. Вероятно, именно благодаря этому набору качеств, в 2012 году на основе люциферазы *Oplophorus* в компании *Promega* была разработана искусственная люцифераза NanoLuc<sup>®</sup>, проявляющая активность с искусственным субстратом фуримазином (в основе которого лежит структура целентеразина) [Hall и др., 2012]. Интенсивность сигнала люминесценции по сравнению с родительской люциферазой была увеличена в 2,5 миллиона раз. Пик билюминесценции находится при 460 нм. Данная искусственная люцифераза, как и люцифераза *Oplophorus*, является секретлируемой, поэтому хорошо подходит для биоимиджинга, как самостоятельного (например, [Azevedo и др., 2014; Chen и др., 2014; Chen, Bagdasarian, Walker, 2015; Karlsson и др., 2015; Nishitsuji и др., 2015; Vinayak и др., 2015]), так и в составе химерных белков (что было показано разработчиками NanoLuc<sup>®</sup> и в других публикациях [Demont и др., 2014; Deplus и др., 2013; He и др., 2014; Norisada и др., 2014; Picaud и др., 2015; Song и др., 2013; Vinayak и др., 2015; Wang и др., 2015a]). Сравнение NanoLuc<sup>®</sup> в ряду с другими люциферазами выявило, что ее очень удобно применять в качестве ортогональной к FLuc в исследованиях по репортёрным генам [Ho и др., 2013]. Например, в статье [Hasson и др., 2015] описан новый метод высокопроизводительного скрининга лекарств против болезни Паркинсона на основе билюминесцентного анализа по репортёрным генам NanoLuc<sup>®</sup> и FLuc, обе люциферазы отвечает за разные события. Также есть пример двойного имиджинга опухолей с использованием пары NanoLuc<sup>®</sup> и FLuc [Germain-Genevois, Garandeau, Couillaud, 2015], первая более эффективна (ярче) *in vitro*, вторая – *in vivo* (из-за максимума билюминесценции NanoLuc<sup>®</sup>, лежащего в диапазоне, где ткани животных клеток поглощают лучше всего). Еще был описан метод двойного имиджинга пары NanoLuc<sup>®</sup> и GLuc (люцифераза *Gaussia*) [Heise и др., 2013].

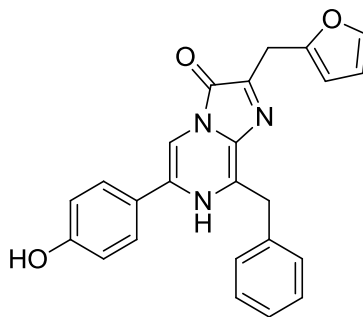


Рисунок 1.6. Структура фуримазина, субстрата для NanoLuc®

Так как обсуждаемая люцифераза является коммерческой разработкой, она доступна и в качестве самого белка в наборе Nano-Glo®, и в составе различных векторов в виде гена *NLuc* и др. [Promega 2015 Life Science Catalog, 2014].

Малые размеры и яркость биолюминесценции NanoLuc® подталкивают сделать выбор в ее пользу для биоимиджинга в тех случаях, когда другие люциферазы оказываются очень большими, например, в исследованиях вирусного цикла вируса гриппа А в животных моделях, стабильность которого значительно ухудшается при увеличении генома [Tran и др., 2013, 2015], или при имиджинге вирусной инфекции альфавируса энцефалита [Sun и др., 2014] (NanoLuc® оказалась более стабильной, чем FLuc). Удобство использование NanoLuc® для биоимиджинга опухоли легких на мышиных моделях было показано в работе группы Люкера [Stacer и др., 2013]. И именно благодаря размеру NanoLuc® популярна в имиджинге белков с помощью гибридных конструкций. Группа Гуо разработала удобную методику сайт-специфичной химической конъюгации NanoLuc® через цистеиновый остаток, подходящую для модификации белков сложной структуры и для любых других макромолекул [Zhang и др., 2013a].

Были разработаны и способы использования NanoLuc® в BRET-парах, например, для анализа взаимодействий между лигандами и рецепторами GCPR [Stoddart и др., 2015]. Созданы новые очень яркие пары LumiFluor: NanoLuc-EGFP (509 нм) и NanoLuc-LSSmOrange (572 нм) [Schaub и др., 2015]. Авторы статьи [Roberts и др., 2015] предлагают использовать NanoLuc® в качестве BRET-донора для исследования характеристик связывания между лекарственным препаратом и белком-мишенью: сама люцифераза конъюгирована с исследуемым белком, а флуоресцентный трейсер закреплен на молекуле субстрата. В статье [Mo и др., 2015] описана технология ультра-высокопроизводительного скрининга белок-белковых взаимодействий на основе пары BRET<sup>n</sup> NanoLuc-Venus в формате биосенсора на 1536 лунки. Также в компании *Promega* недавно была разработана новая BRET-пара NanoLuc® (460 нм) и HaloTag (635 нм) с расстоянием между



пиками в 175 нм [Machleidt и др., 2015], названная авторами NanoBRET. Такой разрыв в максимумах свечения дает высокую чувствительность и совершенно иные возможности для получения изображений высокого разрешения. Авторы продемонстрировали эффективность NanoBRET в изучении белок-белковых взаимодействий.

Для исследования белковых взаимодействий путем сплит-имиджинга люциферазы разработчики *Promega* создали систему NanoBiT и представили ее в статье [Dixon и др., 2015]. NanoLuc<sup>®</sup> разделяют на два полипептида по 1.3 кДа и 18 кДа, каждый из которых может быть присоединен к одному из пары исследуемых белков. Такая репортёрная система вносит минимальные стерические нагрузки на изучаемую пару, оставаясь при этом очень яркой.

За все время изучения целентеразиновых систем был выделен и генетически охарактеризован еще ряд природных люцифераз, приведенный в Таблица 1.2. Среди всего этого разнообразия применение нашли только люциферазы *Renilla*, *Gaussia* и *Metridia longa*.

Таблица 1.2. Люциферазы биolumинесцентных систем целентеразина и фуримазина.

Группа люцифераз	Вид	$\lambda_{\max}$ (нм)	Источник
Субстрат – целентеразин	<i>Ophlophorus gracilinostris</i>	454	[Inouye и др., 2000; Inouye, Sasaki, 2007]
	<i>Renilla reniformis</i>	480	[Lorenz и др., 1991]
	<i>R. muelleri</i>	485/479	[Titushin и др., 2008]
	<i>Gaussia princeps</i>	473	[Verhaegent, Christopoulos, 2002]
	<i>Metridia longa</i>	480	[Markova и др., 2004]
	<i>M. pacifica</i>	485	[Takenaka и др., 2008]
	<i>M. curticauda</i>	492/493	[Takenaka и др., 2012, 2013]
	<i>M. okhotensis</i>	482/493	[Takenaka и др., 2012, 2013]
	<i>M. asymmetrica</i>	492/493	[Takenaka и др., 2012, 2013]
	<i>Pleuromamma scutullata</i>	491/492	[Takenaka и др., 2012, 2013]
	<i>P. xiphias</i>	492	[Takenaka и др., 2012, 2013]
	<i>P. abdominalis</i>	493/490	[Takenaka и др., 2012, 2013]
	<i>Lucicutia ovaliformis</i>	493	[Takenaka и др., 2012, 2013]
	<i>Heterorhabdus tanneri</i>	-	[Takenaka и др., 2012, 2013]
	<i>Heterostylites major</i>	-	[Takenaka и др., 2012]
Субстрат – фуримазин	NanoLuc <sup>®</sup>	460	[Hall и др., 2012]

Одной из первых была клонирована люцифераза коралла *Renilla* [Lorenz и др., 1991]. Она представляет собой белок с молекулярной массой около 36 кДа, максимум эмиссии 480 нм. На данный момент эта люцифераза является одной из наиболее популярных

в биоимиджинговых и других биолюминесцентных исследованиях, и может быть экспрессирована практически во всех типах клеток. Помимо природной *RLuc*, существуют мутантные люциферазы, обладающие повышенной стабильностью и яркостью (подробнее смотри обзор [Markova, Vysotski, 2015]), и даже спектром биолюминесценции, смещенным в длинноволновую область.

На основе люциферазы *RLuc* у *Promega* есть несколько коммерческих продуктов, в том числе разные векторы (*RLuc*, *RLucP*, *RLucCP* и др.), наборы для анализа и др. Поскольку данная люцифераза нашла обширное применение в биологии и медицине, то рассмотрение конкретных примеров, как и в случае люциферазы *P. pyralis*, выходит за рамки данного обзора.

Люцифераза из копеподы (веслоногого ракообразного) *Gaussia princeps* была впервые клонирована в 2002 году [Verhaegent, Christopoulos, 2002]. Это одна из самых маленьких люцифераз, ее масса составляет 19,9 кДа. Как и все секретлируемые люциферазы, она достаточно быстро стала популярной – в базе данных PubMed встречается более 300 ссылок с ее упоминанием. *GLuc* используется как белок-репортёр, как инструмент неинвазивного биоимиджинга, для исследования вирусных инфекций и др. В обзоре 2011 года [Tannous, Teng, 2011] изложены стандартные области применения люциферазы *GLuc*, автор данного обзора остановится лишь на самых актуальных публикациях последних лет.

Самое широкое применение люцифераза *Gaussia* нашла в биоимиджинге как в индивидуальном виде, так и в составе гибридных белков (например, [Hwang и др., 2015; Lang и др., 2015]). Часто *Gaussia* используется при изучении рака [Luker и др., 2012; Niers и др., 2012; Subleski и др., 2015; Yamashita, Nguyen, Chung, 2014], вирусных заболеваний (ВИЧ [Suree и др., 2012], лихорадка Западного Нила [Zhang и др., 2016], вирус гриппа А [Eckert и др., 2014; Munier и др., 2013; Spronken и др., 2015], вирус гепатита С [Liu и др., 2015; Nawtaisong и др., 2015], вирус Эбола [Uebelhoer и др., 2014], цитомегаловирус человека [Drouot, Piret, Boivin, 2013] и др. [Louber и др., 2014; Nie и др., 2014; Qu и др., 2014]) и бактериальных инфекций (*Candida albicans* [Delarze и др., 2015; Kucharíková и др., 2015; Pietrella и др., 2012] и др. [Liu и др., 2014]). Встречаются примеры использования *GLuc* для высокопроизводительного скрининга [Hulleman и др., 2013; Mehraein-Ghomi и др., 2015; Wang и др., 2015c].

Среди интересных примеров стоит отметить применение метода комплементационного белкового анализа с использованием фрагментов *GLuc* для изучения межклеточных взаимодействий. Сближение клеток с С- и N-концевыми

фрагментами люциферазы можно наблюдать по возрастанию интенсивности свечения [Jones и др., 2015].

Также интересен пример, где люцифераза GLuc входит в состав химерного белка вместе с одноцепочным вариативным доменом антитела. Такой искусственный фрагмент был специально создан для определения уровней кортизола методом BL-ELISA по биолюминесцентному сигналу *Gaussia* [Oyama и др., 2015]. Предел определения составил до 26 пкг/анализ, таким образом, предложенный метод является наиболее точным из существующих для иммуносорбентного анализа кортизола на данный момент.

Возможность применения GLuc для исследования функциональности  $\beta$ -клеток с помощью создания химерного белка с проинсулином описана в работе [Burns и др., 2015]. Метод высокопродуктивного скрининга, предложенный авторами, почти в 40 раз дешевле и быстрее традиционного ELISA, и позволяет быстро определять инсулиновый ответ на вещества, повышающие активность  $\beta$ -клеток.

Использование генов GLuc и YFP позволило авторам [Berglund и др., 2013, 2016] разработать люминопсины – гибридные белки из люциферазы (источник света) и родопсина (ионный канал, активируемый светом). Люцифераза находится с внешней стороны мембраны, а YFP – с внутренней. Таким образом, сам родопсин может быть активирован как с помощью внешнего источника света, так и химически (с помощью целентеразина). Такой подход позволяет выборочно активировать определенные нейроны в тканях мозга, что необходимо в исследованиях нейронных цепей и для решения специфических задач.

Поскольку максимум биолюминесценции GLuc находится в синем диапазоне, большая часть излучения поглощается тканями и гемоглобином, что ухудшает чувствительность многих методов биолюминесцентного анализа. Чтобы устранить эту проблему, авторы статьи [Bovenberg, Degeling, Tannous, 2012] предложили «захватывать» GLuc в крови антителом, а затем уже проводить биолюминесцентный анализ. Метод реализован в плащечном формате.

В завершение надо упомянуть, что ведется работа по получению более «красных» версий люциферазы *Gaussia*. В качестве примера можно привести публикацию [Kim и др., 2011], в которой описаны мутантные варианты GLuc, проявляющие 10-кратную интенсивность по отношению к материнской, а также люцифераза Monsta, максимум биолюминесценции которой смещен на 33 нм в красную область ( $\lambda_{\max}$  503 нм). Улучшенные спектроскопические свойства полученных люцифераз были проверены в моделях метастаз меланомы *in vivo* и других анализах.

Люцифераза из веслоногого ракообразного *Metridia longa*, клонированная в 2004 году [Markova и др., 2004], имеет массу около 24 кДа. Особенность MLuc проявляется в том, что по сравнению с люциферазой *Gaussia* ее свечение примерно в 10 раз более стабильно. Данная люцифераза сразу же нашла применение как секретируемый репортёрный белок, пригодный для проведения аналитических исследований *in vitro* и *in vivo* [Haugwitz и др., 2008; Hiramatsu и др., 2005; Huang и др., 2009; Kim, Kim, 2012; Lupold и др., 2012]. Например, в работе [Mukherjee и др., 2014] она применяется как тепловой сенсор в ответ на гипертермическое взаимодействие наночастиц. Клеточная модель рака предстательной железы с использованием MLuc была создана для изучения влияния отдельных микроРНК на чувствительность к ионизирующему излучению [Hatao и др., 2015]. Однако несмотря на растущую популярность MLuc и возможность экспрессировать её практически во всех видах клеток, данная люцифераза пока еще очень мало изучена [Markova, Vysotski, 2015]. Остается проблема быстрой инактивации MLuc под действием альбумина сыворотки крови [Hiramatsu и др., 2005]. Совсем недавно была клонирована изоформа MLuc массой 16,5 кДа [Markova и др., 2015], являющаяся самой маленькой природной люциферазой на данный момент. Авторы показывают возможность экспрессии люциферазы в разных типах клеток. Возможно, если будут найдены способы увеличить стабильность данной люциферазы *in vivo*, она станет такой же популярной, как люцифераза *Renilla*.

### 1.3.3 Фотопротеины

К другой группе биоломинесцентных систем на основе целентеразина относятся фотопротеины – белки, не требующие кислорода для реакции биоломинесценции. Фотопротеин состоит из белковой части (апофермента) и простетической группы (2-гидропероксицелентеразина). Люминесценция происходит в присутствии ионов кальция [Shimomura, 2006]. Белок может испускать свет только один раз, поскольку для нового цикла требуется новая молекула хромофора (целентеразина). Процесс восстановления функции идет медленно. В этом состоит принципиальное отличие фотопротеинов от классических люциферин-люциферазных систем, работающих по принципам ферментативного катализа.

На сегодняшний день выделены и охарактеризованы более десяти фотопротеинов [Shimomura, 2006]. Некоторые из них были клонированы (см. в Таблица 1.3) [Malikova и др., 2014].

Таблица 1.3. Клонированные фотопротеины.

Название фотопротеина	Вид	$\lambda_{\max}$ (нм)	Источник
Акворин	<i>Aequorea victoria</i>	470	[Inouye и др., 1985; Prasher и др., 1987; Prasher, McCann, Cormier, 1985]
Клитин	<i>Clytia gregaria</i>	470	[Inouye, 2008; Inouye, Tsuji, 1993; Markova и др., 2010]
Митрокомин	<i>Mitrocoma cellularia</i>	470	[Fagan и др., 1993]
Обелин	<i>Obelia longissima</i>	495	[Illarionov и др., 1995]
	<i>Obelia geniculata</i>	495	[Markova и др., 2002]
Беровин	<i>Beroe abyssicola</i>	491	[Markova и др., 2012]
Мнемиопсин	<i>Mnemiopsis leidyi</i>	485	[Aghamaali и др., 2011]
VfosPP	<i>Bathocyroe fosteri</i>	493	[Powers и др., 2013]

Традиционное применение фотопротеинов основано на их способности испускать свет при активации ионами кальция, и поэтому связано с внутриклеточным анализом на  $\text{Ca}^{2+}$ . Исторически сложилось, что самым популярным является белок акворин (это был первый выделенный и охарактеризованный белок [Shimomura, Johnson, Saiga, 1962]). Методы внутриклеточного биолюминесцентного анализа  $\text{Ca}^{2+}$ , основанные на акворине, обладают рядом преимуществ. Во-первых, использование акворина позволяет измерять концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  в большом диапазоне от  $10^{-7}$  до  $10^{-3}$  М. Также, применяя сигнальные последовательности, направляющие белок в заранее выбранные органеллы, можно получать селективную картину внутриклеточного распределения ионов. Акворин малочувствителен к изменению pH и концентрации  $\text{Mg}^{2+}$ , дает высокое соотношение сигнал-шум. Из недостатков можно выделить самый главный: малое количество света, искусственно получаемого белком. Другим существенным недостатком акворина и других фотопротеинов является время, которое необходимо затратить на его восстановление после одного цикла (около 1 часа). Из-за высокой чувствительности фотопротеинов и медленного восстановления функций их применение в зонах высокой концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  затруднительно.

Для ознакомления с возможностями применения химерных фотопротеинов для создания кальциевых сенсоров и другими возможными приложениями автор предлагает ознакомиться с обзорами [Hamorsky и др., 2010; Brini, 2008; Malikova и др., 2014].

### 1.3.4 Биолюминесцентная система бактерий

Биолюминесцентная система морских бактерий существенно отличается от других широко известных систем. Причина различия кроется в том, что бактериальный люциферин – миристиновый альдегид (Рисунок 1.7) – окисляется в процессе реакции, но

не является истинным источником света. История изучения биолюминесценции бактерий изложена в книге [Shimomura, 2006].

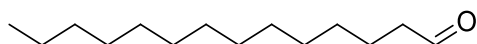


Рисунок 1.7. Люциферин бактерий, миристиновый альдегид.

Также необычно, что необходимыми компонентами люциферин-люциферазной реакции бактерий являются никотинамидадениндинуклеотид (НАДН) и флаavinмоноклеотид (ФМН). Причина кроется в особом механизме реакции, который представлен на следующей схеме:

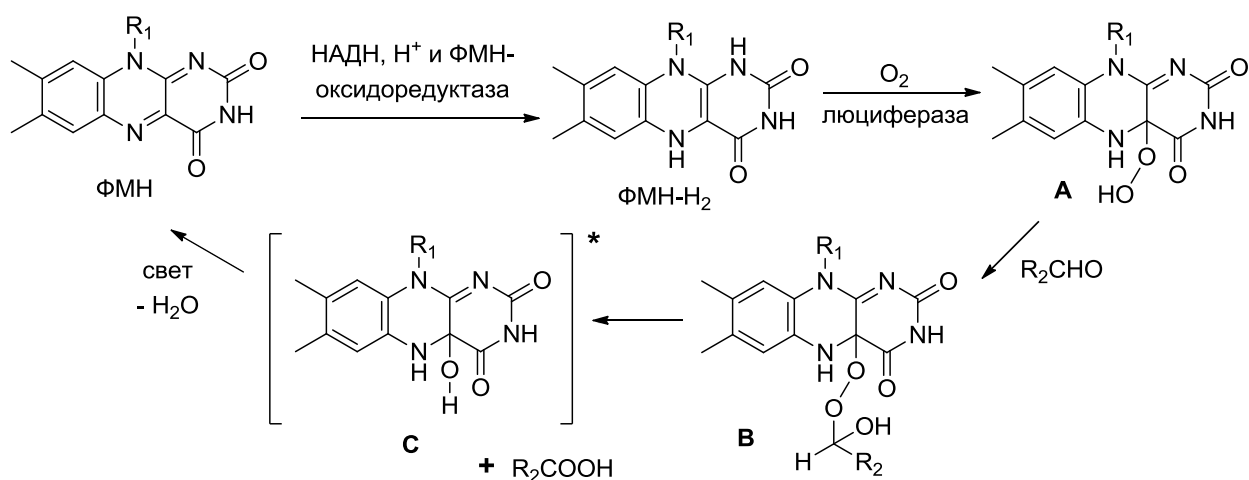


Схема 1.4. Механизм бактериальной биолюминесценции.

Полученный восстановлением ФМН-редуктазой ФМН-Н<sub>2</sub> связывается с люциферазой, быстро окисляется кислородом до гидропероксида **A**, после чего реагирует с альдегидом с образованием пероксиполуацетала **B**. Далее этот интермедиат претерпевает перегруппировку Байера-Виллигера: образуется соответствующая кислота и продукт окисления ФМН **C** в возбужденном состоянии. После испускания света производное ФМН дает исходный ФМН, который снова может быть задействован в реакции, и воду. Таким образом, истинным источником излучения в реакции бактериальной биолюминесценции выступает не альдегид, а гидроксильное производное ФМН.

Наиболее изученными являются биолюминесцентные системы бактерий *Vibrio harveyi*, *V. fischeri*, *Photobacterium phosphoreum* и *P. leiognathi* [Marquette, Blum, 2010], обладающие схожими по структуре люциферазами.

В лабораторных условиях максимум эмиссии составляет 490 нм при использовании деканала в качестве люциферина. В *V. fischeri* ФМН-редуктаза (оксиредуктаза) активна для НАДН и для НАДФН. Бактериальная система, состоящая из двух ферментов, позволяет создавать аналитические методы для комплексного определения НАД(Ф)Н.

Бактериальная биолюминесцентная система может быть полностью закодирована с помощью *lux* оперона, и это является ее несомненным преимуществом. Оперон *luxCDABE* кодирует люциферазы (гетеродимеры *lux A* и *luxB*) и белки (редуктазу, трансферазу и синтетазу) для синтеза самого субстрата (*luxCDE*) [Hamorsky и др., 2010].

Несмотря на то что гены были оптимизированы сначала для эукариотических клеток [Gupta и др., 2003], а вскоре и для клеток млекопитающих [Patterson и др., 2005], *lux* оперон, в основном, применяется в бактериальных клетках для создания биосенсоров (как ген-репортер), исследования развития бактериальных заболеваний, визуализации опухолей и др. Историю развития работы с бактериальной биолюминесцентной системой и ссылки на основные примеры ее применения можно проследить в обзорах [Close и др., 2012; Gahan, 2012]. Стоит отметить, что на сегодняшний день люцифераза из *P. luminescens* используется наиболее активно, поскольку она остается стабильной при более высоких температурах, чем остальные, – вплоть до 45°C [Szittner, Meighen, 1990].

Самым перспективным применением бактериальных биосенсоров представляется их использование в экотоксических исследованиях. Разнообразные загрязнители, например, ионы тяжелых металлов, органические вещества и др., могут быть определены с помощью простых коммерчески доступных тестов на основе биолюминесцентных бактерий (подробно см. в [Fernández-Piñas и др., 2014; Xu и др., 2014]).

Одним из предложенных применений бактериальной люциферазной системы стала разработка генно-инженерных светящихся растений. Первое самостоятельно светящееся растение (без добавления люциферина извне) было разработано в 2010 году [Krichevsky и др., 2010], но светило оно неярко. В настоящее время существует проект Glowing Plant Project [Glowing Plant, 2015], в рамках которого разрабатывается биолюминесцентное растение *Arabidopsis thaliana*, однако в последнее время на веб-странице проекта не наблюдается обновлений. Существуют идеи, что большим потенциалом для создания светящихся растений обладает биолюминесцентная система высших грибов [Reeve и др., 2014].

### 1.3.5 Биолюминесцентная система люциферина рачков *Cypridina*

Среди всех светящихся видов большинство являются морскими организмами. И среди них, несмотря на обширное таксономическое разнообразие, подавляющая часть

изученных биолюминесцентных видов основывают свое свечение на целентеразине и люциферине *Cypridina*.

Впервые люциферин *Cypridina* был выделен в чистом виде и охарактеризован Шимомурой в 1957 году из рачков *Cypridina (Vargula) hilgendorffii* [Shimomura, Goto, Hirata, 1957]. Из-за исключительной нестабильности субстрата на воздухе, особенно в загрязненном виде, выделить его из природного организма крайне затруднительно. Структура люциферина *Cypridina* указана на Рисунок 1.8. Отчетливо видно, что в ее основе лежат фрагменты трех аминокислотных остатков – аргинина, изолейцина и триптофана.

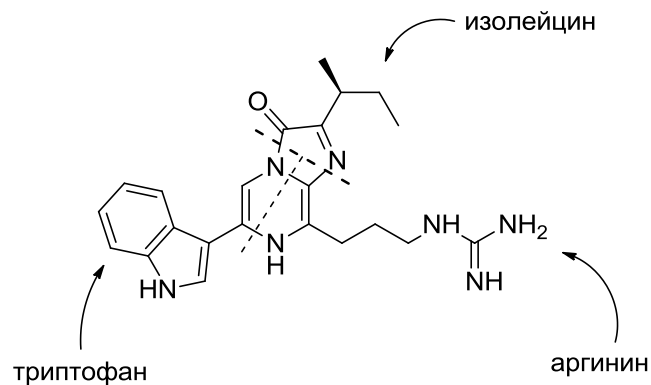


Рисунок 1.8. Структура люциферина *Cypridina*.

Для реакции биолюминесценции *Cypridina* не требуются никакие дополнительные субстраты, кроме самого люциферина, люциферазы и кислорода. Механизм биолюминесценции, который был предложен в 1967 году МакКапрой (для реакции хемилюминесценции люциферина) [McCapra, Chang, 1967] был подтвержден в работе [Shimomura, Johnson, 1971]. Пик биолюминесценции лежит в диапазоне 448-463 нм и зависит от ионной силы раствора.

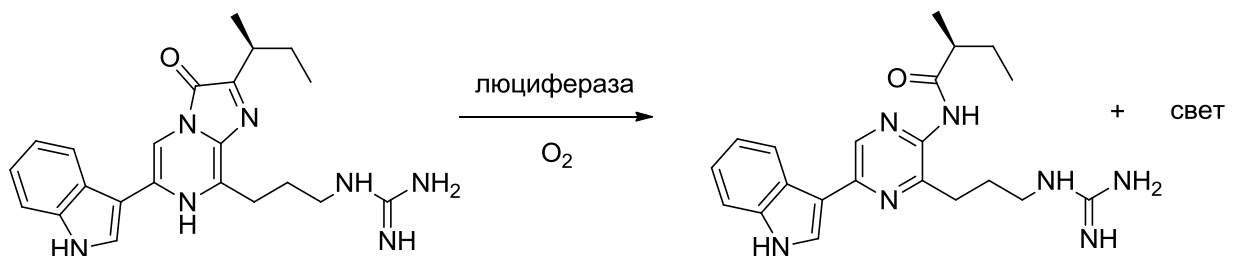


Схема 1.5. Биолюминесцентная реакция люциферина *Cypridina*.

Люцифераза *Cypridina* является одной из самых стабильных и может годами храниться в сухом виде при комнатной температуре. Первые работы по ее выделению были предприняты в 50-х годах 20 века [Shimomura, 2006] разными группами ученых,



клон кДНК *Cypridina (Vargula) hilgendorffii* впервые был получен в 1989 году [Thompson, Nagata, Tsuji, 1989]. Также была клонирована люцифераза *Cypridina noctiluca* [Nakajima и др., 2004].

Таблица 1.4. Выделенные и охарактеризованные люциферазы *Cypridina* (по материалам обзора [Markova, Vysotski, 2015]).

Название люциферазы	Вид	$\lambda_{\max}$ (нм)	Источник
Люциферазы <i>Cypridina</i>	<i>Cypridina (Vargula hilgendorffii)</i>	465	[Thompson, Nagata, Tsuji, 1989]
	<i>Cypridina noctiluca</i>		[Nakajima и др., 2004]
	<i>Periphylla peryphilla</i>	465	[Shimomura и др., 2001]
	<i>Benthoosema pterotum</i>	475	[Homaеi и др., 2013]

Секретируемые люциферазы (такие как *Cypridina*, *Gaussia* и др.) позволяют избежать проблем, связанных со сложностями использования несекретируемой FLuc, таких как контроль внутриклеточной концентрации субстратов – АТФ и люциферина, а также контроль pH. В таком случае активность репортера измеряется вне клетки.

На основе люциферазы *C. hilgendorffii* изначально разрабатывались методы анализа по репортёрным генам [Thompson, Nagata, Tsuji, 1990; Ura и др., 2001], в том числе для генов *Bmal1* и *Per1* для изучения их циркадных ритмов [Nishide и др., 2006] и для продолжительных измерений активности гормона роста [Tanahashi и др., 2001]; теперь она применяется в биоимиджинге путем создания стандартных химерных конструкций с интересующими белками [Miesenböck, Rothman, 1997], и при разработке препаратов для иммунологических анализов [Maeda и др., 1996; Wu и др., 2007, 2009a].

Отдельного внимания заслуживает пример создания «трехцветной» биоимиджинговой системы на основе люцифераз CLuc, FLuc и GLuc для проведения исследования влияния лиганда sTRAIL на активацию ядерного фактора NF- $\kappa$ B в мозговой опухоли мыши [Maguire и др., 2013]. Люцифераза CLuc позволила отследить доставку гена sTRAIL в мозг, люцифераза FLuc работала для имиджинга антиглиоминой терапии как маркер размеров опухоли. Активацию фактора NF- $\kappa$ B в ответ на связывание sTRAIL с рецепторами смерти клеток глиомы можно было отслеживать по GLuc. Подбор люцифераз с ортогональными субстратами позволяет проводить несвязанные биоимиджинговые измерения и следить за разными процессами параллельно в рамках одной модели.

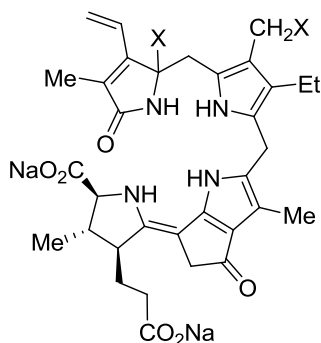
В литературе встречается некоторое число публикаций, в которых описана разработка биолюминесцентных методов на основе люциферазы *C. noctiluca*. Это работы

Охмийи и коллег, которые впервые клонировали ее в 2004 году. Например, они предложили метод для билюминесцентного анализа циркадной экспрессии гена *Bmall* [Yamagishi, Enomoto, Ohmiya, 2006] и *Per2* [Yamada и др., 2013]; разработали устройство для исследования влияния действия дексаметазона на изменение циркадных ритмов экспрессии на основе *Cluc* и *GLuc* [Watanabe и др., 2010]. Также был разработан метод быстрого и высокочувствительного анализа секретируемых белков фенотипа дрожжей *S.cerevisiae* [Kanjou и др., 2007]. Авторы работ [Ochi и др., 2011; Tochigi и др., 2010] утверждают, что люцифераза *Cluc* может успешно заменить  $\beta$ -галактозидазу в качестве репортерного белка в дрожжах при высокопродуктивном скрининге. Также существует пример создания BRET-пары на основе люциферазы *C. noctiluca* и индоцианинового красителя HyLite Fluor<sup>TM</sup> [Wu и др., 2009b]. Эмиссионный спектр полученного конъюгата имеет пик 460 нм и пик 675 нм, находящийся в далекой красной области. Интересно, что при этом сама люцифераза была биотинилирована. Авторы использовали данный конъюгат для «подкрашивания» Dlk-1 экспрессирующих опухолевых клеток с помощью биотин-авидинового взаимодействия с моноклональными Dlk-1-антителами. Такой подход позволил получить изображения живой ткани высокого разрешения без использования внешнего источника светового возбуждения. Та же группа разработала новую BRET-пару на основе *Cluc* и квантовых точек (QD) путем прямой и косвенной конъюгации с максимумами 605, 655 и 705 нм [Wu и др., 2011].

### 1.3.6 Билюминесцентная система люциферинов динофлагеллят и рачков крыля

Среди динофитовых водорослей (динофлагеллят) встречаются светящиеся виды. Первые успешные шаги по установлению химической природы билюминесценции динофлагеллят были сделаны Хастингсом и коллегами в середине 20 века [Bode, Hastings, 1963; Dunlap, Hastings, 1981; Hastings, Sweeney, 1957]. Структура самого люциферина динофлагеллят (из *Pyrocystis lunula*) была определена Накамурой и коллегами в 1989 году [Nakamura и др., 1989] (см. Рисунок 1.9). Первая выделенная природная люцифераза динофлагеллят из *Gonyaulax polyedra* (ныне *Lingulodinium polyedrum*) [Woodland Hastings, Dunlap, 1986], представляет собой белок 130 кДа, состоящий из трех гомологичных доменов [Li, Hong, Hastings, 1997; Schultz и др., 2005]. Также были клонированы другие природные люциферазы динофлагеллят (см. Таблицу 1.5). Строго говоря, отсутствуют доказательства того, что структуры люциферинов идентичны для всех видов динофлагеллят, поскольку такие исследования не проводились, однако это по умолчанию считается верным, так как все они дают перекрестные реакции билюминесценции

с люциферинном из *P. lunula*. Биоллюминесцентные характеристики были изучены только для системы вида *Gonyaulax polyedra*.



**X=OH** люциферин криля  
**X=H** люциферин динофлагеллят

Рисунок 1.9. Структуры люцифериннов динофлагеллят и рачков эвфаузиид.

Несмотря на неточность имеющихся данных относительно структуры люциферина для всех динофлагеллят, было однозначно доказано, что он имеет структуру, схожую с люциферинном рачков эвфаузиид (криля), и компоненты обеих биоллюминесцентных систем могут взаимодействовать перекрестно [Dunlap, Hastings, Shimomura, 1980]. Это явление особенно удивительно потому, что данные виды находятся на значительном таксономическом удалении друг от друга.

Таблица 1.5. Клонированные люциферазы динофлагеллят.

Название люциферазы	Вид	$\lambda_{\max}$ (нм)	Источник
Люциферазы динофлагеллят	<i>Gonyaulax polyedra</i> ( <i>Lingudolium polyedrum</i> )	475	[Bae, Hastings, 1994]
	<i>Pyrocystis lunula</i>		Гены <i>lcfA</i> , <i>lcfB</i> , <i>lcfC</i> [Okamoto и др., 2001]
	<i>Noctiluca scintillians</i>		[Liu, Hastings, 2007]

Компоненты биоллюминесцентной системы криля впервые были выделены Шимомурой [Shimomura, Johnson, 1967] из рачков *Meganocytiphanes norvegica*, впоследствии из *Euphausia pacifica* [Shimomura, 1995]. Автору не удалось найти публикации, подтверждающие установление генетических последовательностей выделенных люцифераз. Механизм биоллюминесценции динофлагеллят и криля изучен недостаточно [Shimomura, 2006].

Каждый домен люциферазы динофлагеллят может быть клонирован и использован для разработки новых биоллюминесцентных методов анализа. Тем не менее, на данный момент количество примеров ограничено в виду того, что биоллюминесцентная система динофлагеллят только недавно вышла на биотехнологическую «арену». Так, например,

третий активный домен *P. lunula* был использован с разными промоторами для разработки методов анализа транскрипционной активности генов в клетках млекопитающих [Suzuki и др., 2005]. Новый метод биолюминесцентного исследования воздействия шаперонов на мутантную человеческую  $\beta$ -галактозидазу (снижение активности  $\beta$ -галактозидазы ведет к дисфункции нейронов, шапероны позволяют стабилизировать ее активность) был разработан авторами [Li и др., 2010] с использованием Dluc. И, наконец, недавно была разработана методика для количественного измерения клеточно-поверхностных белков, химерных с Dluc [Kato и др., 2011]. Авторы утверждают, что данная система может стать очень мощным методом для изучения транспорта мембранных белков и широкого скрининга лекарственных кандидатов для изучения их влияния на экспрессию таких белков.

### 1.3.7 Биолюминесцентная система люциферина моллюска *Latia*

Среди моллюсков новая химическая природа люминесценции была обнаружена Шимомурой и Джонсоном у новозеландского вида пресноводных брюхоногих моллюсков *Latia neritoides* [Shimomura, Johnson, 1968a, 1968b]. Люциферин *Latia* представляет собой формиат енольной формы терпенового альдегида (см. Рисунок 1.10), при взаимодействии с люциферазой *Latia* испускается желто-зеленый свет ( $\lambda_{\max}$  536 нм).

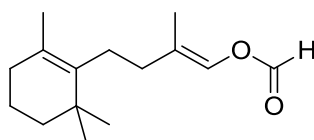


Рисунок 1.10. Люциферин *Latia neritoides*.

Необходимым условием для биолюминесценции *Latia* является наличие кислорода и кофактора, так называемого «пурпурного протеина», красного флуоресцентного белка, структура которого на данный момент неизвестна. Предполагаемый механизм биолюминесценции в *Latia* представлен на схеме:

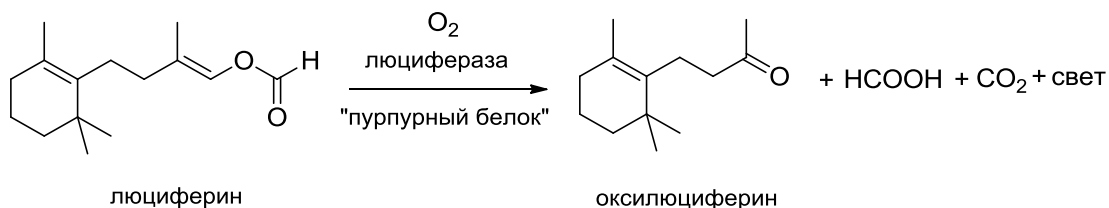


Схема 1.6. Механизм биолюминесценции *Latia*.

Важно отметить, что люциферин *Latia* может выступать только в роли источника энергии для биолюминесцентной реакции, поскольку ни люциферин, ни оксилициферин, ни «пурпурный белок» не обладают свойствами зеленого флуорофора. Исходя из этих данных, изначально возникло предположение о том, что, как и в случае бактериальной люминесценции, источником света в реакции является флавиновый фрагмент [Shimomura, Johnson, Kohama, 1972], однако позже эта идея была отвергнута [Ohmiya и др., 2005].

Группой ученых под руководством Нивы получен ряд разнообразных аналогов природного люциферина *Latia* [Kojima и др., 2000; Nakamura и др., 2004, 2005], однако для всех из них интенсивность люминесценции в разы ниже, чем для природного субстрата, и модификация структуры никак не влияет на длину волны испускания.

Из-за того что на сегодняшний день компонент биолюминесцентной системы *Latia*, ответственный за испускание света, так и не был обнаружен, разработка способов ее применения пока невозможна. Однако даже если он будет определен, сложности все равно возникнут из-за нестабильности и относительной малополярности люциферина, и, как следствие, плохой растворимости в воде, что неизбежно накладывает ряд ограничений на большинство аналитических методов.

### 1.3.8 Биолюминесцентная система люциферина червя *Diplocardia*

Люциферин кольчатого червя *Diplocardia longa* из класса олигохет был выделен и охарактеризован в 1976 году [Ohtsuka, Rudie, Wampler, 1976]. Он обладает очень простой структурой – это N-изовалерил-3-аминопропаналь:

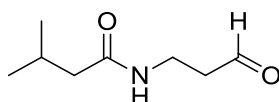


Рисунок 1.11. Люциферин червя *Diplocardia longa*.

Согласно механизму реакции биолюминесценции *Diplocardia* [Rudie, Mulkerrin, Wampler, 1981], альдегид активируется перекисью водорода, а затем аддукт под действием люциферазы распадается с испусканием зеленого света ( $\lambda_{\max}$  500 нм):

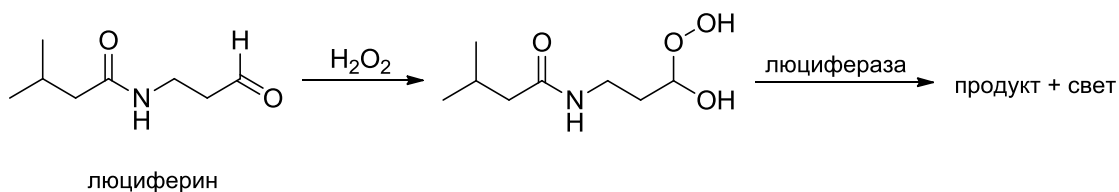


Схема 1.7. Механизм биолюминесценции *Diplocardia longa*.

