

УДК 577.33/.34; 577.355; 535.37

СПЕКТРАЛЬНЫЙ И КИНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ РЕАКЦИИ ОБЕЛИНА<sup>1</sup>Н.В. Белогурова, Н.С. Кудряшева,  
А.Г. Сизых\*

*Методами флуоресцентной спектроскопии исследована биолюминесцентная реакция морского гидроидного полипа *Obelia longissima*. Проведено разделение спектра биолюминесценции и идентифицирована функциональная принадлежность составляющих. Найдено, что для двух исследованных модификаций обелина (так называемой “дикий” формы и мутанта Y138F), сходных по спектральным характеристикам, наблюдается различие в кинетике высвечивания биолюминесценции).*

Биолюминесценция – свечение живых организмов. Это явление представляет собой частный случай хемилюминесценции, катализируемой биологическими катализаторами – ферментами люциферазами. Среди биолюминесцентных реакций интересны кальций-зависимые реакции благодаря их практическому применению в качестве биолюминесцентных и флуоресцентных меток в медицинских и биологических исследованиях, например при иммуноферментном анализе [1].

Кальций-зависимая биолюминесцентная система морского гидроидного полипа *Obelia longissima* изучается не так давно. Фотопротейн (комплекс люциферазы и люциферина) этого гидроидного полипа назван обелином. Он был выделен, очищен [2,3], клонирован, проанализирована его аминокислотная последовательность [4], проведен рентгеноструктурный анализ его трехмерной кристаллической структуры с разрешением 1,7Å [5]. Спектр биолюминесцентной реакции обелина впервые опубликован в работе [6].

Биолюминесценция различных форм обелина представляет собой комбинацию спектров нескольких излучателей, являющихся продуктами биолюминесцентной реакции и образующихся по сложной схеме последовательных и параллельных реакций [7]. Анализ структуры спектра биолюминесценции обелина и его изменение со временем в ходе реакции до сих пор не проводился. Однако такой анализ полезен в плане детализации механизма формирования возбуждения в биолюминесцентной реакции с целью дальнейшего целенаправленного изменения спектральных свойств этой системы [8].

**Материалы и методика эксперимента**

В работе были использованы следующие препараты и реактивы: трис (трис[гидроксиметил]аминометан) (чда); ЭДТА (чда); хлорид кальция (чда); рекомбинантный обелин и мутант обелина Y138F, полученные в лаборатории фотобиологии Института биофизики СО РАН.

Из перечисленных препаратов готовились рабочие растворы: трис-ацетатный буфер (рН 7) с концентрацией триса 0,02 М и концентрацией ЭДТА 0,005 М; раствор хлорида кальция концентрацией 0,05 М; раствор обелина концентрацией 0,145 мг/мл.

Исследовались растворы следующего состава: 0,1 мг/мл обелина или 0,1 мг/мл мутанта обелина Y138F; 0,02 М триса; 0,005 М ЭДТА; 0,00125 М хлорида кальция.

Измерение спектров люминесценции производилось на спектрометре Amnico-Bowman Series 2 (США). Использовалась флуориметрическая кювета с зеркальными стенками сечением 5x5 мм. Следует отметить, что образцы обеих форм обелина индивидуальны, их люминесцентные и, по-видимому, физико-химические свойства переменны. Кинетика развития биолюминесцентной реакции после запуска ионами кальция зависит от стартовых условий эксперимента, в том числе и неконтролируемых. Поэтому момент времени выхода интенсивности биолюминесценции на максимум свечения отстроен от начала запуска и величина отстройки варьируется. Контрольные измерения интенсивности биолюминесценции с помощью спектрофлуориметра, работающего в режиме развертки по времени, показали, что нарастание интенсивности после запуска с выходом в квазистационарное состояние достигается в течение 10–20 с. При измерении спектров этот момент контролировался по индикатору интенсивности спектрофлуориметра и не мог быть отстроен более чем на 20 с. Время измерения каждого спектра (~25 с) значительно меньше длительности полного высвечивания биолюминесценции. Так, в наших экспериментах для «дикий» формы обелина она составила 380 с, а для мутанта – 580 с.

