

СХОДСТВО И РАЗЛИЧИЯ ЛЮЦИФЕРАЗ ПОЛИХЕТ *CHAETOPTERUS VARIOPEDATUS* В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МЕСТА ИХ ОБИТАНИЯ

К. В. Пуртов¹, В. Н. Петушков¹, Н. С. Родионова¹, Т. В. Чепурных², В. Б. Кожемяко³, Р. И. Загитова², А. С. Щеглов^{2,4} ✉, Р. Х. Зиганшин², А. С. Царькова^{2,4}

¹ Институт биофизики, Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской Академии наук, Россия

² Институт биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Москва, Россия

³ Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток, Россия

⁴ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Морские полихеты *Chaetopterus variopedatus* (Renier) (семейство *Chaetopteridae*) — космополиты, представляющие собой видовой комплекс из отдельных популяций-подвидов. При раздражении черви выпускают светящиеся (460 нм) облака слизи, при этом часто ярко светятся и их параподии. На сегодняшний день по-прежнему не ясно, как именно работает биолюминесцентная система этих полихет. Ранее было выдвинуто предположение, что люцифераза *C. variopedatus* может быть использована для детекции ферроптоза — недавно открытого пути программируемой клеточной гибели, вызванной накоплением ионов двухвалентного железа. Целью исследования было выделить и охарактеризовать люциферазы *C. variopedatus*, а также сравнить люциферазы *C. variopedatus* из разных популяций. При выделении ответственного за биолюминесценцию фермента из замороженных образцов бразильских *C. variopedatus* по усовершенствованной методике были получены две активные люциферазы — L1 и L2. Предположив, что одна из указанных люцифераз определяет свечение слизи, а другая — свечение параподий червей, эту же методику применили к раздельным образцам слизи и параподий живых дальневосточных *C. variopedatus*. Однако их слизь оказалась несветящейся. Показано, что функцию свечения параподий полихет *C. variopedatus* обеспечивает люцифераза L2, так как она обнаружена в общей биомассе бразильских полихет и в параподиях дальневосточных полихет. Свечение слизи бразильских *C. variopedatus* обусловлено функционированием люциферазы L1, которая отсутствует в слизи дальневосточного подвида. Набор изоформ люцифераз полихет *C. variopedatus* зависит от места их обитания.

Ключевые слова: биолюминесценция, люцифераза, полихеты, *Chaetopterus variopedatus*, морские черви

Благодарности: профессору Андерсону Оливейра и младшему научному сотруднику Джереми Мирза (Океанографический институт Университета Сан-Паулу) за помощь в сборе биомассы бразильских полихет, а также директору Института Мирового океана Дальневосточного федерального университета Кириллу Винникову за консультации по вопросам систематики *Chaetopterus*.

Вклад авторов: К. В. Пуртов, В. Н. Петушков, Н. С. Родионова — выделение люциферазы; Т. В. Чепурных — выделение ДНК, проведение ПЦР; В. Б. Кожемяко — сбор и подготовка биомассы для выделения люциферазы; Р. И. Загитова, А. С. Щеглов — исследование свойств люцифераз; Р. Х. Зиганшин — масс-спектрометрический анализ; А. С. Царькова — общее руководство проектом.

✉ **Для корреспонденции:** Александр Сергеевич Щеглов
ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, г. Москва, 117997, Россия; jukart@mail.ru

Статья получена: 28.09.2021 **Статья принята к печати:** 12.10.2021 **Опубликована онлайн:** 26.10.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.049

SIMILARITIES AND DIFFERENCES BETWEEN THE *CHAETOPTERUS VARIOPEDATUS* POLYCHAETE LUCIFERASES DEPENDING ON THE TYPE OF HABITAT

Purtov KV¹, Petushkov VN¹, Rodionova NS¹, Chepurnykh TV², Kozhemyako VB³, Zagitova RI², Shcheglov AS^{2,4} ✉, Ziganshin RH², Tsarkova AS^{2,4}

¹ Institute of Biophysics, Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Russia

² Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia

³ Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia

⁴ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

The marine polychaete *Chaetopterus variopedatus* (Renier) (family *Chaetopteridae*) is a cosmopolitan species complex, consisting of distinct populations/subspecies. The worms release glowing (460 nm) clouds of mucus when disturbed, and their parapodia often glow brightly. Currently, it is still unclear how exactly the bioluminescence system of these polychaetes functions. It has been previously assumed that the *C. variopedatus* luciferase may be used for detection of ferroptosis, the recently explored pathway of programmed cell death, resulting from accumulation of the ferrous ions. This study was aimed to extract and characterize the *C. variopedatus* luciferases, as well as to compare luciferases obtained from *C. variopedatus* of different populations. When extracting the enzyme responsible for bioluminescence from the frozen samples of Brazilian *C. variopedatus* using the improved method, two active luciferases, L1 and L2, were obtained. We assumed that one of the listed above luciferases was responsible for luminescence of the mucus and the other luciferase was responsible for luminescence in parapodia, and used the method for the distinct samples of mucus and parapodia of the living Far Eastern *C. variopedatus*. However, mucus of the latter turned out to be non-glowing. It is shown that luciferase L2 is responsible for luminescence in the parapodia of the *C. variopedatus* polychaete, since this luciferase has been found in the total biomass of Brazilian polychaetes and parapodia of Far Eastern polychaetes. Luminescence of the Brazilian *C. variopedatus* mucus is attributed to the functioning of luciferase L1, which is lacking in the mucus of the Far Eastern subspecies. The range of luciferase isoforms in polychaetes *C. variopedatus* depends on the place of origin.