Поскольку необходимым участником реакции является перекись водорода, то возможно создание аналитических методов ее количественной оценки на основе люциферин-люциферазной реакции *Diplocardia*. Такие методы были созданы [Mulkerrin, Wampler, 1978; Wampler, Mulkerrin, Rich, 1979]: они позволяют определить наномолярные концентрации пероксида с высокой чувствительностью (до 2 пкмоль), а также пригодны для оценки активности пероксидаз, производящих пероксиды (например, глюкоксидаза, путресцинооксидаза).

Основным препятствием для развития метода является ограниченная доступность люциферазы *Diplocardia* и ее низкая стабильность – до 60% активности теряется при хранении в фосфатном буфере при 4°C в течение 2 недель. Присутствие ионов  $Fe^{2+}$  приводит к ингибированию реакции, т.к. они активно разлагают перекись. Также ингибиторами выступают органические буферы и сильные хелатирующие агенты (в связи с тем, что в люциферазе есть ионы меди).

### 1.3.9 Биолюминесцентная система люциферина червя *Fridericia heliota*

Структура люциферина сибирского почвенного малощетинкового червя *Fridericia heliota* (Annelida: Clitellata: Oligochaeta: Enchytraeidae) [Petushkov, Rodionova, 2005] была определена сравнительно недавно - в 2014 году [Petushkov и др., 2014]. Люциферин представляет собой необычный пептид, состоящий из последовательно соединенных остатков гамма-аминомасляной кислоты, модифицированного остатка тирозина, аминокислоты лизина и щавелевой кислоты (См. Рисунок 1.12). Максимум биолюминесценции *Fridericia* лежит в области 478 нм.

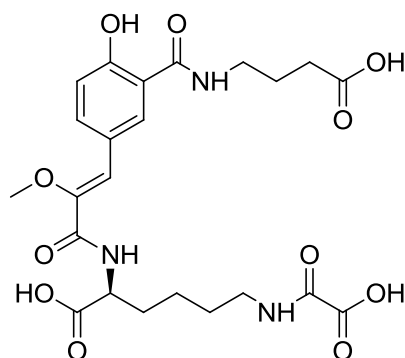


Рисунок 1.12. Люциферин *Fridericia heliota*.

На сегодняшний день люцифераза *Fridericia* еще не была выделена и не охарактеризована, поэтому пока рано говорить о возможных способах использования данной люциферин-люциферазной системы, однако тот факт, что сам люциферин

*Fridericia* прост в синтезе, очень стабилен и нетоксичен [Восьмая формула света - Пресс-центр - ИБХ РАН], позволяет прогнозировать, что со временем билюминесценция *Fridericia heliota* найдет самое широкое применение.

## ГЛАВА II. Результаты и обсуждение

### 2.1 Биolumинесцентная система *Fridericia heliota*

Биolumинесцентная система сибирского почвенного червя *Fridericia heliota* была впервые охарактеризована в 2014 году, когда была определена структура субстрата люциферина **2.1** [Petushkov и др., 2014]. Первичный синтез люциферина и его простейших аналогов был выполнен в ходе работы над кандидатской диссертацией Александрой Царьковой [Царькова А. С., 2015].

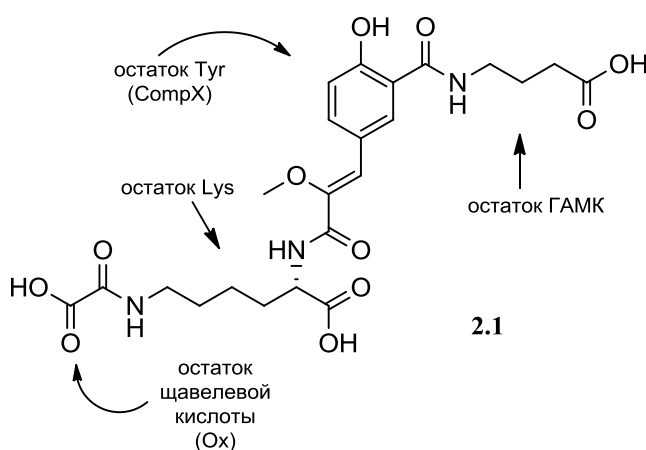


Рисунок 2.1. Структура люциферина *Fridericia heliota*.

Люциферин *Fridericia heliota* **2.1** – это необычный пептид, состоящий из остатков гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), модифицированного тирозина (CompX), лизина (Lys) и щавелевой кислоты (Ox). В настоящей работе была поставлена задача оптимизации некоторых ключевых стадий синтеза люциферина *F. heliota* с целью его получения в больших количествах.

#### 2.1.1 Оптимизация синтеза люциферина *Fridericia heliota*

Одним из исходных соединений для синтеза люциферина является метиловый эфир CompX **2.4**, получаемый в две стадии из доступной салициловой кислоты (Схема 2.1). Недостатком использовавшихся ранее методик синтеза были низкие выходы реакций (Схема 2.1, пунктир) и трудность разделения *Z,E*-изомеров на второй стадии. Метод синтеза CompX был нами усовершенствован. На стадии получения альдегида была произведена замена растворителя, а вторая стадия – реакция Хорнера-Уодсворта-Эммонса – проведена с другим основанием в метаноле. В итоге выходы реакций повысились с 2% до 13% на две стадии. На финальной стадии соотношение *Z:E*-изомеров изменилось с 2:1 до 3:1. Также был найден удобный метод очистки целевого продукта



от примеси исходного альдегида и второго изомера путем перекристаллизации в толуоле. После охлаждения из раствора выпадает осадок целевого *Z*-изомера.

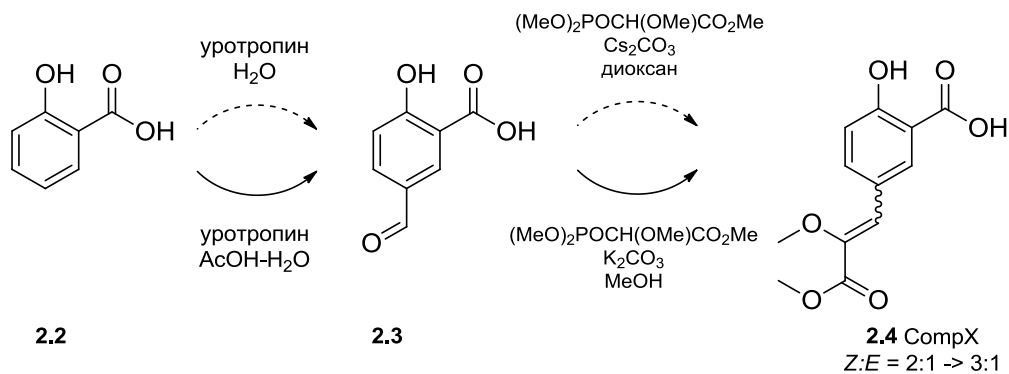


Схема 2.1 Оптимизация синтеза метилового эфира CompX **2.4**.

Если обратиться к схеме дальнейшего синтеза люциферина *F. heliota* из диссертации [Царькова А. С., 2015], то из **2.4** в три стадии получают промежуточное соединение **2.5**, которое затем требует еще трех стадий для получения производного **2.7**, в котором омыляют этильную защитную группу и получают люциферин **2.1**.

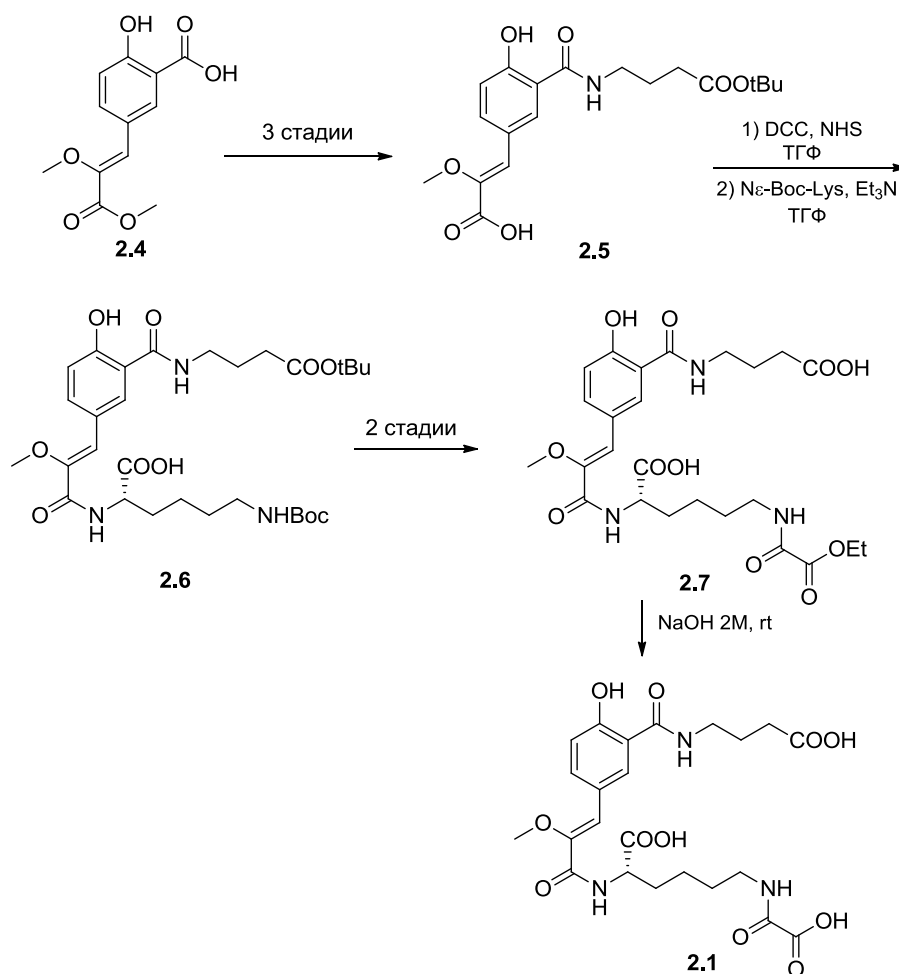


Схема 2.2. Синтез люциферина *F. heliota* из диссертации [Царькова А. С., 2015].

Для оптимизации синтеза люциферина в реакции пептидного синтеза было предложено вместо  $\epsilon$ -*N*-БОК-*L*-лизина использовать его производное **2.10** (Схема 2.3), уже содержащее фрагмент щавелевой кислоты. Гидробромид  $\omega$ -(этилоксалил)лизина **2.10** был получен из  $\alpha$ -*N*-БОК-*L*-лизина **2.8** в две стадии. Использование соединения **2.10** позволило упростить синтез люциферина червя и его аналогов, исключив лишние стадии удаления защитных групп и ацилирования.

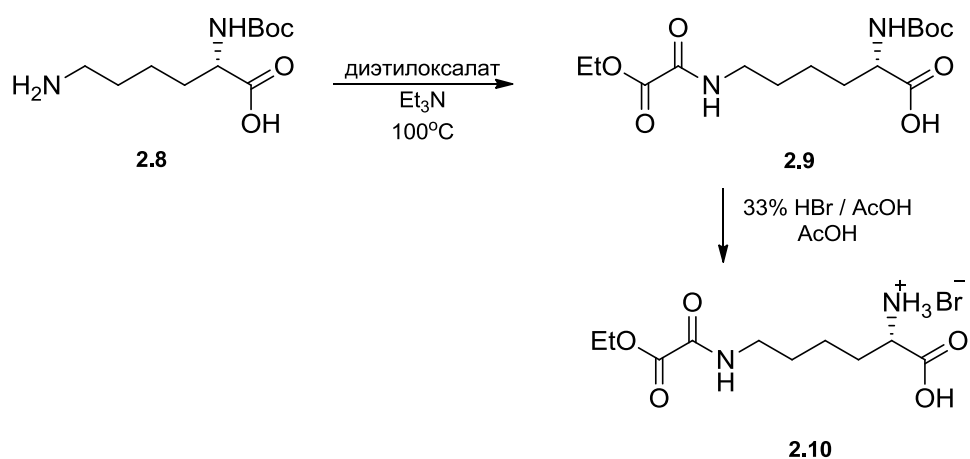


Схема 2.3. Синтез гидробромида  $\omega$ -(этилоксалил)лизина **2.10**.

Впоследствии для еще большего упрощения сборки люциферина *F. heliota* был получен новый структурный фрагмент лизина, содержащий *трет*-бутильную защитную группу на остатке щавелевой кислоты вместо этильной (Схема 2.4).  $\alpha$ -*N*-*Z*-*L*-лизин **2.11** переводили в производное **2.13** путем ацилирования с последующим удалением карбоксибензильной защиты гидрогенолизом.

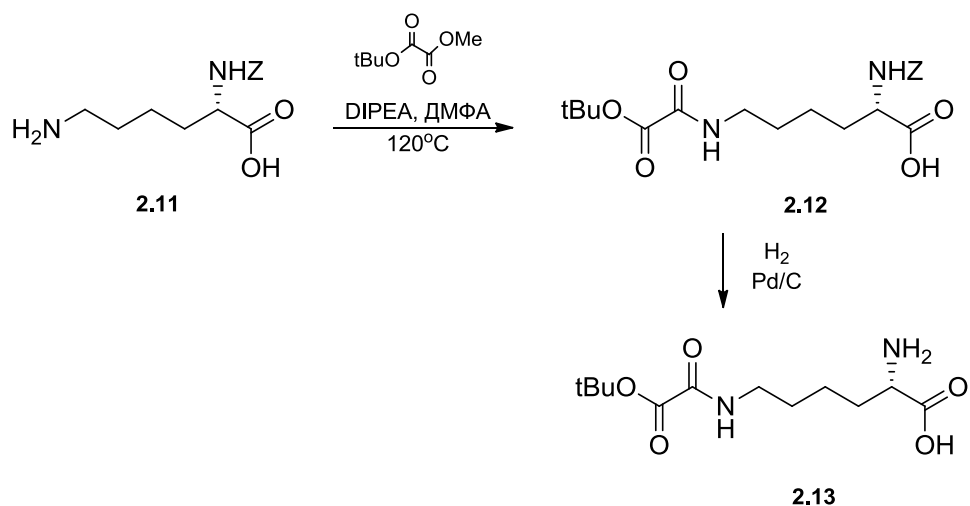


Схема 2.4. Синтез  $\omega$ -(*трет*-бутилоксалил)лизина **2.13**.

Такая замена позволила избежать дополнительной стадии удаления защитной группы на последнем этапе синтеза люциферина. Таким образом, исходная схема синтеза была сокращена с девяти до семи стадий с суммарным выходом 2% (было 0.04%):

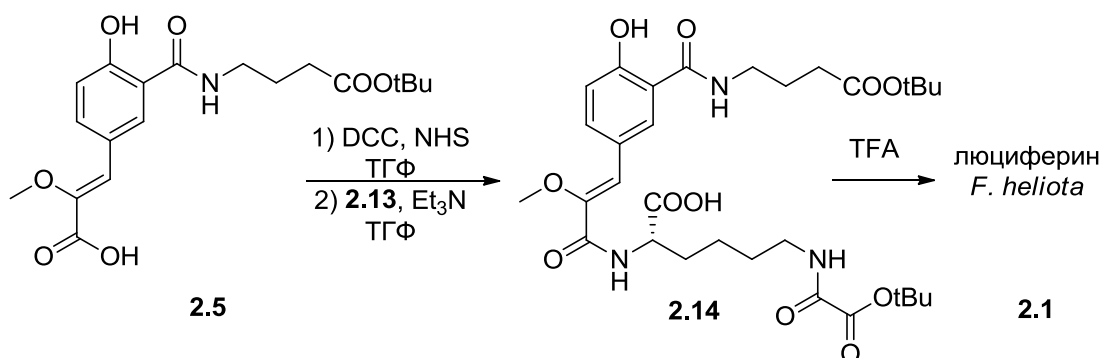


Схема 2.5 Улучшенная схема синтеза люциферина *Fridericia heliota*.

### 2.1.2 Изучение структуры природных аналогов люциферина *Fridericia heliota*

В рамках работы по установлению структуры природных аналогов люциферина *F.heliota* Максимом Дубинным из данных спектров ЯМР было определено, что природные соединения AsLn5 **2.15**, AsLn11 **2.16** и AsLn12 **2.17**, выделяемые из червей, имеют общий тирозиноподобный фрагмент, который был назван нами CompY (по аналогии с фрагментом CompX).

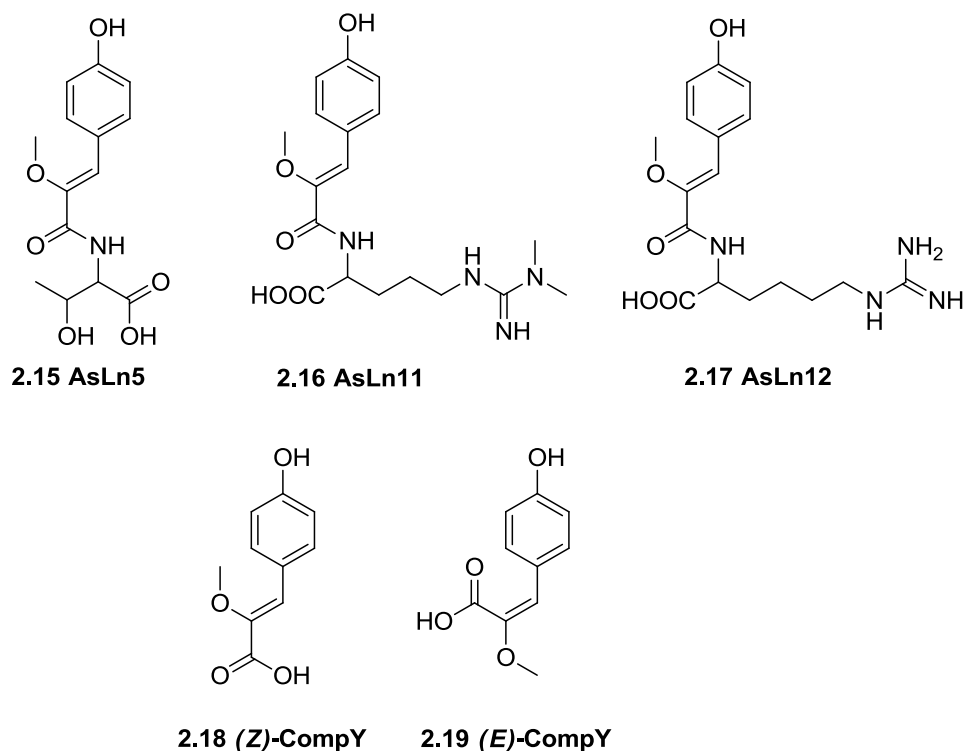


Рисунок 2.2. Природные аналоги люциферина из *F. heliota* AsLn5, AsLn11 и AsLn12, их структурный фрагмент (Z)-CompY и изомер (E)-CompY.

Для установления конфигурации двойной связи в CompY нами был осуществлен синтез соединений (Z)-CompY **2.18** и (E)-CompY **2.19**. Сравнение характерных сигналов в  $^1\text{H}$ -ЯМР и отсутствие в ROESY-спектре кросс-пика между метокси-группой и винильным синглетом доказало, что именно (Z)-CompY является структурным фрагментом соединений **2.15-2.17**.

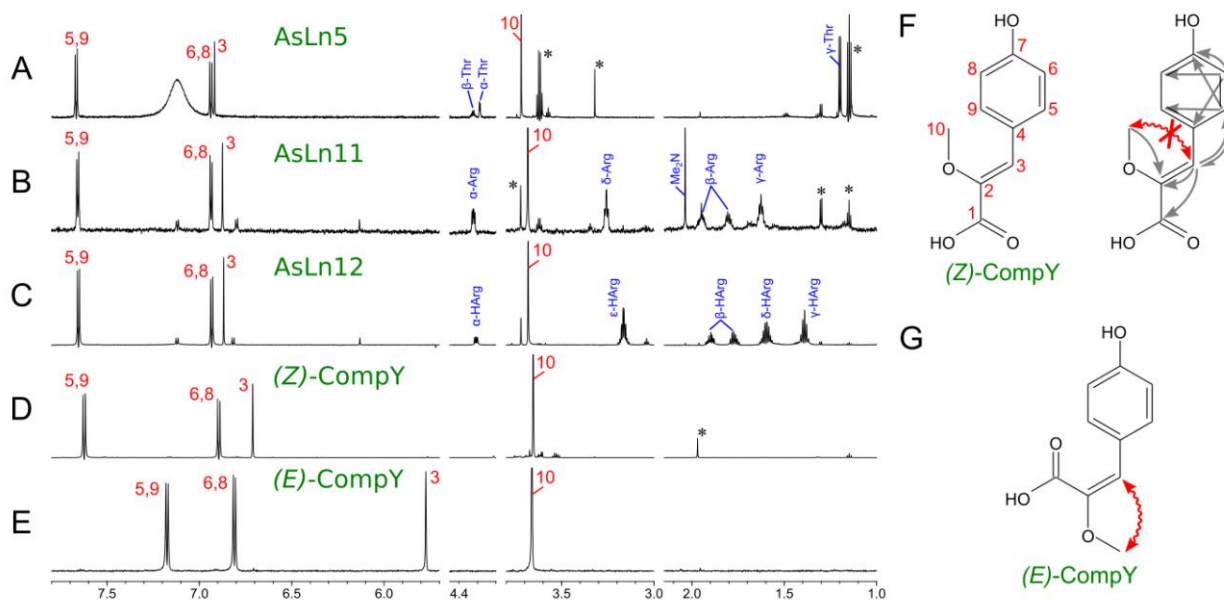


Рисунок 2.3.  $^1\text{H}$ -ЯМР спектры природных и синтетических аналогов люциферина *F. heliota*: 800 МГц (A,B,C) и 700 МГц (D,E). F: нумерация атомов в структуре (Z)-CompY, показаны взаимодействия в эксперименте HMBC и отсутствие сигнала в спектре ROESY. E: наблюдаемый сигнал в ROESY-эксперименте для (E)-CompY.

Соединения CompY получали из общего исходного *n*-гидроксибензальдегида по аналогии со схемой синтеза CompX (Схема 2.6). Сначала осуществляли введение бензилоксиметильной защитной группы, после чего проводили реакцию Хорнера-Уодсворта-Эммонса, образующиеся изомеры разделяли при хроматографической очистке. Затем в полученных соединениях последовательно удаляли две защитные группы. Целевые продукты **2.18** и **2.19** были получены в четыре стадии с суммарным выходом 20% и 10% соответственно.

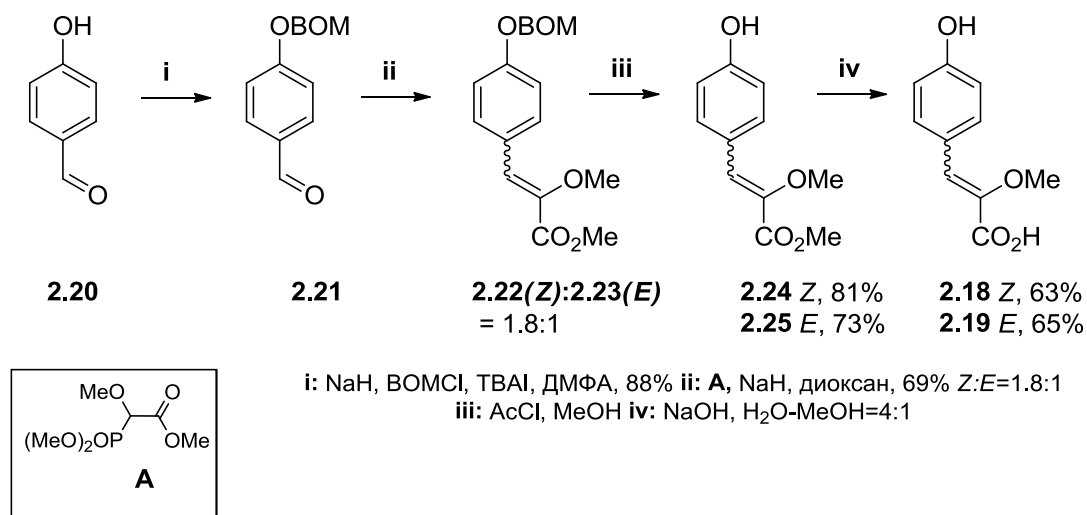


Схема 2.6. Синтез соединений (Z)-CompY **2.18** и (E)-CompY **2.19**.

Таким образом было доказано, что все природные аналоги люциферина из *F. heliota* (CompX, CompY и AsLn5, AsLn 11, AsLn12) так же, как и сам люциферин, имеют Z-конфигурацию двойной связи в тирозиновом фрагменте. Эти данные в дальнейшем будут использованы для установления путей биосинтеза люциферина *F. heliota*.

### 2.1.3 Изучение механизма реакции биолюминесценции *Fridericia heliota*

В связи с установлением структуры люциферина актуальной стала задача определения механизма биолюминесценции и получения его аналогов, которые бы обладали новыми спектральными характеристиками. Для решения этой задачи необходимо было ответить на вопрос о функциональной роли различных структурных фрагментов молекулы люциферина. В ходе предварительных исследований было установлено, что активность в реакции биолюминесценции, вероятнее всего, проявляет одна из карбоксильных групп в остатке ω-оксалиллизина (LysOx), поэтому модификация исходной структуры без потери активности возможна по фрагменту ГАМК. Для проверки этой гипотезы был осуществлен синтез двух аналогов люциферина, переменных по этому остатку.

Для синтеза производного люциферина с линкерной аминогруппой **2.28** и его конъюгата с флуоресцентным красителем **2.30** были использованы вещества CompX **2.4** и **2.10** (Схема 2.7).

Путем активации кислоты из **2.4** был получен пептид **2.27**, в котором удаляли метильную защитную группу, а затем проводили пептидный синтез - сочетание с остатком лизина **2.10**. Для получения целевого продукта **2.28** удаляли защитные трет-бутильную и этильную группы. Соединение **2.30** было получено конъюгацией

амина **2.28** и соответствующего активированного эфира **2.29** (соединение предоставлено Михаилом Барановым) в гидрокарбонатном буфере.

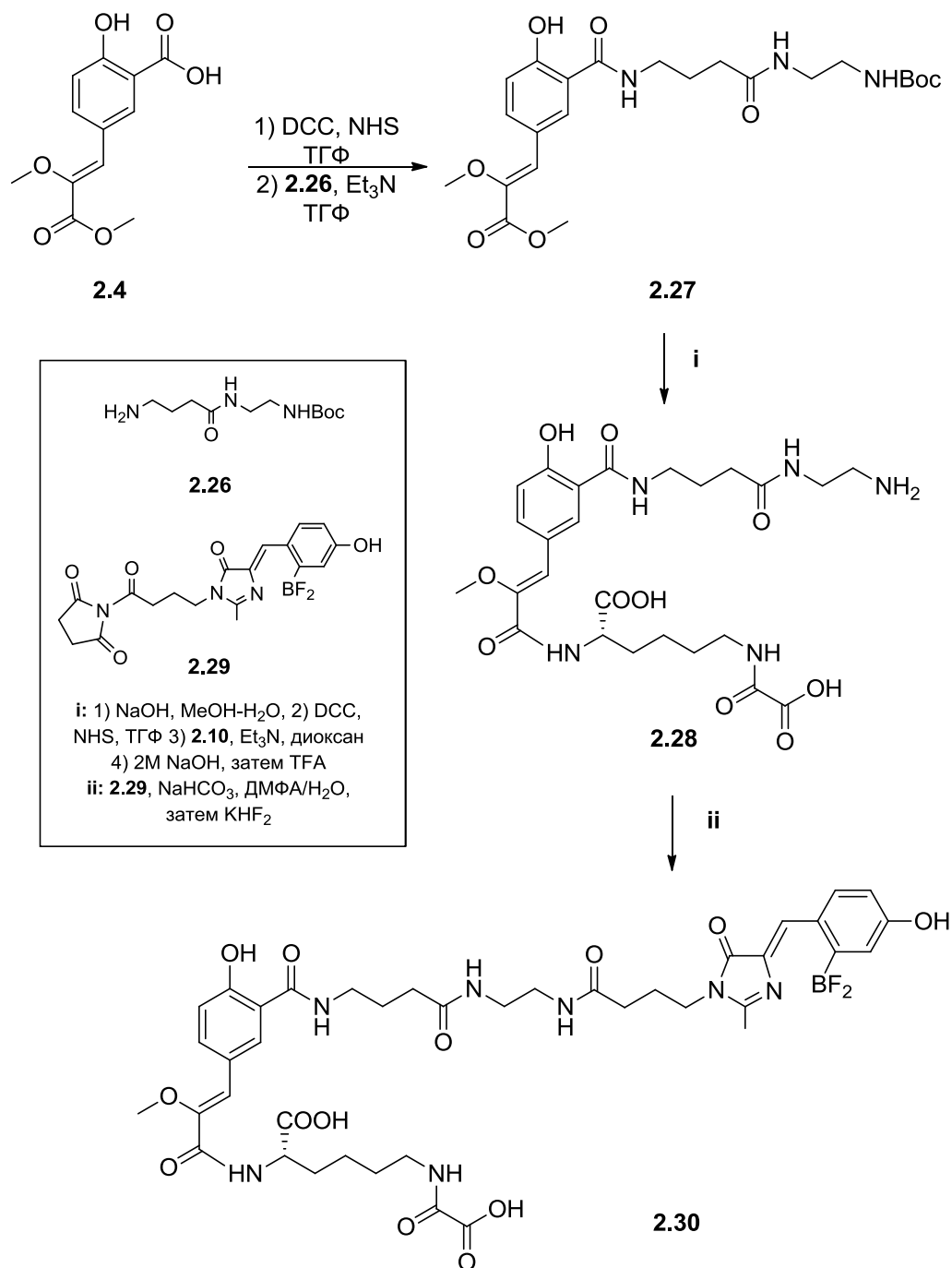


Схема 2.7. Синтез аналогов люциферина *F. heliota* **2.28** и **2.30**.

Было показано, что соединения **2.28** и **2.30** обладают билюминесцентными свойствами, аналогичными природному люциферину, проявляя активность при добавлении экстракта люциферазы. Эти данные подтвердили гипотезу о том, что фрагмент ГАМК не принимает участие в реакции билюминесценции *F. heliota*.

Спектры поглощения и биолюминесценции аналога люциферина **2.30** в сравнении с люциферинном **2.1** представлены на Рисунке 2.4. Можно наблюдать значительное смещение максимума поглощения для соединения **2.30** в красную область, которое объясняется наличием новой хромофорной группы. Максимум биолюминесценции также смещается: если для люциферина **2.1** он составляет 478 нм, то для аналога **2.30**, в котором возможен Фёрстеровский перенос энергии излучения (BRET) с люциферина на хромофорную группу, пик биолюминесценции соответствует 528 нм.

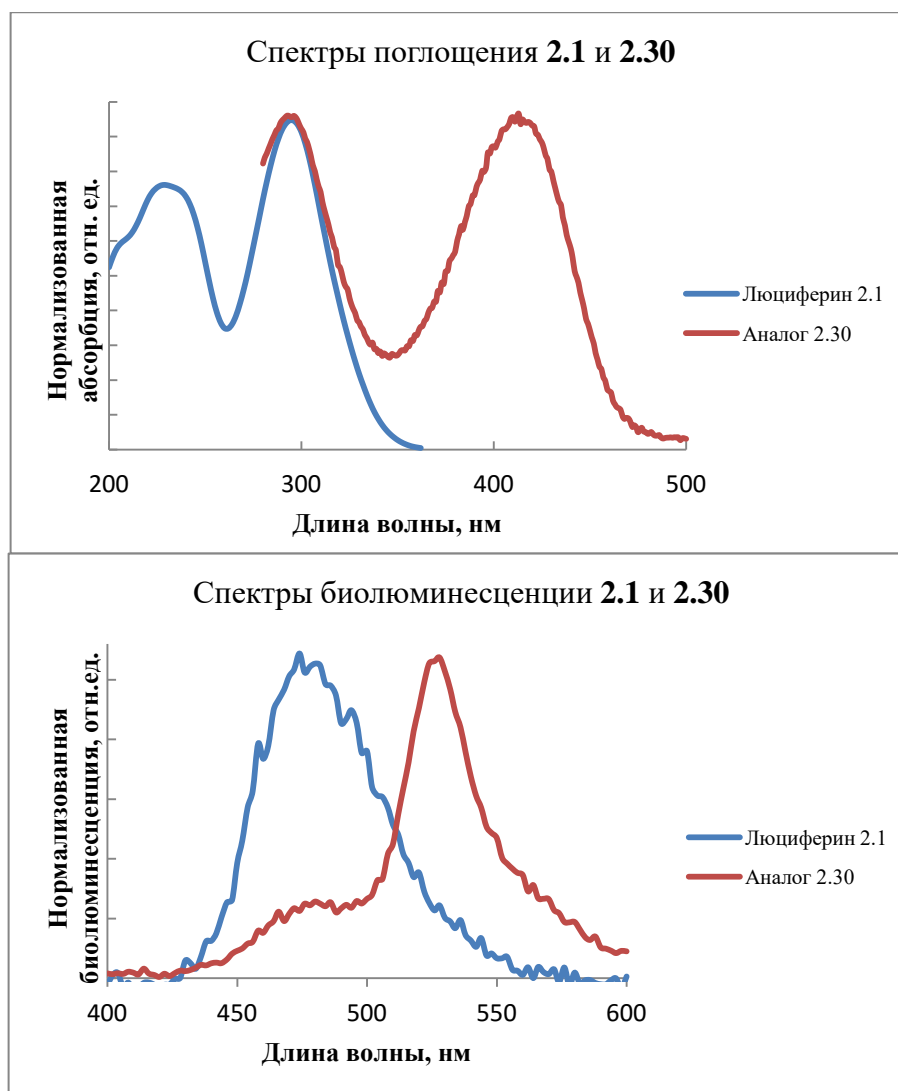


Рисунок 2.4. Спектры поглощения и биолюминесценции люциферина **2.1** и аналога **2.30**.

Наши коллеги из Красноярска Валентин Петушков и Наталья Родионова смешали синтетический люциферин *F.heliota* с экстрактом люциферазы в присутствии избытка АТФ. Контроль за ходом реакции осуществлялся методом ВЭЖХ аликвот, наблюдалось уменьшение пика исходного вещества (люциферина) и образование мажорного продукта.

Через 25 часов, когда примерно 62% люциферина было израсходовано, основным продуктом реакции (предположительно, оксильюциферин) был выделен с помощью ВЭЖХ. Структура оксильюциферина была определена Максимом Дубинным при использовании сочетания методов спектроскопии ЯМР и масс-спектрометрии. Таким образом, реакция биолюминесценции *F. heliota* имеет вид:

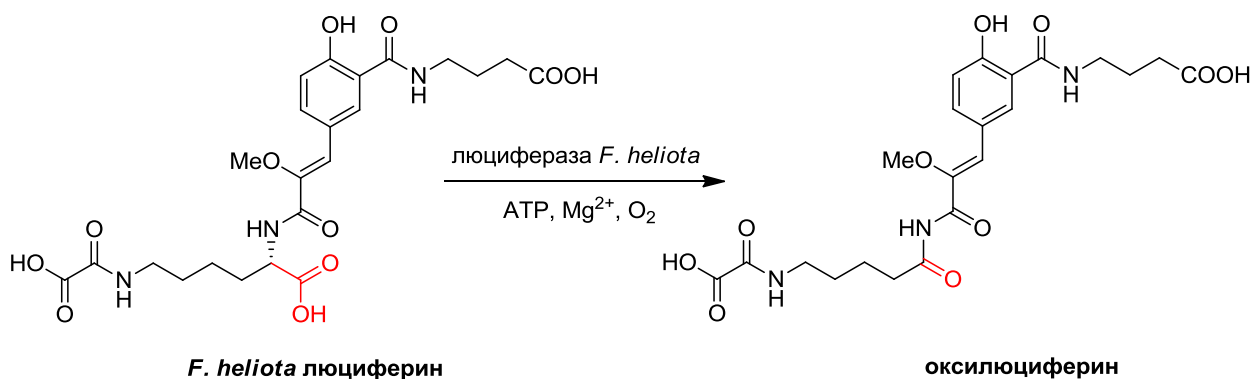
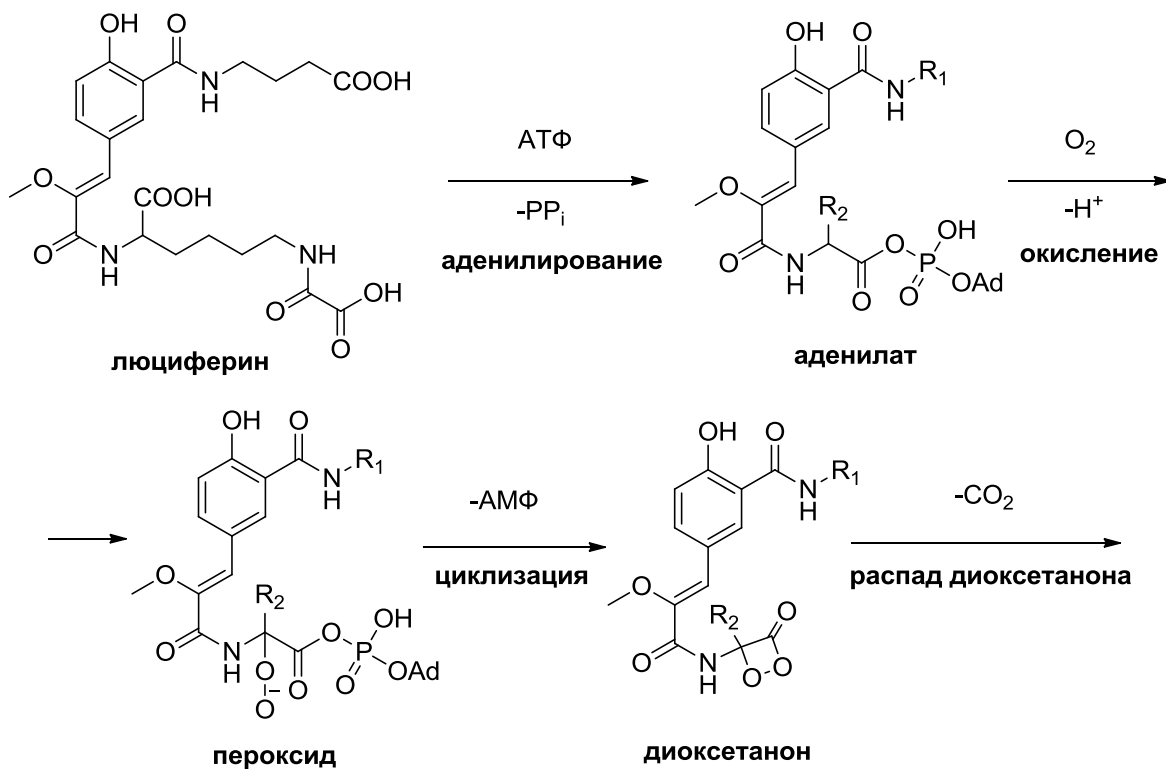


Схема 2.8. Реакция биолюминесценции *Fridericia heliota*.

При рассмотрении структуры оксильюциферина *F. heliota* возникает предположение, что он получается путем окислительного декарбоксилирования по  $\alpha$ -положению в лизиновом остатке. На основании полученных данных был предложен механизм реакции биолюминесценции *F. heliota*, аналогичный механизму биолюминесценции D-люциферина светляка [Shimomura, 2006]:





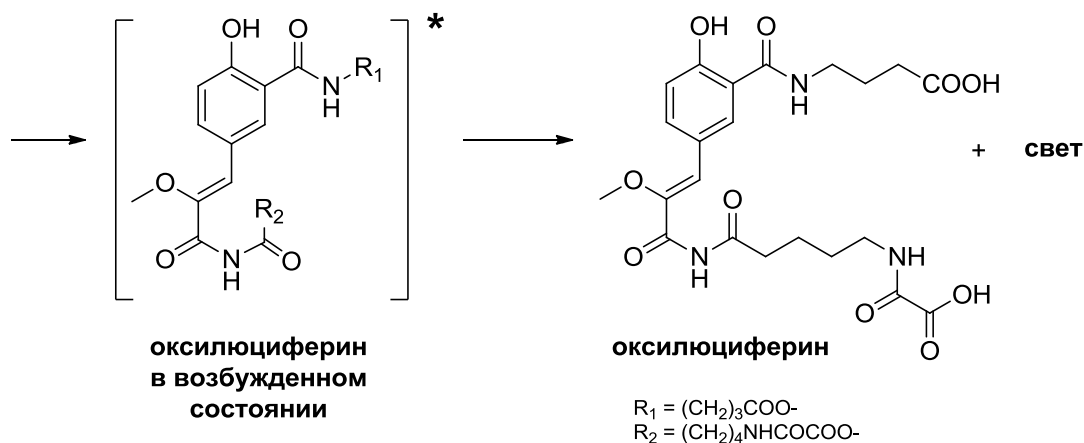


Схема 2.9. Механизм реакции биолюминесценции *Fridericia heliota*.

