

*На правах рукописи*

**Белогурова Надежда Валентиновна**

**СПЕКТРАЛЬНО-ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ  
Ca<sup>2+</sup>-РЕГУЛИРУЕМЫХ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ  
РЕАКЦИЙ ФОТОПРОТЕИНОВ**

03.01.02 – биофизика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Красноярск – 2010

Работа выполнена в лаборатории фотобиологии Института биофизики Сибирского отделения Российской академии наук, г. Красноярск

**Научный руководитель:**

доктор физико-математических наук,  
профессор

Кудряшева Надежда Степановна

**Официальные оппоненты:**

доктор химических наук

Трофимов Алексей Владиславович

доктор биологических наук,  
профессор

Исмаилов Анвар Джураевич

**Ведущая организация:**

Национальный исследовательский Томский государственный университет

Защита диссертации состоится 23 сентября 2010 года в 14 часов на заседании диссертационного Совета Д 501.001.96 при кафедре биофизики биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, Ленинские горы, МГУ, биологический факультет, кафедра биофизики, «Новая» аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2010 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного Совета,  
кандидат биологических наук



Страховская Марина Глебовна

**Актуальность проблемы.**  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемые биоломинесцентные реакции, катализируемые фотопротеинами, ответственны за свечение морских кишечнополостных. В настоящее время наиболее изученными фотопротеинами являются акворин и обелин, выделенные соответственно из медузы *Aequorea victoria* и гидроидного полипа *Obelia longissima*. Фотопротеин представляет собой стабильный фермент-субстратный комплекс, состоящий из апопротеина – односубъединичного полипептида (~22 кДа) и «преактивированного» кислородом субстрата, 2-гидропероксицелентеразина, прочно, но нековалентно связанного с белком внутри гидрофобной полости [1]. При связывании ионов кальция происходит реакция внутримолекулярного окислительного декарбоксилирования, продуктами которой являются  $\text{CO}_2$  и целентерамид в возбужденном состоянии, релаксация которого сопровождается излучением кванта видимого света. Продукт биоломинесцентной реакции – комплекс апопротеина с целентерамидом – принято называть разряженным фотопротеином. Разряженные фотопротеины, в отличие от фотопротеинов, являются флуоресцентными белками и характеризуются эффективной синезеленой флуоресценцией.

Интенсивность исследования фотопротеинов в настоящее время связана с перспективностью их использования в современных биологических технологиях. Благодаря способности люминесцировать в присутствии ионов кальция, фотопротеины успешно используют для мониторинга внутриклеточного кальция и визуализации внутриклеточных процессов [2]. С помощью фотопротеиновых меток возможно решение ряда задач высокочувствительной и экспрессной аналитики – от диагностики заболеваний до анализа генетически модифицированных продуктов и единичных нуклеотидных замен.

Методы молекулярной биологии позволили конструировать линии клеток и целые организмы, способные стабильно экспрессировать ген, кодирующий апопротеин. Поскольку целентеразин является гидрофобным, он легко проникает через мембрану, трансформируя синтезирующийся апопротеин в фотопротеин, способный генерировать свет при появлении ионов кальция. Фактически, такие клетки и организмы имеют генетически встроенный индикатор кальция. В настоящее время получен целый ряд разнообразных клеточных систем, экспрессирующих ген фотопротеина.

Вместе с тем, проводимые исследования относятся в основном к области биологических наук; фотофизические подходы не достаточно активно привлекались для исследования фотопротеинов. В связи с этим представляет интерес активность и природа электронно-возбужденных состояний эмиттера биоломинесценции кишечнополостных.

Спектры биоломинесценции фотопротеинов и фотолуминесценции разряженных фотопротеинов широкие и асимметричные, их можно представить в виде суперпозиции спектров нескольких излучателей (различных форм целентерамида) с разной энергией флуоресцентных состояний. Разложение данных спектров на составляющие до сих пор не проводилось. Такое

разложение позволит определить количество, вклады и спектральные характеристики компонентов данных спектров, провести идентификацию эмиттеров и установить связь между спектральным составом люминесценции фотопротеинов и эффективностью протонных взаимодействий в активном центре белка.

Наименее изученной стадией всех биолюминесцентных процессов является стадия, предшествующая образованию флуоресцентных состояний эмиттера. В работе [3] была теоретически обоснована гипотеза о возможности заселения высших электронно-возбужденных состояний биолюминесцентного эмиттера. Заселенность высших электронно-возбужденных состояний эмиттера экспериментально подтверждена для бактериальной биолюминесценции [4]. Было высказано предположение об универсальности этой гипотезы для биолюминесцентных реакций всех организмов. Поэтому представляет интерес тестирование заселенности высших электронно-возбужденных эмиттера состояний в биолюминесцентных реакциях кишечнополостных.

**Цель исследования** состояла в изучении заселенности электронно-возбужденных состояний эмиттеров биолюминесценции фотопротеинов и фотолюминесценции разряженных фотопротеинов.

В работе поставлены следующие **задачи**.

1. Экспериментально доказать возможность заселения высших электронно-возбужденных состояний эмиттера в биолюминесценции кишечнополостных.

2. Выявить и охарактеризовать спектральные компоненты биолюминесценции фотопротеинов обелина и акворина, провести их соотнесение различным формам целентерамида.

3. Выявить и охарактеризовать спектральные компоненты фотолюминесценции разряженных акворина и обелина, провести их соотнесение различным формам целентерамида.

4. Исследовать зависимость спектральных характеристик биолюминесценции обелина и фотолюминесценции разряженного обелина от концентрации ионов кальция в ферментативной системе.

**Научная новизна.** Впервые, на примере биолюминесценции обелина дикого типа и его мутанта F88Y, экспериментально доказана возможность заселения высших электронно-возбужденных состояний эмиттера в  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемой биолюминесцентной реакции кишечнополостных. Установлена энергия высших электронно-возбужденных состояний эмиттера биолюминесценции фотопротеинов – около  $31000 \text{ см}^{-1}$ .

Выделены и описаны компоненты сложных спектров биолюминесценции обелина и акворина и фотолюминесценции разряженных обелина и акворина. Выделенные спектральные компоненты приписаны излучению ряда форм целентерамида, различающихся степенью ионизации во флуоресцентном состоянии.

Впервые продемонстрировано, что интенсивность и спектральный состав фотолюминесценции разряженного обелина зависят от концентрации ионов кальция в реакционной смеси, а также длин волн возбуждения и испускания.

Зарегистрирован конформационный переход в разряженном обелине при концентрации ионов кальция около  $5 \cdot 10^{-7}$  М.

**Практическая значимость.** Полученные закономерности формирования сложных спектров биолюминесценции и фотолюминесценции фотопротеинов являются теоретической основой для разработки новых методов варьирования их спектральных характеристик. Анализ изменений вкладов спектральных компонентов фотолюминесценции позволяет судить об изменениях, происходящих в активном центре фермента. Показана принципиальная возможность использования интенсивности фотолюминесценции разряженного обелина для определения концентрации ионов кальция.

**Апробация работы.** Основные положения работы представлены на III Съезде биофизиков России (Воронеж, Россия, 2004), XII Европейской конференции по спектроскопии биологических молекул (Бобигни, Франция, 2007), Международной конференции «Конверсия энергии в молекулярных и наносистемах» (Москва, Россия, 2007), XXIX Европейском конгрессе по молекулярной спектроскопии (Опатия, Хорватия, 2008), V Съезде Российского фотобиологического общества «Преобразование энергии света при фотосинтезе» (Пушино, 2008), Конференции и выставке по нанотехнологиям «НаноИзраиль 2009» (Иерусалим, Израиль, 2009), XIII Европейской конференции по спектроскопии биологических молекул (Палермо, Италия, 2009), X Международной конференции по молекулярной спектроскопии (Краков, Польша, 2009), XVI Международном симпозиуме по биолюминесценции и хемилюминесценции (Лион, Франция, 2010).

Работа выполнена при финансовой поддержке следующих грантов: Министерства Образования РФ REC-002 KR-006; ФСП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» по теме: «Биолюминесцентный анализ: биосенсоры и биокаталитические технологии»; РФФИ № 07-04-01248-а; Сибирского Федерального Университета для поддержки научных исследований студентов, аспирантов и молодых ученых: «Спектральная идентификация эмиттеров биолюминесцентной реакции  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых фотопротеинов», 2007; «Ведущие научные школы» № 1211.2008.4, Программы РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Работа была удостоена государственной премии Красноярского края в 2009 году.