Keywords: bioluminescence, luciferase, polychaetes, *Chaetopterus variopedatus*, marine worms

Acknowledgements: we would like to thank Anderson Oliveira, Professor, and Jeremy Mirza, junior researcher at the Oceanographic Institute of the University of São Paulo for assistance in collecting the biomass of Brazilian polychaetes, and Kirill Vinnikov, Director at the Institute of Marine Biology, Far Eastern Federal University, for advice on the *Chaetopterus* taxonomy.

Author contribution: Purtov KV, Petushkov VN, Rodionova NS — luciferase extraction; Chepurnykh TV — DNA extraction, PCR; Kozhemyako VB — biomass collection and preparation for luciferase extraction; Zagitova RI, Shcheglov AS — studying the properties of luciferases; Ziganshin RH — mass spectrometry; Tsarkova AS — overall project management.

✉ **Correspondence should be addressed:** Aleksandr S. Shcheglov
Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, 117997, Russia; jukart@mail.ru

Received: 28.09.2021 **Accepted:** 12.10.2021 **Published online:** 26.10.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.049

Chaetopterus variopedatus (Renier) относится к семейству *Chaetopteridae*, одному из наиболее дифференцированных среди морских полихет, ведущих на взрослой стадии развития бентосный образ жизни, за исключением необычного пелагического вида *C. pugaporcinus* (Osborn) [1]. Разные исследователи описывают *C. variopedatus* как видовой комплекс, состоящий из нескольких отдельных популяций-подвидов [2–4]. *C. variopedatus* — космополит, обитает в умеренных и тропических регионах по всему миру. Разные подвиды *C. variopedatus* встречаются в прибрежных районах России, Японии, Австралии, Бразилии, Европы и США [5]. Несколько лет назад филогенетические отношения в семействе *Chaetopteridae* были пересмотрены [1, 6], однако для *C. variopedatus sensu lato* (Hartman) до сих пор нет полной ясности в этом вопросе.

C. variopedatus живет, прячась в построенной самостоятельно погруженной в грунт U-образной пергаментной трубке. У него сегментированное тело с парными конечностями — параподиями. В ответ на агрессивное воздействие извне *C. variopedatus* выпускает облако светящейся голубым светом (с максимумом на 460 нм) слизи [7]. При этом также ярко светятся параподии всех сегментов тела червя. Это явление издавна привлекало внимание любопытных наблюдателей, о чем свидетельствуют многочисленные публикации. Многие исследователи на протяжении последних 70 лет пытались понять биохимические аспекты процесса свечения *C. variopedatus* [8–10]. Однако результаты довольно противоречивы, и на сегодняшний день по-прежнему не ясно, как именно работает биолюминесцентная система этих полихет.

Ранее мы писали, что из биомассы *C. variopedatus*, собранной в проливе Сан-Себастьян побережья Бразилии, за несколько этапов очистки был получен препарат люциферазы, с которым воспроизведена характерная биолюминесцентная реакция *in vitro*. Для этого к препарату добавляли спиртовой экстракт *C. variopedatus*, содержащий основной субстрат (люциферин) и ионы двухвалентного железа [11].

Мы предположили, что люцифераза *C. variopedatus* может быть использована для детекции ферроптоза [12] — недавно открытого пути программируемой клеточной гибели, вызванной накоплением ионов двухвалентного железа [13]. Изучение ферроптоза важно как для фундаментальной науки, так и для прикладных биомедицинских разработок. Показано, что процессы, похожие на ферроптоз, имеют место при некоторых нейродегенеративных заболеваниях [14]. Кроме того, индукторы ферроптоза представляют собой перспективные противоопухолевые препараты [15].

Таким образом, детальная характеристика и расшифровка биолюминесцентной системы *C. variopedatus* является актуальной научной задачей. Целью исследования было выделить и охарактеризовать люциферазы *C. variopedatus*, а также сравнить люциферазы *C. variopedatus* из разных популяций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор биомассы *C. variopedatus*

Вылов *C. variopedatus* производили в двух местах: проливе Сан-Себастьян побережья Бразилии и бухте Троицы залива Посьета Японского моря. Особей извлекали из домиков и немедленно замораживали в жидком азоте.