Если реакция протекает по этому механизму, то промежуточным продуктом биолюминесценции *F. heliota* является аденилат люциферина по карбоксильной группе лизина. Для доказательства этой гипотезы нами были предприняты попытки осуществить химический синтез аденилата из люциферина, чтобы затем продемонстрировать его биолюминесцентные свойства. Однако активация карбоксильной группы лизина с помощью любого известного способа (активированные сложные эфиры, смешанные ангидриды и т.д.) приводила к разложению субстрата и образованию сложной смеси продуктов. Тогда был осуществлен синтез модельного соединения аденилата, содержащего *трет*-бутильный заместитель на карбокси-группе лизина **2.31** (Схема 2.10), аминогруппа в  $\omega$ -положении была защищена бензилоксикарбонильным заместителем. Хемилюминесценция соединения **2.31** под действием оснований подтвердила предположения о механизме реакции биолюминесценции *F. heliota*.

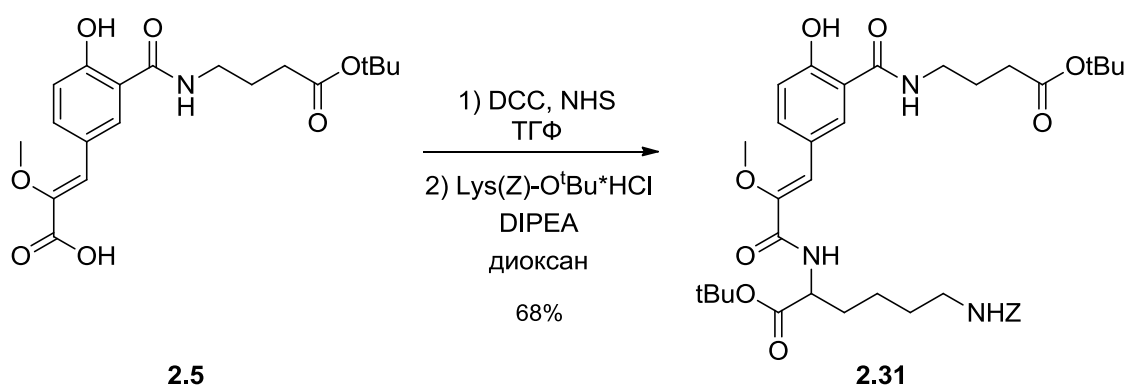


Схема 2.10. Синтез модельного соединения аденилата люциферина *F. heliota* **2.31**.

#### 2.1.4 Заключение

Таким образом, в рамках работы по изучению биолюминесцентной системы *Fridericia heliota* была выполнена модификация синтеза люциферина: количество стадий

уменьшено с девяти до семи, суммарный выход увеличен в 50 раз. Также был осуществлен синтез двух его аналогов, варьирующихся по остатку ГАМК. Аналоги люциферина проявили биолюминесцентную активность, для одного из них, содержащего новую хромофорную группу, было показано значительное смещение максимумов спектров поглощения и биолюминесценции в красную область. Были синтезированы фрагменты CompY с различными конфигурациями двойной связи для установления структуры природных аналогов люциферина AsLn5, AsLn11 и AsLn12. Для определения механизма реакции биолюминесценции был получен аналог аденилата люциферина, проявивший хемиллюминесцентную активность под действием оснований на воздухе. Таким образом, был установлен механизм окисления люциферина *F. heliota*.

Простота синтеза, нетоксичность и исключительная стабильность люциферина *Fridericia heliota* делают его перспективным кандидатом для применения в биологии и медицине. Участие АТФ в реакции биолюминесценции позволяет данному люциферину стать альтернативой для популярного сейчас D-люциферина. Можно надеяться, что после того как будет выделена и клонирована люцифераза *F. heliota* и станет доступной разработка новых аналитических методов на ее основе, биолюминесцентная система *F. heliota* найдет широкое применение.

## 2.2 Биolumинесцентная система высших грибов

Биolumинесценция грибов – грибного мицелия и плодовых тел - была выявлена еще в глубокой древности [Harvey, 1957; Shimomura, 2006]. Всего существует около 70 видов люминесцентных грибов, они распределены по 9 родам [Stevani и др., 2013; Wassink, 1978]. Цвет биolumинесценции для всех известных грибов одинаковый – максимум эмиссии составляет около 530 нм.

На протяжении всего XX века не удавалось определить структуру основного компонента биolumинесцентной системы – грибного люциферина. В 1959 году впервые удалось продемонстрировать люциферин-люциферазную реакцию при смешении грибных экстрактов [Airth, McElroy, 1959] и добавлении НАД(Ф)Н. На сегодняшний день точно известно, что биolumинесценция в высших грибах – это двухступенчатый процесс. На первой стадии происходит превращение предшественника люциферина в люциферин под действием растворимого фермента и при участии НАД(Ф)Н. На второй стадии люциферин окисляется в присутствии нерастворимой люциферазы – происходит процесс собственно биolumинесценции [Airth, Foerster, 1962, 1964]:

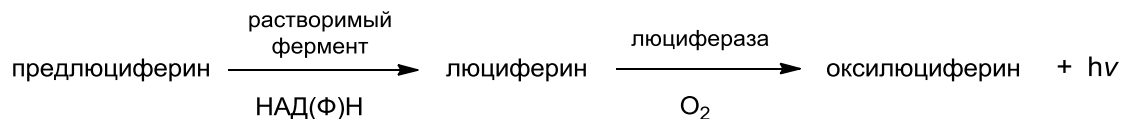


Схема 2.11. Реакция биolumинесценции в высших грибах.

Наши коллеги из Красноярска (Константин Пуртов, Валентин Петушков и Наталья Родионова) обнаружили, что в несветящихся грибах *Pholiota squarrosa* предшественник люциферина содержится в количествах, в 100 раз превышающих его содержание в светящихся грибах [Purtov и др., 2015]. Предлюциферин был выделен хроматографически и охарактеризован методами ЯМР и масс-спектрометрии – оказалось, что это вещество уже было описано и представляет собой гиспидин – соединение класса стирилпиранов, вторичных метаболитов в растениях и грибах [Lee, Yun, 2011]. Кросс-эксперименты показали универсальность данного субстрата для биolumинесцентной реакции разных видов люминесцентных грибов. Дальнейшие работы с использованием экстрактов растворимого фермента из светящихся грибов *Neonothopanus nambi* позволили энзиматически конвертировать гиспидин в грибной люциферин и определить его структуру [Purtov и др., 2015]. <sup>1</sup>H-ЯМР-спектры гиспидина и грибного люциферина из природных экстрактов представлены на Рисунке 2.5:

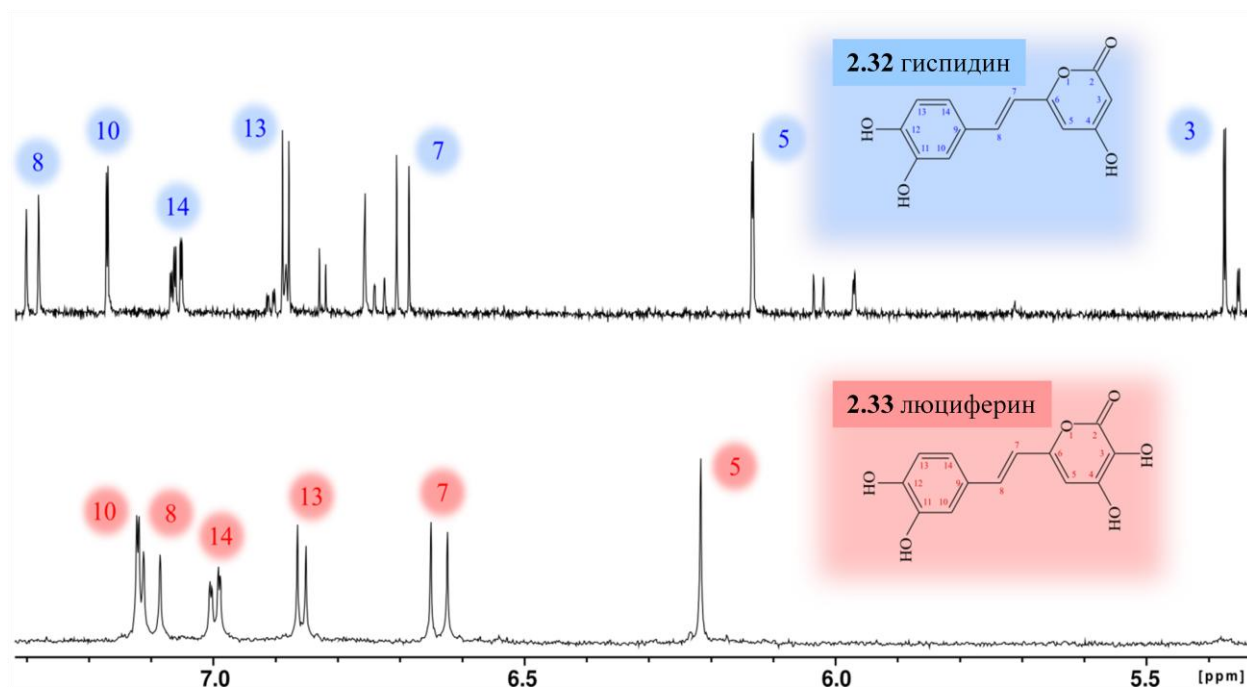


Рисунок 2.5. <sup>1</sup>H-ЯМР-спектры и структуры предлюциферина **2.32** и люциферина грибов **2.33**.

Люциферин грибов **2.33** представляет собой 3-гидроксигиспидин. Гидроксилирование гиспидина по третьему положению в пираноновом ядре представляет собой первую стадию в последовательности химических превращений, приводящих к грибной биолюминесценции.

### 2.2.1 Синтез люциферина высших грибов

В настоящей работе была поставлена задача получить грибной люциферин синтетическим путем, в первую очередь, для независимого подтверждения его структуры, а также для использования синтетического субстрата в дальнейших работах по изучению биолюминесцентной системы грибов.

Поскольку синтез гиспидина **2.32** уже был известен [Adam и др., 1994] и сам гиспидин является коммерчески доступным, то первой нашей попыткой провести синтез 3-гидроксигиспидина **2.33** стал биомиметический синтез из гиспидина **2.32**. Ряд пробных экспериментов с гиспидином и его защищенными производными, в которых в качестве окислителей использовались БАИБ, БАИБ в сочетании с NBS и NIS, а также диоксид селена, *мета*-хлорнадбензойная кислота (mCPBA) и др., приводили в основном к деградации исходного вещества и образованию следовых количеств продукта, детектируемых на хроматограммах ВЭЖХ, а также с помощью анализа аликвот реакционной смеси на люминометре в присутствии люциферазы грибов. Тогда было принято решение проводить синтез люциферина *de novo*. Ключевой стадией в синтезе

гиспидина **2.32** является создание двойной связи путем конденсации двух фрагментов – дигидроксibenзальдегида и метилпиранона. Поскольку вышеописанные попытки окисления гиспидина по положению 3 оказались неудачными, мы решили ввести гидроксильную группу в пираноновое ядро до того, как оно вступит в реакцию конденсации (Схема 2.12).

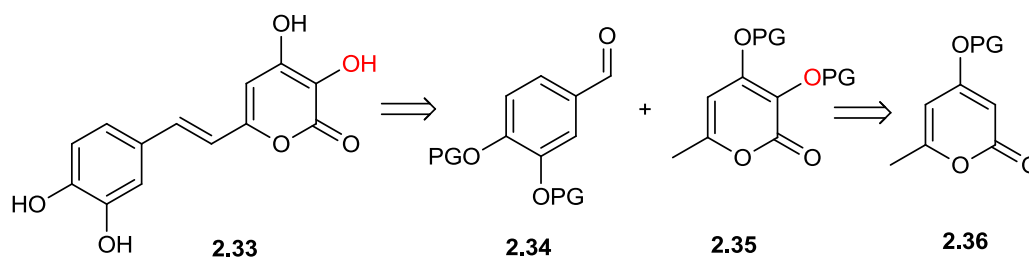


Схема 2.12. Ретросинтетический анализ грибного люциферина.

Синтез люциферина грибов был начат исходя из коммерчески доступного предшественника – дегидроацетовой кислоты **2.37** (Схема 2.13). В исходном веществе под действием концентрированной серной кислоты удаляли ацетильную группу [Soldi и др., 2012], а затем проводили окисление третьего положения под действием производного, полученного из камфорсульфокислоты и БАИБ [Hatzigrigoriou, Varvoglis, Bakola-Christianopoulou, 1990]. Полученное соединение **2.39** обрабатывали 5М раствором щелочи для омыления сульфонового эфира.

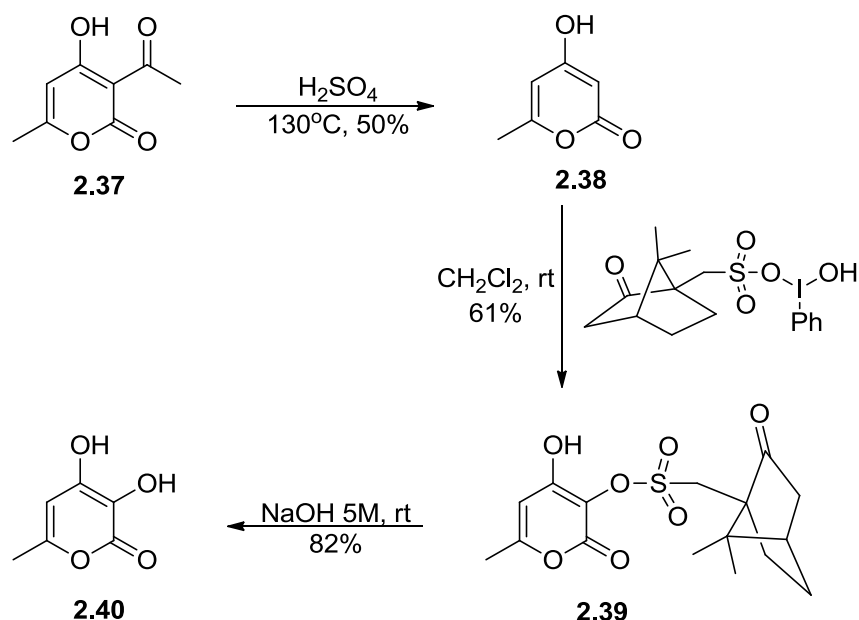


Схема 2.13. Синтез соединения **2.40**.

Нами были опробованы методики конденсации незащищенных производных **2.38** и **2.40** с различными альдегидами для получения гиспидина или грибного люциферина напрямую, минуя введение защитных групп (Схема 2.14). Подбираемые условия указаны

в Таблице 2.1. Все предпринятые попытки оказались неудачными: либо реакция не шла вовсе, либо в качестве мажорных образовывались продукты поликонденсации. Желаемые продукты в реакционных смесях обнаружены не были. Поэтому в дальнейшем мы перешли к варианту синтеза с защитой гидроксильных групп в обоих циклах люциферина.

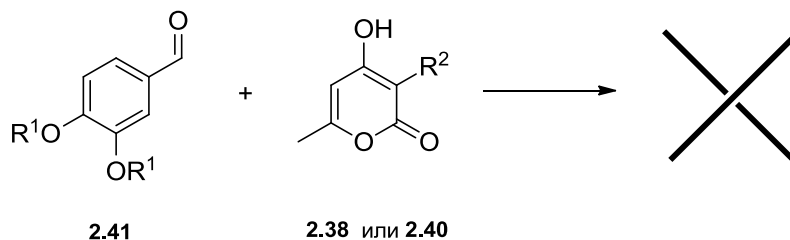


Схема 2.14. Реакция конденсации незащищенных производных **2.38** и **2.40** с альдегидами.

Таблица 2.1. Подбор условий для проведения реакции конденсации.

R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Условия
H	H	ZnCl <sub>2</sub> в ТГФ, кипячение
		tBuOK, ТГФ
		Пиридин, нагревание
		Mg(OMe) <sub>2</sub> , MeOH, нагревание
	OSO <sub>2</sub> Camphor	ZnCl <sub>2</sub> в ТГФ, кипячение
-CH <sub>2</sub> -	H	ZnCl <sub>2</sub> в ТГФ, кипячение
		tBuOK, ТГФ
		Пиридин, нагревание
		Mg(OMe) <sub>2</sub> , MeOH, нагревание
	OH	Пиридин, Ag, нагревание
		Mg(OMe) <sub>2</sub> , MeOH, Ag, нагревание
		2M NaOH, H <sub>2</sub> O

Попытки ввести стандартные защитные группы на свободные гидроксильные группы в **2.40**, которые бы выдержали дальнейшие планируемые превращения: третбутилдиметилсилильные, бензильные, а также метиленовую или ацетонидную защиты, оказались неудачными. И хотя в ходе реакций бензилирования/силилирования по различным методикам по ТСХ можно было проследить образование моно- и дзамещенных производных в небольшом количестве, выделить их из реакционной смеси не удавалось. Был сделан косвенный вывод о том, что постановка защит на две соседние гидроксильные группы в пираноновом кольце затруднена стерически. Единственный вариант защитных групп, которые можно было установить на соседние гидроксильные –

это, как и в случае описанного ранее синтеза гиспидина, метильные защитные группы. Реакция метилирования **2.40** под действием диметилсульфата и карбоната натрия в ацетоне при нагревании позволила получить исходное вещество **2.42** для синтеза грибного люциферина и, как оказалось впоследствии, различных его аналогов.

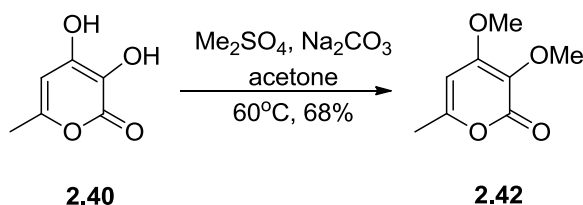


Схема 2.15. Метилирование пиранона **2.40**.

Реакция конденсации **2.42** с 3,4-метилендиоксibenзальдегидом **2.43** в присутствии метилата магния в метаноле давала продукт **2.44** (в основном, *транс*-изомер, незначительная примесь *цис*-изомера отделялась при хроматографической очистке), в котором затем удаляли все защитные группы действием избытка трибромид бора в дихлорметане в инертной атмосфере (Схема 2.16). Стоит отметить, что в отличие от защищенного гиспидина **B**, в котором удаление единственной метильной защитной группы в пираноновом кольце было возможно только под действием этантиолята натрия в диметилформамиде при нагревании до 140°C, удаление всех защитных групп (и в бензольном, и в пираноновом ядре) при синтезе люциферина проходило в одну стадию. Таким образом, грибной люциферин **2.33** был получен из исходного 3,4-дигидрокси-6-метил-2*H*-пиран-2-она **2.40** с суммарным выходом 18% на три стадии.

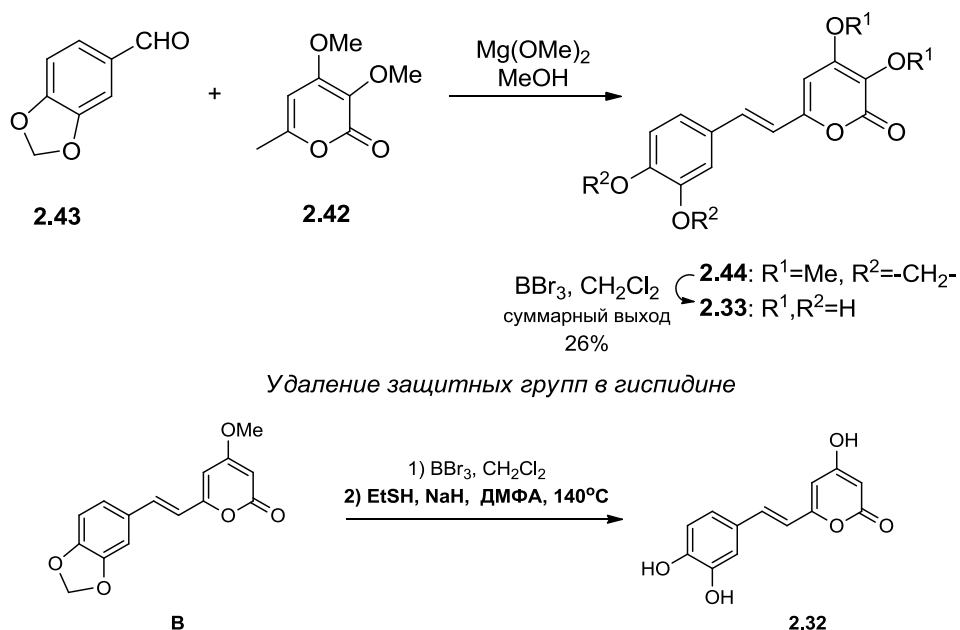


Схема 2.16. Синтез грибного люциферина **2.33** и условия удаления защитных групп в гиспидине.

### 2.2.2 Синтез аналогов грибного люциферина

Для определения структурных фрагментов молекулы люциферина грибов, ответственных за люминесцентную реакцию, и получения аналогов люциферина грибов с измененными спектрами биолюминесценции, была поставлена задача получить ряд аналогов грибного люциферина, содержащих различные донорные заместители в бензольном ядре. Нами были выбраны следующие исходные альдегиды: *n*-метоксибензальдегид, тиофен-2-карбальдегид, 6-(диметиламино)-2-нафтальдегид, а также азотсодержащие 1*H*-индол-3-карбальдегид, *n*-(диметиламино)бензальдегид и 1,2,3,5,6,7-гексагидропиридо[3,2,1-*ij*]хинолин-9-карбальдегид. Структуры целевых соединений **2.45-2.50** представлены на схеме:

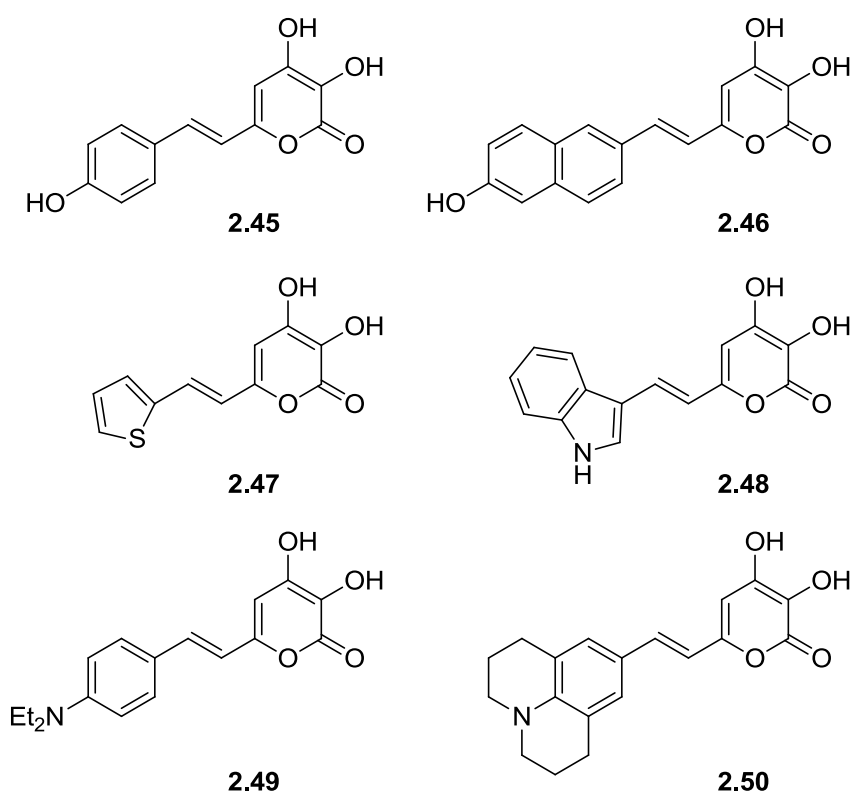


Рисунок 2.6. Структуры целевых соединений **2.45-2.50**.

Сборку аналогов люциферина было запланировано осуществить аналогично разработанной нами схеме синтеза люциферина. Однако в данном случае при первой попытке получения веществ **2.45** и **2.46** мы столкнулись с очень низкими, практически следовыми выходами в реакции конденсации с метилатом магния в метаноле. Поэтому был предложен альтернативный вариант сборки целевых продуктов. Исходное вещество **2.42** обрабатывали NBS при катализе бензоилпероксидом в  $\text{CCl}_4$  [Vacardit, Moreno-Mañas, Pleixats, 1982]. Полученный бромид **2.51** действием трифенилфосфина переводили в фосфониевую соль **2.52**. Трифенилфосфониевую соль использовали для проведения



реакции Виттига с альдегидами в стандартных условиях для построения двойной связи. В полученных продуктах защитные группы удаляли описанным выше методом в кислых условиях. Таким образом, в пять стадий из **2.42** был получен ряд аналогов природного люциферина грибов с выходами 1-7%. Поскольку перед нами не стояла задача наработать данные вещества в больших количествах, оптимизация методик синтеза с целью увеличения выходов не проводилась.

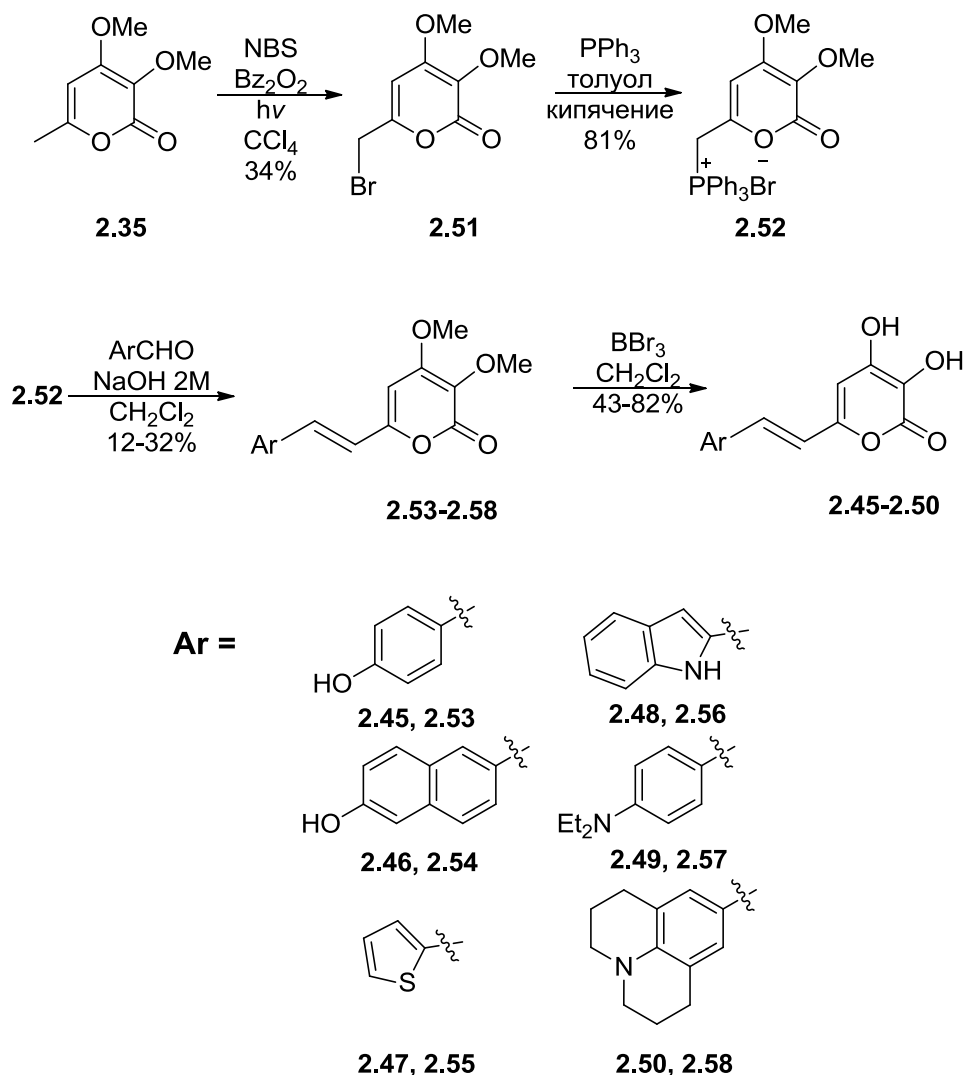


Схема 2.17. Синтез аналогов грибного люциферина **2.45-2.50**.

### 2.2.3 Спектральные характеристики аналогов грибного люциферина

Для аналогов **2.45-2.50** были изучены спектральные характеристики: измерены спектры абсорбции, возбуждения и эмиссии флуоресценции, а также изучена их активность при добавлении экстракта люциферазы грибов (Таблица 2.2).

Из шести полученных аналогов билюминесцентную активность проявили пять, неактивным с люциферазой оказалось только тиофен-содержащее производное **2.47**. Спектры билюминесценции соединений **2.33**, **2.45-2.46**, **2.48-2.50** представлены

на Рисунке 2.7. Можно наблюдать, что максимум билюминесценции для нафталин-содержащего производного **2.46** смещен относительно природного люциферина в красную область, в то время как для производных **2.45** и **2.48-49** наблюдается смещение в синюю часть спектра. Максимум билюминесценции для производного **2.50** близок к максимуму для люциферина (Таблица 2.3).

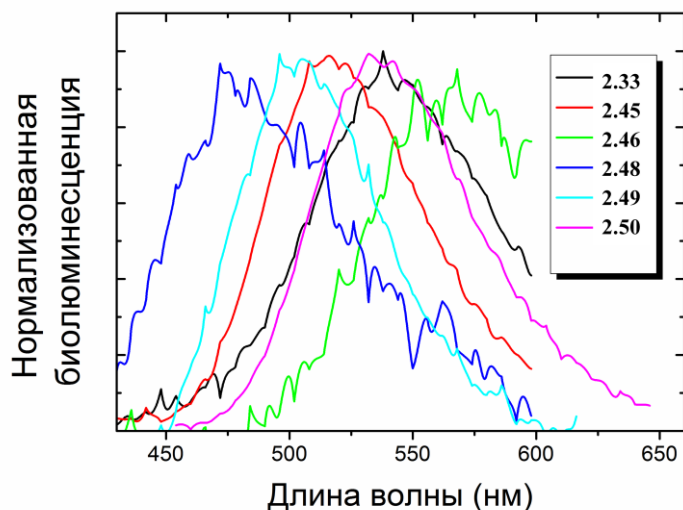


Рисунок 2.7. Спектры билюминесценции соединений **2.33**, **2.45-46** и **2.48-50**.

Для пяти аналогов люциферина, проявивших билюминесцентные свойства, была измерена активность относительно природного люциферина (Таблица 2.2). Сравнение проводили на основании высоты максимума билюминесценции образца (в отн. ед.), нормированной на концентрацию вещества. По полученным данным можно наблюдать, что активность аминокислотных аналогов люциферина **2.49** и **2.50** в 2 и 4 раза соответственно превышает активность природного люциферина **2.33**, в то время как производные с нафталиновым и индольным ядром малоактивны. Самый близкий аналог люциферина **2.33**, содержащий фенольный заместитель вместо катехольного, проявляет активность, равную 75% активности природного люциферина.

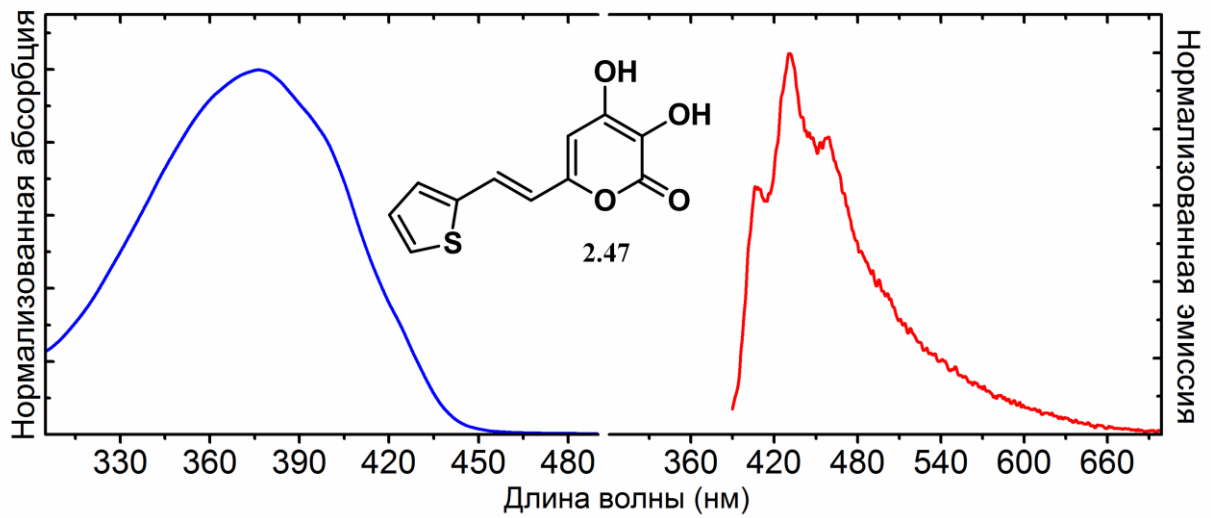
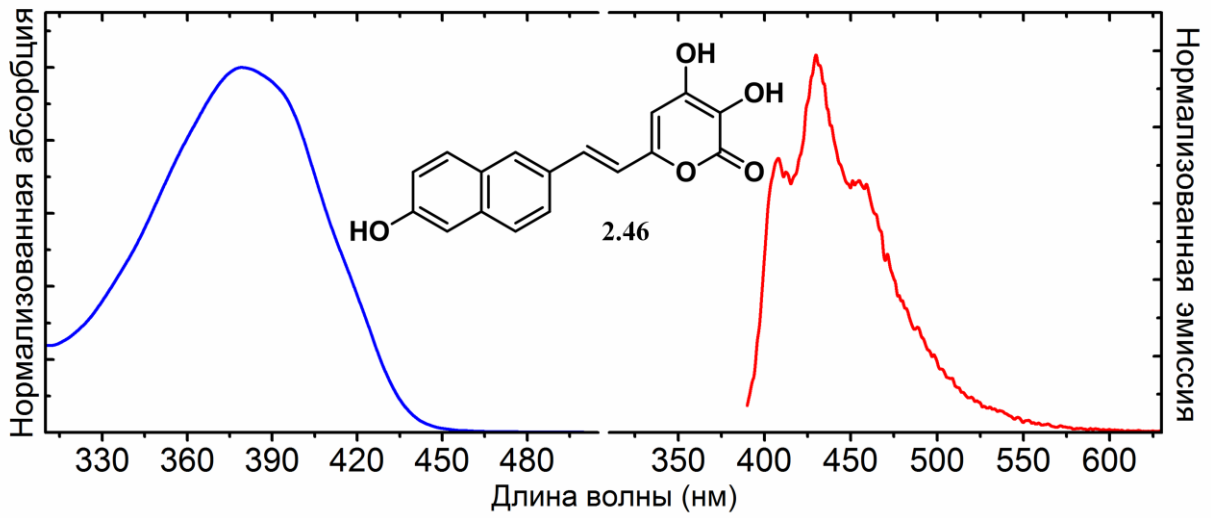
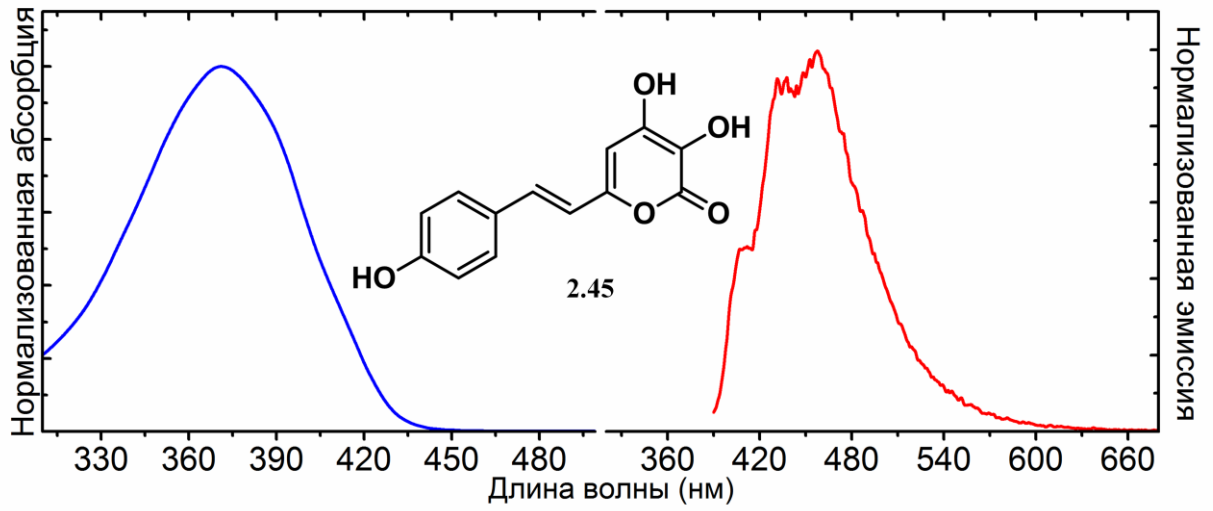
Таблица 2.2. Активность билюминесценции полученных соединений.

Соединение	Активность, %
<b>2.33</b>	100
<b>2.45</b>	75
<b>2.46</b>	5
<b>2.48</b>	2
<b>2.49</b>	190
<b>2.50</b>	390

Спектры поглощения и эмиссии флуоресценции для соединений **2.45-2.50** приведены на Рисунке 2.8. Максимумы абсорбции для данных соединений (см. Таблица 2.3) находятся в диапазоне от 366 нм (*n*-диэтиламинопроводное **2.49**) до 424 нм (производное **2.50**), максимумы флуоресценции – в диапазоне от 430 нм до 574 нм. Общий вид спектров поглощения и эмиссии соответствует типичным спектрам стирилпионов: есть полосы, характерные для несопряженных колец по отдельности. Чем больше степень сопряжения, тем ярче проявляется спектральная полоса, отвечающая сопряженной системе (например, в **2.50**).

Таблица 2.3. Суммарные данные по спектральным характеристикам полученных субстратов.