Серия спектров биолюминесценции регистрировалась при постоянном напряжении на ФЭУ 900 В, скорости сканирования 12 нм/с и размере щели 4 нм. Съемка спектров фотолюминесценции продукта реакции

<sup>1</sup> Работа выполнена при финансовой поддержке следующих грантов: грант ИНТАС 2000-0562, 2000-2005 гг., «Роль высших электронно-возбужденных состояний в биолюминесценции»; грант Министерства образования Российской Федерации и CRDF REC002, 1999-2005 гг., «Научно-образовательный центр «Енисей»: экологизация технологий и образования»; Программа СО РАН по физико-химической биологии, грант «Молекулярные механизмы образования эмиттера в биолюминесцентных реакциях различных организмов», 2003-2005 гг.

\* © Н. В. Белогурова, Н. С. Кудряшева, А. Г. Сизых, Красноярский государственный университет, 2005.

производилась при возбуждении длиной волны 340 нм. Спектр возбуждения продукта регистрировался на длине волны 500 нм.

После записи производилось сглаживание спектров и коррекция на спектральную чувствительность спектрометра.

Разделение сложных спектров на составляющие выполнялось методом анализа приращения функции К.Б. Яцимирского и Т.В. Мальковой [9], уточнение положения максимумов - методом второй производной [10,11].

Спектр биолюминесценции разделялся на три контура. Один из них соответствовал продукту реакции, а два других согласно данным работы [7] – эмиттерам биолюминесценции. Форма спектра продукта в биолюминесцентном контуре определялась по спектру фотолуминесценции реакционной смеси после протекания реакции. Формы спектров эмиттеров задавались гауссовым распределением.

Разделение общего контура и анализ кинетических закономерностей производились двумя способами: 1) выполнялось разделение ненормированного суммарного контура биолюминесценции, и анализировались зависимости интегральной интенсивности выделенных контуров в ходе биолюминесцентной реакции. Эти данные позволяли выявить кинетические закономерности спада интенсивности для каждого из компонентов сложного контура; 2) производилось разделение нормированного по максимуму интенсивности суммарного контура биолюминесценции, и анализировались зависимости интегральной интенсивности выделенных контуров от времени протекания биолюминесцентной реакции. Эти данные позволили найти закономерности перераспределения интенсивности частных контуров внутри нормированного общего контура.

### **Результаты и обсуждение**

Спектр биолюминесцентной реакции обелина представляет собой широкий (до  $4500\text{см}^{-1}$ ) контур, являющийся суперпозицией трех индивидуальных контуров с максимумами при значениях волновых чисел  $\tilde{\nu}_I = 19800\text{см}^{-1}$ ,  $\tilde{\nu}_{II} = 21600\text{см}^{-1}$ ,  $\tilde{\nu}_{III} = 25000\text{см}^{-1}$  (рис. 1). Мотивация деления сложного контура на три составляющих основана на результатах работы [7] и настоящего исследования, из которых следует, что спектр биолюминесценции формируется излучением двух эмиттеров [7]; кроме того, должен существовать продукт реакции, по своему строению сходный со строением эмиттера. Существование продукта видно из данных рис. 1, где представлен спектр фотолуминесценции реакционной смеси после протекания биолюминесцентной реакции при возбуждении на длине волны 340 нм. Этот спектр по положению и форме совпадает со спектром целентрамида - продукта биолюминесцентной реакции [12]. Следует отметить, что люминесценция продукта может возбуждаться в процессе самой реакции по каналам излучательного или безызлучательного переноса энергии от эмиттера к продукту, так как энергия флуоресцентного состояния продукта меньше чем энергия аналогичного состояния эмиттера. Как следует из рис. 1, переносу энергии способствует небольшое перекрытие коротковолнового крыла спектра биолюминесценции со спектром возбуждения продукта (СВП). Поэтому продукт вносит свой вклад в суммарный спектр биолюминесценции. Похожее явление наблюдалось в спектре бактериальной биолюминесценции *in vitro* [13]. Следует отметить, что спектры биолюминесценции «дикого» обелина и его мутанта Y138F близки по форме. Различие состоит в смещении максимума «дикого» обелина относительно максимума мутанта на 4 нм в длинноволновую сторону. В отдельных препаратах мутанта Y138F коротковолновый максимум, соответствующий контуру III, был представлен со значительно меньшим весом. Возможной причиной отмеченных спектральных изменений может быть влияние структуры белкового окружения субстрата, формирующего тип межмолекулярного взаимодействия субстрат–белок. Поскольку в форме спектров «дикого» и мутанта обелина наблюдаются незначительные различия, было высказано предположение, что природа этих препаратов может проявиться в различии кинетики биолюминесцентного свечения.