Транспортировку замороженных полихет осуществляли на сухом льду, а хранение — при температуре $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Для получения светящейся слизи червей извлекали из домика, помещали в морскую воду и механически стимулировали в темноте. Светящуюся слизь собирали пипеткой и замораживали в жидком азоте.

Выделение люциферазы

100 г замороженной биомассы *C. variopedatus* гомогенизировали в 900 мл 50 мМ Трис-буфера, pH 7,5. Гомогенат обрабатывали ультразвуком с помощью ультразвукового гомогенизатора Ultrasonic Disintegrator UD-20 (Techpan; Польша) 5 раз по 2 мин на льду, а затем центрифугировали (25 000 g x 20 мин) при 4 °C. К супернатанту добавляли сульфат аммония до конечной концентрации 500 мМ и пропускали через колонку с ДЭАЭ-целлюлозой (Cellulose DEAE-32, Serva; Германия), уравновешенную 500 мМ сульфатом аммония. Полученный фильтрат наносили на колонку 25 x 100 мм Phenyl Sepharose CL-4B (Cytiva; США), уравновешенную 500 мМ сульфата аммония. Люциферазу элюировали 5 мМ Трис-HCl буфером, pH 7,5.

Фракции с люциферазной активностью объединяли и наносили на колонку 16 x 200 мм Sepharose DEAE FF (Cytiva; США), уравновешенную 20 мМ Трис-HCl, pH 7,5; промывали этим же буфером и элюировали линейным градиентом. Буфер А — 20 мМ Трис-HCl, pH 7,5, буфер Б — 500 мМ NaCl, 20 мМ Трис-HCl, pH 7,5. Скорость потока — 4 мл/мин, время градиента — 25 мин.

Полученный препарат концентрировали на ячейке 10 кДа (Amicon; Ирландия) и наносили на колонку 26 x 400 мм с сорбентом Sephacryl S200 (Cytiva; США), уравновешенную 200 мМ NaCl с 20 мМ Трис-HCl, pH 7,5. Элюцию проводили этим же буфером со скоростью 1,5 мл/мин. К объединенным фракциям с люциферазной активностью добавляли сульфат аммония до конечной концентрации 500 мМ и наносили полученный раствор на колонку 5 x 90 мм с сорбентом C8 (Cytiva; США). Элюцию проводили линейным градиентом. Буфер А — 500 мМ сульфата аммония, 5 мМ Трис-HCl, pH 7,5, буфер Б — 5 мМ Трис-HCl, pH 7,5. Скорость потока — 0,5 мл/мин, время градиента — 80 мин.

Полученный препарат люциферазы разводили в два раза дистиллированной водой и наносили на колонку 3 x 50 мм с сорбентом monoQ (Cytiva; США), уравновешенную 20 мМ Трис-HCl, pH 7,5, промывали тем же буфером и элюировали линейным градиентом. Буфер А — 20 мМ Трис-HCl pH 7,5, буфер Б — 500 мМ NaCl, 20 мМ Трис-HCl, pH 7,5. Скорость потока — 0,5 мл/мин, время градиента — 80 мин.

Препарат концентрировали на центрифужном фильтре 10 кДа (Amicon; Ирландия) до 200 мкл, затем проводили гель-фильтрацию на колонке 10 x 300 мм Superdex 200 (Cytiva; США), уравновешенной 100 мМ NaCl, 50 мМ Трис-HCl, pH 7,5. Элюцию проводили этим же буфером со скоростью 0,8 мл/мин.

Люциферазу из светящейся слизи (10 мл) выделяли аналогичным образом. Измерение активности люциферазы проводили по ранее разработанному протоколу [11].

Для определения видовой специфичности имеющихся образцов *Chaetopterus* использовали праймеры HCO2198 (5'-TAAACTTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') и LCO1490 (5'-TCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'). Была выделена ДНК каждого из образцов замороженных тканей

C. variopedatus — для этого использовали набор реактивов ExtractDNA Blood & Cells («Евроген»; Россия). После этого с помощью указанных праймеров амплифицировали последовательности фрагмента гена COI длиной 650 п.н., используя в качестве матрицы ДНК каждого из образцов замороженных тканей. Полученные продукты ПЦР были секвенированы по Сенгеру.

Масс-спектрометрический анализ препаратов очищенных люцифераз бразильских и дальневосточных *C. variopedatus* проводили на масс-спектрометре Q Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific; США), сопряженном с хроматографом Ultimate 3000 Nano LC System (Thermo Fisher Scientific; США), посредством наноэлектроспрейного источника ионизации (Thermo Fisher Scientific; США). При масс-спектрометрическом анализе использовали следующие параметры: разрешение — 140 000, диапазон сканирования — 500–2000 m/z, уровень AGC — 3×10^6 , максимальное время инъекции ионов — 30 мсек. Полученные первичные данные визуализировали при помощи программы XCalibur (Thermo Fisher Scientific; США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Применение анионообменной хроматографии высокого разрешения привело к разделению целевого препарата на две практически гомогенные люциферазы: L1 с временем удержания 21,5 мин и L2 с временем удержания 46 мин (рис. 1). Их нативные молекулярные массы, рассчитанные по результатам гель-фильтрации, составили 70 кДа и 60 кДа соответственно (рис. 2).