Соединение	$\lambda_{\max}$ биолюминесценции нм	$\lambda_{\max}$ абсорбции, нм	$\lambda_{\max}$ возбуждения, нм	$\lambda_{\max}$ флуоресценции, нм
<b>2.33</b>	538	-	-	-
<b>2.45</b>	516	372	367	458
<b>2.46</b>	564	380	350	430
<b>2.47</b>	-	376	350	430
<b>2.48</b>	480	386	351	431
<b>2.49</b>	504	366	370	430
<b>2.50</b>	534	424	450	574



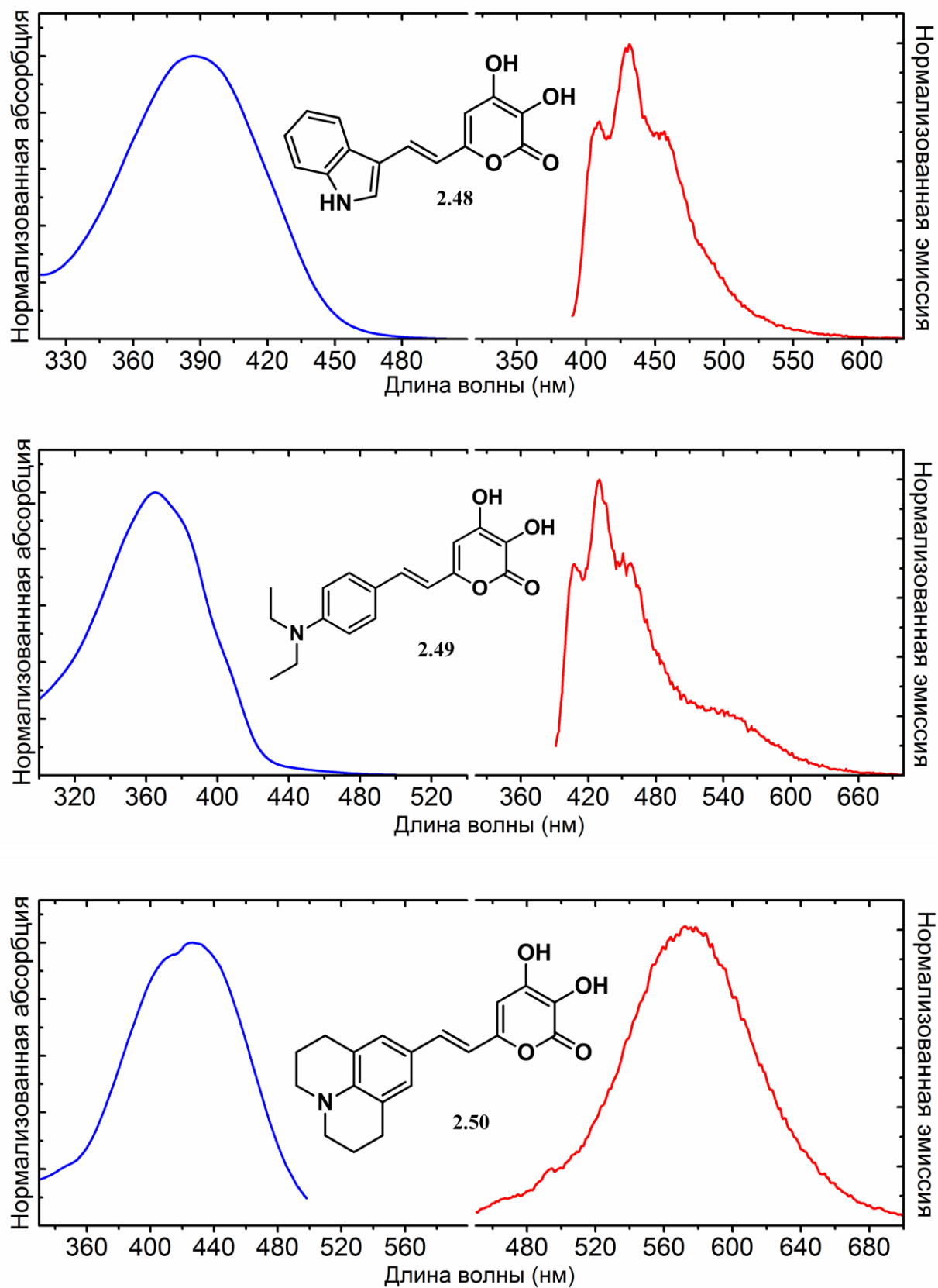


Рисунок 2.8. Спектры поглощения и эмиссии флуоресценции соединений **2.45-2.50**.

## 2.2.4 Синтез предполагаемого оксилиуциферина грибов и его аналога для изучения механизма биолюминесцентной реакции грибов

Возможность широкого варьирования структуры полученных аналогов в области ароматического ядра люциферина без потери люминесцентной активности ясно указывает на то, что реакция биолюминесценции грибного люциферина затрагивает только пираноновый фрагмент молекулы субстрата.

Для установления структуры продукта реакции биолюминесценции грибного люциферина – оксилиуциферина – субстрат реакции инкубировали с белковым экстрактом гриба *N. nambii*, содержащим люциферазу, отслеживая динамику образования продуктов по ВЭЖХ во времени. Анализ ВЭЖХ давал следующую картину: первоначально из люциферина (пик №5) образуется продукт (пик №6), который затем деградирует (пик уменьшается), и начинают увеличиваться пики №1-4 (Рисунок 2.9).

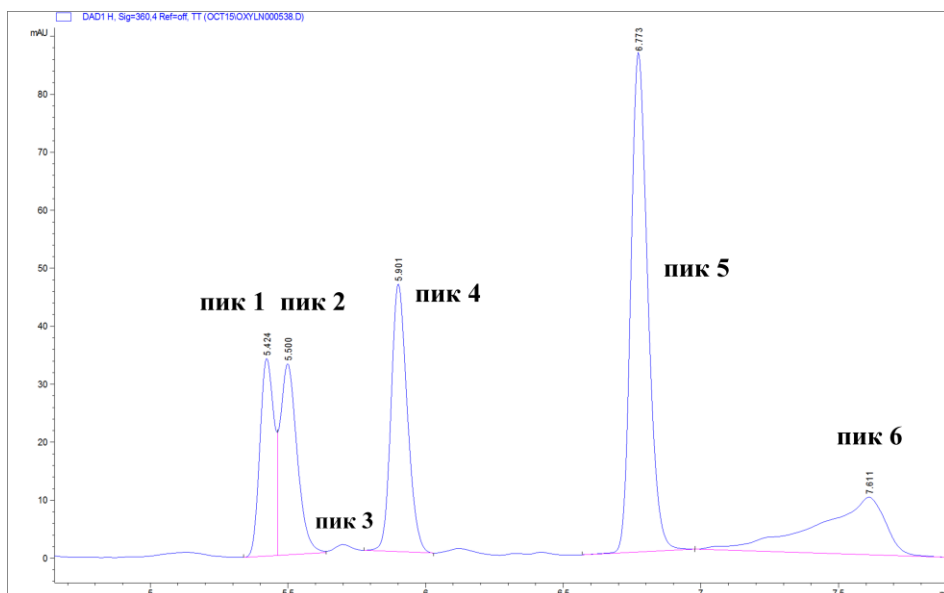


Рисунок 2.9. Хроматограмма реакционной смеси люциферин+люцифераза после 180 минут реакции

Из диаграммы динамики пиков можно наблюдать, как со временем практически исчезает пик люциферина (пик №5). Пик №6 сначала накапливается, а затем уменьшается, демонстрируя кинетику стационарного состояния. Пики №1-4 постепенно накапливаются. Пик №1 начинает медленно убывать со временем.

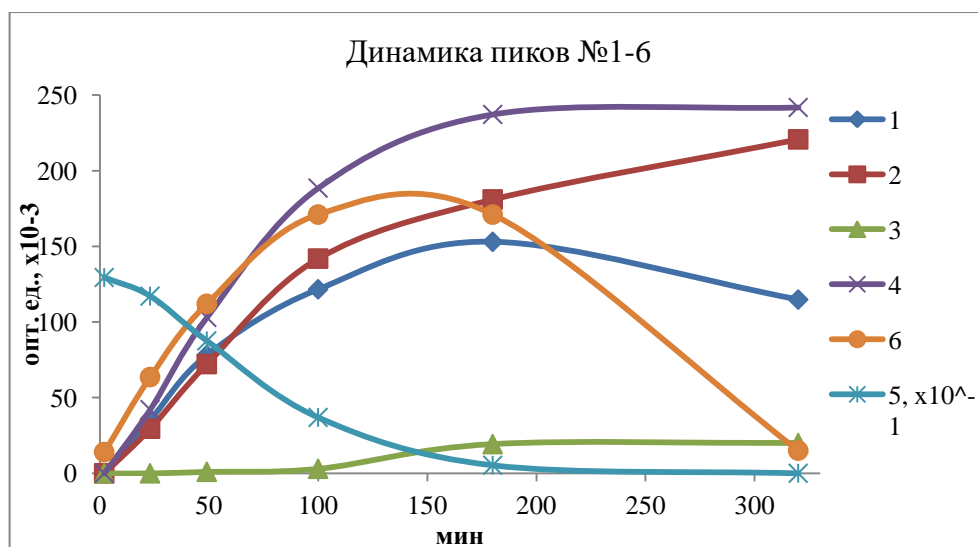


Рисунок 2.10. Диаграмма динамики пиков ВЭЖХ.

На основе кинетических данных мы предположили, что пик №6 соответствует оксильоциферину, а пики №1-4 – продуктам его распада. Пик №3 был идентифицирован по виду спектра поглощения, а также по хроматографической подвижности и сравнению с коммерческим образцом, как кофейная (3,4-дигидроксикоричная) кислота **2.59**:

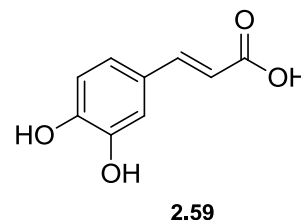
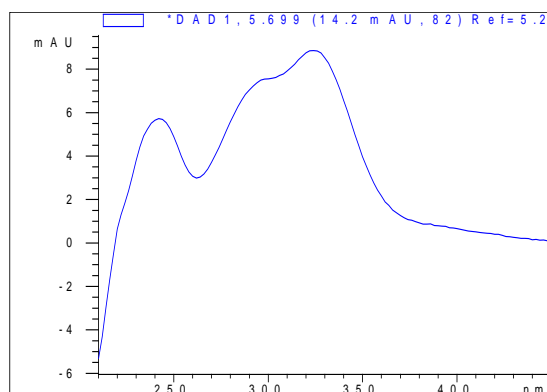


Рисунок 2.11. Спектр поглощения и структура продукта в пике 3 (кофейная кислота).

Продукты в пиках №2 и №4 были выделены методом ВЭЖХ и проанализированы методом спектроскопии ЯМР, получены спектры поглощения. Стоит отметить, что со временем пик №2 постепенно переходит в пик №4 – это прослеживается по изменению профилей хроматограмм для образца смеси двух пиков, полученных в разные промежутки времени при хранении:

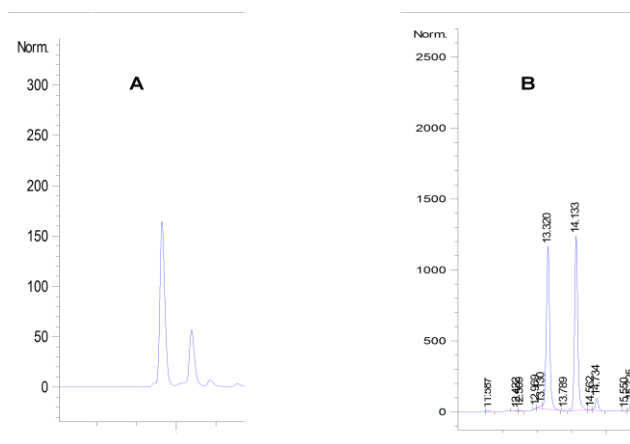


Рисунок 2.12. Вид профилей двух хроматограмм для пиков №2 и 4 (показана только интересующая область). Хроматограммы **A** и **B** получены анализом одного образца с разницей во времени в 24 часа. Можно наблюдать, как изменяется соотношение пиков №2 и 4 в пользу последнего.

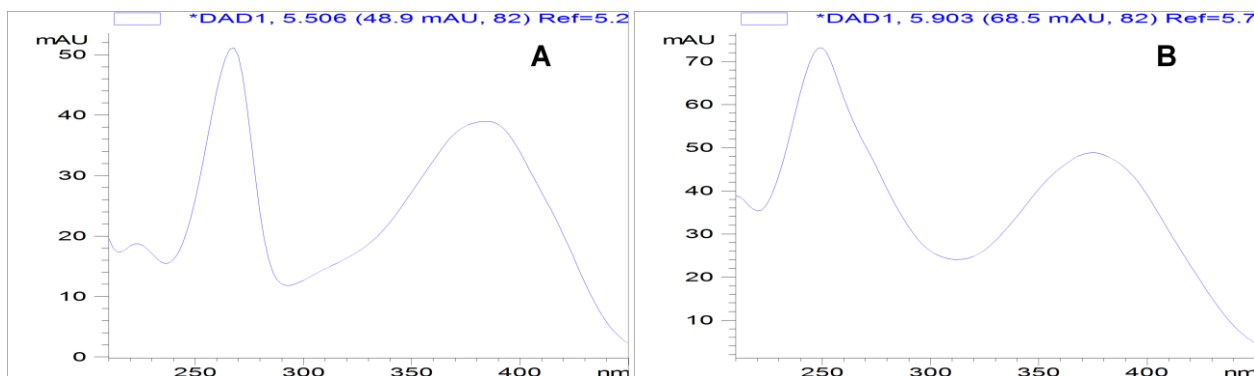


Рисунок 2.13. Вид спектров поглощения для пиков №2 (**A**) и №4 (**B**).

В спектрах ЯМР для пиков №2 и 4 отсутствовали сигналы, характерные для ароматической системы. Вместо них наблюдалась пара дублетов с КССВ 16.0 Гц – признак наличия *транс*-двойной связи. Также для вещества из пика №2 было замечен переход в продукт, идентичный пику №4, и соответствующее изменение набора сигналов в спектре ЯМР.



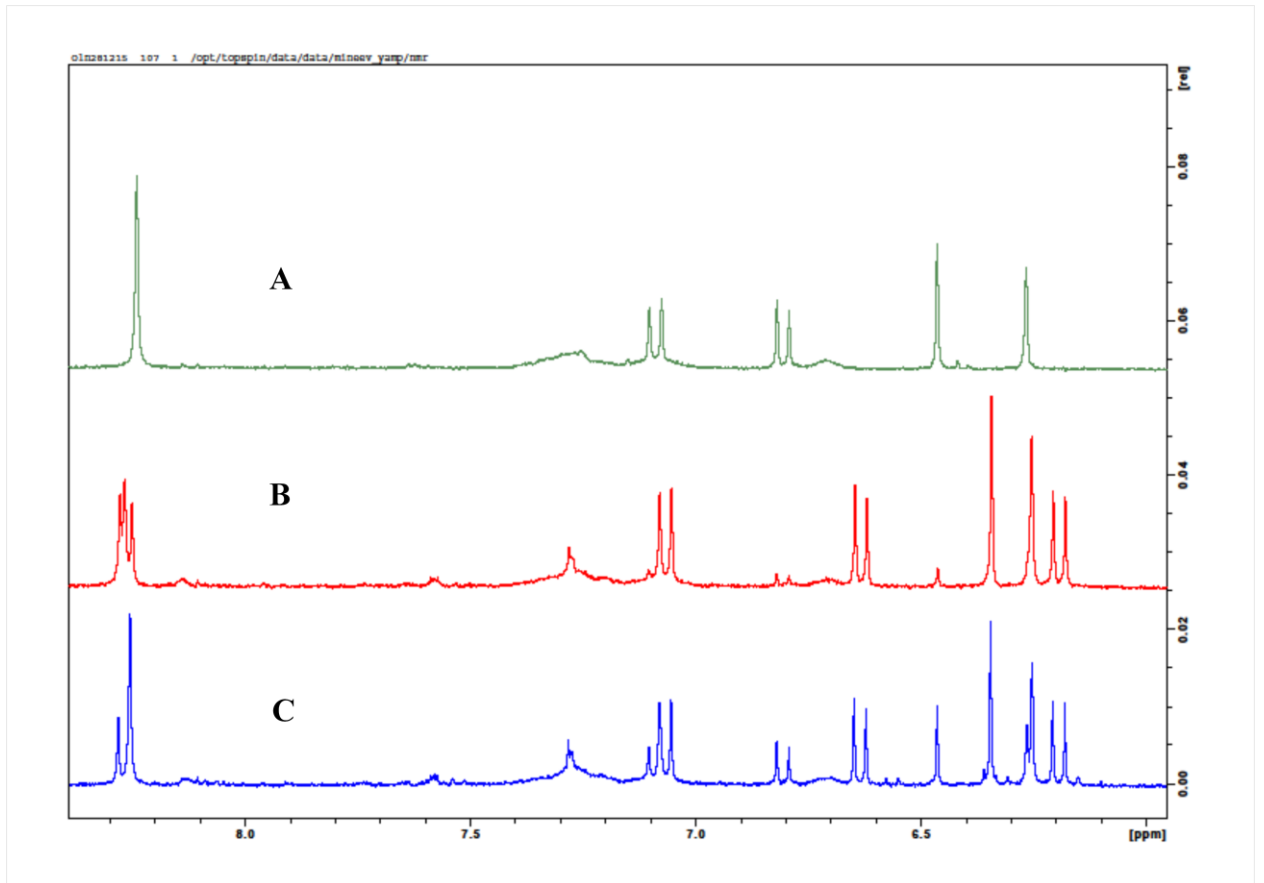


Рисунок 2.14.  $^1\text{H}$ -ЯМР спектры в  $\text{CD}_3\text{OD}$  для пика №2 (А), пика №4 (В) и пика №2 после инкубации в ампуле при  $20^\circ\text{C}$  в течение суток (С).

Из-за малой концентрации для пары соединений удалось получить лишь  $^1\text{H}$ ,  $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ -HSQC и  $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ -HMBC спектры. Полученным данным ЯМР-спектроскопии отвечали структуры, представленные на Рисунках 2.15 и 2.16.

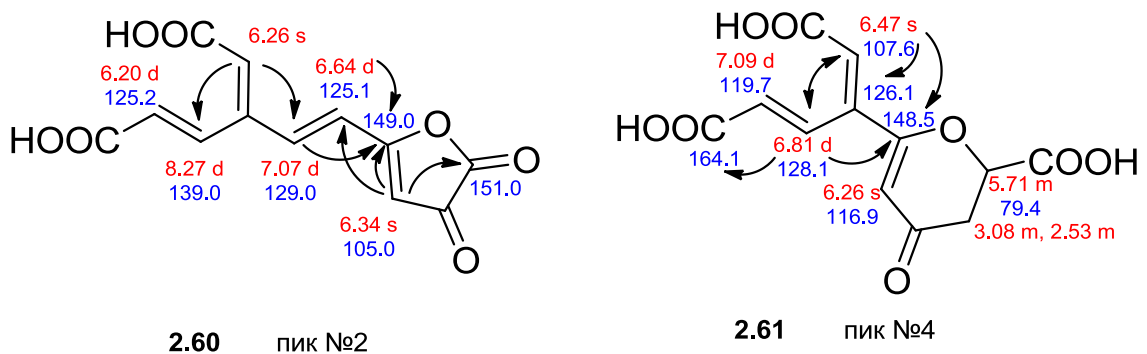


Рисунок 2.15. Структуры веществ для пиков №2 (**2.60**) и №4 (**2.61**). Красным цветом указаны хим. сдвиги протонов, синим – атомов углерода. Стрелками указаны H-C-корреляционные взаимодействия в спектрах HMBC.

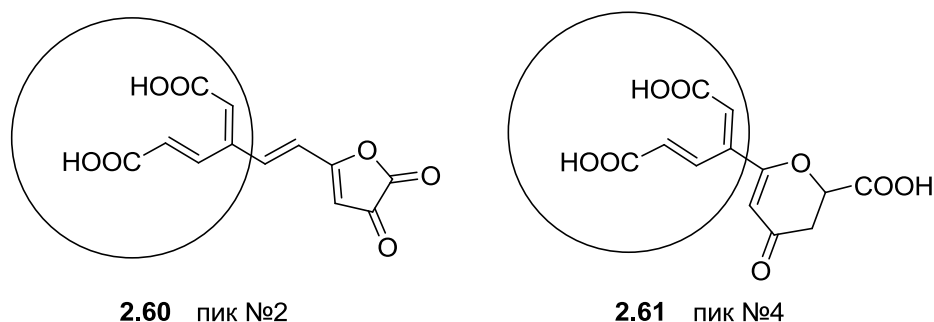


Рисунок 2.16. Структуры веществ пиков №2 **2.60** и №4 **2.61**. Обведены фрагменты, образующиеся в результате окислительной деградации катехольного фрагмента молекулы люциферина.

В полученных структурах можно наблюдать одинаковые фрагменты, очевидно, образующиеся в результате окислительной деградации катехольного ароматического ядра в молекуле люциферина грибов (Рисунок 2.16). На основании данных о строении продуктов распада оксилуциферина **2.59-2.61**, с учетом того, что обе молекулы **2.60** и **2.61** содержат на один атом углерода меньше, чем молекула люциферина, была предположена следующая структура оксилуциферина грибов **2.62** (Рисунок 2.17):

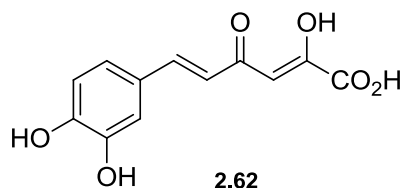


Рисунок 2.17. Предполагаемая структура оксилуциферина высших грибов **2.62**.

Предполагаемый механизм образования продуктов деградации **2.59-2.61** из оксилуциферина изложен на Схеме 2.18:

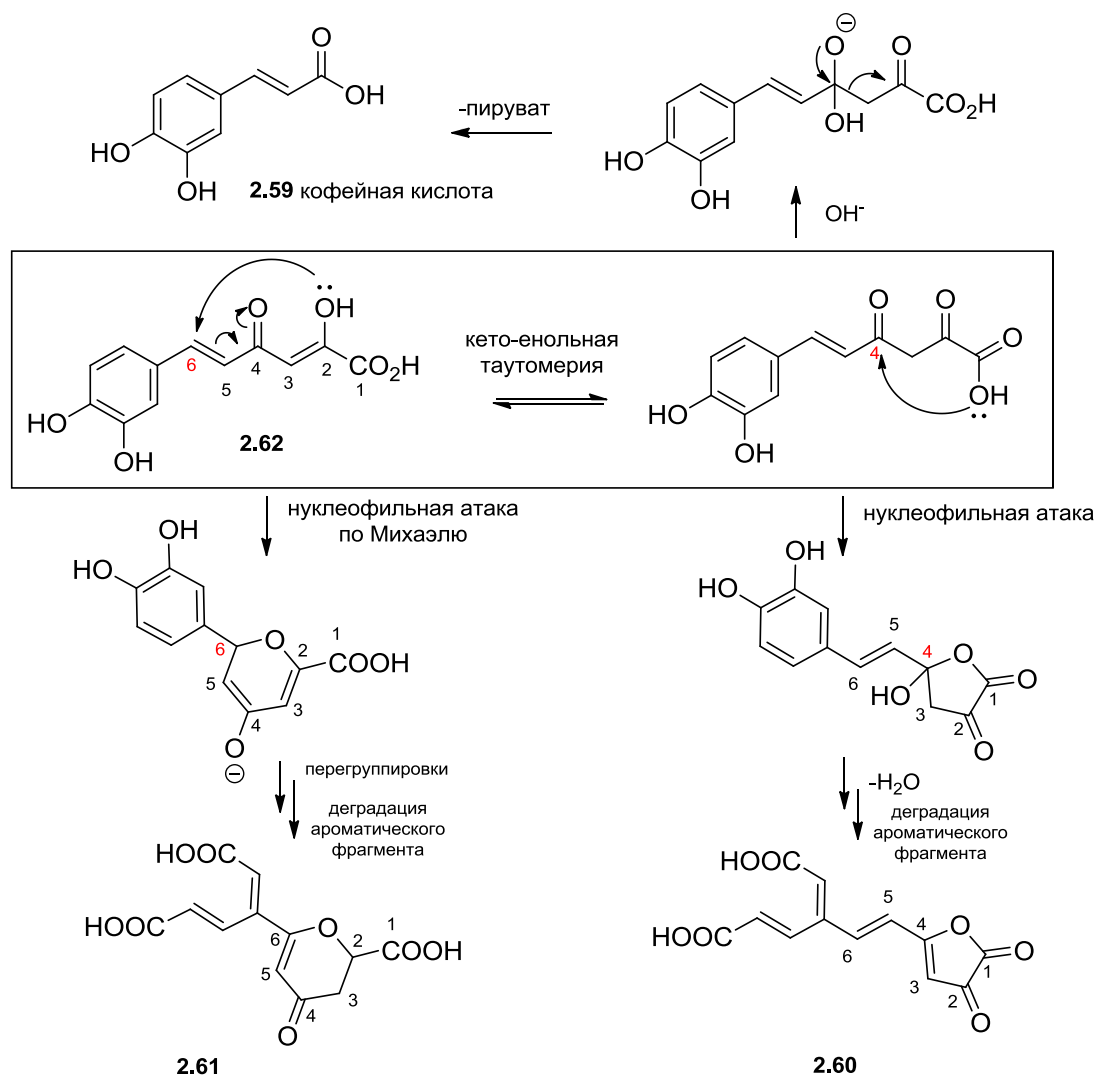


Схема 2.18. Предполагаемый механизм деградации оксилуциферина **2.62**.

Вследствие кето-енольной таутомеризации исходного оксилуциферина **2.62** возможны два варианта его дальнейших превращений: 1) если нуклеофильная атака в еноле происходит по 6 атому углерода, то получается производное **2.61**; 2) если енол таутомеризуется в кетон, а потом происходит нуклеофильная атака по 4 атому углерода с замыканием пятичленного цикла, то после отщепления воды получается продукт **2.60**. На схеме указано, что деградация ароматического фрагмента происходит в финале превращений, однако установить точный порядок приведенных стадий не представляется возможным. Кофейная кислота **2.59** может образоваться из предполагаемого оксилуциферина **2.62** при отщеплении пирувата или окислении концевых функциональных групп. Причиной образования большого числа продуктов деградации оксилуциферина может быть недостаточная степень очистки препарата люциферазы грибов. Белковый экстракт гриба *N. nambi*, помимо люциферазы, может содержать

примеси редокс-ферментов, поэтому наряду с реакцией билюминесценции возможны побочные процессы.

Для подтверждения структуры оксилуциферина **2.62** был осуществлен встречный синтез этого производного (см. далее). Полученное соединение совпало по хроматографической подвижности, форме пика и спектру поглощения с пиком №6 (см. Рисунок 2.9).

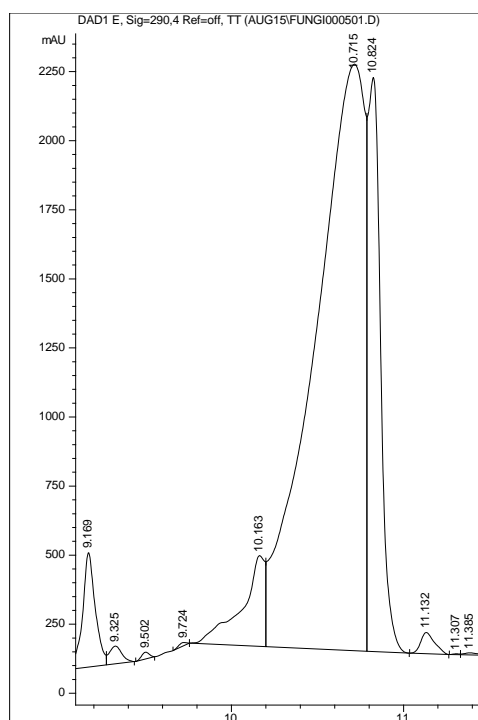


Рисунок 2.18. Фрагмент хроматограммы образца оксилуциферина **2.62**. Показан профиль поглощения на длине волны 290 нм. Время удерживания **2.62** – 10.7 мин. По хроматограмме можно наблюдать, что пик чистого вещества имеет несимметричную форму, предположительно, вследствие образования динамической смеси таутомеров.

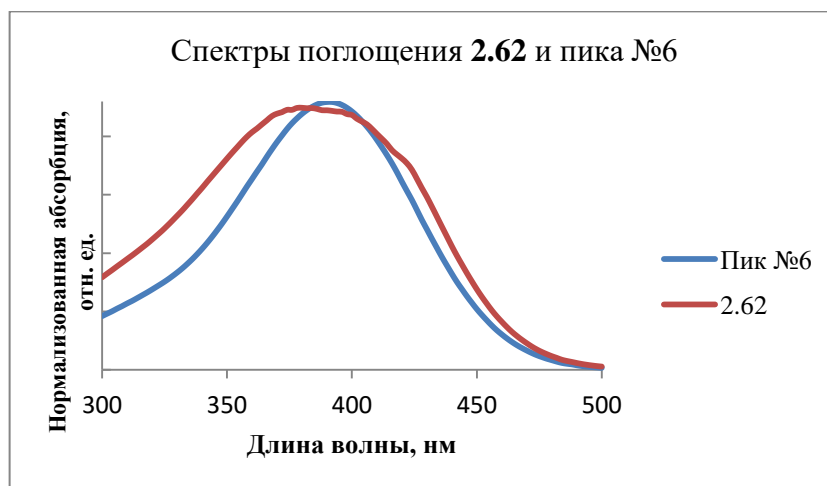


Рисунок 2.19. Спектры поглощения оксилуциферина **2.62** и пика №6.

Таким образом, полученные нами данные позволяют предположить, что реакция билюминесценции высших грибов имеет вид:

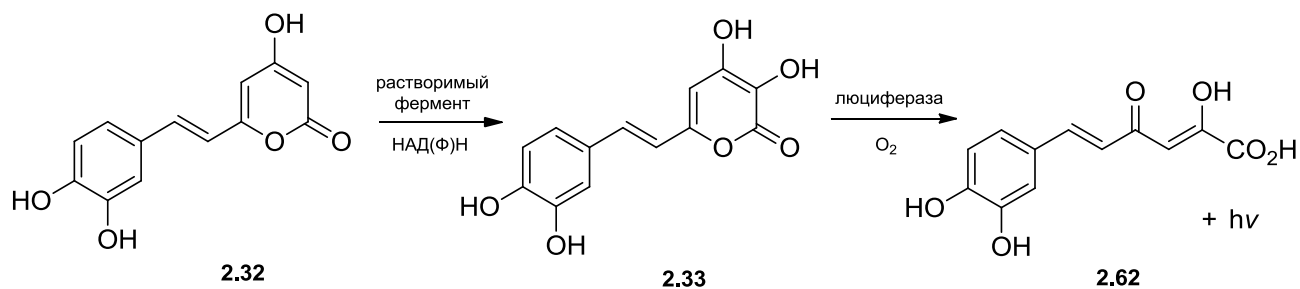


Схема 2.19. Реакция билюминесценции высших грибов.

Поскольку при инкубации люциферина с экстрактом люциферазы получается смесь продуктов деградации, включающей в себя расщепление катехольного фрагмента ароматической системы, то для исключения побочного процесса окисления катехольного ядра было предложено использовать вместо люциферина его близкий аналог **2.45**. Так как в соединении **2.45** склонный к окислению катехольный фрагмент заменен на более устойчивый фенольный, мы предположили, что продукт его БЛ реакции - аналог оксилуциферина **2.63** - не должен подвергаться побочному окислительному расщеплению по ароматическому ядру при инкубации с белковым экстрактом, содержащим люциферазу:

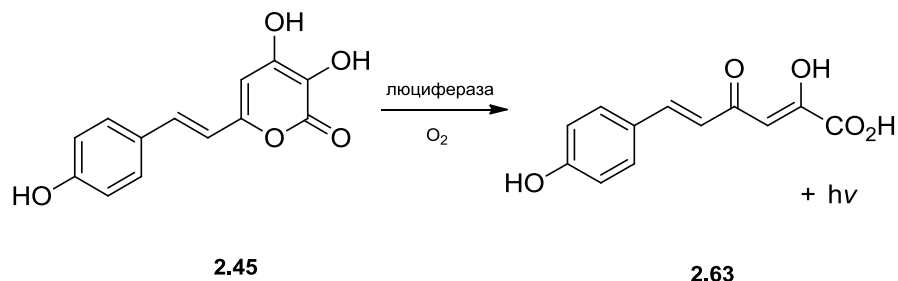


Схема 2.20. Предполагаемый механизм БЛ реакции аналога люциферина **2.45**.

Оксилуциферин **2.62** и его аналог **2.63** были получены схожим образом из соответствующих альдегидов: 3,4-диметоксибензальдегида и *n*-метоксибензальдегида (Схема 2.21). Первоначально альдегиды по описанной методике конденсации [Adeva и др., 2000] переводили в производные **2.64** и **2.65**, которые затем последовательно обрабатывали 1M LiHMDS в абсолютном тетрагидрофуране и метиоксалилхлоридом при -78°C в инертной атмосфере. В полученных производных **2.66** и **2.67** действием избытка трибромида бора в абсолютном дихлорметане удаляли все защитные группы, целевые продукты выделяли методом ВЭЖХ.

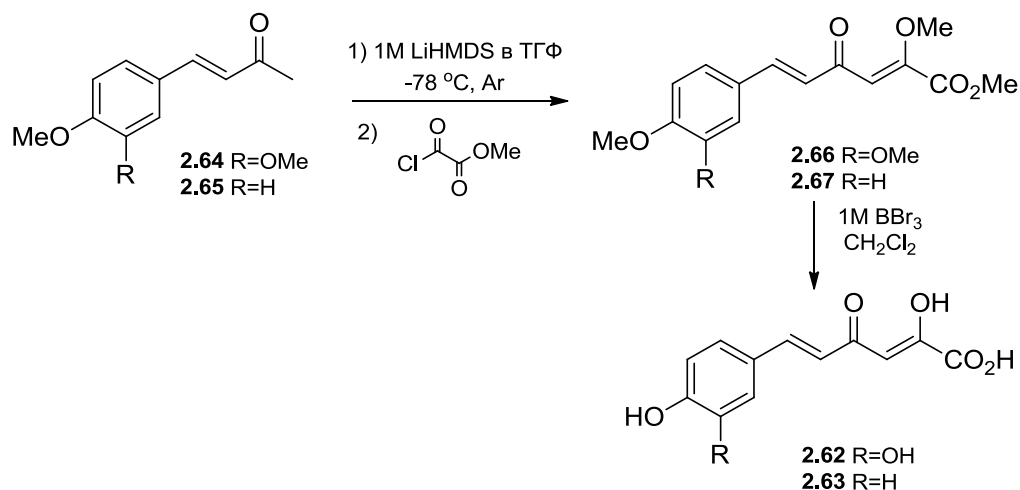


Схема 2.21. Синтез оксильюциферина **2.62** и его аналога **2.63**.

Проведение экспериментов по инкубации соединений **2.45** и **2.63** с люциферазой грибов позволит в будущем окончательно установить механизм реакции биолюминесценции высших грибов.

### 2.2.5 Заключение

В рамках работы по изучению новой биолюминесцентной системы высших грибов был впервые осуществлен синтез люциферина грибов и доказана его структура, получен ряд структурных аналогов люциферина, изучены их активности в реакциях биолюминесценции и спектральные характеристики. Предложена структура оксильюциферина грибов, установлено строение продуктов его ферментативной деградации, осуществлен синтез предполагаемого оксильюциферина и его аналога.

## ГЛАВА III. Экспериментальная часть

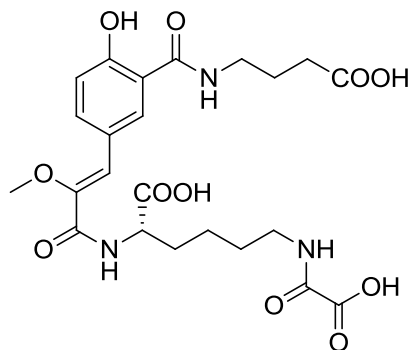
### 3.1 Материалы и оборудование

Спектры ЯМР регистрировали на приборах Bruker Avance III 800 (снабжен 5-мм СРТХI криодатчиком), Bruker Avance III 700, Bruker Avance III 600 и Bruker Fourier 300 и Bruker AM300 в D<sub>2</sub>O, ДМСО-*d*<sub>6</sub>, CDCl<sub>3</sub>, CD<sub>3</sub>OD, ацетоне-*d*<sub>6</sub>, внутренний стандарт - тетраметилсилан. Спектры поглощения в УФ и видимом диапазонах регистрировали на спектрофотометре Varian Cary 100 Bio. Спектры флуоресценции (возбуждения и эмиссии) и биолюминесценции получали на спектрофлуориметре Agilent 1260 Infinity LC при использовании программного обеспечения Agilent Cary Eclipse, a.u. – условные единицы. Масс-спектры высокого разрешения регистрировали на приборе Agilent 6224 TOF LC/MS System методом электрораспылительной ионизации (ESI), анализ масс-спектров проводили в программе MassHunter Workstation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Аналитическую и препаративную тонкослойную хроматографию проводили на пластинках Merck (Германия) с флуоресцентным индикатором UV-254, визуализацию осуществляли УФ (254 и 312 нм) или окрашиванием стандартным раствором нингидрина, фосфорномолибденовой кислоты или KMnO<sub>4</sub>. Для колоночной хроматографии использовали силикагель фирмы Merck (Kieselgel 60, 70-230 mesh). Реактивы Acros Organics и Sigma Aldrich применяли без дополнительной очистки. Для проведения реакций использовали свежеперегнанные растворители фирмы Химмед.

## 3.2 Синтез

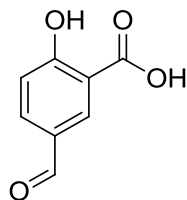
### 3.2.1 Модификация синтеза люциферина *Fridericia heliota*



**(*S,Z*)-6-(карбоксоформамидо)-2-(3-(3-((3-карбоксопропил)карбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриламидо)гексановая кислота (2.1).**

К защищенному производному **2.14** (5 мг, 0.008 ммоль) добавляли 100% трифторуксусную кислоту (0.5 мл). Через 25 минут реакционную смесь упаривали на вакууме, далее растворяли в воде (0.5 мл) и лиофилизовали. Продукт выделяли методом обращеннофазовой ВЭЖХ: бел. крист. (4 мг, 99%)

ЯМР-спектры соединения **2.1** полностью соответствовали данным из [Царькова А. С., 2015].

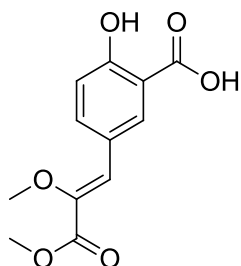


**5-формил-2-гидроксибензойная кислота (2.3).**

К раствору салициловой кислоты (20 г, 0.15 моль) в смеси АсОН-Н<sub>2</sub>О (120 мл – 20 мл) добавляли уротропин (42 г, 0.30 моль). Реакционную смесь кипятили в течение 3 часов, затем упаривали, добавляли соляную кислоту (раствор 75 мл конц. НСl в 75 мл воды) и оставляли на ночь при комнатной температуре. Далее охлаждали до 0°C, кристаллы отфильтровывали, промывали водой (4x50 мл) и Et<sub>2</sub>O (2x50 мл), сушили на воздухе. Продукт бел. крист. **2.3** (4.5 г, 19%).

ЯМР-спектры соединения **2.3** полностью соответствовали данным из [Царькова А. С., 2015].

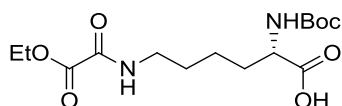




**(Z)-5-(2,3-диметокси-3-оксопроп-1-ен-1-ил)-2-гидроксибензойная кислота (2.4).**

К раствору вещества **2.3** (100 мг, 0.60 ммоль) метаноле (5 мл) добавляли метил 2-(диметоксифосфорил)-2-метоксиацетат (166 мг, 1.6 ммоль) и карбонат калия (416 мг, 3.0 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 2.5 часов, затем подкисляли 10% соляной кислотой до pH=4, экстрагировали этилацетатом (3x150 мл), промывали водой (100 мл), органическую фазу высушивали над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, упаривали на вакууме. Из сухого остатка методом колоночной хроматографии (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:AcOH=98:2:1) выделяли продукт: бел. крист. **2.4** (103 мг, 68%).

ЯМР-спектры соединения **2.4** полностью соответствовали данным из [Царькова А. С., 2015].



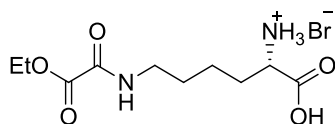
**(S)-2,2-диметил-4,12,13-триоксо-3,14-диокса-5,11-дизагексадекан-6-карбоновая кислота (2.9).**

К суспензии (S)-6-амино-2-(*трет*-бутоксикарбониламино)гексановой кислоты **2.8** (1.0 г, 4.06 моль) в диэтилоксалате (10 мл) добавляли триэтиламин (1.13 мл, 8.12 моль), реакцию смесь выдерживали при 100°C 2 часа до полного растворения осадка. После охлаждения разбавляли хлороформом (100 мл), промывали водой (3x100 мл), органическую фазу упаривали, высушивали на масляном насосе: светло-коричнев. ждк. **2.9** (1.01 г, 72%).

<sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.28 (уш.с, 1H), 5.16 (уш.с, 1H), 4.33 (м, 3H), 3.34 (дд, 2H, J = 13.46, 6.84 Гц), 1.88 (уш.с, 1H), 1.71 (м, 1H), 1.60 (м, 2H), 1.43 (с, 11H), 1.37 (т, 3H).

<sup>13</sup>C ЯМР (700 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 175.9, 160.8, 156.9, 155.8, 80.4, 63.3, 53.1, 39.6, 32.0, 28.9, 28.4, 22.6, 14.0.