**Личный вклад соискателя** состоял в подборе биолюминесцентных систем и адаптации биолюминесцентных методик для проверки заселенности высших электронно-возбужденных состояний эмиттера биолюминесценции кишечнорастворимых, постановке и проведении всех экспериментов, обработке и обсуждении экспериментальных данных, подготовке публикаций. Основная часть результатов была получена в сотрудничестве с А.Г. Сизых, Л.А. Франк,

Н.П. Маликовой, Ф.Н. Томилиным, Р.Р. Алиевой. Автор приносит благодарность всем коллегам за участие в совместных работах и обсуждении результатов.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 4 статьи, 11 тезисов и материалов конференций, имеется заявка на патент Российской Федерации «Флуоресцентный способ определения концентрации кальция».

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа изложена на 123 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, результатов и обсуждения, выводов и списка литературы. Работа, проиллюстрирована 42 рисунками и содержит 12 таблиц.

**Список сокращений:** РОРОР - 1,4-бис(5-фенилоксазол-2-ил)бензол; МСБ - п-бис(о-метилстерил)бензол; С - концентрация, М;  $[Ca^{2+}]$  - равновесная концентрация ионов кальция, М; [Ак], [Об], [F88Y] - концентрация акворина, обелина, мутанта обелина F88Y соответственно, М; ВЭВС - высшие электронно-возбужденные состояния.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

**Первая глава** диссертационной работы посвящена обзору литературы по механизму биоломинесцентной реакции фотопротеинов. Описаны структура фотопротеинов и основные проблемы, связанные с изучением формирования эмиттера. Проанализированы имеющиеся в настоящее время гипотезы о механизме образования эмиттеров в  $Ca^{2+}$ -регулируемых биоломинесцентных реакциях и роли переноса протона в этом процессе. Описаны физико-химические основы теории хемилюминесценции и систематики молекул по спектрально-люминесцентным свойствам, на основе которых сформулирована гипотеза о возможности заселения ВЭВС в биоломинесцентном процессе. Представлены современные подходы к исследованию процессов переноса энергии в растворах флуоресцентных соединений при фотовозбуждении, а также в более сложных системах с химическим возбуждением.

**Во второй главе «Материалы и методы»** описаны использованные в работе приборы, реагенты и методические подходы. Рекомбинантные препараты акворина, обелина дикого типа и его мутантов F88Y, Y138F и I144H были получены в лаборатории фотобиологии Института биофизики СО РАН. Спектры биоломинесценции фотопротеинов, а также фотолюминесценции (испускания и возбуждения) разряженных фотопротеинов регистрировали на спектрометре Aminco-Bowman Series 2 (Thermo Spectronic, США). Для измерения спектров поглощения использовали двулучевой регистрирующий спектрофотометр UVIKON 943 (KONTRON Instruments, Италия). Обессоливание растворов фотопротеинов проводили гель-фильтрацией с помощью хроматографической колонки D-Salt™ Dextran Desalting Column.

Разряженные фотопротеины получали в результате проведения биоломинесцентной реакции либо при добавлении  $CaCl_2$  к растворам

фотопротеинов, либо путем нагревания растворов фотопротеинов при 40<sup>0</sup>С в течение 2х часов в отсутствии Са<sup>2+</sup> (термоинактивация). Таким образом, [Са<sup>2+</sup>] варьировали в диапазоне 0 - 0,005 М.

Тестирование заселенности ВЭВС эмиттера биолюминесценции проводили с помощью экзогенных флуоресцентных соединений (акцепторов энергии возбуждения) с различной энергией флуоресцентных состояний. Данная методика состояла в сравнении спектров биолюминесценции фотопротеинов до и после добавления в реакционную смесь флуоресцентного соединения и выявления сенсibilизированной флуоресценции этого соединения. В этих экспериментах использовали следующие экзогенные флуоресцентные соединения: антрацен, РОРОР, МСБ, пирен, 2-метоксинафталин, нафталин, п-терфенил, 1,4-дифенилбутадиеи.

Изложена методика подбора модельной функции для описания спектральных составляющих и способы разложения сложных спектров на компоненты. Спектры биолюминесценции акворина и обелина, а также спектры фотолуминесценции разряженных акворина и обелина были разложены на контуры, имеющие гауссову форму в координатах интенсивность люминесценции – волновое число, см<sup>-1</sup>. Сравнивали площади расчетного суммарного спектра и экспериментально полученного; отклонение площади расчетного спектра от экспериментального оценивали величиной *d*, определяемой по следующей формуле:

$$d = \frac{|S_{\text{экс}} - S_{\text{расч}}|}{S_{\text{экс}}} \cdot 100\%,$$

где *S*<sub>экс</sub> - площадь экспериментального спектра; *S*<sub>расч</sub> - площадь расчетного спектра, т.е. сумма площадей, выделенных компонентов. Величина *d* для всех спектров не превышала 0,2 %.

**В третьей главе «Изучение заселенности высших электронно-возбужденных состояний эмиттера биолюминесценции кишечнополостных»** экспериментально подтверждена заселенность ВЭВС эмиттера в Са<sup>2+</sup>-регулируемой биолюминесцентной реакции кишечнополостных.

Эмиттеры биолюминесценции всех видов представляют собой гетероциклические молекулы, характеризующиеся высоким выходом флуоресценции [5]; уровни энергии их ππ\*-состояний не являются низшими [6]. Существует вероятность участия в биолюминесцентном процессе указанных ππ\*-состояний, формирующихся электронными подсистемами карбонильных групп молекулы, т.к. именно карбонильные группы образуются в реакциях окисления органических субстратов.

Для доказательства заселенности ВЭВС эмиттера биолюминесценции кишечнополостных в качестве акцепторов энергии использовали ряд экзогенных флуоресцентных соединений. При этом соблюдались два основных условия: (1) энергия флуоресцентного состояния акцептора (ππ\*-типа) была

больше, чем энергия флуоресцентного состояния биоломинесцентного эмиттера (рис. 1); (2) спектр биоломинесценции не перекрывался со спектром поглощения акцептора. В этом случае исключается заселение флуоресцентного состояния акцептора за счет индуктивно-резонансного переноса энергии с флуоресцентного состояния биоломинесцентного эмиттера или за счет тривиальной абсорбции излучения. Таким образом, флуоресцентное состояние акцептора может заселяться только в результате межмолекулярного переноса энергии с ВЭВС эмиттера биоломинесценции (рис. 1). Сенсibilизированная флуоресценция акцептора, полученная в ходе биоломинесцентной реакции, является свидетельством заселенности ВЭВС эмиттера биоломинесценции.

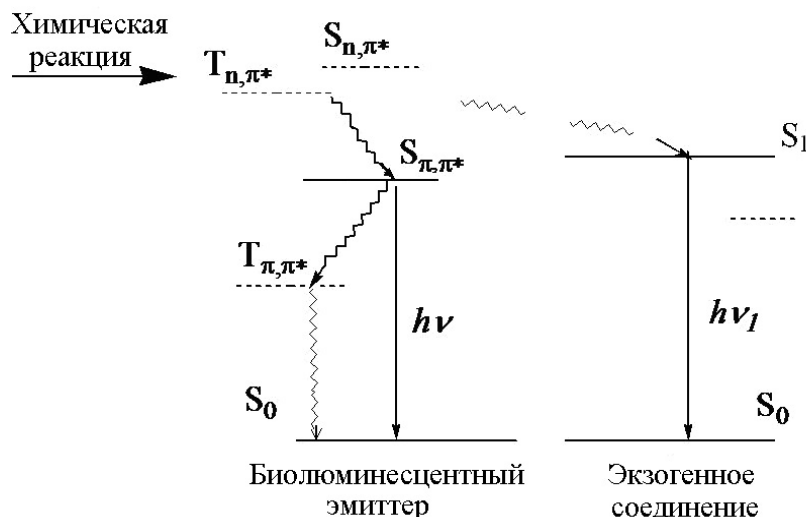


Рис. 1. Диаграммы Яблонского для биоломинесцентного эмиттера и экзогенного флуоресцентного соединения.