В денатурирующих условиях SDS-фореза люцифераза L1 состоит из моносубъединиц, примерно по 18 кДа каждая, а L2 — как минимум из двух разных субъединиц массой около 18 и 15 кДа (рис. 3).

Присутствие в одном животном двух разных люцифераз может свидетельствовать о их различном происхождении или об особенностях функционирования [16, 17]. Хотя люминесценция *C. variopedatus* одноцветная (синяя),

вероятно, каждая из его люцифераз функционирует локально: например, одна определяет свечение пароподий, другая — свечение слизи, выделяемой червем во внешнюю среду.

Для проверки этой гипотезы использовали образец слизи, собранной и отдельно замороженной при ловле бразильских *C. variopedatus*. Хроматографический анализ препарата, очищенного по приведенной выше методике, показал присутствие только одной люциферазы, причем время ее удержания на колонке monoQ (45,5 мин) практически совпало с таковым для L1, выделенной ранее из тотальной биомассы червя (см. рис. 1). Отдельных образцов пароподий бразильских полихет не было, а количества полученных препаратов L1 и L2 оказалось недостаточно для их сиквенса. Поэтому авторы обратились к более близкому источнику таких червей — дальневосточному побережью России.

Полихеты, выловленные в бухте Троицы залива Посыета Японского моря, изначально были определены как *C. variopedatus* по морфологическим признакам и доставлены в лабораторию живыми. Для более точного определения видовой специфичности имеющихся *Chaetopterus* авторы секвенировали фрагмент гена первой субъединицы цитохром С оксидазы (COI) длиной 650 п. н. Анализ последовательностей по базе данных GenBank показал, что фрагменты COI бразильского и дальневосточного образцов с высокой степенью гомологии (более 99%) принадлежат двум разным подвидам: *C. variopedatus* (AM503096.1) и *C. cautus* Marenzeller (LC533809.1) соответственно. В настоящее время они объединены в один видовой комплекс *C. variopedatus* [6].

В процессе сбора дальневосточных полихет выделяемую ими слизь замораживали отдельно. После размораживания в лаборатории не удалось зарегистрировать ее люминесценцию. Порции свежей слизи, полученные в ответ на механическую и химическую стимуляцию живых червей, тоже не светились. Добавка люциферина и двухвалентного железа к образцам слизи также не