HRMS (ESI) m/z: вычислено для C<sub>15</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>+</sup> ([M+H]<sup>+</sup>) 347.1813, найдено 347.1810.



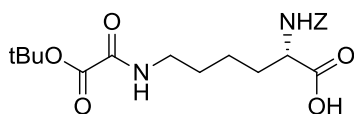
**(S)-1-карбоксии-5-(2-этокси-2-оксоацетидами)пентан-1-аммоний бромид (2.10).**

К раствору (S)-2,2-диметил-4,12,13-триоксо-3,14-диокса-5,11-диазагексадекан-6-карбоновой кислоты **2.9** (1000 мг, 2.89 ммоль) в ледяной уксусной кислоте (5 мл) добавляли 33% HBr в ледяной уксусной кислоте (2 мл). Через 5 минут реакционную смесь разбавляли диэтиловым эфиром (20 мл). После выпадения осадка раствор декантировали, осадок последовательно промывали диэтиловым эфиром (6x50 мл). Сухой остаток высушивали на масляном насосе: бел. крист. **2.10** (735 мг, 78%).

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  4.25 (кв, 2H,  $J = 7.27$  Гц), 3.90 (т, 1H,  $J = 5.77$  Гц), 3.23 (т, 2H,  $J = 7.05$  Гц), 1.89 (м, 1H), 1.82 (м, 1H), 1.54 (м, 2H), 1.40 (м, 1H), 1.34 (м, 1H), 1.24 (т, 3H,  $J = 7.27$  Гц).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (700 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  172.7, 160.6, 158.7, 64.1, 53.2, 39.3, 24.5, 27.5, 21.6, 13.1.

HRMS (ESI)  $m/z$ : вычислено для  $\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_5^+$  247.1288, найдено 247.1287.

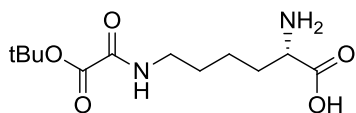


**(S)-6-(2-(*tert*-бутоксии)-2-оксоацетидами)-2-(2-фенилацетидами)гексановая кислота (2.12).**

К раствору  $\alpha$ -N-Z-L-лизина (1000 мг, 3.57 ммоль) в ДМФА (9 мл) добавляли *tert*бутилметилоксалат (0.78 мл, 5.35 ммоль) (получен по методике из [Cox, Wang, 2001]) и DIPEA (1.86 мл, 10.7 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 120°C в течение 4.5 часов, далее подкисляли AcOH до pH=4.0, разбавляли хлороформом (50 мл), промывали водой (2x40 мл), насыщенным раствором NaCl (50 мл), органическую фазу осушали над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , растворитель упаривали. Из остатка методом колоночной хроматографии ( $\text{CHCl}_3$  : EtOH :  $\text{H}_2\text{O}$ =95:5:1) выделяли продукт: бел. крист. **2.12** (474 мг, 34%).

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  12.40 (уш.с., 1H), 8.61 (с, 1H), 7.42 (уш.д., 1H), 7.36-7.31 (м, 5H), 5.04 (с, 2H), 3.93 (дт, 1H), 3.08 (м, 2H), 1.69 (м, 1H), 1.60 (м, 1H), 1.48 (с, 9H), 1.46 (м, 1H), 1.33 (м, 1H).

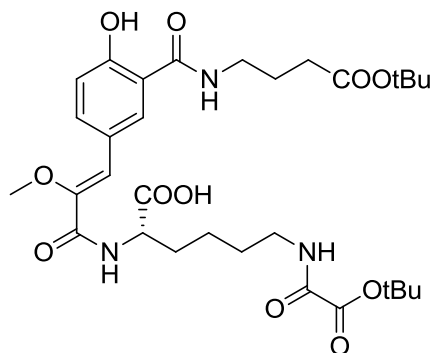
$^{13}\text{C}$  ЯМР (700 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  174.4, 160.6, 158.3, 156.6, 137.5, 128.8, 128.3, 128.2, 83.4, 65.9, 54.3, 39.2, 30.9, 28.6, 27.9, 23.5.



**(S)-2-амино-6-(2-(*tert*-бутокси)-2-оксоацетамидо)гексановая кислота (2.13).**

К раствору соединения **2.12** (474 мг, 1.21 ммоль) в этаноле (10 мл) добавляли 10% палладий на угле (80 мг) и прикапывали уксусную кислоту (10 мкл). Далее в течение 3.5 часов пропускали водород. Затем реакционную смесь отфильтровывали через силикагель, промывая этанолом, фильтрат упаривали на вакууме. Продукт бел. крист. **2.13** (320 мг, 97%).

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц, ДМСО- $d_6$ ):  $\delta$  3.15 (уш.т, 1H), 3.08 (м, 2H), 1.72 (м, 1H), 1.58 (м, 1H), 1.47 (с, 9H), 1.42 (м, 2H), 1.31 (м, 2H).



**(S,Z)-6-(2-(*tert*-бутокси)-2-оксоацетамидо)-2-(3-(3-((4-(*tert*-бутокси)-4-оксобутил)карбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриламидо)гексановая кислота (2.14).**

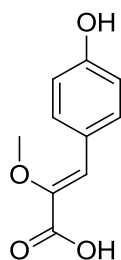
К раствору кислоты **2.5** (504 мг, 1.33 ммоль) в ТГФ (5 мл) добавляли *N*-гидроक्सисукцинимид (183 мг, 1.59 ммоль) и 2М раствор DCC в ТГФ (0.8 мл, 1.59 ммоль). Через два часа образовавшийся осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали, из сухого остатка методом колоночной хроматографии выделяли активированный эфир (этилацетат:гексан градиент от 25:75 до 50:50), который сразу использовали в следующей стадии. Раствор активированного эфира (517 мг, 1.09 ммоль) в ТГФ (9 мл) добавляли к смеси **2.13** (372 мг, 1.36 ммоль) и DIPEA (0.94 мл, 5.43 ммоль). Реакционную смесь выдерживали сутки, затем подкисляли АсОН, разбавляли этилацетатом (50 мл), промывали водой (30 мл), насыщенным раствором NaCl (30 мл), упаривали. Из сухого остатка методом колоночной хроматографии ( $\text{CHCl}_3$ :MeOH:AcOH=95:5:1) выделяли продукт: бцв. жидк. **2.14** (465 мг, 55 %).

$^1\text{H}$  ЯМР (700 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.93 (м, 1H), 7.77 (с, 1H), 7.61 (д,  $J = 8.4$  Гц, 1H), 7.56 (д,  $J = 8.6$  Гц, 1H), 7.43 (м, 1H), 6.89 (д,  $J = 8.7$  Гц, 1H), 6.81 (с, 1H), 4.76 (м, 1H), 3.54 (с, 3H),

3.51 (м, 2H), 3.40 (м, 1H), 3.31 (м, 1H), 2.37 (т,  $J = 7.2$  Гц, 2H), 1.97 (м, 3H), 1.91 (м, 1H), 1.63 (м, 2H), 1.48 (с, 9H), 1.43 (с, 9H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (300 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  173.4, 170.2, 164.9, 162.2, 159.7, 158.5, 146.8, 135.3, 128.2, 123.7, 120.4, 118.6, 114.8, 85.0, 81.0, 59.5, 39.6, 39.5, 31.7, 28.8, 28.2, 27.8, 24.5, 22.7, 20.8.

## 3.2.2 Синтез (Z)-СompY и его изомера

**(Z)-3-(4-гидроксифенил)-2-метоксиакриловая кислота (2.18).**

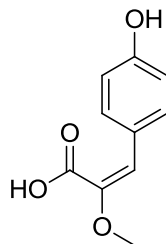
Вещество **2.24** (56 мг, 0.27 ммоль) растворяли в смеси вода-метанол (0.4 мл: 0.1 мл) и добавляли NaOH (33 мг, 0.83 ммоль). Реакционную смесь выдерживали при перемешивании в течение 2 часов, затем реакцию останавливали, подкисляя AcOH до pH=6. К смеси добавляли EtOAc (15 мл), промывали водой (20 мл). Органическую фазу промывали насыщенным раствором NaCl (20 мл), сушили надо безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, затем упаривали. Из остатка колоночной хроматографией (CHCl<sub>3</sub>-EtOH-AcOH 97:3:1) выделяли продукт: бел. крист. **2.18, CompY** (34 мг, 63%).

<sup>1</sup>H-ЯМР (700 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.60 (д, J = 8.67 Гц, 2H), 6.78 (д, J = 8.45 Гц, 2H), 6.71 (с, 1H), 3.65 (с, 3H).

<sup>1</sup>H-ЯМР (700 МГц, D<sub>2</sub>O, pH=4.98) δ 7.63 (д, J = 9.02 Гц, 2H), 6.90 (д, J = 9.02 Гц, 2H), 6.83 (с, 1H), 3.66 (с, 3H).

<sup>13</sup>C-ЯМР (700 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 165.4, 158.2, 143.8, 131.6, 124.4, 122.7, 115.5, 58.3.

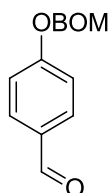
<sup>13</sup>C-ЯМР (700 МГц, D<sub>2</sub>O, pH=4.98) δ 171.8, 155.8, 148.5, 131.4, 126.4, 120.1, 115.7, 58.4.

**(E)-3-(4-гидроксифенил)-2-метоксиакриловая кислота (2.19).**

По аналогичной методике, что и для синтеза **2.18**, из **2.25** (50 мг, 0.24 ммоль) был получен продукт: **2.19 CompY, (E)-изомер** (30 мг, 65%).

<sup>1</sup>H-ЯМР (700 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.36 (с, 1H), 7.08 (д, J = 8.55 Гц, 2H), 6.67 (д, J = 8.55 Гц, 2H), 5.95 (с, 1H), 3.62 (с, 3H).

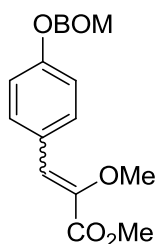
<sup>13</sup>C-ЯМР (700 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 165.6, 156.1, 147.3, 129.3, 125.1, 114.9, 106.3, 55.5.



**4-((бензилокси)метокси)бензальдегид (2.21).**

К раствору 4-гидроксибензальдегида **2.20** (200 мг, 1.64 ммоль) в сухом ДМФА (5 мл) при 0°C добавляли 60% гидрид натрия (98 мг, 2.46 ммоль) при интенсивном перемешивании. Через 15 минут прикапывали BOMCl (0.35 мл, 2.46 ммоль) и добавляли тетрабутиламмоний йодид (60 мг, 0.16 ммоль). Реакционную смесь выдерживали 1.5 часа при комнатной температуре при перемешивании, затем разбавляли этилацетатом (2x25 мл), промывали водой (25 мл). Объединенные органические фракции промывали насыщенным раствором NaCl (25 мл), высушивали над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали. Из сухого остатка методом колоночной хроматографии (гексан-EtOAc = 95:5) выделяли продукт: бцв. жидк. **2.21** (347 мг, 88%).

<sup>1</sup>H-ЯМР (700 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.89 (с, 1H), 7.83 (д, *J* = 8.45 Гц, 2H), 7.33-7.27 (м, 5H), 7.17 (д, *J* = 8.67 Гц, 2H), 5.35 (с, 2H), 4.71 (с, 2H).



**(Z)-метил 3-(4-((бензилокси)метокси)фенил)-2-метоксиакрилат (2.22) и (E)-метил 3-(4-((бензилокси)метокси)фенил)-2-метоксиакрилат (2.23).**

К раствору альдегида **2.21** (55 мг, 0.23 ммоль) и метил 2-(диметоксифосфорил)-2-метоксиацетата (150 мг, 1.36 ммоль) в диоксане (2 мл) добавляли 60% NaNH (40 мг, 0.91 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение суток при нагревании до 60°C. Затем убрали нагрев, смесь охлаждали до комнатной температуры, разбавляли этилацетатом (15 мл), промывали водой (15 мл) и насыщенным раствором NaCl (15 мл), органическую фазу осушали над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали. Из сухого остатка методом колоночной хроматографии (гексан-EtOAc = 95:5) выделяли продукты: **2.22** (33 мг, 44%) и **2.23** (19 мг, 25%).

**(Z)-изомер (2.22):**

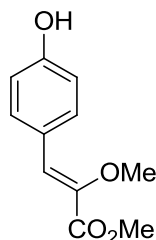
<sup>1</sup>H-ЯМР (700 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.83 (д, *J* = 8.67 Гц, 2H), 7.36-7.33 (м, 5H), 7.10 (д, *J* = 8.67 Гц, 2H), 6.98 (с, 1H), 5.32 (с, 2H), 4.73 (с, 2H), 3.85 (с, 3H), 3.77 (с, 3H).

$^{13}\text{C}$ -ЯМР (700 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  165.2, 158.0, 144.3, 137.3, 131.9, 128.6, 128.2, 128.1, 127.4, 124.2, 116.4, 92.3, 70.3, 59.3, 52.2.

**(E)-изомер (2.23):**

$^1\text{H}$ -ЯМР (700 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.36-7.33 (м, 5H), 7.17 (д,  $J = 8.67$  Гц, 2H), 7.04 (д,  $J = 8.45$  Гц, 2H), 6.11 (с, 1H), 5.30 (с, 2H), 4.73 (с, 2H), 3.75 (с, 3H), 3.72 (с, 3H).

$^{13}\text{C}$ -ЯМР (700 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  164.7, 156.6, 146.9, 137.4, 129.9, 128.6, 128.2, 128.2, 128.0, 116.1, 109.8, 92.5, 70.2, 56.1, 52.2.

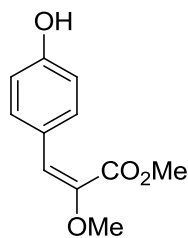


**(Z)-метил 3-(4-гидроксифенил)-2-метоксиакрилат (2.24).**

К раствору производного **2.22** (127 мг, 0.39 ммоль) в диэтиловом эфире (3 мл) добавляли ацетил хлорид (0.2 мл) в метаноле (1.8 мл). За ходом реакции следили по ТСХ (силикагель, гексан-этилацетат 3:1). По окончании реакции растворитель упарили, из остатка методом флэш-хроматографии (гексан:EtOAc=75:25) выделяли продукт: бцв. жидк. **2.24** (69 мг, 81%).

$^1\text{H}$ -ЯМР (700 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.65 (д,  $J = 8.67$  Гц, 2H), 6.86 (д,  $J = 8.45$  Гц, 2H), 6.97 (с, 1H), 5.88 (уш.с., 1H), 3.85 (с, 3H), 3.75 (с, 3H).

$^{13}\text{C}$ -ЯМР (700 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  165.7, 156.9, 143.8, 132.2, 126.1, 124.8, 115.8, 59.3, 52.3.



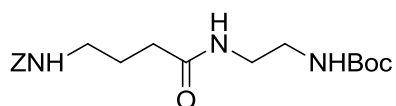
**(E)-метил 3-(4-гидроксифенил)-2-метоксиакрилат (2.25).**

По аналогичной методике, что и для синтеза **2.24**, из **2.23** (110 мг, 0.34 ммоль) был получен продукт: бцв. жидк. **2.25** (50 мг, 73%).

$^1\text{H}$ -ЯМР (700 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.10 (д,  $J = 8.24$  Гц, 2H), 6.74 (д,  $J = 8.45$  Гц, 2H), 6.12 (с, 1H), 5.50 (уш.с., 1H), 3.73 (с, 3H), 3.71 (с, 3H).

$^{13}\text{C}$ -ЯМР (700 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  165.1, 155.1, 146.4, 130.0, 126.8, 115.3, 110.5, 56.2, 52.3.

### 3.2.3 Синтез биолюминесцентных аналогов люциферина *Fridericia heliota*



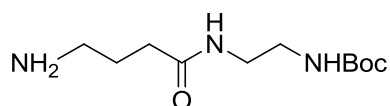
#### **Трет-бутил 2-(4-(2-фенилацетоксиамино)бутанамидо)этилкарбамат (2.26а).**

К раствору 4-(2-фенилацетоксиамино)бутановой кислоты (3.54 г, 0.015 моль) в абсолютном тетрагидрофуране (50 мл) добавляли *tert*-бутил 2-аминоэтилкарбамат (2.75 г, 0.017 моль), *N,N,N',N'* – тетраметил-*O*-(1*H*-бензотриазол-1-ил)уридий гексафторфосфат (НВТУ) (7.07 г, 0.019 моль) и триэтиламин (2.4 мл, 0.017 моль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре 18 часов, далее экстрагировали хлороформом (100 мл), промывали насыщенным раствором карбоната калия (100 мл), водой (100 мл), насыщенным раствором NaCl (100 мл). Органическую фазу осушали над безводным сульфатом натрия, упаривали. Из сухого остатка методом колоночной хроматографии (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:AcOH=95:5:1) выделяли продукт: бцв. жидк. **2.26а** (5.11 г, 90 %).

<sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.36 (с, 2H), 7.35 (с, 2H), 7.32 (м, 1H), 6.34 (уш.с, 1H), 5.12 (уш.с, 1H), 5.10 (с, 2H), 5.06 (уш.с, 1H), 3.34 (м, 2H), 3.25 (м, 4H), 2.21 (т, 2H, *J* = 6.72 Гц), 2.21 (м, 2H, *J* = 6.72 Гц), 1.43 (с, 9H).

<sup>13</sup>C ЯМР (700 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 172.6, 156.9, 156.8, 136.5, 128.5, 128.2, 79.6, 66.8, 40.7, 40.4, 40.2, 33.4, 28.4.

HRMS (ESI) *m/z*: вычислено для C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> ([*M*-Вос+H]<sup>+</sup>) 280.1656, найдено 280.1636.



#### **Трет-бутил 2-(4-аминобутанамидо)этилкарбамат (2.26).**

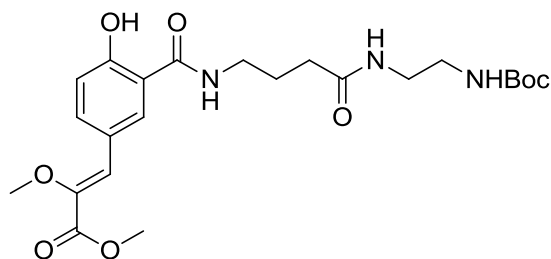
К раствору *tert*-бутил 2-(4-(2-фенилацетоксиамино)бутанамидо)этилкарбамата **2.26а** (4.68 г, 0.012 моль) в смеси 96% этанола (100 мл) и ледяной уксусной кислоты (500 мкл) при перемешивании добавляли палладий на активированном угле (0.6 г). Реакционную смесь выдерживали в атмосфере водорода в течение 3 часов, затем фильтровали через целит, фильтрат упаривали: бцв. ждк. **2.26** (2.85 г, 94%).

<sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.23 (уш.с, 1H), 5.38 (уш.с, 1H), 4.73 (уш.с, 2H), 3.33 (м, 2H), 3.24 (уш.с, 2H), 2.87 (уш.м, 2H), 2.32 (уш.м, 2H), 1.91 (уш.м, 2H), 1.43 (с, 9H).

<sup>13</sup>C ЯМР (700 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 173.4, 157.1, 79.7, 40.7, 40.5, 39.7, 33.5, 28.7, 25.4.

HRMS (ESI) *m/z*: вычислено для C<sub>11</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> ([*M*+H]<sup>+</sup>) 246.1812, найдено 246.1789.





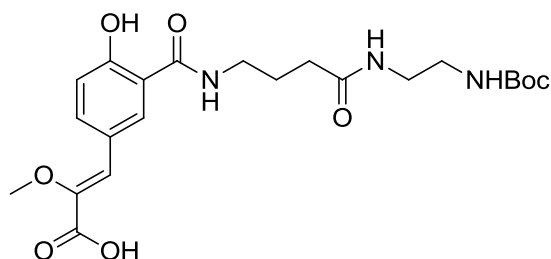
**(Z)-метил 3-(3-(4-(2-(*tert*-бутоксикарбониламино)этиламино)-4-оксобутилкарбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакрилат (2.27).**

К раствору (Z)-5-(2,3-диметокси-3-оксопроп-1-енил)-2-гидроксибензойной кислоты **2.4** (181 мг, 0.72 ммоль) в абсолютном ТГФ (3 мл) добавляли *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид (178 мг, 0.86 ммоль) и *N*-гидроксисукцинимид (124 мг, 1.078 ммоль). Реакционную смесь выдерживали при перемешивании 3 часа. Затем осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали. Из сухого остатка методом колоночной хроматографии выделяли продукт – активированный эфир. Сукцинимидный эфир растворяли в абсолютном тетрагидрофуране (3 мл), добавляли *tert*-бутил 2-(4-аминобутанамидо)этилкарбамат **2.26** (178 мг, 0.73 ммоль) и триэтиламин (200 мкл, 1.452 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 2 часа при комнатной температуре, далее добавляли хлороформ (15 мл), промывали водой (2x15 мл), органическую фазу высушивали над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, концентрировали. Из остатка методом колоночной хроматографии (CHCl<sub>3</sub>:MeOH=98:2) выделяли продукт: бел. крист. **2.27** (187 мг, 54%).

<sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 12.89 (с, OH), 8.18 (уш.с, 1H), 7.94 (с, 1H), 7.84 (дд, 1H, *J* = 8.67 Гц, 1.95 Гц), 6.96 (д, 1H, *J* = 8.67 Гц), 6.94 (с, 1H), 6.45 (уш.с, 1H), 5.08 (уш.с, 1H), 3.85 (с, 3H), 3.79 (с, 3H), 3.49 (кв, 2H, *J* = 6.50 Гц), 3.37 (кв, 2H, *J* = 5.85 Гц), 3.26 (м, 2H), 2.39 (м, 2H), 1.98 (м, 2H), 1.41 (с, 9H).

<sup>13</sup>C ЯМР (700 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 174.2, 170.1, 165.2, 162.5, 157.3, 144.2, 135.7, 128.7, 124.3, 124.0, 118.8, 114.7, 79.9, 59.4, 52.3, 41.3, 40.2, 40.0, 34.4, 28.4, 23.8.

HRMS (ESI) *m/z*: вычислено для C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub><sup>+</sup> ([M+H]<sup>+</sup>) 480.2340, найдено 480.2316.



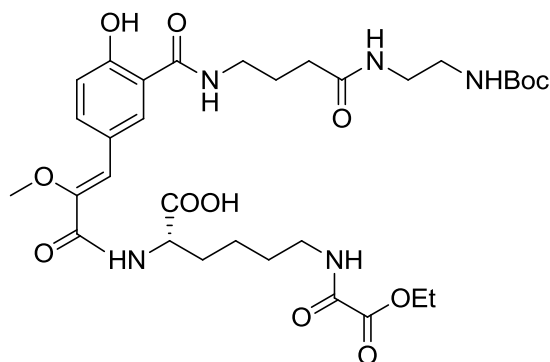
**(Z)-3-(3-(4-(2-*tert*-бутоксикарбониламино)этиламино)-4-оксобутилкарбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриловая кислота (2.27b).**

К раствору (*Z*)-метил 3-(3-(4-(2-(*трет*-бутоксикарбониламино)этиламино)-4-оксобутилкарбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакрилата **2.27** (175 мг, 0.37 ммоль) в смеси MeOH:H<sub>2</sub>O 1:4 (2 мл) добавляли NaOH (50 мг, 2 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов, далее подкисляли уксусной кислотой до pH=6, разбавляли этилацетатом (20 мл), промывали водой (2x20 мл), насыщенным раствором NaCl (20 мл). Органическую фазу высушивали над безводным сульфатом натрия, концентрировали. Из сухого остатка методом колоночной хроматографии (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:AcOH=95:5:1) выделяли продукт: бел. крист. **2.27b** (140 мг, 88%).

<sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 12.83 (уш.с, 1H), 8.81 (уш.с, 1H), 8.08 (с, 1H), 7.95 (дд, 1H, *J* = 8.77 Гц, <1.5 Гц), 7.82 (уш.с, 1H), 6.94 (д, 1H, *J* = 8.77 Гц), 6.83 (с, 1H), 6.74 (уш.с, 1H), 3.70 (с, 3H), 3.30 (м, 2H), 3.05 (м, 2H), 2.97 (м, 2H), 2.13 (м, 2H), 1.77 (м, 2H), 1.36 (с, 9H).

<sup>13</sup>C ЯМР (700 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 171.8, 168.5, 160.4, 155.6, 134.1, 130.1, 124.1, 117.8, 115.4, 77.6, 58.5, 38.7, 32.8, 28.2, 24.9, 14.0.

HRMS (ESI) *m/z*: вычислено для C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub><sup>+</sup> ([M+H]<sup>+</sup>) 466.2184, найдено 466.2156.



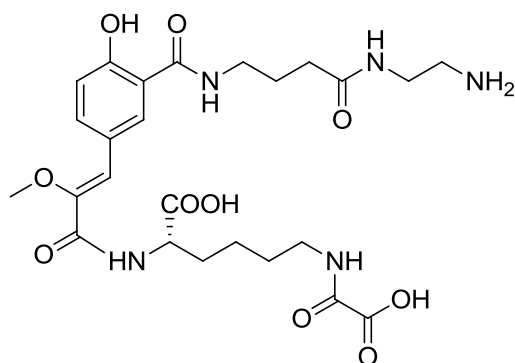
**(*S,Z*)-2-(3-(3-(4-(2-(*трет*-бутоксикарбониламино)этиламино)-4-оксобутилкарбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриламидо)-6-(2-этокси-2-оксоацетамидо)гексановая кислота (**2.28a**).**

К раствору (*Z*)-3-(3-(4-(2-(*трет*-бутоксикарбониламино)этиламино)-4-оксобутилкарбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриловой кислоты **2.27b** (85 мг, 0.15 ммоль) в абсолютном ТГФ (3 мл) добавляли *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид (74 мг, 0.36 ммоль) и *N*-гидроксисукцинимид (51 мг, 0.45 ммоль). Реакционную смесь выдерживали при перемешивании 3 часа. Затем осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали. Из сухого остатка методом колоночной хроматографии выделяли продукт – активированный эфир. К смеси сукцинимидного эфира и 1-карбокси-5-(2-этокси-2-оксоацетамидо)пентан-1-аммоний бромида добавляли триэтиламин (116 мкл, 0.83 ммоль),

затем растворяли в абсолютном диоксане (2 мл). Реакционную смесь перемешивали 5 часов при комнатной температуре, далее подкисляли АсОН до pH=5, разбавляли хлороформом (20 мл), промывали водой (2x20 мл), органическую фазу высушивали над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, концентрировали. Из остатка методом колоночной хроматографии (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:АсОН=93:7:1) выделяли продукт: бцв. ждк. **2.28a** (70 мг, 34%).

<sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 12.87 (уш.с, 1H), 8.39 (уш.с, 1H), 7.88 (с, 1H), 7.57 (уш.с, 1H), 7.47 (уш.с, 1H), 7.18 (д, 1H, *J* = 7.80 Гц), 6.90 (д, 1H, *J* = 8.45 Гц), 6.84 (уш.с, 1H), 5.26 (уш.с, 1H), 4.62 (уш.с, 1H), 4.30 (кв, 2H, *J* = 6.94 Гц), 3.57 (с, 3H), 3.51 (м, 2H), 3.31 (м, 4H), 3.24 (уш.с, 2H), 2.37 (м, 3H), 2.00 (м, 3H), 1.84 (уш.с, 1H), 1.61 (уш.с, 2H), 1.42 (м, 2H), 1.41 (с, 9H), 1.34 (т, 3H, *J* = 6.94 Гц).

HRMS (ESI) *m/z*: вычислено для C<sub>32</sub>H<sub>48</sub>N<sub>5</sub>O<sub>12</sub><sup>+</sup> ([M+H]<sup>+</sup>) 694.3294, найдено 694.3247.

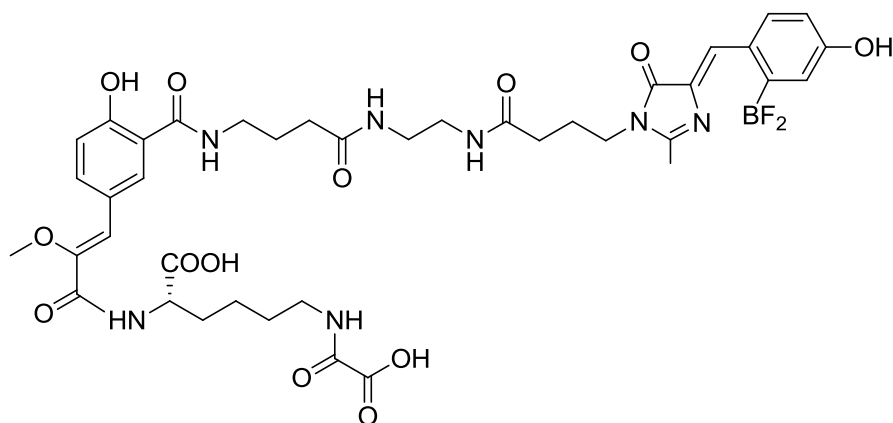


**(*S,Z*)-2-(3-(3-(4-(2-аминоэтиламино)-4-оксобутилкарбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриламидо)-6-(карбоксийформамидо)гексановая кислота (2.28).**

(*S,Z*)-2-(3-(3-(4-(2-(*трет*-бутоксикарбониламино)этиламино)-4-оксобутилкарбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриламидо)-6-(2-этокси-2-оксоацетамидо)гексановую кислоту **2.28a** (35 мг, 0.05 ммоль) растворяли в 2М NaOH (1.5 мл), выдерживали 30 минут при комнатной температуре. Далее подкисляли АсОН до pH=5, экстрагировали этилацетатом (10 мл), промывали водой (10 мл), органическую фазу упаривали. Сухой остаток растворяли в 30% CF<sub>3</sub>COOH в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 мл), через 15 минут упаривали, соупаривали с толуолом 3 раза, высушивали на масляном насосе. Из остатка методом обращеннофазовой ВЭЖХ выделяли продукт: бел. крист. **2.28** (10 мг, 35%).

<sup>1</sup>H ЯМР (700 МГц, D<sub>2</sub>O): δ 8.05 (с, 1H), 7.93 (д, 1H, *J* = 8.45 Гц), 7.11 (д, 1H, *J* = 8.67 Гц), 6.90 (с, 1H), 4.39 (м, 1H), 3.75 (с, 3H), 3.53 (т, 2H, *J* = 6.50 Гц), 3.46 (т, 2H, *J* = 6.07 Гц), 3.31 (т, 2H, *J* = 6.50 Гц), 3.14 (т, 2H, *J* = 6.07 Гц), 2.45 (т, 2H, *J* = 7.15 Гц), 2.02 (м, 3H), 1.86 (м, 1H), 1.66 (м, 2H), 1.47 (м, 2H).

HRMS (ESI)  $m/z$ : вычислено для  $C_{25}H_{36}N_5O_{10}^+$  ( $[M+H]^+$ ) 566.2457, найдено 566.2401.



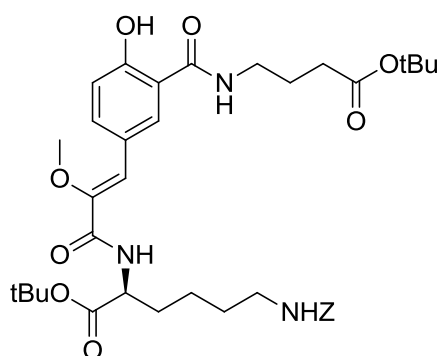
**(S)-6-(карбоксоформаидо)-2-((Z)-3-(3-(4-(2-(4-((Z)-4-(2-(дифторборил)-4-гидроксибензилиден)-2-метил-5-оксо-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-ил)бутанамидо)этиламино)-4-оксобутилкарбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриламидо)гексановая кислота (2.30).**

К раствору соединения **2.28** (0.13 мг, 0.23 мкмоль) в 0.15 М  $NaHCO_3$  (0.1 мл, pH=8.5) добавили (Z)-1-(4-(4-(2-(дифторборил)-4-гидроксибензилиден)-2-метил-5-оксо-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-ил)бутаноил)пирролидин-2,5-дион **2.29** (0.9 мг, 2.0 мкмоль) (предоставлен Михаилом Барановым) в абсолютном ДМФА (0.1 мл). Реакционную смесь выдерживали в течение суток. Затем добавили  $KHF_2$  (2.5 мг, 0.03 ммоль), выдерживали 5 часов. Далее реакционную смесь концентрировали. Методом обращеннофазовой ВЭЖХ выделяли продукт **2.30** (0.17 мг, 85 %).

$^1H$  ЯМР (700 МГц,  $D_2O$ ):  $\delta$  7.69 (с, 1H), 7.52 (д, 1H), 7.21 (д, 1H), 7.11 (с, 1H), 6.98 (с, 1H), 6.74 (м, 1H), 6.64 (м, 1H), 6.46 (с, 1H), 3.62 (м, 1H), 3.51 (с, 3H), 3.31-3.15 (м, 6H), 2.76 (с, 3H), 2.71 (с, 1H), 2.64 (м, 2H), 2.30-2.15 (м, 4H), 1.90-1.80 (м, 4H), 1.55-1.20 (м, 6H).

HRMS (ESI)  $m/z$ : вычислено для  $C_{40}H_{49}BF_2N_7O_{13}^+$  ( $[M+H]^+$ ) 884.3444, найдено 884.3440.

### 3.2.4 Синтез аналога аденилата люциферина *Fridericia heliota*



(*S, Z*)-*трет*бутил 6-(((бензилокси)карбонил)амино)-2-(3-(3-((4-*трет*-бутоксид)-4-оксобутил)карбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриламидо)гексаноат (**2.31**).

К раствору (*Z*)-3-(3-((4-*трет*-бутоксид)-4-оксобутил)карбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриловой кислоты **2.5** (получена по методике из [Царькова А. С., 2015]) (504 мг, 1.33 ммоль) в тетрагидрофуране (5 мл) добавляли раствор *N,N'*-дициклогексилкарбодиимида в ТГФ (2М, 0.8 mL, 1.59 mmol) и *N*-гидрокси-сукцинимид (183 мг, 1.59 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2.5 часов, затем осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали. Сухой остаток подвергали колоночной хроматографии (гексан-этилацетат 75:25 – 50:50) для выделения активированного эфира – бел. крист. (544 мг), который сразу использовали в следующей стадии. Раствор активированного эфира (20 мг, 0.042 ммоль) в диоксане (3 мл) добавляли к смеси Lys(*Z*)-O-*t*Bu\*HCl (50 мг, 0.13 ммоль) и *N*-этилдиизопропиламина (88 мкл, 0.51 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов, подкисляли AcOH до pH=6, далее разбавляли этилацетатом (25 мл), промывали водой (20 мл), насыщенным раствором NaCl (20 мл), осушали над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали. Из сухого остатка методом колоночной хроматографии (CHCl<sub>3</sub>-EtOH-AcOH 98:2:1) выделяли продукт: бел. крист. **2.31** (23 мг, 68% на две стадии).

<sup>1</sup>H-ЯМР (700 МГц, CDCl<sub>3</sub>) 12.72 (с, 1H), 7.74 (д, *J* = 8.4 Гц, 1H), 7.71 (с, 1H), 7.35-7.27 (м, 5H), 7.14 (м, 2H), 6.97 (м, 2H), 5.12 – 5.04 (м, 2H), 4.85 (уш.с., 1H), 4.60 (тд, *J* = 8.0, 5.1 Гц, 1H), 3.67 (с, 3H), 3.52 – 3.43 (м, 2H), 3.20 (м, 2H), 2.39 (т, *J* = 6.7 Гц, 2H), 1.94 (м, 2H), 1.78 – 1.65 (м, 2H), 1.64 – 1.51 (м, 4H), 1.48 (с, 9H), 1.45 (с, 9H).

<sup>13</sup>C-ЯМР (700 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.6, 171.5, 170.0, 163.8, 162.2, 156.6, 147.4, 136.8, 135.5, 128.6, 128.2, 128.2, 127.6, 124.2, 119.7, 119.0, 114.5, 82.5, 81.4, 66.7, 59.6, 40.9, 39.9, 34.1, 33.5, 32.7, 29.5, 28.2, 28.2, 25.8, 25.1, 24.0, 22.5.

HRMS (ESI) *m/z*: вычислено для C<sub>37</sub>H<sub>52</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) 698.3647, найдено 698.3647.

### 3.2.5 Синтез люциферина, оксилуциферина высших грибов и их аналогов

**Общая методика А для синтеза соединений 2.33, 2.45-50, 2.62-63: снятие защитных групп.** К раствору защищенного субстрата (1 экв) в абсолютном дихлорметане (0.1 мл) в атмосфере аргона прикапывали 1М раствор  $BBr_3$  в абсолютном  $CH_2Cl_2$  (0.2 мл, более 30 экв). Реакционную смесь выдерживали ночь, затем разбавляли этилацетатом (2x0.5 мл), промывали фосфатным буфером (pH 7.0, 0.5 мл), осушали над безводным  $Na_2SO_4$ . Растворитель упаривали, из сухого остатка методом ВЭЖХ выделяли продукт.

**Общая методика очистки соединений 2.33, 2.45-2.50, 2.62-63:** целевые продукты очищали на полу-препаративной колонке (9.4 x 250 мм) ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 5мкм (Agilent Technologies) на хроматографе Agilent 1260 Infinity LC. Колонку калибровали смесью 95% водной муравьиной кислоты (0.1%) и 5% ацетонитрила. Пробу растворяли в ДМСО, порцию раствора объемом 100 мкл загружали на колонку, затем элюировали.

Элюирование проводили с использованием программы элюирования с градиентом: растворитель А – 0.1% муравьиная кислота, растворитель В – ацетонитрил. Колонка и растворители использовались при комнатной температуре, скорость потока – 3 мл/мин. Абсорбцию наблюдали при 210, 230, 250, 270, 290, 310, 330 и 360 нм.

Для веществ **2.33, 2.45, 2.49** использовали программный градиент 5-40% В в течение 25 минут. Для веществ **2.46-2.48, 2.50, 2.62** применяли метод Celent с программным градиентом 5-100% В за 24 минуты. Времена удерживания для целевых веществ приведены в таблице.

Хроматографические фракции высушивали на центрифужном вакуумном концентраторе SpeedVac.

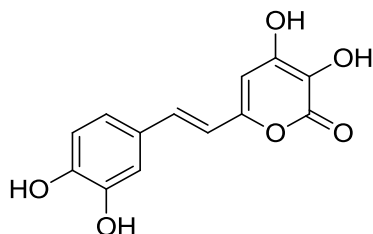
Таблица 3.1. Времена удерживания целевых соединений.

Соединение	<b>2.46</b>	<b>2.47</b>	<b>2.48</b>	<b>2.60</b>	<b>2.62</b>
Время удерживания (из 24 мин)	13.3 мин	14.1 мин	13.7 мин	18.8 мин	10.7 мин
Соединение	<b>2.33</b>	<b>2.45</b>	<b>2.49</b>		
Время удерживания (из 25 мин)	17.2 мин	19.5 мин	19.5 мин		

**Очистку соединения 2.63** проводили на хроматографе Nexera X2 (Shimadzu) с диодно-матричным детектором SPD M20A на колонке (4.6 мм x 150 мм) Discovery C18, 5 мкм. Подвижная фаза: растворитель А – 0.1 % TFA; растворитель В - ацетонитрил. Начальный состав 90% А - 10% В, далее от 0 до 11 мин вогнутый градиент с коэффициентом кривизны 4 до 100 % В. Колонка и растворители использовались при

комнатной температуре, скорость потока – 1 мл/мин. Детектирование образца проводили при 390 нм.

Спектры эмиссии для образцов в ацетоне получали при  $\lambda_{\text{возбуждения}}$  380 нм для соединений **2.45-2.49** и 430 нм для соединения **2.50**.



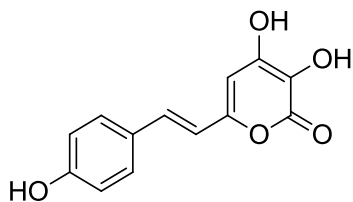
**(E)-6-(3,4-дигидрокстирил)-3,4-дигидрокси-2H-пиран-2-он (2.33).**

К раствору пиранона **2.42** (30 мг, 0.18 ммоль) и альдегида **2.43** (98 мг, 0.59 ммоль) в абсолютном MeOH (0.5 мл) в атмосфере аргона добавляли раствор Mg(OMe)<sub>2</sub> в MeOH (приготовленный растворением 50 мг магния в 1 мл MeOH). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре при перемешивании в течение 48 часов. Далее разбавляли хлороформом (2x10 мл), промывали фосфатным буфером (10 мл), осушали над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, растворитель упаривали. Из сухого остатка методом флэш-хроматографии выделяли продукт **2.44**, который сразу же вводили в следующую стадию без дополнительной очистки. Продукт **2.33** (12 мг, 26%) получали по общей методике **A** из **2.44**.