Для подбора оптимальной системы «фотопроtein-акцептор» были проанализированы спектры биоломинесценции пяти фотопроteинов (акворина, обелина дикого типа и его мутантов F88Y, Y138F и I144H) и спектры поглощения (возбуждения) ряда флуоресцентных молекул. Показано, что описанным выше условиям удовлетворяет биоломинесценция обелина дикого типа и его мутанта F88Y в присутствии следующих флуоресцентных молекул: пирена, нафталина, 2-метоксинафталина, п-терфенила и 1,4-дифенилбутадиена.

На рис. 2 представлено относительное расположение уровней энергии электронно-возбужденных состояний биоломинесцентного эмиттера и подобранных флуоресцентных соединений.

В результате изучения спектров биоломинесценции обелина и обелина F88Y в присутствии данных соединений была обнаружена сенсibilизированная флуоресценция пирена, нафталина и 2-метоксинафталина. В качестве примера, на рис. 3 приведены спектры биоломинесценции обелина F88Y в присутствии (3) и отсутствии (4) пирена. Разностный спектр (5), полученный вычитанием спектра 4 из спектра 3, совпадает по положению и форме с флуоресценцией пирена при фотовозбуждении (2).



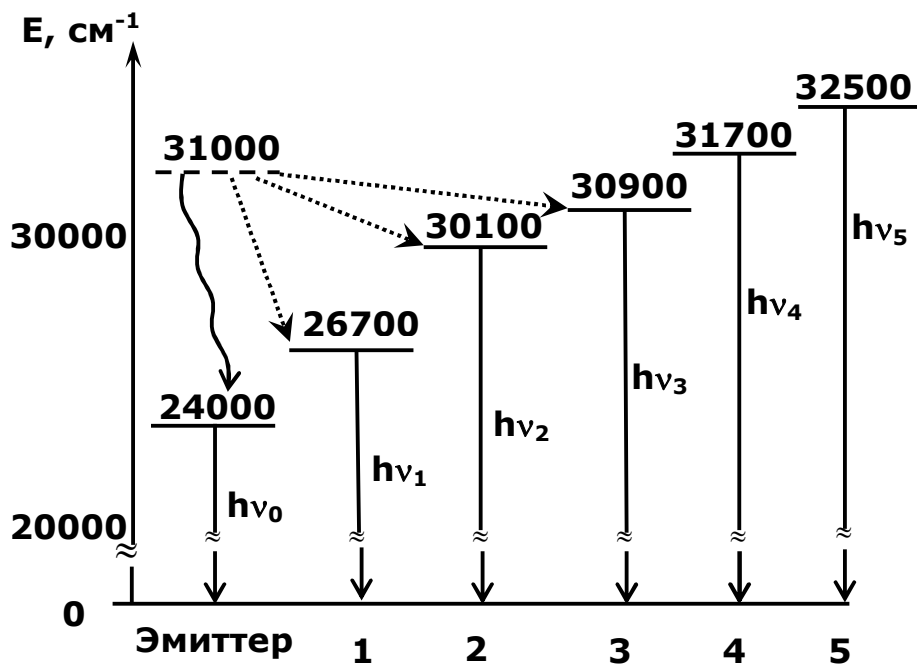


Рис. 2. Энергии электронно-возбужденных состояний биоломинесцентного эмиттера и экзогенных флуоресцентных соединений: 1 – пирен, 2 – 2-метоксинафталин, 3 – нафталин, 4 – п-терфенил, 5 – 1,4-дифенилбутadiен. Флуоресцентные состояния обозначены сплошными линиями; высшее электронно-возбужденное состояние эмиттера биоломинесценции – пунктиром.

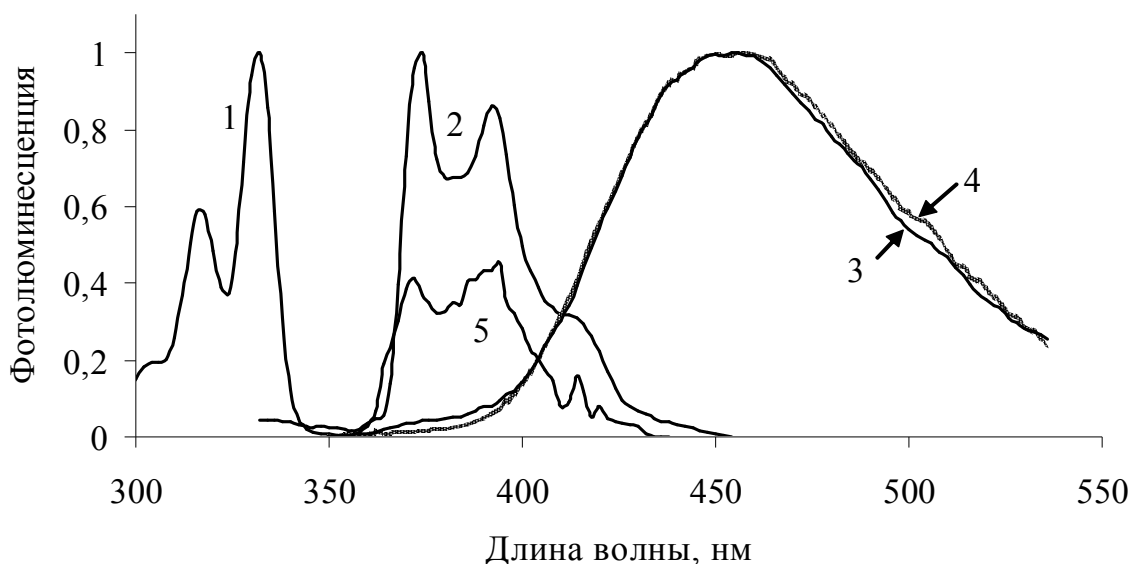


Рис. 3. Спектры люминесценции: (1) возбуждения пирена ( $\lambda_{\text{исп}} = 400$  нм),  $C = 3 \cdot 10^{-6}$  М; (2) испускания пирена ( $\lambda_{\text{возб}} = 315$  нм),  $C = 3 \cdot 10^{-6}$  М; (3) биоломинесценции обелина F88Y в присутствии пирена,  $C = 10^{-6}$  М; (4) биоломинесценции обелина F88Y,  $[F88Y] = 10^{-5}$  М; (5) сенсibilизированной флуоресценции пирена, усредненной по 20 экспериментам (увеличен в 10 раз).

В ходе биолюминесцентной реакции обелина дикого типа и его мутанта F88Y не найдена сенсibilизированная флуоресценция п-терфенила и 1,4-дифенилбутадиена.

Таким образом, наличие сенсibilизированной флуоресценции соединений 1-3 (рис. 2) и ее отсутствие для соединений 4-5 доказывает заселенность ВЭС биолюминесцентного эмиттера кишечнорастворимых и позволяет локализовать их энергию около  $31\ 000\ \text{см}^{-1}$ .

На рис. 4 приведена кристаллическая структура обелина. Из этого рисунка видно, что молекула хромофора находится в центре белковой глобулы на расстоянии приблизительно  $25\ \text{Å}$  от поверхности. В этих условиях индуктивно-резонансный (Ферстеровский) синглет-синглетный перенос энергии с эмиттера на молекулу акцептора является более вероятным, по сравнению с обменно-резонансным, благодаря его большему эффективному радиусу переноса – порядка  $30\text{-}50\ \text{Å}$ . Этот факт дает основание предполагать, что ВЭС биолюминесцентного эмиттера кишечнорастворимых имеют синглетную природу.

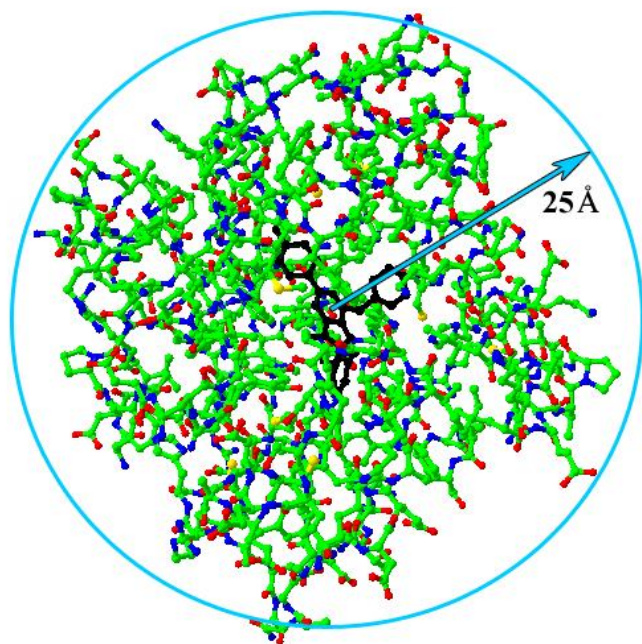


Рис. 4. Структура обелина (PDB 1SL9). Целентеразин (выделен черным цветом) находится в центре белковой глобулы.