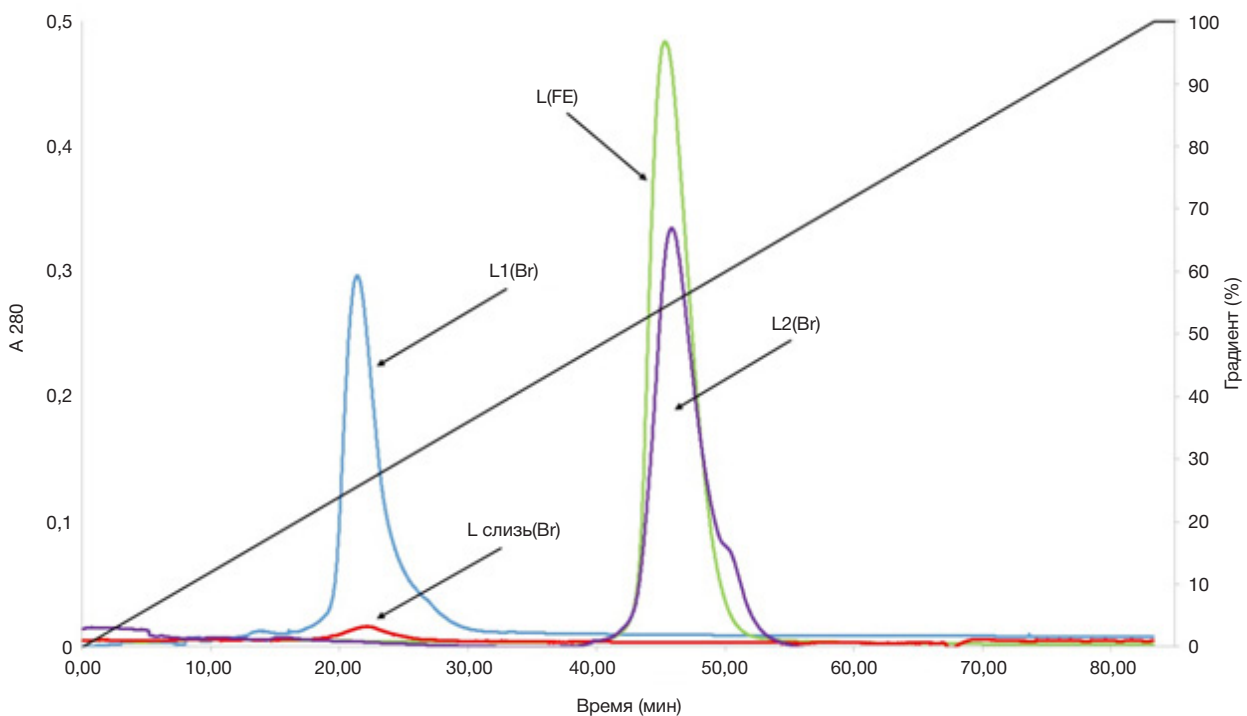


Рис. 1. Время удержания различных люцифераз *C. variopedatus* при хроматографировании на анионообменной колонке monoQ, линейный градиент; Br — бразильские полихеты, FE — дальневосточные полихеты

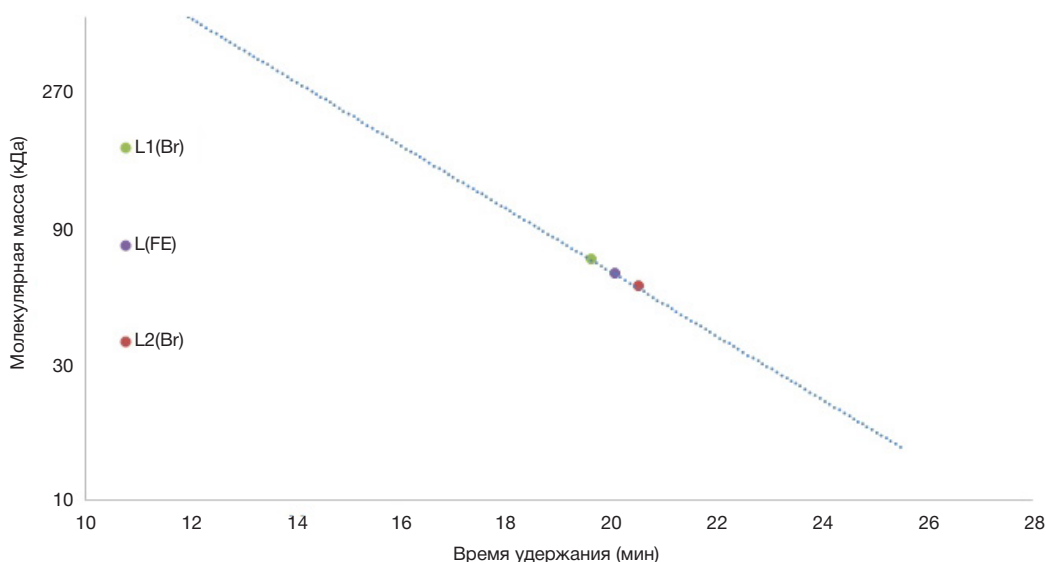


Рис. 2. Определение молекулярных масс различных люцифераз *C. variopedatus* с помощью гель-фильтрации; Br — бразильские полихеты, FE — дальневосточные полихеты

приводила к светоизлучению. Попытки выделить из образцов слизи какую-либо люциферазу по приведенной выше методике успехом не увенчались.

С регистрацией свечения пароподий дальневосточных полихет проблем не возникло. Из них удалось выделить высокоочищенную люциферазу L(FE) с нативной молекулярной массой 65 кДа (см. рис. 2). Время удержания этой люциферазы на колонке топоQ — 45,5 мин, что практически совпадает с таковым для люциферазы L2 (см. рис. 1). На денатурирующем SDS-форезе видно, что L(FE), как и L2 бразильских полихет, состоит из двух различных субъединиц. Молекулярные массы субъединиц этих белков тоже близки (см. рис. 3).

Проведен масс-спектрометрический анализ препаратов очищенных люцифераз бразильских и дальневосточных *Chaetopterus*. Результаты, соотношение масса/заряд (m/z), заряд (z) и рассчитанная молекулярная масса (m) представлены в таблице.

Препараты люцифераз L2(Br) и L(FE) существенно более гетерогенны, чем препарат L1(Br), что, по-видимому, объясняется посттрансляционными модификациями и отщеплением концевых аминокислот. Наборы масс,

полученные для L2(Br) и L(FE), практически идентичны, что говорит о сходстве самих ферментов, и значительно отличаются от такового для L1(Br).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Биолюминесцентные системы широко применяют в различных биомедицинских технологиях [18, 19]. Одним из важных направлений является люминесцентный биоимиджинг — прижизненная визуализация клеток и внутриклеточных процессов [20]. В случае успешной расшифровки люциферазы *C. variopedatus* предположительно может быть использована для создания сенсора ферроптоза [12]. Мы оптимизировали ранее разработанную [11] методику выделения люциферазы *C. variopedatus*, что позволило получить практически чистый препарат, пригодный для масс-спектрометрического анализа.