<sup>1</sup>H-ЯМР (800 МГц, Ацетон-d<sub>6</sub>) δ 7.12 (д, *J*=2.0 Гц, 1H), 7.10 (д, *J*=16.0 Гц, 1H), 6.99 (дд, *J*=8.2, 2.0 Гц, 1H), 6.86 (д, *J*=8.2 Гц), 6.64 (д, *J*=16.0 Гц, 1H), 6.21 (с, 1H).

ЯМР-спектры синтетического и природного люциферинов полностью совпадают.

HRMS (ESI) *m/z*: вычислено для C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>O<sub>6</sub><sup>+</sup> ([M+H]<sup>+</sup>) 263.0550, найдено 263.0570.



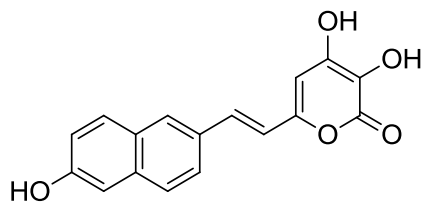
**(E)-3,4-дигидрокси-6-(4-гидроксистирил)-2H-пиран-2-он (2.45).**

Получали по общей методике **A** из **2.53** (1 мг, 0.003 ммоль): желт. крист. **2.45** (0.5 мг, 60%).

<sup>1</sup>H-ЯМР (700 МГц, Ацетон-d<sub>6</sub>) δ 7.49 (д, *J*<sub>1</sub>=8.5 Гц, 1H), 7.16 (д, *J*<sub>2</sub>=16.0 Гц, 1H), 6.88 (д, *J*<sub>1</sub>=8.5 Гц, 1H), 6.69 (д, *J*<sub>2</sub>=16.0 Гц, 1H), 6.22 (с, 1H).

<sup>13</sup>C-ЯМР (700 МГц, Ацетон-d<sub>6</sub>) δ 158.1, 151.6, 149.4, 131.5, 128.7, 127.8, 123.6, 116.6, 115.7, 101.6.

HRMS (ESI)  $m/z$ : вычислено для  $C_{13}H_{11}O_5^+$  ( $[M+H]^+$ ) 247.0601, найдено 247.0582.



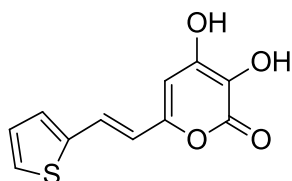
**(E)-3,4-дигидрокси-6-(2-(6-гидроксинафталин-2-ил)винил)-2H-пиран-2-он (2.46).**

Получали по общей методике **A** из **2.54** (1.9 мг, 0.005 ммоль): желт. крист. **2.46** (0.6 мг, 43%).

$^1H$ -ЯМР (700 МГц, Ацетон- $d_6$ )  $\delta$  7.96 (с, 1H), 7.82 (д,  $J_1=8.8$  Гц, 1H), 7.73– 7.66 (м, 2H), 7.36 (д,  $J_1=16.0$  Гц, 1H), 7.22 (д,  $J_3=2.4$  Гц, 1H), 7.18 (дд,  $J_{1,3}=8.8, 2.4$  Гц, 1H), 6.94 (д,  $J_1=16.0$  Гц, 1H), 6.31 (с, 1H).

$^{13}C$ - ЯМР (700 МГц, Ацетон- $d_6$ )  $\delta$  156.1, 151.2, 149.3, 135.3, 131.7, 130.8, 129.9, 128.5, 127.9, 126.8, 124.0, 123.6, 118.7, 118.3, 109.1, 102.3.

HRMS (ESI)  $m/z$ : вычислено для  $C_{17}H_{13}O_5^+$  ( $[M+H]^+$ ) 297.0757, найдено 297.0724.



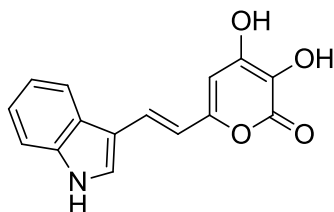
**(E)-3,4-дигидрокси-6-(2-(тиофен-2-ил)винил)-2H-пиран-2-он (2.47).**

Получали по общей методике **A** из **2.55** (3.4 мг, 0.001 ммоль): желт. крист. **2.47** (2.5 мг, 82%).

$^1H$ -ЯМР (600 МГц, Ацетон- $d_6$ )  $\delta$  7.48 (д,  $J_1=5.1$  Гц, 1H), 7.37 (д,  $J_2=15.8$  Гц, 1H), 7.34 (д,  $J_3=3.6$  Гц, 1H), 7.10 (дд,  $J_{1,3}=5.1, 3.6$  Гц, 1H), 6.62 (д,  $J_2=15.8$  Гц, 1H), 6.31 (с, 1H).

$^{13}C$ -ЯМР (600 МГц, Ацетон- $d_6$ )  $\delta$  150.4, 149.1, 141.2, 128.7, 128.1, 126.3, 124.6, 124.0, 118.4, 102.6.

HRMS (ESI)  $m/z$ : вычислено для  $C_{11}H_9O_4S^+$  ( $[M+H]^+$ ) 237.0216, найдено 237.0196.



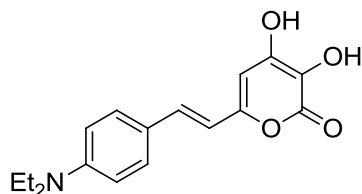
**(E)-6-(2-(1H-индол-3-ил)винил)-3,4-дигидрокси-2H-пиран-2-он (2.48).**

Получали по общей методике **A** из **2.56** (2.3 мг, 0.006 ммоль): оранж. крист. **2.48** (0.8 мг, 51%).

$^1H$ -ЯМР (600 МГц, Ацетон- $d_6$ )  $\delta$  8.02 (д,  $J_1=7.8$  Гц, 1H), 7.76 (с, 1H), 7.50 (д, 1H), 7.48 (д,  $J_2=16.1$  Гц, 1H), 7.25 – 7.16 (м, 2H), 6.84 (д,  $J_2=16.1$  Гц, 1H), 6.25 (с, 1H).



$^{13}\text{C}$ -ЯМР (600 МГц, Ацетон- $d_6$ )  $\delta$  152.6, 149.9, 137.6, 127.8, 126.0, 125.3, 122.8, 122.4, 120.4, 119.9, 114.5, 113.7, 111.9, 99.8.



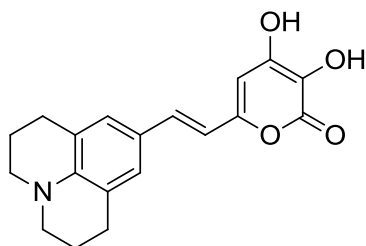
**(E)-6-(4-(диэтиламино)стирил)-3,4-дигидрокси-2H-пиран-2-он (2.49).**

Получали по общей методике А из **2.57** (1.6 мг, 0.005 ммоль): оранж. крист. **2.49** (0.9 мг, 62%).

$^1\text{H}$ -ЯМР (700 МГц, Ацетон- $d_6$ )  $\delta$  7.44 (д,  $J_1=8.7$  Гц, 1H), 7.13 (д,  $J_2=15.9$  Гц, 1H), 6.73 (д,  $J_1=8.7$  Гц, 1H), 6.58 (д,  $J_2=15.9$  Гц, 1H), 6.14 (с, 1H), 3.45 (кв,  $J_3=7.1$  Гц, 2H), 1.18 (т,  $J_3=7.1$  Гц, 3H).

$^{13}\text{C}$ -ЯМР (700 МГц, Ацетон- $d_6$ )  $\delta$  152.3, 149.7, 148.4, 132.2, 128.7, 123.0, 122.9, 113.7, 111.5, 100.1, 44.0, 12.1.

HRMS (ESI)  $m/z$ : вычислено для  $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{NO}_4^+$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 302.1387, найдено 302.1367.



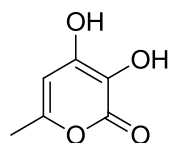
**(E)-6-(2-(1,2,3,5,6,7-гексагидропиридо[3,2,1-*ij*]-хинолин-9-ил)винил)-3,4-дигидрокси-2H-пиран-2-он (2.50).**

Получали по общей методике А из **2.58** (1.1 мг, 0.003 ммоль): оранж. крист. **2.50** (0.5 мг, 50%).

$^1\text{H}$ -ЯМР (800 МГц, Ацетон- $d_6$ )  $\delta$  7.03 (д,  $J_1=15.9$  Гц, 1H), 6.99 (с, 1H), 6.52 (д,  $J_1=15.9$  Гц, 1H), 6.12 (с, 1H), 3.24 (т,  $J_2 = 6.4$  Гц, 1H), 2.74 (т,  $J_2 = 6.4$  Гц, 1H), 1.95 (м, 1H).

$^{13}\text{C}$ -ЯМР (800 МГц, Ацетон- $d_6$ )  $\delta$  152.4, 149.7, 143.6, 132.6, 126.1, 122.9 (2C), 121.1, 113.2, 99.9, 49.7, 27.3, 21.6.

HRMS (ESI)  $m/z$ : вычислено для  $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{NO}_4^+$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 326.1387, найдено 326.1393.



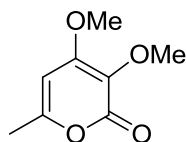
**3,4-дигидрокси-6-метил-2H-пиран-2-он (2.40).**

Вещества **2.38** и **2.39** получали из коммерчески доступной дегидроацетовой кислоты **2.37** по методикам, описанным в [Hatzigrigoriou, Varvoglis, Bakola-Christianopoulou, 1990; Soldi и др., 2012]. 5М раствор NaOH в воде (275 mL) добавляли к **2.39** (6.7 г, 18.8 ммоль), реакционную смесь перемешивали 2 часа при комнатной температуре. Затем подкисляли до pH=3 добавлением 10% водной HCl и экстрагировали EtOAc (400 мл, 5x200 мл, 5x100 мл), высушивали над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, растворитель упаривали. Из сухого остатка методом колоночной хроматографии (CHCl<sub>3</sub>-MeOH-AcOH 94:5:1) выделяли продукт: желт. крист. **2.40** (2.2 г, 82%).

<sup>1</sup>H-ЯМР (300 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 10.51 (с, 1H), 8.34 (с, 1H), 5.96 (с, 1H), 2.10 (с, 3H).

<sup>13</sup>C-ЯМР (300 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 161.8, 153.0, 151.0, 121.8, 101.0, 18.6.

HRMS (ESI) m/z: вычислено для C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup> ([M+H]<sup>+</sup>) 143.0339, найдено 143.0333.



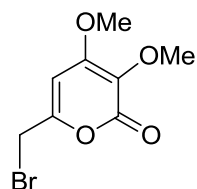
#### **3,4-диметокси-6-метил-2H-пиран-2-он (2.42).**

К раствору пиранона **2.40** (600 мг, 4.22 ммоль) в ацетоне (20 мл) добавляли диметилсульфат (2.4 мл, 25.3 ммоль), карбонат натрия (2.7 г, 25.3 ммоль) и DIPEA (150 мкл, 0.84 ммоль). Реакционную смесь нагревали до 60 °С в течение 6 часов, затем оставляли на ночь при перемешивании при комнатной температуре. Далее разбавляли EtOAc (50 мл), промывали фосфатным буфером (pH 7.0, 70 мл), концентрированным раствором NaCl (50 мл), осушали над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, растворитель упаривали на вакууме. Из сухого остатка методом колоночной хроматографии (EtOAc:гексан, градиент 0:1 to 1:1) выделяли продукт: светло-желт. крист. **2.42** (486 мг, 68%).

<sup>1</sup>H-ЯМР (300 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.92 (с, 1H), 3.94 (с, 3H), 3.80 (с, 3H), 2.22 (с, 3H).

<sup>13</sup>C-ЯМР (300 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 162.1, 159.0, 158.0, 126.9, 97.0, 60.3, 57.5, 20.0.

HRMS (ESI) m/z: вычислено для C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup> ([M+H]<sup>+</sup>) 171.0652, найдено 171.0652.



#### **6-(бромометил)-3,4-диметокси-2H-пиран-2-он (2.51).**

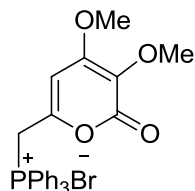
К раствору вещества **2.42** (100 мг, 0.59 ммоль) в CCl<sub>4</sub> (12 мл) добавляли N-бромсукцинимид (105 мг, 0.59 ммоль) и бензоилпероксид (1 мг). Реакцию проводили под светом яркой лампы, ход реакции контролировали по ТСХ. Затем реакционную смесь разбавляли CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 мл), промывали насыщенным раствором Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (20 мл),

органическую фазу сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , упаривали. Из остатка флэш-хроматографией (EtOAc:гексан 1:1) выделяли продукт: бел. крист. **2.51** (50 мг, 34%).

$^1\text{H}$ -ЯМР (300 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.25 (с, 1H), 4.14 (с, 2H), 3.99 (с, 3H), 3.85 (с, 3H).

$^{13}\text{C}$ -ЯМР (300 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  160.9, 157.6, 154.1, 128.8, 99.8, 60.4, 58.0, 26.8.

HRMS (ESI)  $m/z$ : вычислено для  $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{BrO}_4^+$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 248.9757, найдено 248.9752.



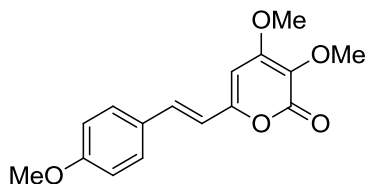
**((3,4-диметокси-2-оксо-2H-пиран-6-ил)метил)трифенилфосфоний бромид (2.51).**

Раствор бромида **2.51** (120 мг, 0.48 ммоль) в сухом толуоле (14 мл) добавляли к  $\text{PPh}_3$  (152 мг, 0.58 ммоль) в аргоновой атмосфере. Реакционную смесь кипятили 4 часа в инертной атмосфере, затем оставляли при перемешивании на ночь при комнатной температуре. Растворитель упаривали, сухой остаток промывали диэтиловым эфиром (4x10 мл), после высушивания получали продукт: желто-оранж. крист. **2.52** (199 мг, 81%).

$^1\text{H}$ -ЯМР (300 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ) 7.96-7.37 (м, 15H), 5.45 (д,  $J=14.71$  Гц, 2H), 5.27 (с, 1H), 3.83 (с, 3H), 3.69 (с, 3H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (300 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  160.4, 158.8, 147.7, 135.5, 134.3, 132.1, 130.4, 117.2, 104.4, 60.2, 58.3, 29.2.

**Общий метод Б для синтеза соединений 2.53-2.58: реакция Виттига.** К смеси 2М NaOH (1мл) и раствора фосфониевой соли **2.52** (0.03 ммоль) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1 мл) добавляли альдегид (0.04 ммоль, 1.5 экв). Через три часа реакционную смесь разбавляли  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2x1мл), промывали водой (2x1мл), органическую фазу высушивали над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , растворитель упаривали. Из сухого остатка методом флэш-хроматографии выделяли продукт.



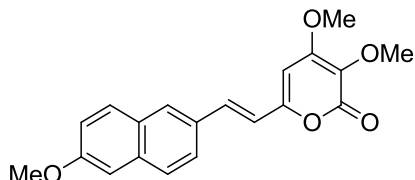
**(E)-3,4-диметокси-6-(4-метоксистирил)-2H-пиран-2-он (2.53).**

Вещество получали по общей методике **Б** из **2.52** (15 мг, 0.03 ммоль) и 4-метоксибензальдегида (6 мг, 0.04 ммоль). Продукт выделяли при очистке методом флэш-хроматографии (EtOAc:гексан градиент от 0:1 до 3:7): светло-желт. крист. **2.53** (1 мг, 12%).

$^1\text{H}$ -ЯМР (700 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.51 (д,  $J_1=8.77$  Гц, 2H), 7.47 (д,  $J_2=15.79$  Гц, 1H), 6.98 (д,  $J_1=8.77$  Гц, 2H), 6.53 (д,  $J_2=15.79$  Гц, 1H), 6.13 (с, 1H), 4.06 (с, 3H), 3.95 (с, 3H), 3.91 (с, 3H).

$^{13}\text{C}$ -ЯМР (700 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  161.0, 160.8, 159.0, 155.4, 135.9, 128.9, 128.2, 127.8, 116.2, 114.5, 97.0, 60.4, 57.3, 55.5.

HRMS (ESI)  $m/z$ : вычислено для  $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{O}_5^+$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 289.1071, найдено 289.1067.



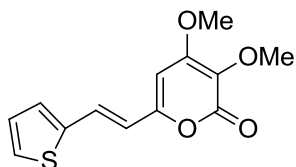
**(E)-3,4-диметокси-6-(2-(6-метоксинафталин-2-ил)винил)-2H-пиран-2-он (2.54).**

Вещество получали по общей методике **Б** из **2.52** (15 мг, 0.03 ммоль) и 6-метокси-2-нафталальдегида (8 мг, 0.04 ммоль). Продукт выделяли при очистке методом флэш-хроматографии (EtOAc:гексан градиент от 0:1 до 3:7): бело-желт. крист. **2.54** (1.5 мг, 15%).

$^1\text{H}$ -ЯМР (700 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.89 (с, 1H), 7.82 (д,  $J_1=8.99$  Гц, 1H), 7.79 (д,  $J_2=8.55$  Гц, 1H), 7.68 (дд,  $J_2=8.55$  Гц,  $J_3<1.5$  Гц, 1H), 7.64 (д,  $J_4=15.79$  Гц, 1H), 7.24 (дд,  $J_1=8.99$  Гц,  $J_5=2.41$  Гц, 1H), 7.20 (д,  $J_5=2.41$  Гц, 1H), 6.73 (д, 1H,  $J_4=15.79$  Гц), 6.19 (с, 1H), 4.08 (с, 3H), 4.01 (с, 3H), 3.96 (с, 3H).

$^{13}\text{C}$ -ЯМР (700 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  161.1, 158.9, 158.7, 155.2, 135.5, 135.2, 130.8, 130.0, 128.9, 128.6, 128.1, 127.5, 123.8, 119.5, 117.5, 106.2, 97.5, 60.5, 57.5, 55.4.

HRMS (ESI)  $m/z$ : вычислено для  $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{O}_5^+$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 337.1227, найдено 337.1214.



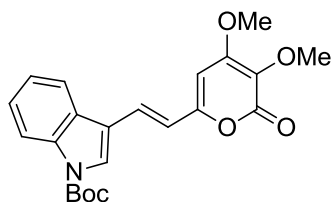
**(E)-3,4-диметокси-6-(2-(тиофен-2-ил)винил)-2H-пиран-2-он (2.55).**

Вещество получали по общей методике **Б** из **2.52** (15 мг, 0.03 ммоль) и тиофен-2-карбальдегида (4 мкл, 0.04 ммоль). Продукт выделяли при очистке методом флэш-хроматографии (EtOAc:гексан градиент от 0:1 до 3:7): бело-желт. крист. **2.55** (3.4 мг, 44%).

$^1\text{H}$ -ЯМР (700 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.62 (д,  $J_1=15.57$  Гц, 1H), 7.38 (д,  $J_2=5.04$  Гц, 1H), 7.24 (д,  $J_3=3.51$  Гц, 1H), 7.11 (м, 1H), 6.46 (д,  $J_1=15.57$  Гц, 1H), 6.14 (с, 1H), 4.05 (с, 3H), 3.95 (с, 3H).

$^{13}\text{C}$ -ЯМР (700 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  160.9, 158.9, 154.5, 140.8, 129.5, 128.2 (2C), 128.1, 127.0, 117.5, 97.6, 60.3, 57.3.

HRMS (ESI)  $m/z$ : вычислено для  $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{O}_4\text{S}^+$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 265.0529, найдено 265.0511.



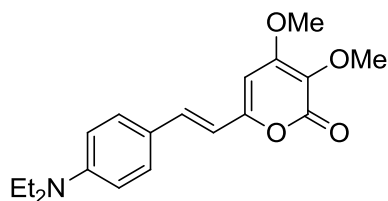
**(E)-*tert*-бутил 3-(2-(3,4-диметокси-2-оксо-2*H*-пиран-6-ил)винил)-1*H*-индол-1-карбоксилат (2.56).**

Вещество получали по общей методике **Б** из **2.52** (15 мг, 0.03 ммоль) и *tert*-бутил 1*H*-индол-1-карбоксилата (11 мг, 0.04 ммоль). Продукт выделяли при очистке методом флэш-хроматографии (EtOAc:гексан градиент от 0:1 до 3:7): желто-оранж. крист. **2.56** (4.5 мг, 39%).

$^1\text{H}$ -ЯМР (700 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.27 (уш.д,  $J_1=7.89$  Гц, 1H), 7.92 (д,  $J_2=8.11$  Гц, 1H), 7.88 (с, 1H), 7.64 (д,  $J_3=16.00$  Гц, 1H), 7.46 (м, 1H), 7.41 (м, 1H), 6.77 (д,  $J_3=16.00$  Гц, 1H), 6.19 (с, 1H), 4.08 (с, 3H), 3.96 (с, 3H), 1.76 (с, 9H).

$^{13}\text{C}$ -ЯМР (700 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  167.9, 161.1, 158.9, 155.2, 136.3, 128.0 (2C), 127.1, 127.0, 125.3, 123.5, 120.0, 118.0, 117.6, 115.7, 97.0, 84.6, 60.4, 57.3, 28.2.

HRMS (ESI)  $m/z$ : вычислено для  $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{NO}_6^+$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 398.1598, найдено 398.1580.



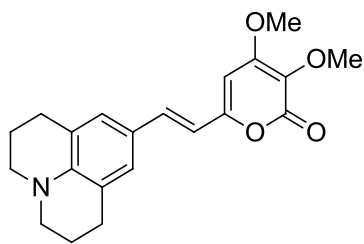
**(E)-6-(4-(диэтиламино)стирил)-3,4-диметокси-2*H*-пиран-2-он (2.57).**

Вещество получали по общей методике **Б** из **2.52** (15 мг, 0.03 ммоль) и 4-(диэтиламино)бензальдегида (8 мг, 0.04 ммоль). Продукт выделяли при очистке методом флэш-хроматографии (EtOAc:гексан градиент от 0:1 до 3:7): оранж. крист. **2.57** (3.2 мг, 32%).

$^1\text{H}$ -ЯМР (700 МГц, Ацетон- $d_6$ )  $\delta$  7.47 (д,  $J_1=8.88$  Гц, 1H), 7.23 (д,  $J_2=15.89$  Гц, 1H), 6.75 (д,  $J_1=8.88$  Гц, 1H), 6.62 (д,  $J_2=15.89$  Гц, 1H), 6.40 (с, 1H), 4.00 (с, 3H), 3.75 (с, 3H), 3.47 (кв,  $J_3=7.02$  Гц, 2H), 1.19 (т,  $J_3=7.02$  Гц, 3H).

$^{13}\text{C}$ -ЯМР (700 МГц, Ацетон- $d_6$ )  $\delta$  160.0, 159.5, 156.1, 148.7, 134.4, 129.0, 126.8, 122.5, 113.5, 111.5, 95.8, 58.9, 43.9, 56.7, 12.0.

HRMS (ESI)  $m/z$ : вычислено для  $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{NO}_4^+$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) 330.1700, найдено 330.1677.



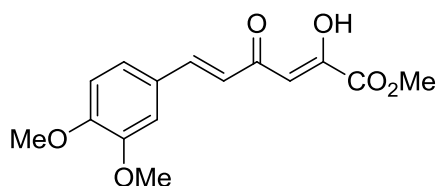
**(E)-6-(2-(1,2,3,5,6,7-гексагидропиридо[3,2,1-*ij*]хинолин-9-ил)винил)-3,4-диметокси-2H-пиран-2-он (2.58).**

Вещество получали по общей методике **Б** из **2.52** (15 мг, 0.03 ммоль) и 1,2,3,5,6,7-гексагидропиридо[3,2,1-*ij*]хинолин-9-карбальдегида (9 мг, 0.044 ммоль). Продукт выделяли при очистке методом флэш-хроматографии (EtOAc:гексан градиент от 0:1 до 3:7): оранж. крист. **2.58** (2.2 мг, 21%).

<sup>1</sup>H-ЯМР (700 МГц, Ацетон-*d*<sub>6</sub>) δ 7.01 (с, 1H), 7.13 (д, *J*<sub>1</sub>=15.89 Гц, 1H), 6.56 (д, *J*<sub>1</sub>=15.89 Гц, 1H), 6.38 (с, 1H), 4.00 (с, 3H), 3.75 (с, 3H), 3.25 (т, *J*<sub>2</sub>=5.87 Гц, 4H), 2.74 (т, *J*<sub>3</sub>=6.36 Гц, 4H), 1.95 (м, 4H).

<sup>13</sup>C-ЯМР (700 МГц, Ацетон-*d*<sub>6</sub>) δ 160.1, 159.6, 156.3, 144.1, 134.9, 126.5 (2C), 122.5, 121.1, 113.0, 95.5, 59.0, 56.6, 49.6, 27.5, 21.6.

HRMS (ESI) *m/z*: вычислено для C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup> ([M+H]<sup>+</sup>) 354.1700, найдено 354.1669.



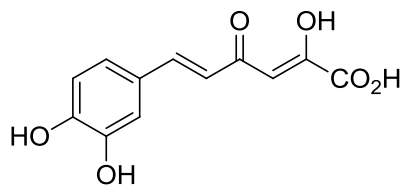
**(2Z,5E)-метил 6-(3,4-диметоксифенил)-2-гидрокси-4-оксагекса-2,5-диенат (2.66).**

Соединение **2.64** получали из коммерчески доступного 3,4-диметоксибензальдегида согласно методике, описанной в [Adeva и др., 2000]. К раствору **2.64** (100 мг, 0.485 ммоль) в сухом ТГФ (10 мл) в аргонной атмосфере при -78°C добавляли раствор 1M LiHMDS в ТГФ (1.1 мл). Реакционную смесь оставляли при перемешивании на ночь, медленно доводя до комнатной температуры. Далее добавляли EtOAc (2x50 мл), промывали 1M HCl (50 мл), органическую фазу упаривали на вакууме. Из сухого остатка методом колоночной хроматографии (EtOAc:гексан, градиент от 2:8 до 1:0, затем EtOAc:EtOH градиент от 9:1 до 1:1) выделяли продукт: красно-оранж. крист. **2.66** (113 мг, 80%).

<sup>1</sup>H-ЯМР (300 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.69 (д, *J*<sub>1</sub>=15.83 Гц, 1H), 7.16 (дд, *J*<sub>2,3</sub>=8.29, 1.58 Гц, 1H), 7.07 (д, *J*<sub>3</sub>=1.58 Гц, 1H), 6.88 (д, *J*<sub>2</sub>=8.29 Гц, 1H), 6.53 (м, 2H), 3.92 (уш.с., 6H), 3.90 (с, 3H).

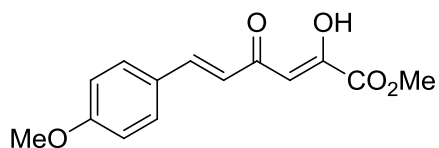
<sup>13</sup>C-ЯМР (300 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 185.7, 172.7, 162.9, 152.0, 149.5, 143.8, 143.8, 127.5, 123.7, 121.1, 111.3, 110.0, 100.7, 56.2, 56.1, 53.2.

HRMS (ESI)  $m/z$ : вычислено для  $C_{15}H_{17}O_6^+$  ( $[M+H]^+$ ) 293.1020, найдено 293.0999.



**(2Z,5E)-6-(3,4-дигидроксифенил)-2-гидрокси-4-оксогекса-2,5-диеновая кислота (2.62).**

Получали по общей методике **A** из **2.66** (33 мг, 0.11 ммоль): продукт желт. крист. **2.62** (8 мг, 29%). ЯМР-спектры чистого вещества в  $CD_3OD$  находились в полном соответствии с данными из [Crosby и др., 2010].



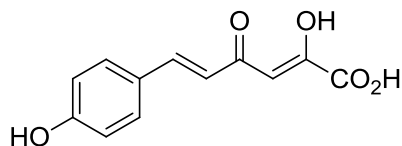
**(2Z,5E)-метил 2-гидрокси-6-(4-метоксифенил)-4-оксогекса-2,5-диеноат (2.67).**

Кетон **2.65** получали согласно общей методике из [Adeva и др., 2000]. Синтез **2.67** из исходного **2.65** (500 мг, 2.84 ммоль) проводили по той же методике, что и для получения вещества **2.66**. После очистки методом колоночной хроматографии ( $CHCl_3$ : EtOH градиент от 100:0 до 99.5:0.5) выделяли продукт: желто-оранж. крист. **2.67** (273 мг, 37%).

$^1H$  ЯМР (700 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.79 (д,  $J = 15.8$  Гц, 1H), 7.61 (д,  $J = 8.7$  Гц, 2H), 7.01 (д,  $J = 8.7$  Гц, 2H), 6.62 (д,  $J = 16.0$  Гц, 1H), 6.60 (с, 1H), 3.99 (с, 3H), 3.93 (с, 3H).

$^{13}C$ -ЯМР (300 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  186.1, 162.8, 162.1, 161.8, 143.5, 130.4, 127.1, 120.8, 114.6, 100.7, 55.5, 53.1.

HRMS (ESI)  $m/z$ : вычислено для  $C_{14}H_{14}NaO_5^+$  ( $[M+Na]^+$ ) 285.0733, найдено 285.0731.



**(2Z,5E)-2-гидрокси-6-(4-гидроксифенил)-4-оксогекса-2,5-диеновая кислота (2.63).**

Получали по общей методике **A** из **2.67** (100 мг, 0.38 ммоль): продукт желт. крист. **2.63** (62 мг, 70%).

$^1H$  ЯМР (700 МГц,  $CD_3OD$ )  $\delta$  7.75 (д,  $J = 15.8$  Гц, 1H), 7.56 (д,  $J = 8.5$  Гц, 2H), 6.86 (д,  $J = 8.6$  Гц, 2H), 6.71 (д,  $J = 15.8$  Гц, 1H).

$^{13}C$ -ЯМР (300 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  185.7, 166.7, 160.6, 143.9, 143.7, 130.5, 126.0, 119.3, 115.7.

HRMS (ESI)  $m/z$ : вычислено для  $C_{12}H_{10}NaO_5^+$  ( $[M+Na]^+$ ) 257.0420, найдено 257.0419.

## Выводы

- 1) Проведена оптимизация метода синтеза люциферина почвенного червя *Fridericia heliota*: количество стадий уменьшено с девяти до семи, суммарный выход увеличен в 50 раз: с 0.04% до 2%.
- 2) Синтезирован фрагмент природных аналогов люциферина почвенного червя *Fridericia heliota* – AsLn5, AsLn11 и AsLn12 – (Z)-CompY ((Z)-3-(4-гидроксифенил)-2-метоксиакриловая кислота) и её *транс*-изомер. Доказана Z-конфигурация двойной связи в природных аналогах люциферина *Fridericia* AsLn5, AsLn11 и AsLn12.
- 3) Получены аналоги люциферина *Fridericia heliota*, варьибельные по фрагменту ГАМК – производное люциферина с линкерной аминогруппой (S,Z)-2-(3-(3-(4-(2-аминоэтиламино)-4-оксобутилкарбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриламидо)-6-(карбоксихормамидо)гексановая кислота **2.28** и его конъюгат с флуоресцентным красителем (S)-6-(карбоксихормамидо)-2-((Z)-3-(3-(4-(2-(4-((Z)-4-(2-(дифторбутил)-4-гидроксибензилиден)-2-метил-5-оксо-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-ил)бутанамидо)этиламино)-4-оксобутилкарбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриламидо)гексановая кислота **2.30**. Показано, что аналоги **2.28** и **2.30** проявляют биолюминесцентную активность, причем максимум эмиссии БЛ соединения **2.30** проявляет батохромный сдвиг на 50 нм по сравнению с люциферинном *Fridericia*. Таким образом, впервые получен аналог люциферина *Fridericia* с измененными спектральными свойствами.
- 4) Синтезировано модельное соединение аденилата люциферина *Fridericia heliota* (S,Z)-*трет*-бутил 6-(((бензилокси)карбонил)амино)-2-(3-(3-((4-(*трет*-бутоксид)-4-оксобутил)карбамоил)-4-гидроксифенил)-2-метоксиакриламидо)гексаноат **2.31**, изучены его хемилюминесцентные свойства. Показано, что механизм биолюминесцентной реакции *Fridericia heliota* включает образование аденилата люциферина.
- 5) Впервые синтезирован люциферин высших грибов (E)-6-(3,4-дигидрокстирил)-3,4-дигидрокси-2H-пиран-2-он.
- 6) Синтезировано шесть структурных аналогов люциферина высших грибов: (E)-3,4-дигидрокси-6-(4-гидроксистирил)-2H-пиран-2-он **2.45**, (E)-3,4-дигидрокси-6-(2-(6-гидроксиафталин-2-ил)винил)-2H-пиран-2-он **2.46**, (E)-3,4-дигидрокси-6-(2-(тиофен-2-ил)винил)-2H-пиран-2-он **2.47**, (E)-6-(2-(1H-индол-3-ил)винил)-3,4-дигидрокси-2H-пиран-2-он **2.48**, (E)-6-(4-(диэтиламино)стирил)-3,4-дигидрокси-



*2H*-пиран-2-он **2.49**, (*E*)-6-(2-(1,2,3,5,6,7-гексагидропиридо[3,2,1-*ij*]хинолин-9-ил)винил)-3,4-дигидрокси-*2H*-пиран-2-он **2.50**. Изучены спектральные характеристики полученных соединений. Показано, что соединения **2.45**, **2.46**, **2.48-2.50** проявляют биолюминесцентные свойства. Таким образом, показано, что в реакции биолюминесценции люциферина грибов ключевую роль играет пираноновый фрагмент субстрата, в то время как катехольный фрагмент выполняет роль ауксохромного заместителя.

- 7) Установлено строение продуктов биолюминесцентной реакции грибов **2.59-2.61**.
- 8) Предложена структура оксилуциферина высших грибов (*2Z,5E*)-6-(3,4-дигидроксифенил)-2-гидрокси-4-оксогекса-2,5-диеновой кислоты.

## Благодарности

В первую очередь автор выражает благодарность своему научному руководителю Ямпольскому Илье Викторовичу за помощь и полезные советы на протяжении всего исследования, за энтузиазм, научную смелость и бесконечную любовь к науке. Также автор благодарит Царькову Александру, Балееву Надежду, Баранова Михаила и других сотрудников Группы синтеза природных соединений за помощь в проведении работы, ценные обсуждения и создание чудесной рабочей атмосферы. Автор благодарит сотрудников Лаборатории фотобиологии Института Биофизики СО РАН Валентина Петушкова, Наталью Родионову и Константина Пуртова за плодотворное сотрудничество в изучении двух биолюминесцентных систем. Автор благодарит Максима Дубинного и Константина Минеева за бесценную помощь в регистрации и расшифровке ЯМР-спектров, а также Вадима Качалу за обучение основам получения спектров. Автор также благодарит Константина Владимировича Антонова за регистрацию спектров HRMS. Автор выражает благодарность своим учителям в науке Вадиму Крылову и Семенову Сергею Евгеньевичу за веру, помощь и постоянную поддержку. Автор также благодарит своих родителей и своего мужа Алексея Осипова за то, что они всегда рядом в трудную минуту.

## Список сокращений

<b>Ac</b>	ацетил
<b>ATP-TCA</b>	ATP tumor chemosensitivity assay / анализ хемосенситивности опухолей по АТФ
<b>Ar</b>	арил
<b>BL</b>	bioluminescence / биолюминесценция
<b>BL-ELISA</b>	bioluminescent enzyme-linked immunosorbent assay / биолюминесцентный иммуноферментный анализ
<b>Boc</b>	<i>tert</i> -бутоксикарбонил
<b>BOM</b>	бензилоксиметил
<b>BRET</b>	bioluminescence resonance energy transfer / Фёрстеровский резонансный перенос энергии в биолюминесценции
<b>Bz</b>	бензоил
<b>CLuc</b>	люцифераза <i>Cypridina</i>
<b>DCC</b>	<i>N,N'</i> -дициклогексилкарбодиимид
<b>DIPEA</b>	диизопропилэтиламин
<b>ELISA</b>	иммуноферментный анализ
<b>ESI</b>	electrospray ionization / ионизация распылением в электрическом поле
<b>Et</b>	этил
<b>GLuc</b>	люцифераза копеподы <i>Gaussia</i>
<b>GPCR</b>	G-protein coupled receptors / рецепторы, сопряженные с G-белком
<b>HBTU</b>	<i>N,N,N',N'</i> – тетраметил- <i>O</i> -(1 <i>H</i> -бензотриазол-1-ил)уроний гексафторфосфат
<b>HMBC</b>	heteronuclear multiple bond correlation/ гетероядерная многосвязная корреляционная спектроскопия ЯМР
<b>HSQC</b>	Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy/ гетероядерная одноквантовая корреляционная спектроскопия ЯМР
<b>HRMS</b>	high resolution mass-spectrometry / масс-спектрометрия высокого разрешения
<b>LCI</b>	luciferase complementation imaging / имиджинг по методу «сплит»-люциферазы
<b>LiHMDS</b>	бис(триметилсилил)амид лития
<b>Lys</b>	лизин
<b>Me</b>	метил
<b>MLuc</b>	люцифераза копеподы <i>Metridia longa</i>
<b>NBS</b>	<i>N</i> -бромсукцинимид

<b>NHS</b>	<i>N</i> -гидроксисукцинимид
<b>NIS</b>	<i>N</i> -йодсукцинимид
<b>FRET</b>	Förster resonance energy transfer / Фёрстеровский резонансный перенос энергии
<b>FLuc</b>	люцифераза светляка <i>Photinus pyralis</i>
<b>PG</b>	protective group / защитная группа
<b>Ph</b>	фенил
<b>QD</b>	Quantum Dots / квантовые точки
<b>RLuc</b>	люцифераза коралла <i>Renilla</i>
<b>ROESY</b>	rotating frame nuclear Overhauser effect spectroscopy / rotating frame ЯМР спектроскопия с эффектом Оверхаузера
<b>TBAI</b>	тетрабутиламмоний йодид
<b>TFA</b>	трифторуксусная кислота
<b>THF</b>	тетрагидрофуран
<b>tBu</b>	<i>трет</i> бутил
<b>Z</b>	бензилоксикарбонил
<b>АДФ</b>	аденозин-5'-дифосфат
<b>АТФ</b>	аденозин-5'-трифосфат
<b>БАИБ</b>	бисацетоксийодбензол
<b>Б, БЛ, БЛИ</b>	биолюминесценция, биоломинесценция, биолюминесцентный имиджинг
<b>БОК</b>	<i>трет</i> -бутоксикарбонил
<b>ВЭЖХ</b>	высокоэффективная жидкостная хроматография
<b>ГАМК</b>	<i>гамма</i> -аминомасляная кислота
<b>ДМСО</b>	диметилсульфоксид
<b>ДМФА</b>	диметилформамид
<b>КССВ</b>	константа спин-спинового взаимодействия
<b>МРТ</b>	магнитно-резонансная томография
<b>НАД<sup>+</sup>, НАДН</b>	никотинамидадениндинуклеотид
<b>НАДФ<sup>+</sup>, НАДФН</b>	никотинамидадениндинуклеотидфосфат
<b>ОФЭКТ</b>	однофотонная эмиссионная компьютерная томография
<b>ПЗС</b>	прибор с зарядовой связью
<b>ПЭТ</b>	позитронно-эмиссионная томография
<b>ТГФ</b>	тетрагидрофуран
<b>ФМН</b>	флавиномононуклеотид
<b>ЯМР</b>	ядерный магнитный резонанс

## Список литературы

1. Abraham E.H., Salikhova A.Y., Hug E.B. Critical ATP parameters associated with blood and mammalian cells: Relevant measurement techniques // *Drug Dev. Res.* 2003. Т. 59. № 1. С. 152–160.
2. Adam W. и др. A Convenient Synthesis of Hispidin from Piperonal // *Synthesis (Stuttg.)*. 1994. Т. 1994. № 11. С. 1133–1134.
3. Adams S.T., Miller S.C. Beyond D-luciferin: expanding the scope of bioluminescence imaging in vivo. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2014. Т. 21. С. 112–20.
4. Adeva M. и др. Open Analogues of Arcyriaflavin A. Synthesis through Diels–Alder Reaction between Maleimides and 1-Aryl-3- tert -butyldimethylsiloxy-1,3-butadienes // *J. Org. Chem.* 2000. Т. 65. № 11. С. 3387–3394.
5. Aelvoet S.-A. и др. Noninvasive bioluminescence imaging of  $\alpha$ -synuclein oligomerization in mouse brain using split firefly luciferase reporters. // *J. Neurosci.* 2014. Т. 34. № 49. С. 16518–32.
6. Agarwal D.P. и др. A sensitive bioluminescent assay of alcohol dehydrogenase in human serum and tissue extracts // *Fresenius' Zeitschrift fur Anal. Chemie.* 1982. Т. 311. № 4. С. 374–374.
7. Aghamaali M.R. и др. Cloning, sequencing, expression and structural investigation of mnemiopsin from *Mnemiopsis leidyi*: an attempt toward understanding  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated photoproteins. // *Protein J.* 2011. Т. 30. № 8. С. 566–74.
8. Airth R.L., Foerster G.E. The isolation of catalytic components required for cell-free fungal bioluminescence // *Arch. Biochem. Biophys.* 1962. Т. 97. № 3. С. 567–573.
9. Airth R.L., Foerster G.E. Enzymes associated with bioluminescence in *Panus stypticus luminescens* and *Panus stypticus non-luminescens* // *J. Bacteriol.* 1964. Т. 88. № 5. С. 1372–1379.
10. Airth R.L., McElroy W.D. Light emission from extracts of luminous fungi. // *J. Bacteriol.* 1959. Т. 77. № 2. С. 249–50.
11. Akiyoshi R., Ogo K., Suzuki H. Star-worm luciferase. Патент № 20140073031. USA. Olympus corporation (Tokyo, JP), Perak state development corporation (IPOH, MY), Nimura genetic solutions co., ltd. (Tokyo, JP), 2014.
12. Alam R. и др. Designing quantum rods for optimized energy transfer with firefly luciferase enzymes. // *Nano Lett.* 2012. Т. 12. № 6. С. 3251–6.
13. Alam R. и др. Novel multistep BRET-FRET energy transfer using nanoconjugates of firefly proteins, quantum dots, and red fluorescent proteins. // *Nanoscale.* 2013. Т. 5. № 12. С.