Предложены химические преобразования, связанные с формированием высших возбужденных состояний  $\pi\pi^*$ -типа в  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемой биолюминесцентной реакции кишечнорастворимых. На рис. 5 изображен гетеролитический разрыв пероксидной связи (структура I). При этом образуется возбужденная карбонильная группа в синглетном  $\pi\pi^*$ -состоянии, характеристика которого – частичное смещение электронной плотности с несвязывающей n-орбитали атома кислорода на  $\pi^*$ -орбиталь ароматической молекулы ( $n \rightarrow \pi^*$  переход [6]). Образованию и стабилизации этого состояния должно благоприятствовать электронно-донорное окружение карбонила кетоимидной группы в активном центре фотопротейна. Таким образом образуется  $\pi\pi^*$ -состояние, локализованное на карбонильной группе в

положении 2, входящей в кетоимидную группу (структура II). Последующая внутримолекулярная деградация энергии распространяет возбуждение по всей молекуле (структура III), формируя  $\pi\pi^*$ -возбуждение. Процесс завершается испусканием кванта света ( $\pi\pi^*$ -флуоресценция). Схожий механизм локализации первичного возбуждения на кетоимидной группе ранее предлагался для эмиттера бактериальной биолюминесценции [4].

Участие ВЭС, вероятно, является общим свойством биолюминесцентных реакций различных светящихся организмов.

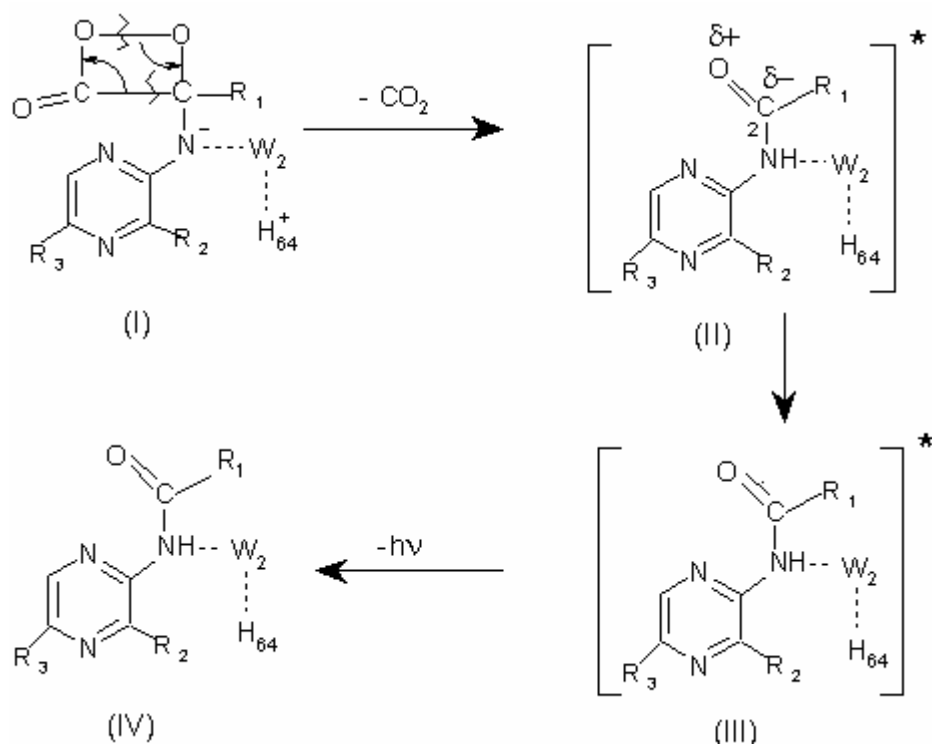


Рис. 5. Стадии формирования возбуждения в  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемой биолюминесцентной реакции и образование высоковозбужденного состояния  $\pi\pi^*$ -типа. Структуры: (I) - 2-пероксицелентеразин, (II) -  $\pi\pi^*$ -состояние целентерамида в качестве высоковозбужденного предшественника эмиттера, (III) -  $\pi\pi^*$ -состояние целентерамида, (IV) - целентерамид в основном состоянии. Аминокислота гистидин ( $\text{H}_{64}$ ) и молекула воды ( $\text{W}$ ) в активном центре обелина приведены в соответствии с [7].

### **Компоненты спектров био- и фотолюминесценции фотопротеинов.**

Спектры биолюминесценции фотопротеинов и фотолюминесценции разряженных фотопротеинов представляют собой суперпозицию нескольких спектров, каждый из которых можно соотнести с излучателем определенной структуры. На рис. 6 и 7 приведены спектры фотолюминесценции (испускания и возбуждения) разряженных обелина и акворина.

Разделение спектров фотолюминесценции на компоненты показало, что испускание обелина является суперпозицией спектров четырех излучателей (I, II, III, V, рис. 6), а акворина – двух (IV, V, рис. 7). В то же время, спектр

возбуждения обелина представлен тремя компонентами (VI, VII, VIII, рис. 6), а акворина - одним (VIII, рис. 7).

Положения максимумов выделенных компонентов, а также их вклады в экспериментальные спектры фотолюминесценции приведены в таблице 1. Из таблицы видно, что максимумы соответствующих компонентов близки, но вклады их различны.

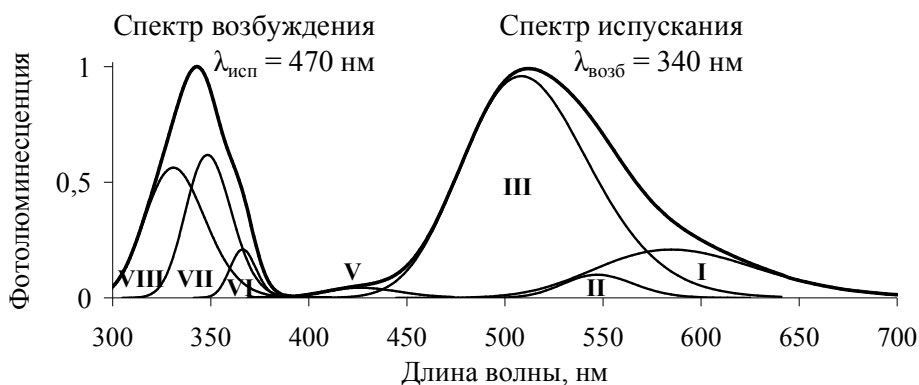


Рис. 6. Спектры фотолюминесценции разряженного обелина и их составляющие,  $[Ca^{2+}] = 3 \cdot 10^{-6} M$ ,  $[Об] = 5 \cdot 10^{-7} M$ .

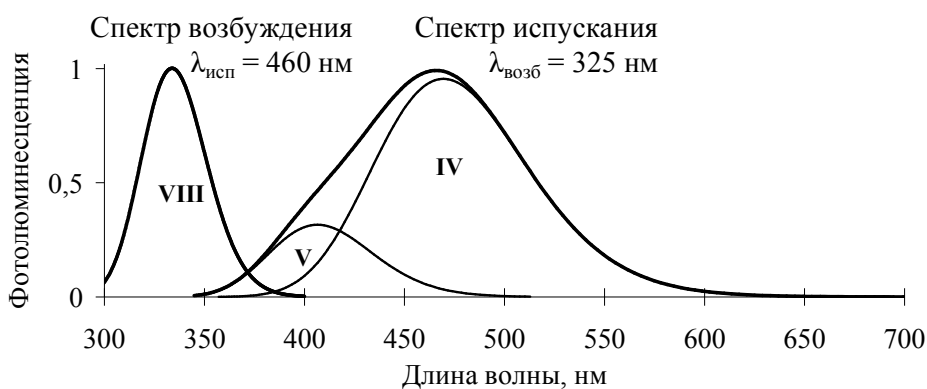


Рис 7. Спектры фотолюминесценции разряженного акворина и их составляющие,  $[Ca^{2+}] = 3 \cdot 10^{-6} M$ ,  $[Ак] = 5 \cdot 10^{-7} M$ .