Изначально для исследования использовали *C. variopedatus*, выловленных в Бразилии, однако из-за логистических проблем стали использовать *C. variopedatus*, выловленных в Приморском крае России. Интересно, что в отличие от бразильских, дальневосточные *C. variopedatus*

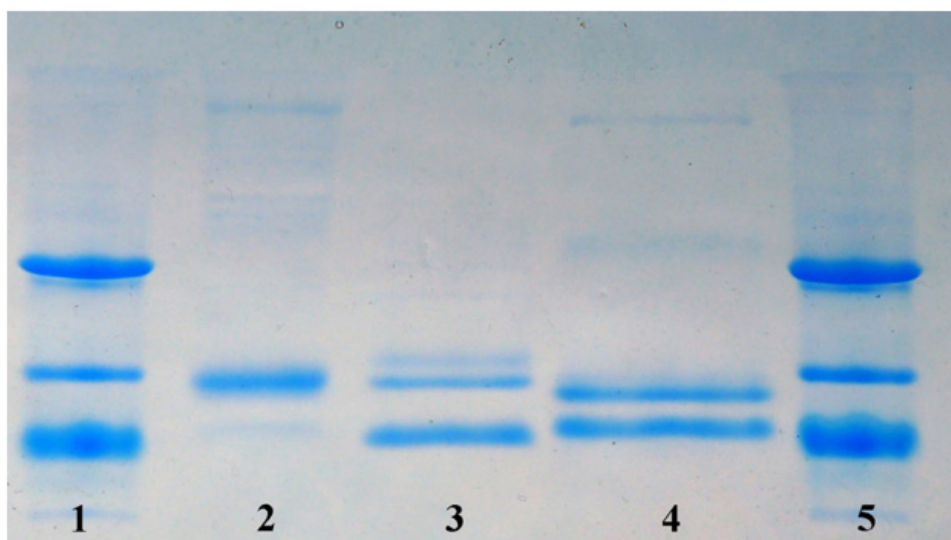


Рис. 3. Денатурирующий электрофорез (15% SDS-ПААГ) препаратов L1 (2) и L2 (3) бразильского и люциферазы дальневосточного *C. variopedatus* (4). Треки 1 и 5 — калибровочная белковая смесь для SDS-ПААГ фореза: 29 000, 21 000, 12 500, 6500 кДа

Таблица. Масс-спектрометрический анализ препаратов очищенных люцифераз бразильских (Br) и дальневосточных (FE) *Chaetopterus*

L1(Br)			L2(Br)			L(FE)		
<i>m/z</i>	<i>z</i>	<i>m</i>	<i>m/z</i>	<i>z</i>	<i>m</i>	<i>m/z</i>	<i>z</i>	<i>m</i>
1355,5	12	16253	1352,49	11	14866,39	1352,67	11	14868,37
1364	12	16356	1364,5	11	14998,5	1355,5	12	16254
1374,94	11	15113,34	1365,94	11	15014,34	1364,09	12	16357
1383,58	11	15208,38	1373,31	11	15095,41	1366,13	11	15016,43
			1374,77	11	15111,47	1373,41	11	15096,51
			1383,76	11	15210,36	1374,95	11	15113,45
			1396,93	12	16751,16	1383,85	11	15211,35
			1405,35	12	16852,2	1396,94	12	16751,28
						1404,44	12	16853,28

Примечание: *m/z* — соотношение масса/заряд; *z* — заряд; *m* — молекулярная масса.

не секретировали светящуюся слизь. В бразильских *C. variopedatus* были обнаружены две различных изоформы люциферазы (L1 и L2), тогда как в дальневосточных была обнаружена одна (L). Масс-спектрометрический и хроматографический анализ показал, что L2 и L обладают существенным сходством и отличаются от L1. По-видимому, функцию свечения параподий полихет *C. variopedatus* обеспечивает люцифераза L2 (L), поскольку она обнаружена в общей биомассе бразильских полихет и в параподиях дальневосточных полихет. Свечение слизи бразильских *C. variopedatus* обусловлено функционированием люциферазы L1, которая отсутствует в слизи дальневосточного подвида.

Выводы

На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы: 1) функцию свечения параподий полихет *C. variopedatus* обеспечивает люцифераза L2, так как она обнаружена в общей биомассе бразильских полихет как L2(Br) и в параподиях дальневосточных полихет как идентичная ей L(FE); 2) свечение слизи бразильских *C. variopedatus* обусловлено функционированием люциферазы L1, которая отсутствует в слизи дальневосточного подвида; 3) набор изоформ люцифераз полихет *C. variopedatus* зависит от места их обитания.