5303–6.

14. Alipour B.S. и др. Molecular cloning, sequence analysis, and expression of a cDNA encoding the luciferase from the glow-worm, *Lampyrus turkestanicus*. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. Т. 325. № 1. С. 215–22.

15. Almeida P.E. de, Rappard J.R.M. van, Wu J.C. In vivo bioluminescence for tracking cell fate and function. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2011. Т. 301. № 3. С. H663–71.

16. Amaral D.T., Prado R.A., Viviani V.R. Luciferase from *Fulgeochlizus bruchi* (Coleoptera:Elateridae), a Brazilian click-beetle with a single abdominal lantern: molecular evolution, biological function and comparison with other click-beetle luciferases. // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2012. Т. 11. № 7. С. 1259–67.

17. Anderstam B. и др. A luminometric assay for determination of ethanol in microdialysates // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 2009. Т. 58. №1. С. 89-96.

18. Andreotti P.E. и др. Chemosensitivity Testing of Human Tumors Using a Microplate Adenosine Triphosphate Luminescence Assay: Clinical Correlation for Cisplatin Resistance of Ovarian Carcinoma // *Cancer Res.* 1995. Т. 55. № 22. С. 5276–5282.

19. Arai R. и др. Detection of protein-protein interaction by bioluminescence resonance energy transfer from firefly luciferase to red fluorescent protein // *J. Biosci. Bioeng.* 2002. Т. 94. № 4. С. 362–364.

20. Arifin D.R., Bulte J.W.M. Imaging of pancreatic islet cells. // *Diabetes. Metab. Res. Rev.* 2011. Т. 27. № 8. С. 761–6.

21. Aswendt M., Adamczak J., Tennstaedt A. A review of novel optical imaging strategies of the stroke pathology and stem cell therapy in stroke. // *Front. Cell. Neurosci.* 2014. Т. 8. С. 226.

22. Awais M., Ozawa T. Illuminating intracellular signaling and molecules for single cell analysis. // *Mol. Biosyst.* 2011. Т. 7. № 5. С. 1376–87.

23. Ayzenberg I. и др. Analysis of neurogenesis during experimental autoimmune encephalomyelitis reveals pitfalls of bioluminescence imaging. // *PLoS One.* 2015. Т. 10. № 3. С. e0118550.

24. Azad T., Tashakor A., Hosseinkhani S. Split-luciferase complementary assay: applications, recent developments, and future perspectives. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2014. Т. 406. № 23. С. 5541–60.

25. Azevedo M.F. и др. *Plasmodium falciparum* transfected with ultra bright NanoLuc luciferase offers high sensitivity detection for the screening of growth and cellular trafficking inhibitors. // *PLoS One.* 2014. Т. 9. № 11. С. e112571.

26. Bacardit R., Moreno-Mañas M., Pleixats R. Functionalization at C-5 and at the C-6 methyl group of 4-methoxy-6-methyl-2-pyrone // *J. Heterocycl. Chem.* 1982. Т. 19. № 1. С. 157–160.
27. Bae Y.M., Hastings J.W. Cloning, sequencing and expression of dinoflagellate luciferase DNA from a marine alga, *Gonyaulax polyedra* // *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* 1994. Т. 1219. № 2. С. 449–456.
28. Bally J.K. and M.B. Bioluminescence - Recent Advances in Oceanic Measurements and Laboratory Applications / под ред. D. Lapota. InTech, 2012.
29. Berglund K. и др. Light-emitting channelrhodopsins for combined optogenetic and chemical-genetic control of neurons. // *PLoS One.* 2013. Т. 8. № 3. С. e59759.
30. Berglund K. и др. Luminopsins integrate opto- and chemogenetics by using physical and biological light sources for opsin activation // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2016. Т. 113. № 3. С. 201510899.
31. Bertrand L. и др. The BRET2/arrestin assay in stable recombinant cells: a platform to screen for compounds that interact with G protein-coupled receptors (GPCRs) // *J. Recept. Signal Transduct.* 2002. Т. 22. №1-4. С. 533-41.
32. Björkman K.M., Karl D.M. A novel method for the measurement of dissolved adenosine and guanosine triphosphate in aquatic habitats: applications to marine microbial ecology. // *J. Microbiol. Methods.* 2001. Т. 47. № 2. С. 159–67.
33. Bode V.C., Hastings J.W. The purification and properties of the bioluminescent system in *Gonyaulax polyedra* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1963. Т. 103. № 3. С. 488–499.
34. Borghei G., Hall E.A.H. BRET-linked ATP assay with luciferase. // *Analyst.* 2014. Т. 139. № 17. С. 4185–92.
35. Bovenberg M.S.S., Degeling M.H., Tannous B.A. Enhanced Gaussia luciferase blood assay for monitoring of in vivo biological processes. // *Anal. Chem.* 2012. Т. 84. № 2. С. 1189–92.
36. Braks J. и др. Bioluminescence imaging of *P. berghei* Schizont sequestration in rodents. // *Methods Mol. Biol.* 2013. Т. 923. С. 353–68.
37. Branchini B.R. и др. Luciferase from the Italian firefly *Luciola italica*: molecular cloning and expression. // *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 2006. Т. 145. № 2. С. 159–67.
38. Branchini B.R. и др. Red-emitting luciferases for bioluminescence reporter and imaging applications. // *Anal. Biochem.* 2010. Т. 396. № 2. С. 290–7.
39. Branchini B.R. и др. Sequential bioluminescence resonance energy transfer-

fluorescence resonance energy transfer-based ratiometric protease assays with fusion proteins of firefly luciferase and red fluorescent protein. // *Anal. Biochem.* 2011. Т. 414. № 2. С. 239–45.

40. Branchini B.R. и др. A *Photinus pyralis* and *Luciola italica* chimeric firefly luciferase produces enhanced bioluminescence. // *Biochemistry.* 2014. Т. 53. № 40. С. 6287–9.

41. Branchini B.R. и др. An enhanced chimeric firefly luciferase-inspired enzyme for ATP detection and bioluminescence reporter and imaging applications. // *Anal. Biochem.* 2015. Т. 484. С. 148–53.

42. Brini M. Calcium-sensitive photoproteins. // *Methods.* 2008. Т. 46. № 3. С. 160–6.

43. Brock M. и др. Bioluminescent *Aspergillus fumigatus*, a new tool for drug efficiency testing and in vivo monitoring of invasive aspergillosis. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. Т. 74. № 22. С. 7023–35.

44. Brock M. Application of bioluminescence imaging for in vivo monitoring of fungal infections. // *Int. J. Microbiol.* 2012. Т. 2012. С. 956794.

45. Brogan J. и др. Imaging Molecular Pathways: Reporter Genes // *Radiat. Res.* 2012. Т. 177, С. 508-513.

46. Broggin-Tenzer A., Vuong V., Pruschy M. Metabolism of tumors under treatment: mapping of metabolites with quantitative bioluminescence. // *Radiother. Oncol.* 2011. Т. 99. № 3. С. 398–403.

47. Brolin S.E. и др. Photokinetic micro assay based on dehydrogenase reactions and bacterial luciferase // *Anal. Biochem.* 1971. Т. 42. № 1. С. 124–135.

48. Brolin S.E., Berne C., Isacson U. Photokinetic assay of NADH and NADPH in microdissected tissue samples // *Anal. Biochem.* 1972. Т. 50. № 1. С. 50–55.

49. Bungart B.L. и др. Nanoparticle-emitted light attenuates amyloid- $\beta$ -induced superoxide and inflammation in astrocytes. // *Nanomedicine.* 2014. Т. 10. № 1. С. 15–7.

50. Burbelo P.D., Lebovitz E.E., Notkins A.L. Luciferase immunoprecipitation systems for measuring antibodies in autoimmune and infectious diseases. // *Transl. Res.* 2015. Т. 165. № 2. С. 325–35.

51. Burns S.M. и др. High-throughput luminescent reporter of insulin secretion for discovering regulators of pancreatic Beta-cell function. // *Cell Metab.* 2015. Т. 21. № 1. С. 126–37.

52. Cali J.J. и др. Bioluminescent assays for ADMET // *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2008. Т. 8. № 1. С. 103-120.

53. Carling P. Methods for assessing the adequacy of practice and improving room disinfection. // *Am. J. Infect. Control.* 2013. Т. 41. № 5 Suppl. С. S20–5.



54. Cevenini L. и др. Multicolor bioluminescence boosts malaria research: quantitative dual-color assay and single-cell imaging in *Plasmodium falciparum* parasites. // *Anal. Chem.* 2014. Т. 86. № 17. С. 8814–21.
55. Chan K.-M., Raikwar S.P., Zavazava N. Strategies for differentiating embryonic stem cells (ESC) into insulin-producing cells and development of non-invasive imaging techniques using bioluminescence // *Immunol. Res.* 2007. Т. 39. № 1-3. С. 261–270.
56. Chan M.-C. и др. Applying ATP bioluminescence to design and evaluate a successful new intensive care unit cleaning programme // *J. Hosp. Infect.* 2015. Т. 90. № 4. С. 344–6.
57. Chen S. и др. Ingestibility, digestibility, and engineered biological control potential of *Flavobacterium hibernum*, isolated from larval mosquito habitats. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. Т. 80. № 3. С. 1150–8.
58. Chen S., Bagdasarian M., Walker E.D. *Elizabethkingia anophelis*: molecular manipulation and interactions with mosquito hosts. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2015. Т. 81. № 6. С. 2233–43.
59. Chen X., Qian Y., Wu S. The Warburg effect: evolving interpretations of an established concept. // *Free Radic. Biol. Med.* 2015. Т. 79. С. 253–63.
60. Cheng Y.-H. и др. Modulation of Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1) Potency by Endocannabinoid-like Lipids Represents a Novel Mode of Regulating GLP-1 Receptor Signaling. // *J. Biol. Chem.* 2015. Т. 290. № 23. С. 14302–13.
61. Choi Y.S. и др. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the luciferase from the firefly, *Hotaria unmunšana*. // *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 2002. Т. 132. № 3. С. 661–70.
62. Choi Y.S. и др. Genomic structure of the luciferase gene and phylogenetic analysis in the *Hotaria*-group fireflies // *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 2003. Т. 134. № 2. С. 199–214.
63. Close D. и др. The evolution of the bacterial luciferase gene cassette (*lux*) as a real-time bioreporter. // *Sensors (Basel)*. 2012. Т. 12. № 1. С. 732–52.
64. Cochran J.N. и др. AlphaScreen HTS and live-cell bioluminescence resonance energy transfer (BRET) assays for identification of Tau-Fyn SH3 interaction inhibitors for Alzheimer disease. // *J. Biomol. Screen.* 2014. Т. 19. № 10. С. 1338–49.
65. Coleman S.M., McGregor A. A bright future for bioluminescent imaging in viral research. // *Future Virol.* 2015. Т. 10. № 2. С. 169–183.
66. Contag C.H. и др. Photonic detection of bacterial pathogens in living hosts // *Mol. Microbiol.* 1995. Т. 18. № 4. С. 593–603.

67. Cox R.J., Wang P.S.H. Synthesis and in vitro enzyme activity of aza, oxa and thia derivatives of bacterial cell wall biosynthesis intermediates // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*. 2001. № 17. С. 2022–2034.
68. Crosby D.C. и др. Design, synthesis, and biological evaluation of novel hybrid dicaffeoyltartaric/diketo acid and tetrazole-substituted L-chicoric acid analogue inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase. // *J. Med. Chem.* 2010. Т. 53. № 22. С. 8161–75.
69. Daniel C. и др. Bioluminescence imaging study of spatial and temporal persistence of *Lactobacillus plantarum* and *Lactococcus lactis* in living mice. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2013. Т. 79. № 4. С. 1086–94.
70. Daniel C. и др. Dual-Color Bioluminescence Imaging for Simultaneous Monitoring of the Intestinal Persistence of *Lactobacillus plantarum* and *Lactococcus lactis* in Living Mice. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2015. Т. 81. № 16. С. 5344–9.
71. Day J.C. и др. Genomic structure of the luciferase gene from the bioluminescent beetle, *Nyctophila cf. caucasica*. // *J. Insect Sci.* 2006. Т. 6. С. 1–8.
72. De A. и др. BRET<sup>3</sup>: a red-shifted bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based integrated platform for imaging protein-protein interactions from single live cells and living animals. // *FASEB J.* 2009. Т. 23. № 8. С. 2702–9.
73. Delarze E. и др. Adaptation of a *Gaussia princeps* Luciferase reporter system in *Candida albicans* for in vivo detection in the *Galleria mellonella* infection model. // *Virulence*. 2015. Т. 6. № 7. С. 684–93.
74. Demont E.H. и др. 1,3-Dimethyl Benzimidazolones Are Potent, Selective Inhibitors of the BRPF1 Bromodomain // *ACS Med. Chem. Lett.* 2014. Т. 5. № 11. С. 1190–1195.
75. Deplus R. и др. TET2 and TET3 regulate GlcNAcylation and H3K4 methylation through OGT and SET1/COMPASS // *EMBO J.* 2013. Т. 32. № 5. С. 645–655.
76. Devine J.H. и др. Luciferase from the East European firefly *Luciola mingrelica*: Cloning and nucleotide sequence of the cDNA, overexpression in *Escherichia coli* and purification of the enzyme // *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* 1993. Т. 1173. № 2. С. 121–132.
77. Dixon A.S. и др. NanoLuc Complementation Reporter Optimized for Accurate Measurement of Protein Interactions in Cells. // *ACS Chem. Biol.* 2015.
78. Doerler M. и др. Does chemosensitivity-assay-directed therapy have an influence on the prognosis of patients with malignant melanoma stage IV? A retrospective study of 14 patients with malignant melanoma stage IV. // *Eur. J. Med. Res.* 2007. Т. 12. № 10. С. 497–502.

79. Dong T., Zhao X. Rapid identification and susceptibility testing of uropathogenic microbes via immunosorbent ATP-bioluminescence assay on a microfluidic simulator for antibiotic therapy. // *Anal. Chem.* 2015. Т. 87. № 4. С. 2410–8.

80. Doyle T.C. и др. Visualizing fungal infections in living mice using bioluminescent pathogenic *Candida albicans* strains transformed with the firefly luciferase gene. // *Microb. Pathog.* 2006. Т. 40. № 2. С. 82–90.

81. Dragulescu-Andrasi A. и др. Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) imaging of protein-protein interactions within deep tissues of living subjects. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011. Т. 108. № 29. С. 12060–5.

82. Drouin-Ouellet J. и др. Toll-like receptor expression in the blood and brain of patients and a mouse model of Parkinson's disease. // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2015. Т. 18. № 6. С. pyu103.

83. Drouot E., Piret J., Boivin G. Novel method based on “en passant” mutagenesis coupled with a gaussia luciferase reporter assay for studying the combined effects of human cytomegalovirus mutations. // *J. Clin. Microbiol.* 2013. Т. 51. № 10. С. 3216–24.

84. Dunlap J.C., Hastings J.W. Biochemistry of dinoflagellate bioluminescence: the purification and characterization of dinoflagellate luciferin from *Pyrocystis lunula* // *Biochemistry.* 1981. Т. 20. № 4. С. 983–989.

85. Dunlap J.C., Hastings J.W., Shimomura O. Crossreactivity between the light-emitting systems of distantly related organisms: Novel type of light-emitting compound. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1980. Т. 77. № 3. С. 1394–7.

86. Eckert N. и др. Influenza A virus encoding secreted Gaussia luciferase as useful tool to analyze viral replication and its inhibition by antiviral compounds and cellular proteins. // *PLoS One.* 2014. Т. 9. № 5. С. e97695.

87. El-Sayed R. и др. Thermostable luciferase from *Luciola cruciate* for imaging of carbon nanotubes and carbon nanotubes carrying doxorubicin using in vivo imaging system. // *Nano Lett.* 2013. Т. 13. № 4. С. 1393–8.

88. Fagan T.F. и др. Cloning, expression and sequence analysis of cDNA for the Ca(2+)-binding photoprotein, mitrocomin. // *FEBS Lett.* 1993. Т. 333. № 3. С. 301–5.

89. Fan F., Wood K. V. Bioluminescent assays for high-throughput screening. // *Assay Drug Dev. Technol.* 2007. Т. 5. № 1. С. 127–36.

90. Fehm T. и др. Antitumor activity of zoledronic acid in primary breast cancer cells determined by the ATP tumor chemosensitivity assay. // *BMC Cancer.* 2012. Т. 12. С. 308.

91. Fernández-Piñas F. и др. Evaluation of the ecotoxicity of pollutants with

bioluminescent microorganisms. // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2014. T. 145. C. 65–135.

92. Feugang J.M. и др. Self-illuminating quantum dots for non-invasive bioluminescence imaging of mammalian gametes. // *J. Nanobiotechnology.* 2015. T. 13. C. 38.

93. Frank L.A., Krasitskaya V. V. Application of enzyme bioluminescence for medical diagnostics. // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2014. T. 144. C. 175–97.

94. Franke-Fayard B. и др. Murine malaria parasite sequestration: CD36 is the major receptor, but cerebral pathology is unlinked to sequestration. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005. T. 102. № 32. C. 11468–73.

95. Frundzhyan V., Ugarova N. Bioluminescent assay of total bacterial contamination of drinking water. // *Luminescence.* 2007. T. 22. № 3. C. 241–4.

96. Furuya K., Sokabe M., Grygorczyk R. Real-time luminescence imaging of cellular ATP release. // *Methods.* 2014. T. 66. № 2. C. 330–44.

97. Gabriel G.V.M., Lopes P.S., Viviani V.R. Suitability of *Macrolampis* firefly and *Pyrearinus* click beetle luciferases for bacterial light off toxicity biosensor. // *Anal. Biochem.* 2014. T. 445. C. 73–9.

98. Gabriel G.V.M., Viviani V.R. Novel application of pH-sensitive firefly luciferases as dual reporter genes for simultaneous ratiometric analysis of intracellular pH and gene expression/location. // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2014. T. 13. № 12. C. 1661–70.

99. Gahan C.G.M. The bacterial lux reporter system: applications in bacterial localisation studies. // *Curr. Gene Ther.* 2012. T. 12. № 1. C. 12–9.

100. Gammon S.T. и др. Rational design of novel red-shifted BRET pairs: Platforms for real-time single-chain protease biosensors. // *Biotechnol. Prog.* 2009. T. 25. № 2. C. 559–69.

101. Gammon S.T. и др. Preclinical anatomical, molecular, and functional imaging of the lung with multiple modalities. // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2014. T. 306. № 10. C. L897–914.

102. Germain-Genevois C., Garandeau O., Couillaud F. Detection of Brain Tumors and Systemic Metastases Using NanoLuc and Fluc for Dual Reporter Imaging. // *Mol. Imaging Biol.* 2016. T. 18 №1. C. 62-69.

103. Glaysher S., Cree I.A. Cell sensitivity assays: the ATP-based tumor chemosensitivity assay. // *Methods Mol. Biol.* 2011. T. 731. C. 247–57.

104. Godinat A. и др. A biocompatible “split luciferin” reaction and its application for non-invasive bioluminescent imaging of protease activity in living animals. // *Curr. Protoc. Chem. Biol.* 2014. T. 6. № 3. C. 169–89.

105. Gong L. и др. 3-Bromopyruvic acid, a hexokinase II inhibitor, is an effective

antitumor agent on the hepatoma cells : in vitro and in vivo findings. // *Anticancer. Agents Med. Chem.* 2014. Т. 14. № 5. С. 771–6.

106. Guardigli M., Lundin A., Roda A. in *Chemiluminescence and Bioluminescence* / под ред. A. Roda. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2010. С.143-190.

107. Gudermann T.W., Cooper T.G. A sensitive bioluminescence assay for myo-inositol // *Anal. Biochem.* 1986. Т. 158. № 1. С. 59–63.

108. Gupta R. и др. Expression of the *Photobacterium luminescens lux* genes (*luxA*, *B*, *C*, *D*, and *E*) *Saccharomyces cerevisiae* // *FEMS Yeast Res.* 2003. Т. 4. № 3. С. 305–313.

109. Hall M.P. и др. Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. // *ACS Chem. Biol.* 2012. Т. 7. № 11. С. 1848–57.

110. Hamorsky K.T. и др. in *Chemiluminescence and Bioluminescence* / под ред. A. Roda. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2010.

111. Harvey E.N. in *History of Luminescence From the Earliest Times Until 1900.* / Philadelphia, USA: American Philosophical Society, 1957.

112. Hasegawa M. и др. Bioluminescence resonance energy transfer coupled near-infrared quantum dots using GST-tagged luciferase for in vivo imaging. // *Chem. Commun. (Camb)*. 2013. Т. 49. № 3. С. 228–30.

113. Hasson S.A. и др. Chemogenomic profiling of endogenous PARK2 expression using a genome-edited coincidence reporter. // *ACS Chem. Biol.* 2015. Т. 10. № 5. С. 1188–97.

114. Hastings J.W., Sweeney B.M. The luminescent reaction in extracts of the marine dinoflagellate, *Gonyaulax polyedra* // *J. Cell. Comp. Physiol.* 1957. Т. 49. № 2. С. 209–225.

115. Hatano K. и др. A functional screen identifies miRNAs that inhibit DNA repair and sensitize prostate cancer cells to ionizing radiation. // *Nucleic Acids Res.* 2015. Т. 43. № 8. С. 4075–86.

116. Hatzigrigoriou E., Varvoglis A., Bakola-Christianopoulou M. Preparation of [hydroxy(((+)-10-camphorsulfonyl)oxy)iodo]benzene and its reactivity toward carbonyl compounds // *J. Org. Chem.* 1990. Т. 55. № 1. С. 315–318.

117. Haugwitz M. и др. Multiplexing Bioluminescent and Fluorescent Reporters to Monitor Live Cells // *Curr. Chem. Genomics.* 2008. Т. 1. № 1. С.11-19.

118. He S.-X. и др. Nanoluciferase as a novel quantitative protein fusion tag: Application for overexpression and bioluminescent receptor-binding assays of human leukemia inhibitory factor // *Biochimie.* 2014. Т. 106. С. 140–148.

119. Heise K. и др. Dual luciferase assay for secreted luciferases based on Gaussia and NanoLuc. // *Assay Drug Dev. Technol.* 2013. Т. 11. № 4. С. 244–52.

120. Hiramatsu N. и др. Alkaline phosphatase vs luciferase as secreted reporter molecules in vivo. // *Anal. Biochem.* 2005. Т. 339. № 2. С. 249–56.
121. Ho P. и др. Reporter enzyme inhibitor study to aid assembly of orthogonal reporter gene assays. // *ACS Chem. Biol.* 2013. Т. 8. № 5. С. 1009–17.
122. Hochgräfe K., Mandelkow E.-M. Making the brain glow: in vivo bioluminescence imaging to study neurodegeneration. // *Mol. Neurobiol.* 2013. Т. 47. № 3. С. 868–82.
123. Homaei A.A. и др. Purification and characterization of a novel thermostable luciferase from *Bentosema pterotum*. // *J. Photochem. Photobiol. B.* 2013. Т. 125. С. 131–6.
124. Honig A. и др. Microtubule-associated protein tau correlates with estrogen receptor status but not with in vitro paclitaxel sensitivity in primary breast cancer. // *Eur J Gynaecol Oncol.* 2014. Т. 35. № 5. С. 503–7.
125. Hossain M.A., Chowdhury T., Bagul A. Imaging modalities for the in vivo surveillance of mesenchymal stromal cells. // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2015. Т. 9. № 11. С. 1217–24.
126. Hsu C.-Y. и др. Bioluminescence resonance energy transfer using luciferase-immobilized quantum dots for self-illuminated photodynamic therapy. // *Biomaterials.* 2013. Т. 34. № 4. С. 1204–12.
127. Hsu W.-C. и др. Identifying a kinase network regulating FGF14:Nav1.6 complex assembly using split-luciferase complementation. // *PLoS One.* 2015. Т. 10. № 2. С. e0117246.
128. Huang P.-C. и др. A multisampling reporter system for monitoring microRNA activity in the same population of cells. // *J. Biomed. Biotechnol.* 2009. Т. 2009. С. 104716.
129. Huang Y.-S. и др. Comparing visual inspection, aerobic colony counts, and adenosine triphosphate bioluminescence assay for evaluating surface cleanliness at a medical center. // *Am. J. Infect. Control.* 2015. Т. 43. № 8. С. 882–886.
130. Hulleman J.D. и др. A high-throughput cell-based Gaussia luciferase reporter assay for identifying modulators of fibulin-3 secretion. // *J. Biomol. Screen.* 2013. Т. 18. № 6. С. 647–58.
131. Hutchens M., Luker G.D. Applications of bioluminescence imaging to the study of infectious diseases. // *Cell. Microbiol.* 2007. Т. 9. № 10. С. 2315–22.
132. Hwang D.W. и др. Real-time in vivo monitoring of viable stem cells implanted on biocompatible scaffolds. // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2008. Т. 35. № 10. С. 1887–98.
133. Hwang D.W. и др. In vivo bioluminescence imaging for prolonged survival of transplanted human neural stem cells using 3D biocompatible scaffold in corticectomized rat model. // *PLoS One.* 2014. Т. 9. № 9. С. e105129.

134. Hwang J.Y. и др. A multimode optical imaging system for preclinical applications in vivo: technology development, multiscale imaging, and chemotherapy assessment. // *Mol. Imaging Biol.* 2012. Т. 14. № 4. С. 431–42.
135. Hwang M.-H. и др. Biological production of an integrin  $\alpha\beta 3$  targeting imaging probe and functional verification. // *Biomed Res. Int.* 2015. Т. 2015. С. 681012.
136. Iglesias P., Costoya J.A. A novel BRET-based genetically encoded biosensor for functional imaging of hypoxia. // *Biosens. Bioelectron.* 2009. Т. 24. № 10. С. 3126–30.
137. Illarionov B.A. и др. Sequence of the cDNA encoding the Ca(2+)-activated photoprotein obelin from the hydroid polyp *Obelia longissima*. // *Gene.* 1995. Т. 153. № 2. С. 273–4.
138. Inoue S., Kakoi H., Goto T. Oplophorus luciferin, bioluminescent substance of the decapod shrimps, *Oplophorus spinosus* and *Heterocarpus laevigatus* // *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1976. № 24. С. 1056.
139. Inouye S. и др. Cloning and sequence analysis of cDNA for the luminescent protein aequorin. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1985. Т. 82. № 10. С. 3154–3158.
140. Inouye S. и др. Secretional luciferase of the luminous shrimp *Oplophorus gracilirostris*: cDNA cloning of a novel imidazopyrazinone luciferase // *FEBS Lett.* 2000. Т. 481. № 1. С. 19–25.
141. Inouye S. Cloning, expression, purification and characterization of an isotype of clytin, a calcium-binding photoprotein from the luminous hydromedusa *Clytia gregarium*. // *J. Biochem.* 2008. Т. 143. № 5. С. 711–7.
142. Inouye S., Sasaki S. Overexpression, purification and characterization of the catalytic component of *Oplophorus* luciferase in the deep-sea shrimp, *Oplophorus gracilirostris* // *Protein Expr. Purif.* 2007. Т. 56. № 2. С. 261–268.
143. Inouye S., Shimomura O. 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.* 1997. Т. 233. № 2. С. 349–53.
144. Inouye S., Tsuji F.I. Cloning and sequence analysis of cDNA for the Ca(2+)-activated photoprotein, clytin. // *FEBS Lett.* 1993. Т. 315. № 3. С. 343–6.
145. Issad T. и др. Looking for an insulin pill? Use the BRET methodology! // *Diabetes Metab.* 2003. Т. 29. № 2. С. 111–7.
146. Jathoul A.P. и др. A dual-color far-red to near-infrared firefly luciferin analogue designed for multiparametric bioluminescence imaging. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2014. Т. 53. № 48. С. 13059–63.

147. Jimenez L. Molecular diagnosis of microbial contamination in cosmetic and pharmaceutical products: a review. // *J. AOAC Int.* 2001. Т. 84. № 3. С. 671–5.
148. Jones К.А. и др. Visualizing cell proximity with genetically encoded bioluminescent reporters. // *ACS Chem. Biol.* 2015. Т. 10. № 4. С. 933–8.
149. Ju H.-L. и др. Transgenic mouse model expressing P53(R172H), luciferase, EGFP, and KRAS(G12D) in a single open reading frame for live imaging of tumor. // *Sci. Rep.* 2015. Т. 5. С. 8053.
150. Kadurugamuwa J.L. и др. Direct Continuous Method for Monitoring Biofilm Infection in a Mouse Model // *Infect. Immun.* 2003. Т. 71. № 2. С. 882–890.
151. Kafi A.K.M., Hattori M., Ozawa T. Luciferases for the study of protein-protein interactions in live cells and animals // *Nano Life.* 2010. Т. 01. № 01n02. С. 79–87.
152. Kaijzel E.L. и др. in *Chemiluminescence and Bioluminescence* / под ред. A. Roda. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2011.
153. Kanjou N. и др. Yeast mutant with efficient secretion identified by a novel secretory reporter, Cluc. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. Т. 358. № 2. С. 429–34.
154. Karlsson E.A. и др. Visualizing real-time influenza virus infection, transmission and protection in ferrets. // *Nat. Commun.* 2015. Т. 6. С. 6378.
155. Karp M. и др. A Sensitive Model System for In Vivo Monitoring of Baculovirus Gene Expression in Single Infected Insect Cells // *Biotechnology.* 1992. Т. 10. № 5. С. 565–569.
156. Karp M. и др. Identification of biotinylated molecules using a baculovirus-expressed luciferase-streptavidin fusion protein. // *Biotechniques.* 1996. Т. 20. № 3. С. 452–6, 458–9.
157. Kassem I.I. и др. Let There Be Light! Bioluminescent Imaging to Study Bacterial Pathogenesis in Live Animals and Plants. // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2016. Т. 154. С. 119-145.
158. Kato M. и др. Bioluminescence assay for detecting cell surface membrane protein expression. // *Assay Drug Dev. Technol.* 2011. Т. 9. № 1. С. 31–9.
159. Katsumata T. и др. Bioluminescence imaging of  $\beta$  cells and intrahepatic insulin gene activity under normal and pathological conditions. // *PLoS One.* 2013. Т. 8. № 4. С. e60411.
160. Kim M.S., Kim K.H. Effects of NV gene knock-out recombinant viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) on Mx gene expression in Epithelioma papulosum cyprini (EPC) cells and olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) // *Fish Shellfish Immunol.* 2012. Т. 32. № 3. С. 459–463.
161. Kim S.B. и др. Superluminescent variants of marine luciferases for bioassays. // *Anal. Chem.* 2011. Т. 83. № 22. С. 8732–40.



162. Kim S.B., Sato M., Tao H. Circularly permuted bioluminescent probes for illuminating ligand-activated protein dynamics. // *Bioconjug. Chem.* 2008. Т. 19. № 12. С. 2480–6.
163. Kim Y.R. и др. Bioluminescence-activated deep-tissue photodynamic therapy of cancer. // *Theranostics*. 2015. Т. 5. № 8. С. 805–17.
164. Klerk C.P.W. и др. Validity of bioluminescence measurements for noninvasive in vivo imaging of tumor load in small animals. // *Biotechniques*. 2007. Т. 43. № 1 Suppl. С. 7–13, 30.
165. Kobayashi M. и др. Establishment and characterization of transplantable, luminescence labeled rat renal cell carcinoma cell lines. // *J. Urol.* 2010. Т. 183. № 5. С. 2029–35.
166. Kojima S. и др. Bioluminescence activity of Latia luciferin analogs // *Tetrahedron Lett.* 2000. Т. 41. № 22. С. 4409–4413.
167. Koksharov M.I., Ugarova N.N. Approaches to engineer stability of beetle luciferases. // *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2012. Т. 2. № 3. С. e201209004.
168. Kong Y. и др. Whole-body imaging of infection using bioluminescence. // *Curr. Protoc. Microbiol.* 2011. Т. 21:C:2C.4:2C.4.1–2C.4.17.
169. Krappmann S. Lightning up the worm: How to probe fungal virulence in an alternative mini-host by bioluminescence. // *Virulence*. 2015. Т. 6. №8. С. 727–729.
170. Krichevsky A. и др. Autoluminescent plants. // *PLoS One*. 2010. Т. 5. № 11. С. e15461.
171. Kucharíková S. и др. *Candida albicans* biofilm development on medically-relevant foreign bodies in a mouse subcutaneous model followed by bioluminescence imaging. // *J. Vis. Exp.* 2015. № 95. С. 52239.
172. Kung A.L. Harnessing the power of fireflies and mice for assessing cancer mechanisms // *Drug Discov. Today Dis. Mech.* 2005. Т. 2. № 2. С. 153–158.
173. Lampinen J., Virta M., Karp M. Use of controlled luciferase expression to monitor chemicals affecting protein synthesis. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1995. Т. 61. № 8. С. 2981–9.
174. Lang I. и др. Binding studies of TNF receptor superfamily (TNFRSF) receptors on intact cells. // *J. Biol. Chem.* 2016. Т. 291. № 10. С. 5022–37.
175. Lanza I.R. и др. Endurance exercise as a countermeasure for aging. // *Diabetes*. 2008. Т. 57. № 11. С. 2933–42.
176. Lanza I.R., Nair K.S. Functional assessment of isolated mitochondria in vitro. // *Methods Enzymol.* 2009. Т. 457. С. 349–72.

177. Lee I.-K., Yun B.-S. Styrylpyrone-class compounds from medicinal fungi *Phellinus* and *Inonotus* spp., and their medicinal importance. // *J. Antibiot. (Tokyo)*. 2011. Т. 64. № 5. С. 349–59.
178. Lee K.S. и др. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the luciferase from the firefly, *Pyrocoelia rufa*. // *J. Biotechnol.* 2001. Т. 92. № 1. С. 9–19.
179. Leevy W.M., Serazin N., Smith B.D. Optical Imaging of Bacterial Infection Models. // *Drug Discov. Today. Dis. Models*. 2007. Т. 4. № 3. С. 91–97.
180. Leippe D.M. и др. A bioluminescent assay for the sensitive detection of proteases. // *Biotechniques*. 2011. Т. 51. № 2. С. 105–10.
181. Li J. и др. Cage the firefly luciferin! - a strategy for developing bioluminescent probes. // *Chem. Soc. Rev.* 2013. Т. 42. № 2. С. 662–76.
182. Li L. и др. Chemical chaperone therapy: luciferase assay for screening of  $\beta$ -galactosidase mutations. // *Mol. Genet. Metab.* 2010. Т. 101. № 4. С. 364–9.
183. Li L., Hong R., Hastings J.W. Three functional luciferase domains in a single polypeptide chain. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997. Т. 94. № 17. С. 8954–8.
184. Lin J.-W. и др. Screening inhibitors of *P. berghei* blood stages using bioluminescent reporter parasites. // *Methods Mol. Biol.* 2013. Т. 923. С. 507–22.
185. Liu D. и др. Fast hepatitis C virus RNA elimination and NS5A redistribution by NS5A inhibitors studied by a multiplex assay approach. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015. Т. 59. № 6. С. 3482–92.
186. Liu L., Hastings J.W. Two different domains of the luciferase gene in the heterotrophic dinoflagellate *Noctiluca scintillans* occur as two separate genes in photosynthetic species. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007. Т. 104. № 3. С. 696–701.
187. Liu M. и др. Secreted *Gaussia princeps* luciferase as a reporter of *Escherichia coli* replication in a mouse tissue cage model of infection. // *PLoS One*. 2014. Т. 9. № 3. С. e90382.
188. Lorenz W.W. и др. Isolation and expression of a cDNA encoding *Renilla reniformis* luciferase. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991. Т. 88. № 10. С. 4438–4442.
189. Louber J. и др. RIG-I self-oligomerization is either dispensable or very transient for signal transduction. // *PLoS One*. 2014. Т. 9. № 9. С. e108770.
190. Luker K.E. и др. In vivo imaging of ligand receptor binding with *Gaussia* luciferase complementation. // *Nat. Med.* 2012. Т. 18. № 1. С. 172–7.
191. Luker K.E., Luker G.D. Applications of bioluminescence imaging to antiviral research and therapy: multiple luciferase enzymes and quantitation. // *Antiviral Res.* 2008. Т. 78. № 3. С. 179–87.

192. Luker K.E., Luker G.D. Bioluminescence imaging of reporter mice for studies of infection and inflammation. // *Antiviral Res.* 2010. Т. 86. № 1. С. 93–100.
193. Lupold S.E. и др. A real time Metridia luciferase based non-invasive reporter assay of mammalian cell viability and cytotoxicity via the  $\beta$ -actin promoter and enhancer. // *PLoS One.* 2012. Т. 7. № 5. С. e36535.
194. Luwor R.B., Stylli S.S., Kaye A.H. Using bioluminescence imaging in glioma research. // *J. Clin. Neurosci.* 2015. Т. 22. № 5. С. 779–84.
195. Ma N., Marshall A.F., Rao J. Near-infrared light emitting luciferase via biomineralization. // *J. Am. Chem. Soc.* 2010. Т. 132. № 20. С. 6884–5.
196. Machleidt T. и др. NanoBRET--A Novel BRET Platform for the Analysis of Protein-Protein Interactions. // *ACS Chem. Biol.* 2015. Т. 10. № 8. С. 1797–804.
197. Maeda Y. и др. Expression of a bifunctional chimeric protein A-Vargula hilgendorffii luciferase in mammalian cells. // *Biotechniques.* 1996. Т. 20. № 1. С. 116–21.
198. Maguire C.A. и др. Codon-optimized *Luciola italica* luciferase variants for mammalian gene expression in culture and in vivo. // *Mol. Imaging.* 2012. Т. 11. № 1. С. 13–21.
199. Maguire C.A. и др. Triple bioluminescence imaging for in vivo monitoring of cellular processes. // *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 2013. Т. 2. С. e99.
200. Malikova N.P. и др. Characterization of hydromedusan  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated photoproteins as a tool for measurement of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration // *Anal. Bioanal. Chem.* 2014. Т. 406. № 23. С. 5715–5726.
201. March Rosselló G.A. и др. A two-hour antibiotic susceptibility test by ATP-bioluminescence. // *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2015. in press.
202. Markova S. V и др. Obelin from the bioluminescent marine hydroid *Obelia geniculata*: cloning, expression, and comparison of some properties with those of other  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated photoproteins. // *Biochemistry.* 2002. Т. 41. № 7. С. 2227–36.
203. Markova S. V и др. Cloning and expression of cDNA for a luciferase from the marine copepod *Metridia longa*. A novel secreted bioluminescent reporter enzyme. // *J. Biol. Chem.* 2004. Т. 279. № 5. С. 3212–7.
204. Markova S. V и др. Green-fluorescent protein from the bioluminescent jellyfish *Clytia gregaria*: cDNA cloning, expression, and characterization of novel recombinant protein. // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2010. Т. 9. № 6. С. 757–65.
205. Markova S. V и др. The light-sensitive photoprotein berovin from the bioluminescent ctenophore *Beroë abyssicola*: a novel type of  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated photoprotein. // *FEBS J.* 2012. Т. 279. № 5. С. 856–70.