Таблица 1.

Спектральные характеристики компонентов био- и фотолюминесценции фотопротеинов:  $\lambda_{max}$  (нм) – положение максимума, w – вклад компонента в экспериментальный спектр.

№ компонента	Фотолюминесценция		Биолюминесценция	
	Обелин	Акворин	Обелин	Акворин
	$\lambda_{max} / w$	$\lambda_{max} / w$	$\lambda_{max} / w$	$\lambda_{max} / w$
I	572 / 0,14	–	–	–
II	550 / 0,03	–	555 / 0,13	560 / 0,05
III	510 / 0,79	–	510 / 0,14	518 / 0,08
IV	–	472 / 0,77	470 / 0,65	470 / 0,87
V	423 / 0,04	406 / 0,23	400 / 0,08	–
Экспериментальный	510 / 1	474 / 1	480 / 1	475 / 1
VI	365 / 0,07	–		
VII	350 / 0,4	–		
VIII	335 / 0,53	335 / 1		
Экспериментальный	345 / 1	335 / 1		

Результаты разделения спектров биолюминесценции обелина и акворина представлены на рис. 8 и 9. Из этих рисунков видно, что в случае акворина спектр представлен тремя компонентами, а обелина – четырьмя. В таблице 1 приведены положения максимумов компонентов и экспериментального спектра биолюминесценции, а также вклады компонентов в суммарный спектр. Из таблицы видно, что максимумы соответствующих компонентов близки для спектров био- и фотолюминесценции. Определяющий вклад в спектры биолюминесценции обелина и акворина имеет компонент IV; компонент V отсутствует в спектре биолюминесценции акворина.

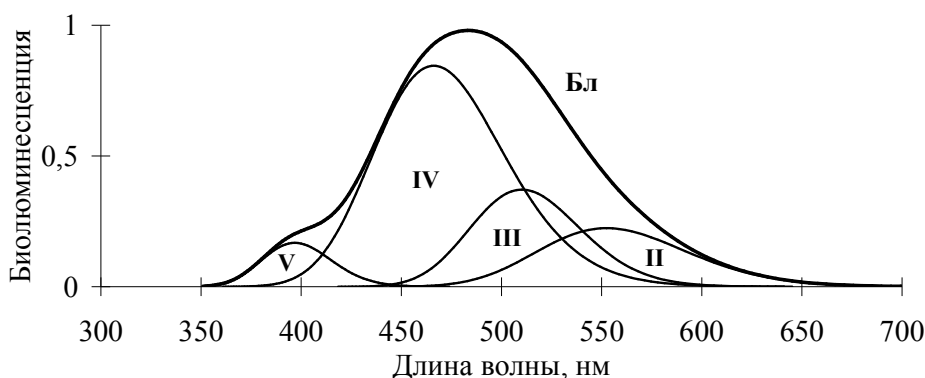


Рис. 8. Спектр биолюминесценции обелина (Бл) и его составляющие,  $C_{Ca^{2+}} = 10^{-6}$  М,  $[Об] = 10^{-6}$  М.

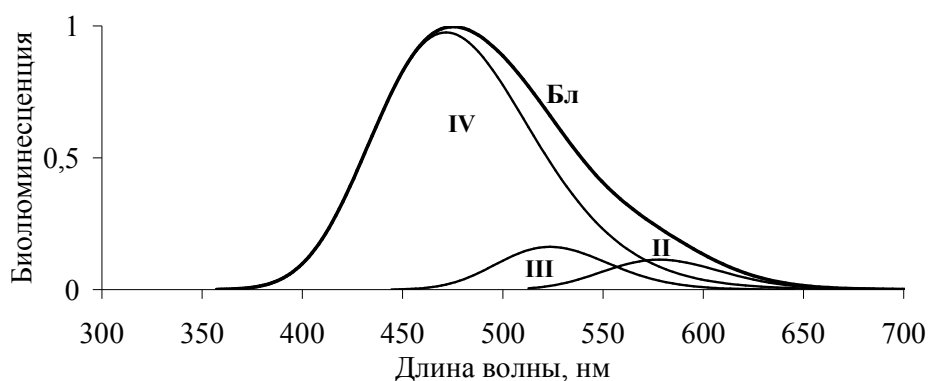


Рис. 9. Спектр биолюминесценции акворина (Бл) и его составляющие,  $C_{Ca^{2+}} = 10^{-6}$  М,  $[Ак] = 10^{-6}$  М.

Проведено соотнесение компонентов I-V спектров биолюминесценции и фотолюминесценции фотопротеинов различным формам целентерамида, которые были описаны в работе [8]. Компонент V приписан излучению протонированной формы целентерамида. Компоненты I-IV вероятно соответствуют формам целентерамида, образующимся в результате переноса протона от 5-(p-гидрокси)фенил группы молекулы целентерамида к протонно-акцепторным группам аминокислотных остатков в активном центре фотопротеина (рис. 10). Таким образом, предполагается существование четырех депротонированных флуоресцентных эмиттеров, которые, различаются своей кислотностью, т.е. эффективным положением протона между фенольной группой целентерамида и акцептором протона.

Используя значения максимумов спектральных компонентов биолюминесценции и фотолюминесценции обелина, мы рассчитали изменения констант кислотности 5-(п-гидрокси)фенильной группы целентерамида в

возбужденном состоянии ( $\Delta pK^*$ , таблица 2) для форм I, II, III, IV относительно протонированной формы V:

$$\Delta pK^* = \{hc(\nu_{AH} - \nu_{A-})/k_B T\},$$

где  $h$  – постоянная Планка;  $c$  – скорость света;  $\nu_{AH}$  – волновое число спектрального максимума протонированной формы целентерамида (компонент V),  $\nu_{A-}$  – волновое число спектрального максимума депротонированных форм целентерамида (компоненты I, II, III или IV);  $k_B$  – константа Больцмана;  $T$  – температура, К.

Данные, представленные в таблице 2, демонстрируют увеличение кислотности целентерамида в возбужденном состоянии в ряду компонентов V – IV – III – II – I в спектрах биолюминесценции и фотолюминесценции обелина.

Таблица 2

Значения  $\Delta pK^*$  молекулы целентерамида для спектральных компонентов I, II, III и IV в спектрах биолюминесценции обелина и фотолюминесценции разряженного обелина.

№ компонента		IV	III	II	I
$\Delta pK^*$	биолюминесценция	18,2	26,4	34,2	–
	фотолюминесценция	–	19,7	26,7	30,2

Спектр испускания разряженного акворина имеет перекрытие со спектром поглощения (возбуждения) (рис. 7). В случае обелина перекрытие отсутствует, наблюдается большой Стоксов сдвиг – порядка 165 нм (рис. 6). При этом вклад протонированной формы (компонент V) в спектр испускания обелина (рис. 6) почти в 8 раз меньше, чем в спектр испускания акворина (рис. 7). Вероятно, в случае разряженного обелина можно говорить о наиболее эффективном переносе протона в возбужденном состоянии по сравнению с разряженным акворинном.

На основе данных о кристаллических структурах разряженного обелина и акворина проанализированы различия во вкладах выделенных компонентов в их спектрах испускания. На рис. 10 приведен фенольный фрагмент целентерамида и его аминокислотное окружение в акворине и обелине с указанием расстояний (в ангстреммах) между группами, вовлеченными в протонные донорно-акцепторные взаимодействия. Из рисунков видно, что аминокислота гистидин (His16 в акворине и His22 в обелине) может являться акцептором протона от фенольной группы целентерамина, в то время как триптофан – донором протона. Гидроксильная группа тирозина при этом может быть донором протона в акворине. Вероятно, большой вклад протонированной формы (компонент V) в спектр испускания разряженного акворина связан с присутствием дополнительного (по сравнению с обелином) протона, донором которого является тирозин (рис. 10 А, Tyr82).