Литература

- Osborn KJ, Rouse GW, Goffredi SK, Robison BH. Description and relationships of *Chaetopterus pugaporcinus*, an unusual pelagic polychaete (*Annelida*, *Chaetopteridae*). *Biol Bull.* 2007; 212 (1): 40–54. DOI: 10.2307/25066579.
- Petersen ME. *Chaetopterus variopedatus* (Renier) (*Annelida*: *Polychaeta*: *Chaetopteridae*): a species complex. What species are being used at MBL? *Biol Bull.* 1984; 167: 513.
- Petersen ME. Contribution to a revision of *Chaetopterus* Cuvier (*Polychaeta*: *Chaetopteridae*): redescription of *C. appendiculatus* Grube and *C. cautus* Marenzeller, with comments on some other species. *Bull Mar Sci.* 1997; 60: 619.
- Bhaud M. The spreading potential of polychaete larvae does not predict adult distributions; consequences for conditions of recruitment. *Hydrobiologia.* 1998; 375: 35. DOI: 10.1023/A:1017073409259.
- Mirza JD, Migotto AE, Yampolsky IV, de Moraes GV, Tsarkova AS, Oliveira AG. *Chaetopterus variopedatus* bioluminescence: a review of light emission within a species complex. *Photochem Photobiol.* 2020; 96: 768–78. DOI: 10.1111/php.13221.
- Moore JM, Nishi E, Rouse GW. Phylogenetic analyses of *Chaetopteridae* (*Annelida*). *Zoologica Scripta.* 2017; 46 (5): 596–610. Available from: <https://doi.org/10.1111/zsc.12238>.
- Ancil M. The epithelial luminescent system of *Chaetopterus variopedatus*. *Can J Zool.* 1979; 57 (6): 1290–310. DOI: 10.1139/Z79-166.
- Shimomura O, Johnson FH, Haneda Y. Partial purification and properties of the *Chaetopterus* luminescence system. *Bioluminescence in Progress*. Princeton University Press; 1966: 495521. Available from: <https://doi.org/10.1515/9781400875689-031>.
- Branchini BR, Behney CE, Southworth TL, Rawat R, Deheyn DD. Chemical analysis of the luminous slime secreted by the marine worm *Chaetopterus* (*Annelida*, *Polychaeta*). *Photochem Photobiol.* 2014; 90 (1): 247–51. DOI: 10.1111/php.12169.
- Shimomura O, Johnson FH. *Chaetopterus* photoprotein: crystallization and cofactor requirements for bioluminescence. *Science.* 1968; 159 (3820): 1239–40. DOI: 10.1126/science.159.3820.1239.
- Purtov KV, Petushkov VN, Rodionova NS, et al. Luciferin-luciferase system of marine polychaete *Chaetopterus variopedatus*. *Dokl Biochem Biophys.* 2019; 486 (1): 209–12. DOI: 10.1134/S1607672919030104.
- Щеглов А. С., Царькова А. С. Перспективы использования биолюминесцентной системы *Chaetopterus variopedatus* для мониторинга ферроптоза в живых организмах. *Вестник РГМУ.* 2021; (3): 79–81. DOI: 10.24075/vrgmu.2021.024.
- Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell.* 2012; 149: 1060–72. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.042.
- Li J, Cao F, Yin H-L, Huang Z-J, Lin Z-T, Mao N, et al. Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death Dis.* 2020; 11 (2): 88. DOI: 10.1038/s41419-020-2298-2.
- Yan H-F, Zou T, Tuo Q-Z, Xu S, Li H, Belaidi AA, et al. Ferroptosis: mechanisms and links with diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 2021; 6 (1): 49. DOI: 10.1038/s41392-020-00428-9.
- Viviani VR, et al. Active-site properties of *Phrixotrix* railroad worm green and red bioluminescence-eliciting luciferases. *J Biochem.* 2006; 140 (4): 467–74. DOI: 10.1093/jb/mvj190.
- Arnoldi FG, da Silva Neto AJ, Viviani VR. Molecular insights on the evolution of the lateral and head lantern luciferases and bioluminescence colors in mastinocerini railroad-worms (*Coleoptera*: *Phengodidae*). *Photochem Photobiol Sci.* 2010; 9 (1): 87–92. DOI: 10.1039/B9PP00078J.
- Nakajim, Y, Ohmiya Y. Bioluminescence assays: multicolor luciferase assay, secreted luciferase assay and imaging luciferase assay. *Expert Opin Drug Discov.* 2010; 5 (9): 835–49. DOI: 10.1517/17460441.2010.506213.
- Syed AJ, Anderson JC. Applications of bioluminescence in biotechnology and beyond. *Chem Soc Rev.* 2021; 50: 5668–705.

DOI: 10.1039/D0CS01492C.

20. Slavine NV, McColl RW. Semi-automated Image processing for

preclinical bioluminescent imaging. *J Appl Bioinform Comput Biol*. 2015; 4 (1): pii: 114. DOI: 10.4172/2329-9533.1000114.