206. Markova S. V., Vysotski E.S. Coelenterazine-Dependent Luciferases. // *Biochem. (Moscow)*. 2015. T. 80. № 6. С. 714–32.
207. Markova S. V. и др. The smallest natural high-active luciferase: Cloning and characterization of novel 16.5-kDa luciferase from copepod *Metridia longa* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015. T. 457. № 1. С. 77–82.
208. Marquette C.A., Blum L.J. in *Chemiluminescence and Bioluminescence* / под ред. A. Roda. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2010.
209. McCapra F., Chang Y.C. The chemiluminescence of a Cypridina luciferin analogue // *Chem. Commun.* 1967. № 19. С. 1011.
210. McElroy W.D. The Energy Source for Bioluminescence in an Isolated System. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1947. T. 33. № 11. С. 342–5.
211. Mehraein-Ghomi F. и др. Inhibitor of p52 NF- $\kappa$ B subunit and androgen receptor (AR) interaction reduces growth of human prostate cancer cells by abrogating nuclear translocation of p52 and phosphorylated AR(ser81). // *Genes Cancer*. 2015. T. 6. № 9-10. С. 428–44.
212. Meister S. и др. Imaging of Plasmodium liver stages to drive next-generation antimalarial drug discovery. // *Science*. 2011. T. 334. № 6061. С. 1372–7.
213. Meroni G., Rajabi M., Santaniello E. D-Luciferin, derivatives and analogues: synthesis and in vitro/in vivo luciferase-catalyzed bioluminescent activity // *Arkivoc*. 2009. С. 265-288. ISSN 1551-7012.
214. Michelini E. и др. Spectral-resolved gene technology for multiplexed bioluminescence and high-content screening. // *Anal. Chem.* 2008. T. 80. № 1. С. 260–7.
215. Miesenböck G., Rothman J.E. Patterns of synaptic activity in neural networks recorded by light emission from synaptolucins. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997. T. 94. № 7. С. 3402–7.
216. Milligan G. Applications of bioluminescence- and fluorescence resonance energy transfer to drug discovery at G protein-coupled receptors. // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2004. T. 21. № 4. С. 397–405.
217. Misawa N. и др. Rapid and high-sensitivity cell-based assays of protein-protein interactions using split click beetle luciferase complementation: an approach to the study of G-protein-coupled receptors. // *Anal. Chem.* 2010. T. 82. № 6. С. 2552–60.
218. Mitani Y. и др. Cloning and characterization of luciferase from a Fijian luminous click beetle. // *Photochem. Photobiol.* 2013. T. 89. № 5. С. 1163–9.
219. Mo X.-L. и др. Enabling systematic interrogation of protein-protein interactions in live cells with a versatile ultra-high-throughput biosensor platform. // *J. Mol. Cell Biol.* 2015.

in press.

220. Mofford D.M. и др. Luciferin Amides Enable in Vivo Bioluminescence Detection of Endogenous Fatty Acid Amide Hydrolase Activity. // *J. Am. Chem. Soc.* 2015. Т. 137. № 27. С. 8684–7.

221. Mueller-Klieser W., Walenta S. Geographical mapping of metabolites in biological tissue with quantitative bioluminescence and single photon imaging // *Histochem. J.* 1993. Т. 25. № 6. С. 407–420.

222. Mukherjee A. и др. Monitoring nanoparticle-mediated cellular hyperthermia with a high-sensitivity biosensor. // *Nanomedicine (Lond)*. 2014. Т. 9. № 18. С. 2729–43.

223. Mulkerrin M.G., Wampler J.E. Bioluminescence and Chemiluminescence // *Methods Enzymol.* 1978. Т. 57. С. 375–381.

224. Munier S. и др. Exploration of binary virus-host interactions using an infectious protein complementation assay. // *Mol. Cell. Proteomics.* 2013. Т. 12. № 10. С. 2845–55.

225. Naik S., Piwnicka-Worms D. Real-time imaging of beta-catenin dynamics in cells and living mice. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007. Т. 104. № 44. С. 17465–70.

226. Nakajima Y. и др. cDNA Cloning and Characterization of a Secreted Luciferase from the Luminous Japanese Ostracod, *Cypridina noctiluca* // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2004. Т. 68. № 3. С. 565–570.

227. Nakajima Y., Ohmiya Y. Bioluminescence assays: multicolor luciferase assay, secreted luciferase assay and imaging luciferase assay // *Expert Opin. Drug Discov.* 2010. Т. 5. № 9. С. 835-849.

228. Nakamura H. и др. Structure of dinoflagellate luciferin and its enzymic and nonenzymic air-oxidation products // *J. Am. Chem. Soc.* 1989. Т. 111. № 19. С. 7607–7611.

229. Nakamura M. и др. Synthesis of *Latia* luciferin benzoate analogues and their bioluminescent activity // *Tetrahedron Lett.* 2004. Т. 45. № 10. С. 2203–2205.

230. Nakamura M. и др. Bioluminescence activity of *Latia* luciferin analogues: replacement of the 2,6,6-trimethylcyclohexene ring onto the methyl-substituted phenyl groups // *Tetrahedron Lett.* 2005. Т. 46. № 1. С. 53–56.

231. Nakamura M. и др. Cell-surface-localized ATP detection with immobilized firefly luciferase. // *Anal. Biochem.* 2006. Т. 352. № 1. С. 61–7.

232. Nawtaisong P. и др. Trans-splicing group I intron targeting hepatitis C virus IRES mediates cell death upon viral infection in Huh7.5 cells. // *Virology.* 2015. Т. 481. С. 223–34.

233. Neuber K. Treosulfan in the treatment of metastatic melanoma: from chemosensitivity testing to clinical trials. // *Recent Results Cancer Res.* 2003. Т. 161. С. 159–79.

234. Nie J. и др. Optimization and validation of a high throughput method for detecting neutralizing antibodies against human papillomavirus (HPV) based on pseudovirions. // *J. Med. Virol.* 2014. Т. 86. № 9. С. 1542–55.
235. Niers J.M. и др. Single reporter for targeted multimodal in vivo imaging. // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. Т. 134. № 11. С. 5149–56.
236. Nishide S. и др. New reporter system for Per1 and Bmal1 expressions revealed self-sustained circadian rhythms in peripheral tissues. // *Genes Cells.* 2006. Т. 11. № 10. С. 1173–82.
237. Nishitsuji H. и др. A novel reporter system to monitor early stages of the HBV life cycle. // *Cancer Sci.* 2015. Т. 106. № 11. С. 1616-1624.
238. Noguchi T. и др. A dual-color luciferase assay system reveals circadian resetting of cultured fibroblasts by co-cultured adrenal glands. // *PLoS One.* 2012. Т. 7. № 5. С. e37093.
239. Norisada J. и др. A sensitive assay for the biosynthesis and secretion of MANF using NanoLuc activity. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014. Т. 449. № 4. С. 483–9.
240. Novak I. и др. ATP release and effects in pancreas // *Drug Dev. Res.* 2003. Т. 59. № 1. С. 128–135.
241. O'Farrell A. и др. Non-invasive molecular imaging for preclinical cancer therapeutic development // *Br. J. Pharmacol.* 2013. Т. 169. № 4. С. 719–735.
242. Oba Y. и др. Identification and characterization of a luciferase isotype in the Japanese firefly, *Luciola cruciata*, involving in the dim glow of firefly eggs. // *Biochemistry.* 2010. Т. 49. № 51. С. 10788–95.
243. Oba Y., Kumazaki M., Inouye S. Characterization of luciferases and its paralogue in the Panamanian luminous click beetle *Pyrophorus angustus*: a click beetle luciferase lacks the fatty acyl-CoA synthetic activity. // *Gene.* 2010. Т. 452. № 1. С. 1–6.
244. Ochi Y. и др. Sensitive detection of chemical-induced genotoxicity by the Cypridina secretory luciferase reporter assay, using DNA repair-deficient strains of *Saccharomyces cerevisiae*. // *Yeast.* 2011. Т. 28. № 4. С. 265–78.
245. Ogo K., Akiyoshi R., Suzuki H. Firefly luciferase. Патент №8722376. USA. Olympus Corporation (Tokyo, JP), Nimura Genetic Solutions Co., Ltd. (Tokyo, JP), Perak State Development Corporation (Perak Darul Ridzuan, MY). , 2014.
246. Ohkuma H. и др. Detection of luciferase having two kinds of luminescent colour based on optical filter procedure: application to an enzyme immunoassay. // *Luminescence.* Т. 15. № 1. С. 21–7.
247. Ohmiya Y. и др. Cloning, expression and sequence analysis of cDNA for the luciferases from the Japanese fireflies, *Pyrocoelia miyako* and *Hotaria parvula* // *Photochem.*

*Photobiol.* 1995. Т. 62. № 2. С. 309–313.

248. Ohmiya Y. и др. Bioluminescence in the Limpet-Like Snail, *Latia neritoides* // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 2005. Т. 78. № 7. С. 1197–1205.

249. Ohtsuka H., Rudie N.G., Wampler J.E. Structural identification and synthesis of luciferin from the bioluminescent earthworm, *Diplocardia longa* // *Biochemistry.* 1976. Т. 15. № 5. С. 1001–1004.

250. Okamoto O.K. и др. Members of a Dinoflagellate Luciferase Gene Family Differ in Synonymous Substitution Rates // *Biochemistry.* 2001. Т. 40. № 51. С. 15862–15868.

251. Oker-Blom C. и др. A baculovirus-expressed fusion protein containing the antibody-binding domain of protein A and insect luciferase. // *Biotechniques.* 1993. Т. 14. № 5. С. 800–9.

252. Österberg E. и др. Evaluation of the adenosine triphosphate test in the diagnosis of urinary tract infection // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1991. Т. 10. № 2. С. 70–73.

253. Oyama H. и др. Gaussia Luciferase as a Genetic Fusion Partner with Antibody Fragments for Sensitive Immunoassay Monitoring of Clinical Biomarkers. // *Anal. Chem.* 2015. Т. 87. № 24. С. 12387–95.

254. Papon N. и др. Illuminating fungal infections with bioluminescence. // *PLoS Pathog.* 2014. Т. 10. № 7. С. e1004179.

255. Patergnani S. и др. Methods to monitor and compare mitochondrial and glycolytic ATP production. // *Methods Enzymol.* 2014. Т. 542. С. 313–32.

256. Patterson S.S. и др. Codon optimization of bacterial luciferase (*lux*) for expression in mammalian cells. // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2005. Т. 32. № 3. С. 115–23.

257. Petushkov V.N. и др. A novel type of luciferin from the Siberian luminous earthworm *Fridericia heliota*: structure elucidation by spectral studies and total synthesis. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2014. Т. 53. № 22. С. 5566–8.

258. Petushkov V.N., Rodionova N.S. New types of luminescent systems of soil enchytraeids (Annelida: Clitellata: Oligochaeta: Enchytraeidae) // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2005. Т. 401. № 1-6. С. 115–118.

259. Pflieger K.D.G. и др. Extended bioluminescence resonance energy transfer (eBRET) for monitoring prolonged protein-protein interactions in live cells. // *Cell. Signal.* 2006. Т. 18. № 10. С. 1664–70.

260. Picaud S. и др. 9H -Purine Scaffold Reveals Induced-Fit Pocket Plasticity of the BRD9 Bromodomain // *J. Med. Chem.* 2015. Т. 58. № 6. С. 2718–2736.

261. Pichler A., Prior J.L., Piwnicka-Worms D. Imaging reversal of multidrug resistance in living mice with bioluminescence: MDR1 P-glycoprotein transports coelenterazine. // *Proc. Natl.*

*Acad. Sci. U. S. A.* 2004. Т. 101. № 6. С. 1702–7.

262. Pietrella D. и др. A luciferase reporter for gene expression studies and dynamic imaging of superficial *Candida albicans* infections. // *Methods Mol. Biol.* 2012. Т. 845. С. 537–46.

263. Ploemen I. и др. Evaluation of immunity against malaria using luciferase-expressing *Plasmodium berghei* parasites. // *Malar. J.* 2011. Т. 10. С. 350.

264. Ploemen I.H.J. и др. Visualisation and quantitative analysis of the rodent malaria liver stage by real time imaging. // *PLoS One.* 2009. Т. 4. № 11. С. e7881.

265. Powers M.L. и др. Expression and characterization of the calcium-activated photoprotein from the ctenophore *Bathocyroe fosteri*: insights into light-sensitive photoproteins. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013. Т. 431. № 2. С. 360–6.

266. Prasher D., McCann R.O., Cormier M.J. Cloning and expression of the cDNA coding for aequorin, a bioluminescent calcium-binding protein // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1985. Т. 126. № 3. С. 1259–1268.

267. Prasher D.C. и др. Sequence comparisons of complementary DNAs encoding aequorin isotypes. // *Biochemistry.* 1987. Т. 26. № 5. С. 1326–32.

268. Prescher J.A., Contag C.H. Guided by the light: visualizing biomolecular processes in living animals with bioluminescence. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2010. Т. 14. № 1. С. 80–9.

269. Prinz A., Diskar M., Herberg F.W. Application of bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for biomolecular interaction studies. // *ChemBiochem.* 2006. Т. 7. № 7. С. 1007–12.

270. Purto K. V и др. The Chemical Basis of Fungal Bioluminescence. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2015. Т. 54. № 28. С. 8124–8.

271. Qu L. и др. Development of a Gaussia luciferase-based human norovirus protease reporter system: cell type-specific profile of Norwalk virus protease precursors and evaluation of inhibitors. // *J. Virol.* 2014. Т. 88. № 18. С. 10312–26.

272. Ray P., Gambhir S.S. Noninvasive imaging of molecular events with bioluminescent reporter genes in living subjects. // *Methods Mol. Biol.* 2007. Т. 411. С. 131–44.

273. Reet N. Van и др. A panel of *Trypanosoma brucei* strains tagged with blue and red-shifted luciferases for bioluminescent imaging in murine infection models. // *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014. Т. 8. № 8. С. e3054.

274. Reeve B. и др. How synthetic biology will reconsider natural bioluminescence and its applications. // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2014. Т. 145. С. 3–30.

275. Robers M.B. и др. Target engagement and drug residence time can be observed in



living cells with BRET. // *Nat. Commun.* 2015. Т. 6. С. 10091.

276. Roda A. и др. Bioluminescence measurement of primary bile acids using immobilized 7 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase: application to serum bile acids. // *J. Lipid Res.* 1982. Т. 23. № 9. С. 1354–61.

277. Roda A. и др. Continuous-flow assays with nylon tube-immobilized bioluminescent enzymes. // *Methods Enzymol.* 1988. Т. 137. С. 161–171.

278. Roda A. и др. Bioengineered bioluminescent magnetotactic bacteria as a powerful tool for chip-based whole-cell biosensors. // *Lab Chip.* 2013. Т. 13. № 24. С. 4881–9.

279. Roura S., Gálvez-Montón C., Bayes-Genis A. Bioluminescence imaging: a shining future for cardiac regeneration. // *J. Cell. Mol. Med.* 2013. Т. 17. № 6. С. 693–703.

280. Rudie N.G., Mulkerrin M.G., Wampler J.E. Earthworm bioluminescence: Characterization of high specific activity *Diplocardia longa* luciferase and the reaction it catalyzes. // *Biochemistry.* 1981. Т. 20. № 2. С. 344–350.

281. Sala-Newby G.B., Thomson C.M., Campbell A.K. Sequence and biochemical similarities between the luciferases of the glow-worm *Lampyrus noctiluca* and the firefly *Photinus pyralis*. // *Biochem. J.* 1996. Т. 313. № 3. С. 761–7.

282. Salipalli S., Singh P.K., Borlak J. Recent advances in live cell imaging of hepatoma cells. // *BMC Cell Biol.* 2014. Т. 15. № 1. С. 26.

283. Salomonsson E. и др. Imaging CXCL12-CXCR4 signaling in ovarian cancer therapy. // *PLoS One.* 2013. Т. 8. № 1. С. e51500.

284. Samanta A. и др. An enzymatically-sensitized sequential and concentric energy transfer relay self-assembled around semiconductor quantum dots. // *Nanoscale.* 2015. Т. 7. № 17. С. 7603–14.

285. Sattler U.G.A. и др. Glycolytic metabolism and tumour response to fractionated irradiation. // *Radiother. Oncol.* 2010. Т. 94. № 1. С. 102–9.

286. Sattler U.G.A., Walenta S., Mueller-Klieser W. A bioluminescence technique for quantitative and structure-associated imaging of pyruvate. // *Lab. Invest.* 2007. Т. 87. № 1. С. 84–92.

287. Schaub F.X. и др. Fluorophore-NanoLuc BRET Reporters Enable Sensitive In Vivo Optical Imaging and Flow Cytometry for Monitoring Tumorigenesis. // *Cancer Res.* 2015. Т. 75. № 23. С. 5023–33.

288. Schipper M.L., Patel M.R., Gambhir S.S. Evaluation of firefly luciferase bioluminescence mediated photodynamic toxicity in cancer cells. // *Mol. Imaging Biol.* 2006. Т. 8. № 4. С. 218–25.

289. Schultz L.W. и др. Crystal structure of a pH-regulated luciferase catalyzing the bioluminescent oxidation of an open tetrapyrrole. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005. Т. 102. № 5. С. 1378–83.
290. Scotto L. и др. Development and characterization of a novel CD19CherryLuciferase (CD19CL) transgenic mouse for the preclinical study of B-cell lymphomas. // *Clin. Cancer Res.* 2012. Т. 18. № 14. С. 3803–11.
291. Senyilmaz D., Teleman A.A. Chicken or the egg: Warburg effect and mitochondrial dysfunction. // *F1000Prime Rep.* 2015. Т. 7. С. 41.
292. Shama G., Malik D.J. The uses and abuses of rapid bioluminescence-based ATP assays. // *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 2013. Т. 216. № 2. С. 115–25.
293. Shimomura O. и др. Properties and reaction mechanism of the bioluminescence system of the deep-sea shrimp *Oplophorus gracilorostris*. // *Biochemistry.* 1978. Т. 17. № 6. С. 994–8.
294. Shimomura O. The roles of the two highly unstable components F and P involved in the bioluminescence of euphausiid shrimps. // *J. Biolumin. Chemilumin.* 1995. Т. 10. № 2. С. 91–101.
295. Shimomura O. и др. Isolation and Properties of the Luciferase Stored in the Ovary of the Scyphozoan Medusa *Periphylla periphylla* // *Biol. Bull.* 2001. Т. 201. № 3. С. 339–347.
296. Shimomura O. *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods.* World Scientific: Singapore, 2006.
297. Shimomura O., Goto T., Hirata Y. Crystalline Cypridina Luciferin // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1957. Т. 30. № 8. С. 929–933.
298. Shimomura O., Johnson F.H. Extraction, Purification, and Properties of the Bioluminescence System of the Euphausiid Shrimp *Meganyctiphanes norvegica* // *Biochemistry.* 1967. Т. 6. № 8. С. 2293–2306.
299. Shimomura O., Johnson F.H. The structure of *Latia* luciferin // *Biochemistry.* 1968a. Т. 7. № 5. С. 1734–1738.
300. Shimomura O., Johnson F.H. Purification and properties of the luciferase and of a protein cofactor in the bioluminescence system of *Latia neritoides* // *Biochemistry.* 1968b. Т. 7. № 7. С. 2574–2580.
301. Shimomura O., Johnson F.H. Mechanism of the luminescent oxidation of Cypridina luciferin // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1971. Т. 44. № 2. С. 340–346.
302. Shimomura O., Johnson F.H., Kohama Y. Reactions Involved in Bioluminescence Systems of Limpet (*Latia neritoides*) and Luminous Bacteria // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1972. Т.

69. № 8. С. 2086–2089.

303. Shimomura O., Johnson F.H., Saiga Y. Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusa, *Aequorea* // *J. Cell. Comp. Physiol.* 1962. Т. 59. № 3. С. 223–239.

304. Short K.R. и др. Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005. Т. 102. № 15. С. 5618–23.

305. Siciliano G., Alano P. Enlightening the malaria parasite life cycle: bioluminescent *Plasmodium* in fundamental and applied research. // *Front. Microbiol.* 2015. Т. 6. С. 391.

306. Slavine N. V, McColl R.W. Semi-automated Image Processing for Preclinical Bioluminescent Imaging. // *J. Appl. Bioinforma. Comput. Biol.* 2015. Т. 4. № 1.

307. Smirnova D. V, Samsonova J. V, Ugarova N.N. The Bioluminescence Resonance Energy Transfer from Firefly Luciferase to a Synthetic Dye and its Application for the Rapid Homogeneous Immunoassay of Progesterone. // *Photochem. Photobiol.* 2016. Т. 92. № 1. С. 158–65.

308. So M.-K. и др. Self-illuminating quantum dot conjugates for in vivo imaging. // *Nat. Biotechnol.* 2006. Т. 24. № 3. С. 339–43.

309. Soldi C. и др. Heck-Matsuda Arylation as a Strategy to Access Kavalactones Isolated from *Polygala sabulosa*, *Piper methysticum*, and Analogues // *European J. Org. Chem.* 2012. Т. 2012. № 19. С. 3607–3616.

310. Song G. и др. A convenient luminescence assay of ferroportin internalization to study its interaction with hepcidin. // *FEBS J.* 2013. Т. 280. № 8. С. 1773–81.

311. Song J. и др. Visualization and quantification of simian immunodeficiency virus-infected cells using non-invasive molecular imaging. // *J. Gen. Virol.* 2015. Т. 96. № 10. С. 3131–42.

312. Spronken M.I. и др. Optimisations and Challenges Involved in the Creation of Various Bioluminescent and Fluorescent Influenza A Virus Strains for In Vitro and In Vivo Applications. // *PLoS One.* 2015. Т. 10. № 8. С. e0133888.

313. Stacer A.C. и др. NanoLuc reporter for dual luciferase imaging in living animals. // *Mol. Imaging.* 2013. Т. 12. № 7. С. 1–13.

314. Stanley P.E. Determination of subpicomole levels of NADH and FMN using bacterial luciferase and the liquid scintillation spectrometer // *Anal. Biochem.* 1971. Т. 39. № 2. С. 441–453.

315. Stevani C. V и др. Current status of research on fungal bioluminescence: biochemistry and prospects for ecotoxicological application. // *Photochem. Photobiol.* 2013. Т.

89. № 6. С. 1318–26.

316. Stoddart L.A. и др. Application of BRET to monitor ligand binding to GPCRs. // *Nat. Methods*. 2015. Т. 12. № 7. С. 661–3.

317. Stöhr J. и др. Distinct synthetic A $\beta$  prion strains producing different amyloid deposits in bigenic mice. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014. Т. 111. № 28. С. 10329–34.

318. Stolz U. и др. Darwinian natural selection for orange bioluminescent color in a Jamaican click beetle. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003. Т. 100. № 25. С. 14955–9.

319. Su L. и др. Microbial biosensors: a review. // *Biosens. Bioelectron.* 2011. Т. 26. № 5. С. 1788–99.

320. Subleski J.J. и др. Serum-based tracking of de novo initiated liver cancer progression reveals early immunoregulation and response to therapy. // *J. Hepatol.* 2015. Т. 63. № 5. С. 1181–9.

321. Sun C. и др. Stable, high-level expression of reporter proteins from improved alphavirus expression vectors to track replication and dissemination during encephalitic and arthritogenic disease. // *J. Virol.* 2014. Т. 88. № 4. С. 2035–46.

322. Suree N. и др. A novel HIV-1 reporter virus with a membrane-bound Gaussia princeps luciferase. // *J. Virol. Methods*. 2012. Т. 183. № 1. С. 49–56.

323. Suzuki C. и др. A new additional reporter enzyme, dinoflagellate luciferase, for monitoring of gene expression in mammalian cells. // *Gene*. 2005. Т. 344. С. 61–6.

324. Szittner R., Meighen E. Nucleotide sequence, expression, and properties of luciferase coded by lux genes from a terrestrial bacterium. // *J. Biol. Chem.* 1990. Т. 265. № 27. С. 16581–16587.

325. Takakura H. и др. Visualization and quantitative analysis of G protein-coupled receptor- $\beta$ -arrestin interaction in single cells and specific organs of living mice using split luciferase complementation. // *ACS Chem. Biol.* 2012. Т. 7. № 5. С. 901–10.

326. Takenaka Y. и др. Two forms of secreted and thermostable luciferases from the marine copepod crustacean, *Metridia pacifica*. // *Gene*. 2008. Т. 425. № 1-2. С. 28–35.

327. Takenaka Y. и др. Evolution of bioluminescence in marine planktonic copepods. // *Mol. Biol. Evol.* 2012. Т. 29. № 6. С. 1669–81.

328. Takenaka Y. и др. Computational analysis and functional expression of ancestral copepod luciferase. // *Gene*. 2013. Т. 528. № 2. С. 201–5.

329. Tan K.S. и др. Rapid method for the detection of root canal bacteria in endodontic therapy. // *J. Endod.* 2015. Т. 41. № 4. С. 447–50.

330. Tanahashi Y. и др. Continuous measurement of targeted promoter activity by a

secreted bioluminescence reporter, *Vargula hilgendorffii* luciferase. // *Anal. Biochem.* 2001. Т. 289. № 2. С. 260–6.

331. Tannous B.A., Teng J. Secreted blood reporters: insights and applications. // *Biotechnol. Adv.* 2011. Т. 29. № 6. С. 997–1003.

332. Tatsumi H. и др. Luciferase cDNA from Japanese firefly, *Luciola cruciata*: cloning, structure and expression in *Escherichia coli*. // *J. Biolumin. Chemilumin.* Т. 3. № 2. С. 75–8.

333. Tatsumi H. и др. Construction of biotinylated firefly luciferases using biotin acceptor peptides. // *Anal. Biochem.* 1996. Т. 243. № 1. С. 176–80.

334. Tatsumi H., Kajiyama N., Nakano E. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of a cDNA clone encoding luciferase of a firefly, *Luciola lateralis* // *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* 1992. Т. 1131. № 2. С. 161–165.

335. Thompson E.M., Nagata S., Tsuji F.I. Cloning and expression of cDNA for the luciferase from the marine ostracod *Vargula hilgendorffii*. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1989. Т. 86. № 17. С. 6567–6571.

336. Thompson E.M., Nagata S., Tsuji F.I. *Vargula hilgendorffii* luciferase: a secreted reporter enzyme for monitoring gene expression in mammalian cells. // *Gene.* 1990. Т. 96. № 2. С. 257–62.

337. Thorne S.H., Contag C.H. Using in Vivo Bioluminescence Imaging to Shed Light on Cancer Biology // *Proc. IEEE.* 2005. Т. 93. № 4. С. 750–762.

338. Titushin M.S. и др. Coelenterazine-binding protein of *Renilla muelleri*: cDNA cloning, overexpression, and characterization as a substrate of luciferase. // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2008. Т. 7. № 2. С. 189–96.

339. Tochigi Y. и др. Sensitive and convenient yeast reporter assay for high-throughput analysis by using a secretory luciferase from *Cypridina noctiluca*. // *Anal. Chem.* 2010. Т. 82. № 13. С. 5768–76.

340. Tran V. и др. Highly sensitive real-time in vivo imaging of an influenza reporter virus reveals dynamics of replication and spread. // *J. Virol.* 2013. Т. 87. № 24. С. 13321–9.

341. Tran V. и др. Multi-Modal Imaging with a Toolbox of Influenza A Reporter Viruses. // *Viruses.* 2015. Т. 7. № 10. С. 5319–27.

342. Troy T. и др. Quantitative comparison of the sensitivity of detection of fluorescent and bioluminescent reporters in animal models. // *Mol. Imaging.* 2004. Т. 3. № 1. С. 9–23.

343. Tsutomu M., Hiroki T., Eiichi N. Cloning and sequence analysis of cDNA for luciferase of a Japanese firefly, *Luciola cruciata* // *Gene.* 1989. Т. 77. № 2. С. 265–270.

344. Uebelhoer L.S. и др. High-throughput, luciferase-based reverse genetics systems for

identifying inhibitors of Marburg and Ebola viruses. // *Antiviral Res.* 2014. Т. 106. С. 86–94.

345. Ura S. и др. Single cell reporter assay using cell surface displayed Vargula luciferase. // *J. Biosci. Bioeng.* 2001. Т. 92. № 6. С. 575–9.

346. Verhaegent M., Christopoulos T.K. Recombinant Gaussia luciferase. Overexpression, purification, and analytical application of a bioluminescent reporter for DNA hybridization. // *Anal. Chem.* 2002. Т. 74. № 17. С. 4378–85.

347. Vidugiriene J. и др. Bioluminescent cell-based NAD(P)/NAD(P)H assays for rapid dinucleotide measurement and inhibitor screening. // *Assay Drug Dev. Technol.* 2014. Т. 12. № 9-10. С. 514–26.

348. Villalobos V. и др. Dual-color click beetle luciferase heteroprotein fragment complementation assays. // *Chem. Biol.* 2010. Т. 17. № 9. С. 1018–29.

349. Vinayak S. и др. Genetic modification of the diarrhoeal pathogen *Cryptosporidium parvum*. // *Nature.* 2015. Т. 523. № 7561. С. 477–80.

350. Virostko J. и др. Bioluminescence imaging reveals dynamics of beta cell loss in the non-obese diabetic (NOD) mouse model. // *PLoS One.* 2013. Т. 8. № 3. С. e57784.

351. Virta M. и др. Real-time measurement of cell permeabilization with low-molecular-weight membranolytic agents. // *J. Antimicrob. Chemother.* 1995. Т. 36. № 2. С. 303–15.

352. Virta M. и др. Kinetic measurement of the membranolytic activity of serum complement using bioluminescent bacteria // *J. Immunol. Methods.* 1997. Т. 201. № 2. С. 215–221.

353. Virta M., Karp M., Vuorinen P. Nitric oxide donor-mediated killing of bioluminescent *Escherichia coli*. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994. Т. 38. № 12. С. 2775–9.

354. Viviani V.R. и др. Cloning and characterization of the cDNA for the Brazilian *Cratomorphus distinctus* larval firefly luciferase: similarities with European *Lampyrus noctiluca* and Asiatic *Pyrocoelia luciferases*. // *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 2004. Т. 139. № 2. С. 151–6.

355. Viviani V.R. и др. A New Firefly Luciferase with Bimodal Spectrum: Identification of Structural Determinants of Spectral pH-Sensitivity in Firefly Luciferases // *Photochem. Photobiol.* 2007. Т. 81. № 4. С. 843–848.

356. Viviani V.R. и др. A new blue-shifted luciferase from the Brazilian *Amydetes fanestratus* (Coleoptera: Lampyridae) firefly: molecular evolution and structural/functional properties. // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2011. Т. 10. № 12. С. 1879–86.

357. Viviani V.R. и др. Bioluminescence of beetle luciferases with 6'-amino-D-luciferin analogues reveals excited keto-oxyluciferin as the emitter and phenolate/luciferin binding site

interactions modulate bioluminescence colors. // *Biochemistry*. 2014. Т. 53. № 32. С. 5208–20.

358. Viviani V.R. и др. Correction: A new blue-shifted luciferase from the Brazilian *Amydetes fanestratus* (Coleoptera: Lampyridae) firefly: molecular evolution and structural/functional properties. // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2015.

359. Viviani V.R., Bechara E.J., Ohmiya Y. Cloning, sequence analysis, and expression of active *Phrixothrix railroad-worms* luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. // *Biochemistry*. 1999. Т. 38. № 26. С. 8271–9.

360. Патент № US7276363 B2. USA. Viviani V.R., Ohmiya Y. Nucleic acid molecules encoding red and green emitting luciferases // 2007.

361. Wampler J.E., Mulkerrin M.G., Rich E.S. Instrumentation and techniques for analysis of hydrogen peroxide and peroxide-producing reactions involving earthworm (*Diplocardia longa*) bioluminescence. // *Clin. Chem.* 1979. Т. 25. № 9. С. 1628–34.

362. Wang J. и др. Activation of Rab8 guanine nucleotide exchange factor Rabin8 by ERK1/2 in response to EGF signaling. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2015a. Т. 112. № 1. С. 148–53.

363. Wang Y. и др. Noninvasive imaging of tumor burden and molecular pathways in mouse models of cancer. // *Cold Spring Harb. Protoc.* 2015b. Т. 2015. № 2. С. 135–44.

364. Wang Z. и др. Establishment of a High-Throughput Assay to Monitor Influenza A Virus RNA Transcription and Replication. // *PLoS One*. 2015c. Т. 10. № 7. С. e0133558.

365. Wang Z., Yeung E.S. Selective detection of neurotransmitters by fluorescence and chemiluminescence imaging // *Pure Appl. Chem.* 2001. Т. 73. № 10. С. 1599–1611.

366. Wannlund J.C. Analytical applications of firefly luciferase // *TrAC Trends Anal. Chem.* 1983. Т. 2. № 1. С. 7–9.

367. Warawa J.M., Lawrenz M.B. Bioluminescent imaging of bacteria during mouse infection. // *Methods Mol. Biol.* 2014. Т. 1098. С. 169–81.

368. Warburg O. The Metabolism of Carcinoma Cells // *J. Cancer Res.* 1925. Т. 9. № 1. С. 148–163.

369. Wassink E.C. Luminescence in Fungi in *Bioluminescence in Action* / под ред. H.P. (ed). London: Academic Press, 1978. С. 171–197.

370. Watanabe T. и др. Multichannel perfusion culture bioluminescence reporter system for long-term detection in living cells. // *Anal. Biochem.* 2010. Т. 402. № 1. С. 107–9.

371. Watts J.C. и др. Transmission of multiple system atrophy prions to transgenic mice. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013. Т. 110. № 48. С. 19555–60.

372. Watts J.C. и др. Serial propagation of distinct strains of A $\beta$  prions from Alzheimer's

disease patients. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014. Т. 111. № 28. С. 10323–8.

373. Welsh D.K., Kay S.A. Bioluminescence imaging in living organisms. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2005. Т. 16. № 1. С. 73–8.

374. Wibom R., Hultman E. ATP production rate in mitochondria isolated from microsomes of human muscle. // *Am. J. Physiol.* 1990. Т. 259. № 2. С. E204–9.

375. Wood K. V и др. Complementary DNA coding click beetle luciferases can elicit bioluminescence of different colors. // *Science.* 1989. Т. 244. № 4905. С. 700–2.

376. Wood K. V, Lam Y.A., McElroy W.D. Introduction to beetle luciferases and their applications. // *J. Biolumin. Chemilumin.* 1989. Т. 4. № 1. С. 289–301.

377. Woodland Hastings J., Dunlap J.C. Cell-free components in dinoflagellate bioluminescence. The particulate activity: Scintillons; the soluble components: Luciferase, luciferin, and luciferin-binding protein. // *Methods in Enzymology.* 1986. Т. 133. С. 307-327.

378. Wu C. и др. Preparation of biotinylated cypridina luciferase and its use in bioluminescent enzyme immunoassay. // *Anal. Chem.* 2007. Т. 79. № 4. С. 1634–8.

379. Wu C. и др. A bioluminescent enzyme immunoassay for prostaglandin E(2) using Cypridina luciferase. // *Luminescence.* 2009a. Т. 24. № 2. С. 131–3.

380. Wu C. и др. In vivo far-red luminescence imaging of a biomarker based on BRET from Cypridina bioluminescence to an organic dye. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009b. Т. 106. № 37. С. 15599–603.

381. Wu C. и др. Chemical studies on the BRET system between the bioluminescence of Cypridina and quantum dots. // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2011. Т. 10. № 10. С. 1531–4.

382. Xu T. и др. Detection of organic compounds with whole-cell bioluminescent bioassays. // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2014. Т. 144. С. 111–51.

383. Xu Y., Piston D.W., Johnson C.H. A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: Application to interacting circadian clock proteins // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999. Т. 96. № 1. С. 151–156.

384. Xueyan L., Shuang Y., Xingcai L. Phylogenetic relationship of the firefly, *Diaphanes pectinealis* (Insecta, Coleoptera, Lampyridae) based on DNA sequence and gene structure of luciferase // *Zool. Res.* 2006. Т. 27. № 4. С. 367–374.

385. Yamada Y. и др. Monitoring circadian time in rat plasma using a secreted Cypridina luciferase reporter. // *Anal. Biochem.* 2013. Т. 439. № 2. С. 80–7.

386. Yamagishi K., Enomoto T., Ohmiya Y. Perfusion-culture-based secreted bioluminescence reporter assay in living cells. // *Anal. Biochem.* 2006. Т. 354. № 1. С. 15–21.

387. Yamashita H., Nguyen D.T., Chung E. Blood-based assay with secreted *Gaussia*



luciferase to monitor tumor metastasis. // *Methods Mol. Biol.* 2014. Т. 1098. С. 145–51.

388. Ye L. и др. Cloning and sequencing of a cDNA for firefly luciferase from *Photuris pennsylvanica* // *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1997. Т. 1339. № 1. С. 39–52.

389. Yin H. и др. Enhancing pancreatic Beta-cell regeneration in vivo with pioglitazone and alogliptin. // *PLoS One.* 2013. Т. 8. № 6. С. e65777.

390. Zhang J., Li H. Heterogeneity of tumor chemosensitivity in ovarian epithelial cancer revealed using the adenosine triphosphate-tumor chemosensitivity assay. // *Oncol. Lett.* 2015. Т. 9. № 5. С. 2374–2380.

391. Zhang L. и др. A novel ultrasensitive bioluminescent receptor-binding assay of INSL3 through chemical conjugation with nanoluciferase // *Biochimie.* 2013a. Т. 95. № 12. С. 2454–2459.

392. Zhang P.-T. и др. Generation of a recombinant West Nile virus stably expressing the Gaussia luciferase for neutralization assay. // *Virus Res.* 2016. Т. 211. С. 17–24.

393. Zhang Y. и др. ATP-tumor chemosensitivity assay directed chemotherapy in patients with cervical cancer // *Zhong Nan Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ban.* 2013b. Т. 38. № 12. С. 1223–7.

394. Царькова А. С. Синтез люциферина люминесцентного червя *Fridericia heliota* и его аналогов: диссертация кандидата химических наук: 02.00.10 // Москва, 2015.

395. DCS - Innovative Diagnostik-Systeme [Электронный ресурс]. URL: <http://www.dcs-diagnostics.de/tca/index.php> (дата обращения: 25.08.2015).

396. Восьмая формула света - Пресс-центр - ИБХ РАН [Электронный ресурс]. URL: <http://www.ibch.ru/press/news/science/904> (дата обращения: 18.08.2015).

397. Overview of protein interaction assay [Электронный ресурс]. URL: <http://www.nkato.biology.lsu.edu/methods/Protocolinfo.html> (дата обращения: 05.03.2016).

398. Promega 2015 Life Science Catalog. Singapore: Promega Corporation, 2014. 427 С.

399. Products - Promicol [Электронный ресурс]. URL: <http://www.promicol.nl/products/> (дата обращения: 09.09.2015).

400. Rapid microbiological testing systems for processed consumer products - Celsis [Электронный ресурс]. URL: <http://www.celsis.com/our-products> (дата обращения: 09.09.2015).

401. Food&Beverage - Comparison Chart - Compare ATP monitoring Systems Side By Side [Электронный ресурс]. URL: <http://www.hygiene.com/comparison-chart-food-and-beverage.html> (дата обращения: 09.09.2015).

402. Bioluminescent Reporters [Электронный ресурс]. URL:

<https://worldwide.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/bioluminescent-reporters/> (дата обращения: 29.10.2015).

403. Glowing Plant [Электронный ресурс]. URL: <http://www.glowingplant.com/> (дата обращения: 18.02.2016).