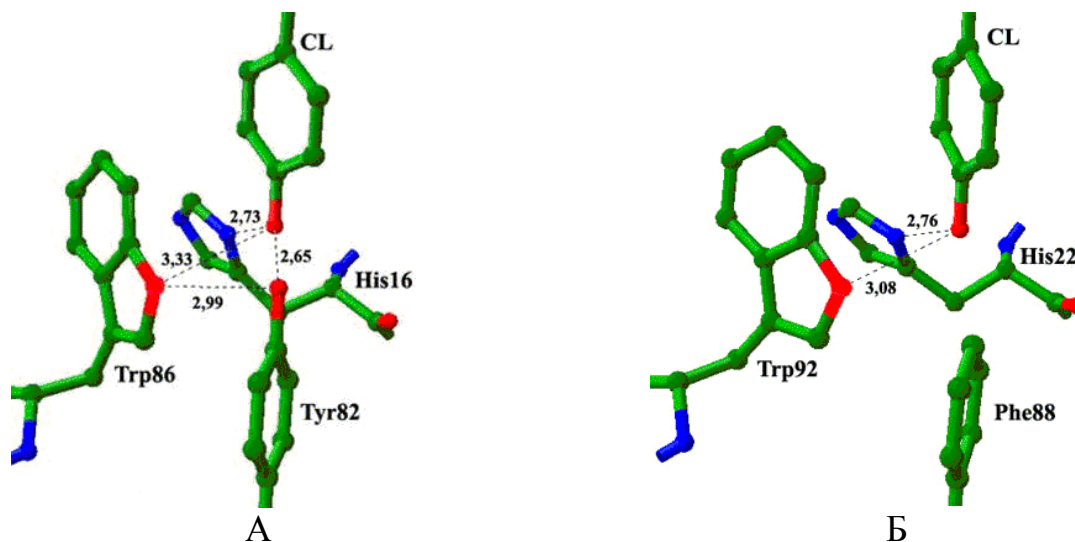


Рис. 10. Фенольный фрагмент целентерамида (CL) и его аминокислотное окружение в (А) акворине (PDB 1UHK) и (Б) обелине (PDB 2F8P). Расстояния указаны в ангстремах. Красным цветом выделены протонно-донорные группы, синим – протонно-акцепторные группы аминокислотных остатков. His – гистидин; Trp - триптофан; Tyr – тирозин; Phe – фенилаланин.

**Зависимость спектров био- и фотолюминесценции обелина от концентрации кальция.** Изучение спектров биолюминесценции обелина при различных  $[Ca^{2+}]$  ( $4 \cdot 10^{-7} \div 5 \cdot 10^{-3}$  М) показало, что спектральные характеристики биолюминесценции обелина не зависят от  $[Ca^{2+}]$ .

Анализ спектров фотолюминесценции (испускания и возбуждения) разряженного обелина при различных  $[Ca^{2+}]$  ( $0 \div 5 \cdot 10^{-3}$  М) показал, что спектральные характеристики фотолюминесценции обелина зависят от  $[Ca^{2+}]$ . На рис. 11 приведены спектры фотолюминесценции разряженного обелина, полученного термоинактивацией ( $[Ca^{2+}] = 0$ ) и путем добавления к раствору обелина избытка  $CaCl_2$ . Присутствие  $Ca^{2+}$  вызывает сдвиг максимума спектра возбуждения в коротковолновую (на 4 нм), а максимума спектра испускания в длинноволновую (на 13 нм) область. При этом наблюдается уменьшение интенсивности коротковолнового плеча в спектре испускания.

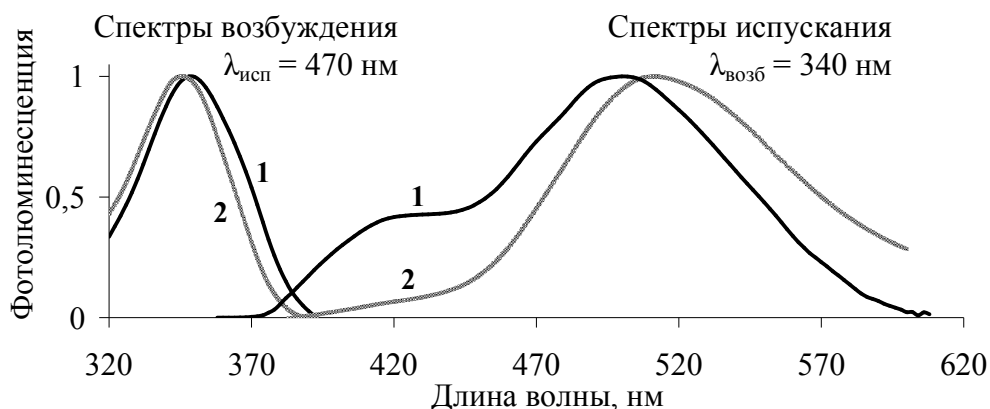


Рис. 11. Спектры фотолюминесценции разряженного обелина (1) в отсутствии и (2) присутствии ионов кальция,  $[Ca^{2+}] = 10^{-4}$  М,  $[Об] = 5 \cdot 10^{-7}$  М.

Были проанализированы интенсивность и спектральный состав фотолюминесценции обелина, разряженного при различных  $[Ca^{2+}]$ . Зависимость интенсивности люминесценции от  $[Ca^{2+}]$  в спектрах испускания приведена на рис. 12, в спектрах возбуждения – на рис. 13. Из рисунков видно, что в двойных логарифмических координатах зависимости имеют линейные участки в интервале концентраций  $2 \cdot 10^{-7} - 1,5 \cdot 10^{-6}$  М. Коэффициенты корреляции линейной аппроксимации для спектров испускания и возбуждения равны 0,984 и 0,996 соответственно. Приведенные данные указывают на принципиальную возможность использования фотолюминесценции разряженного обелина, наряду с биолюминесценцией [9], для количественного определения ионов кальция.

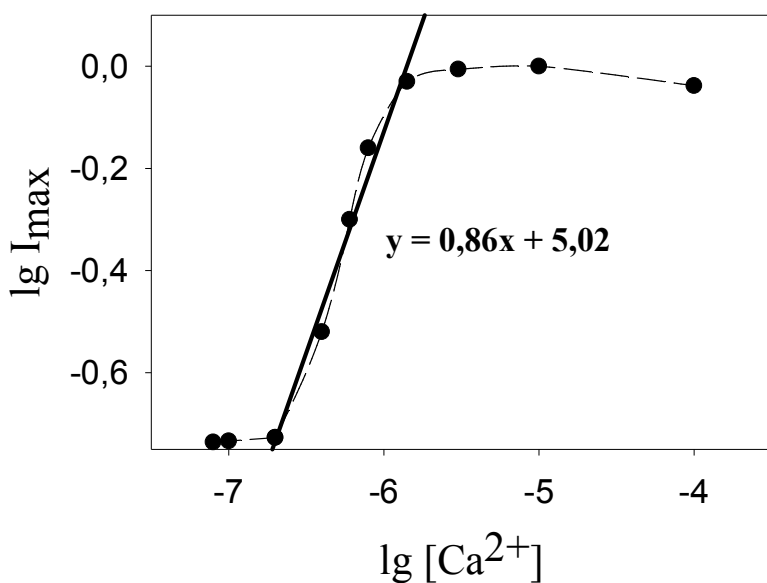


Рис. 12. Зависимость интенсивности фотолюминесценции разряженного обелина в спектрах испускания от  $[Ca^{2+}]$  (при  $\lambda_{\max} = 510$  нм),  $\lambda_{\text{возб}} = 340$  нм,  $[Об] = 5 \cdot 10^{-7}$  М.