References

- Osborn KJ, Rouse GW, Goffredi SK, Robison BH. Description and relationships of *Chaetopterus pugaporcinus*, an unusual pelagic polychaete (*Annelida*, *Chaetopteridae*). *Biol Bull*. 2007; 212 (1): 40–54. DOI: 10.2307/25066579.
- Petersen ME. *Chaetopterus variopedatus* (Renier) (*Annelida*: *Polychaeta*: *Chaetopteridae*): a species complex. What species are being used at MBL? *Biol Bull*. 1984; 167: 513.
- Petersen ME. Contribution to a revision of *Chaetopterus* Cuvier (*Polychaeta*: *Chaetopteridae*): redescription of *C. appendiculatus* Grube and *C. cautus* Marenzeller, with comments on some other species. *Bull Mar Sci*. 1997; 60: 619.
- Bhaud M. The spreading potential of polychaete larvae does not predict adult distributions; consequences for conditions of recruitment. *Hydrobiologia*. 1998; 375: 35. DOI: 10.1023/A:1017073409259.
- Mirza JD, Migotto AE, Yampolsky IV, de Moraes GV, Tsarkova AS, Oliveira AG. *Chaetopterus variopedatus* bioluminescence: a review of light emission within a species complex. *Photochem Photobiol*. 2020; 96: 768–78. DOI: 10.1111/php.13221.
- Moore JM, Nishi E, Rouse GW. Phylogenetic analyses of *Chaetopteridae* (*Annelida*). *Zoologica Scripta*. 2017; 46 (5): 596–610. Available from: <https://doi.org/10.1111/zsc.12238>.
- Ancil M. The epithelial luminescent system of *Chaetopterus variopedatus*. *Can J Zool*. 1979; 57 (6): 1290–310. DOI: 10.1139/Z79-166.
- Shimomura O, Johnson FH, Haneda Y. Partial purification and properties of the *Chaetopterus* luminescence system. *Bioluminescence in Progress*. Princeton University Press; 1966: 495521. Available from: <https://doi.org/10.1515/9781400875689-031>.
- Branchini BR, Behney CE, Southworth TL, Rawat R, Deheyn DD. Chemical analysis of the luminous slime secreted by the marine worm *Chaetopterus* (*Annelida*, *Polychaeta*). *Photochem Photobiol*. 2014; 90 (1): 247–51. DOI: 10.1111/php.12169.
- Shimomura O, Johnson FH. *Chaetopterus* photoprotein: crystallization and cofactor requirements for bioluminescence. *Science*. 1968; 159 (3820): 1239–40. DOI: 10.1126/science.159.3820.1239.
- Purtov KV, Petushkov VN, Rodionova NS, et al. Luciferin-luciferase system of marine polychaete *Chaetopterus variopedatus*. *Dokl Biochem Biophys*. 2019; 486 (1): 209–12. DOI: 10.1134/S1607672919030104.
- Shcheglov AS, Tsarkova AS. The potential of using the bioluminescent system of *Chaetopterus variopedatus* to study ferroptosis in living organisms. *Bulletin of RSMU*. 2021; (3): 79–81. DOI: 10.24075/vrgmu.2021.024.
- Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*. 2012; 149: 1060–72. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.042.
- Li J, Cao F, Yin H-L, Huang Z-J, Lin Z-T, Mao N, et al. Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death Dis*. 2020; 11 (2): 88. DOI: 10.1038/s41419-020-2298-2.
- Yan H-F, Zou T, Tuo Q-Z, Xu S, Li H, Belaidi AA, et al. Ferroptosis: mechanisms and links with diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2021; 6 (1): 49. DOI: 10.1038/s41392-020-00428-9.
- Viviani VR, et al. Active-site properties of *Phrixotrix* railroad worm green and red bioluminescence-eliciting luciferases. *J Biochem*. 2006; 140 (4): 467–74. DOI: 10.1093/jb/mvj190.
- Arnoldi FG, da Silva Neto AJ, Viviani VR. Molecular insights on the evolution of the lateral and head lantern luciferases and bioluminescence colors in mastinocerini railroad-worms (*Coleoptera*: *Phengodidae*). *Photochem Photobiol Sci*. 2010; 9 (1): 87–92. DOI: 10.1039/B9PP00078J.
- Nakajim, Y, Ohmiya Y. Bioluminescence assays: multicolor luciferase assay, secreted luciferase assay and imaging luciferase assay. *Expert Opin Drug Discov*. 2010; 5 (9): 835–49. DOI: 10.1517/17460441.2010.506213.
- Syed AJ, Anderson JC. Applications of bioluminescence in biotechnology and beyond. *Chem Soc Rev*. 2021; 50: 5668–705. DOI: 10.1039/D0CS01492C.
- Slavine NV, McColl RW. Semi-automated Image processing for preclinical bioluminescent imaging. *J Appl Bioinform Comput Biol*. 2015; 4 (1): pii: 114. DOI: 10.4172/2329-9533.1000114.