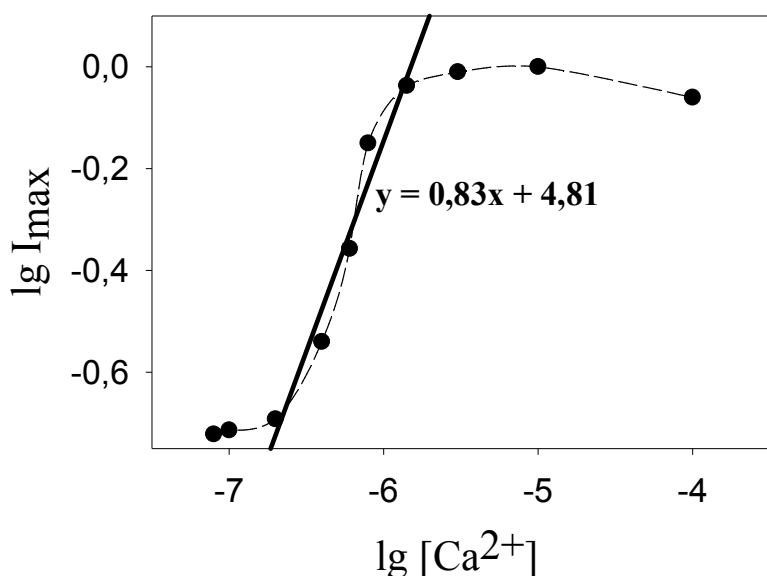


Рис. 13. Зависимость интенсивности фотолюминесценции разряженного обелина в спектрах возбуждения от  $[Ca^{2+}]$  (при  $\lambda_{\max} = 345$  нм),  $\lambda_{\text{исп}} = 510$  нм,  $[Об] = 5 \cdot 10^{-7}$  М.

Спектры фотолюминесценции (возбуждения и испускания) разряженного обелина, полученные при различных  $[Ca^{2+}]$ , были разложены на компоненты. Установлено, что положения максимумов соответствующих компонентов в



спектрах фотолюминесценции близки, не зависят от  $[Ca^{2+}]$  и соответствуют приведенным в таблице 1. В то же время, вклады компонентов изменяются с ростом  $[Ca^{2+}]$ .

На рис. 14 представлены вклады компонентов в спектры испускания обелина, разряженного при различных  $[Ca^{2+}]$ . В прямоугольнике приведены данные для спектра испускания разряженного обелина, полученного термоинактивацией ( $[Ca^{2+}] = 0$ ). Из рисунка видно, что изменение вкладов компонентов происходит скачкообразно при концентрациях кальция около  $5 \cdot 10^{-7}$  М. При этом с увеличением  $[Ca^{2+}]$ :

- вклад компонента V уменьшается;
- вклад компонента III увеличивается;
- исчезают компоненты IV, но появляется компонент I.

На рис. 15 представлены вклады компонентов в спектры возбуждения обелина, разряженного при различных  $[Ca^{2+}]$ . Из рисунка видно, что с увеличением  $[Ca^{2+}]$  вклады компонентов VI и VII уменьшаются, а вклад компонента VIII увеличивается.

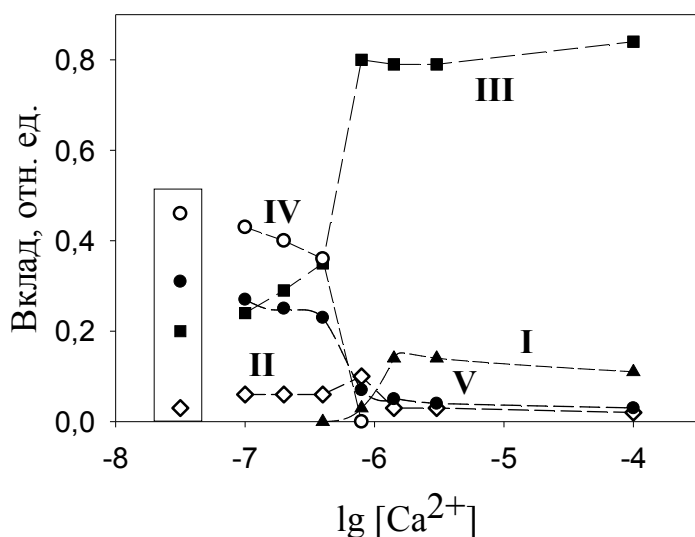


Рис. 14. Вклады компонентов в спектры испускания обелина, разряженного при различных  $[Ca^{2+}]$ . В прямоугольнике приведены данные для спектра испускания обелина, разряженного термоинактивацией,  $[Ca^{2+}] = 0$ .  $[Об] = 5 \cdot 10^{-7}$  М.

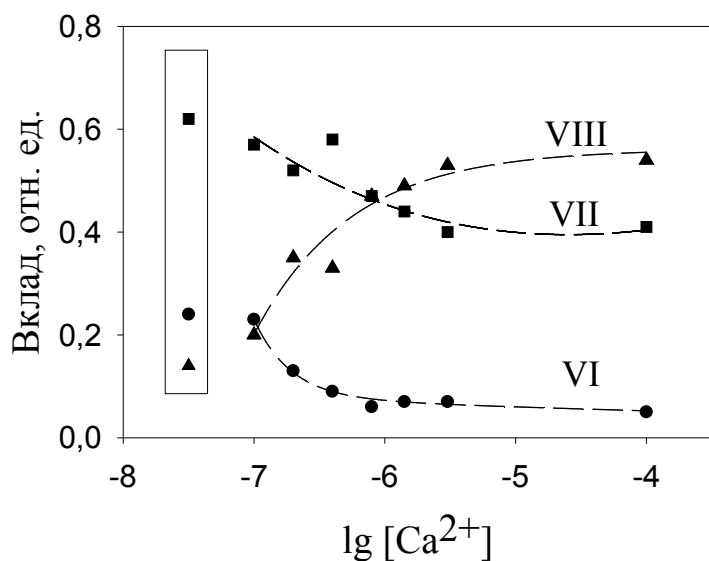


Рис. 15. Вклады компонентов в спектры возбуждения обелина, разряженного при различных  $[Ca^{2+}]$ . В прямоугольнике приведены данные для спектра возбуждения обелина, разряженного термоинактивацией,  $[Ca^{2+}] = 0$ .  $[Об] = 5 \cdot 10^{-7}$  М.

Зависимость спектров фотолюминесценции разряженного обелина от  $[Ca^{2+}]$ , вероятно, связана с заполнением  $Ca^{2+}$ -связывающих сайтов. Известно, что фотопротейины содержат три  $Ca^{2+}$ -связывающих сайта [1], вероятно, последовательное их заполнение приводит к изменению конформации белка, т.е. изменению расстояний между атомами в активном центре. В то же время, структура активного центра фотопротейина влияет на эффективность переноса протона и вероятность образования того или иного эмиттера, что, в конечном счете, определяет спектры возбуждения и испускания. Из рис. 14 и 15 следует, что конформационный переход осуществляется при концентрациях кальция около  $5 \cdot 10^{-7}$  М. При  $[Ca^{2+}] > 10^{-6}$  М наблюдается насыщение системы кальцием, и дальнейшее его увеличение в растворе не изменяет вклад компонентов в общий спектр.

Таким образом, показано, что спектр биолюминесценции обелина не зависит от  $[Ca^{2+}]$  в системе, в то время как спектры фотолюминесценции разряженного обелина (испускания и возбуждения) зависят. Это может указывать на то, что излучение света при биолюминесценции происходит при одной жесткой конформации белка, а фотолюминесценция разряженного обелина осуществляется, как минимум, при двух конформациях белка.

***Зависимость спектров фотолюминесценции разряженного обелина от длины волны возбуждения и испускания.*** Исследованы спектры возбуждения и испускания разряженного обелина при варьировании длин волн испускания и возбуждения соответственно. Спектры возбуждения регистрировали при длинах волн испускания 400–520 нм с шагом 10 нм. Спектры испускания регистрировали при длинах волн возбуждения 260–420 нм с шагом 10 нм. Полученные спектры были разложены на компоненты.

Установлено, что спектры испускания разряженного обелина являются суперпозицией четырех излучателей при всех длинах волн возбуждения. Спектры возбуждения разряженного обелина являются суперпозицией спектров трех излучателей при длинах волн испускания 450–480 нм (компоненты VI, VII, VIII, рис. 6), и четырех – при 490–510 нм. Положения максимумов соответствующих компонентов при варьировании длин волн возбуждения и испускания были близки значениям, приведенным в таблице 1. При этом вклады компонентов в значительной степени зависели от длины волны.

Зависимость спектров фотолюминесценции от длины волны возбуждения/испускания связана с их многокомпонентностью: меняя длину волны возбуждения/испускания, мы увеличиваем вклад того или иного излучателя в общий спектр. Эта зависимость, а также зависимость интенсивности фотолюминесценции от  $[Ca^{2+}]$  закладывают основу для соотнесения компонентов спектра возбуждения с компонентами спектра испускания и анализа процессов переноса протона в возбужденном состоянии.

## ВЫВОДЫ:

- 1 На примере обелина дикого типа и его мутанта F88Y экспериментально подтверждено заселение высших электронно-возбужденных состояний в  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемой биолюминесцентной реакции кишечнорастворимых. Энергия высших электронно-возбужденных состояний локализована около  $31000 \text{ см}^{-1}$ .
- 2 Предложен молекулярный механизм формирования первичного возбуждения в  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемой биолюминесцентной реакции, который включает стадию локализации возбуждения на кетоимидной группе целентерамида. Данная стадия предлагается в качестве общей для биолюминесцентных реакций бактерий и кишечнорастворимых.
- 3 Определены количество, вклады и спектральные характеристики компонентов в спектрах биолюминесценции обелина и акворина, а также спектрах фотолюминесценции разряженных обелина и акворина.
- 4 Проведено соотнесение выделенных компонентов спектров биолюминесценции и фотолюминесценции обелина и акворина различным эмиттерам – протонированной и депротонированным формам целентерамида; проиллюстрирована связь между эффективностью переноса протона в возбужденном состоянии целентерамида и аминокислотным окружением в активном центре фотопротеина.
- 5 Обнаружен линейный участок зависимости интенсивности фотолюминесценции разряженного обелина от концентрации ионов кальция в двойных логарифмических координатах в интервале концентраций  $2 \cdot 10^{-7}$  –  $1,5 \cdot 10^{-6} \text{ М}$ .
- 6 На основе анализа вкладов компонентов в спектры испускания и возбуждения обелина, разряженного при различных концентрациях ионов кальция, установлено наличие конформационного перехода в обелине при  $[\text{Ca}^{2+}] \sim 5 \cdot 10^{-7} \text{ М}$ .

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

### Статьи:

1. Белогурова Н.В., Кудряшева Н.С., Сизых А.Г. Спектральный и кинетический анализ биолюминесцентной реакции обелина // Вестник КрасГУ. Физико-математические науки, Красноярск, 2005, Т.4, С.99-104.
2. Belogurova N.V., Kudryasheva N.S., Alieva R.R., Sizykh A.G. Spectral components of bioluminescence of aequorin and obelin // J.Photochem. Photobiol.B, 2008, V.92, P.117–122.
3. Belogurova N.V., Alieva R.R., Kudryasheva N.S. Activity of upper electron-excited states in bioluminescence of coelenterates // J.Mol.Struct., 2009, V.924-926, P.148–152.
4. Belogurova N.V., Kudryasheva N.S. Discharged photoprotein obelin: fluorescence peculiarities // J.Photochem. Photobiol.B, 2010, V.101, P.103–108.

### Тезисы конференций:

5. Н.С. Кудряшева, Е.В. Немцева, Т.Н. Кириллова, Н.В. Белогурова. Формирование электронно-возбужденных состояний в биолюминесценции // Тезисы докладов III-го Съезда биофизиков России, Воронеж, 2004, Т.2, С. 429.
6. N.S. Kudryasheva, E.V. Nemtseva, T.N. Kirillova, N.V. Belogurova. Electron-excited states and energy transfer processes in bioluminescent reactions of luminous organisms // Abstracts of the 13th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence, J. Luminescence, Japan, 2004, V.19. №3. P.156-157.
7. N. Belogurova, N. Kudryasheva, R. Alieva, A. Sizykh. Spectral components of bioluminescence of aequorin and obelin // Abstract of the 12<sup>th</sup> European conference on the spectroscopy of biological molecules, Bobigny, France, 2007. P. 144.
8. N.S. Kudryasheva, N.V. Belogurova. Energy conversion in bioluminescent reaction // Abstract of the International conference molecular and nano scale systems for energy conversion “MEC-2007”, Moscow, Russia, 2007, P. 106.
9. N.V. Belogurova, N.S. Kudryasheva, R.R. Alieva and A.G. Sizykh. Upper Electron-Excited States in Coelenterate Bioluminescence // Abstract of the XXIX European Congress on Molecular Spectroscopy, Opatija, Croatia, 2008, P. 119.
10. Н.В. Белогурова, Н.С. Кудряшева, Р.Р. Алиева. Экспериментальная проверка гипотезы об активности высших электронно-возбужденных состояний в биолюминесценции кишечнополостных // Тезисы Международной конференции «Преобразование энергии света при фотосинтезе», V Съезд Российского фотобиологического общества, Пушкино, Россия, 2008– С. 199.
11. N.V. Belogurova, R.R. Alieva, N.S. Kudryasheva. Spectroscopic calibration of calcium nano-indicator: photoprotein obelin // Abstract of Conference “NanoIsrael 2009”, Israel, 2009.

12. N.S. Kudryasheva, N.V. Belogurova. Spectral components in coelenterate bioluminescence and in photoluminescence of  $\text{Ca}^{2+}$ -discharged photoproteins // Abstract of the XIII European conference on the spectroscopy of biological molecules, Palermo, Italy, 2009, P. pa72.
13. N.V. Belogurova, R.R. Alieva, N.S. Kudryasheva. Activity of upper electron-excited states in coelenterate bioluminescence // Abstract of the XIII European conference on the spectroscopy of biological molecules, Palermo, Italy, 2009 P. 76.
14. N.S. Kudryasheva, N.V. Belogurova. Spectral components in coelenterate bioluminescence and in photoluminescence of  $\text{Ca}^{2+}$ -discharged photoproteins // Abstract of the X International conference on molecular spectroscopy, Krakow, Poland, 2009, P. 29.
15. N.V. Belogurova, N.S. Kudryasheva. Fluorescence characteristics of discharged photoprotein obelin // Abstract of the 16<sup>th</sup> International symposium on bioluminescence and chemiluminescence, Lyon, France, 2010, P. 135.

### Цитируемая литература

1. Liu, Z.J. Structure of the  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated photoprotein obelin at 1.7 Å resolution determined directly from its sulfur substructure / Z.J. Liu, E.S. Vysotski, C.J. Chen, J.P. Rose, J. Lee, B.C. Wang // *J. Protein Science*, 2000. - V. 9, N 11. - P. 2085-2093.
2. Высоцкий, Е.С. Кальций-регулируемые фотопротеины морских кишечнорастворимых / Е.С. Высоцкий, С.В. Маркова, Л.А. Франк // *Журн. молекулярной биологии*, 2006. - Т.40, № 3. - С. 404-417.
3. Кудряшева Н.С. Электронно-возбужденные состояния при биолюминесценции / Н.С. Кудряшева, П.И. Белобров, В.А. Кратасюк, Д.Н. Шигорин // *Докл.АН СССР*, 1991. - Т. 321, № 4. - С. 837-841.
4. Немцева Е.В. Механизм электронного возбуждения в биолюминесцентной реакции бактерий / Е.В. Немцева, Н.С. Кудряшева // *Журн. Успехи химии*, 2007. - Т. 76, № 1. - С. 101-112.
5. Wilson T. Bioluminescence / T. Wilson, J.W. Hastings // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 1998. - V. 14. - P. 197 - 230.
6. Шигорин Д.Н. Электронно-возбужденные состояния многоатомных молекул / Д.Н. Шигорин, Г.А. Валькова, Е.А. Гаспилович // М.: Наука, 1993. - 495с.
7. Liu Z. J. Crystal structure of obelin after  $\text{Ca}^{2+}$ -triggered bioluminescence suggests neutral coelenteramide as the primary excited state / Z. J. Liu, G.A. Stepanyuk, E.S. Vysotski, J. Lee, S.V. Markova, N.P. Malikova, B.C. Wang // *PNAS*, 2006. – V. 103 N 8. - P. 2570-2575.
8. Shimomura O. Light-emitters involved in the luminescence of coelenterazine / O. Shimomura, K. Teranishi // *J. Luminescence*, 2000. - V. 15. - P. 51-58.
9. Illarionov B.A. Recombinant obelin: cloning and expression of cDNA, purification, and characterization as a calcium indicator / B.A. Illarionov, L.A. Frank, V.A. Illarionova, V.S. Bondar, E.S. Vysotski, J.R. Blinks // *J. Methods in enzymology*, 2000. - V. 305. - P. 223-249.