С учетом существующей версии механизма биолюминесцентной реакции [7] составляющие II и III сложного контура биолюминесценции можно отождествить со спектрами двух эмиттеров, причем второй контур представляет собой спектр люминесценции фенолят аниона целентрамида, а третий - его неионизированной формы (рис. 2). Следует отметить, что максимум второго контура, соответствующий более эффективному эмиттеру, не совпадает с максимумом суммарного спектра, как предполагалось ранее [7]. Вместе с тем он близок к максимуму спектра биолюминесценции акворина, наиболее изученного из всех фотопротеинов [14,15] и являющегося ферментом другого кишечнополостного *Aequorea Victoria*.

Разделение спектров позволило проследить за изменениями характеристик отдельных контуров в спектре биолюминесценции в ходе реакции и сравнить эти изменения с модификацией характеристик общего контура. На рис. 3 приведены зависимости относительной интегральной интенсивности контуров (общего (БЛ), I, II и III) от времени биолюминесцентной реакции, катализируемой «дикой» формой обелина. Из рисунка видно, что характеры изменений во времени относительной интегральной интенсивности трех выделенных контуров и общего контура близки и описываются экспоненциальной зависимостью

$$I = I_{\infty} + I_0 \cdot \exp(-kt) \quad (1)$$

с высоким значением коэффициента корреляции (R). Величина k имеет смысл эмпирической константы скорости, характеризующей процесс спада интенсивности биолюминесценции. Параметры уравнения (1) для дикой формы обелина приведены в табл. 1. Величины стандартных отклонений, указанных для параметров уравнения (1) и далее для уравнения (2) (табл. 2), характеризуют точность аппроксимации, выполненной по совокупности экспериментальных точек отдельного эксперимента.

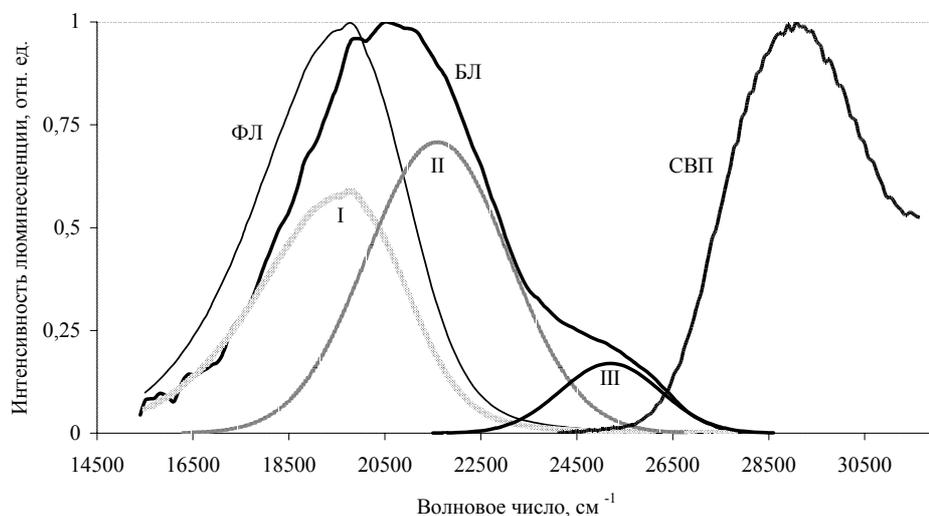


Рис.1. Спектр биолюминесценции обелина и его составляющие: БЛ – суммарный спектр биолюминесценции и его составляющие I, II, III; ФЛ – фотолуминесценция продукта реакции ( $\lambda_{возб} = 340$  нм); СВП – спектр возбуждения продукта ( $\lambda_{регист} = 500$  нм)

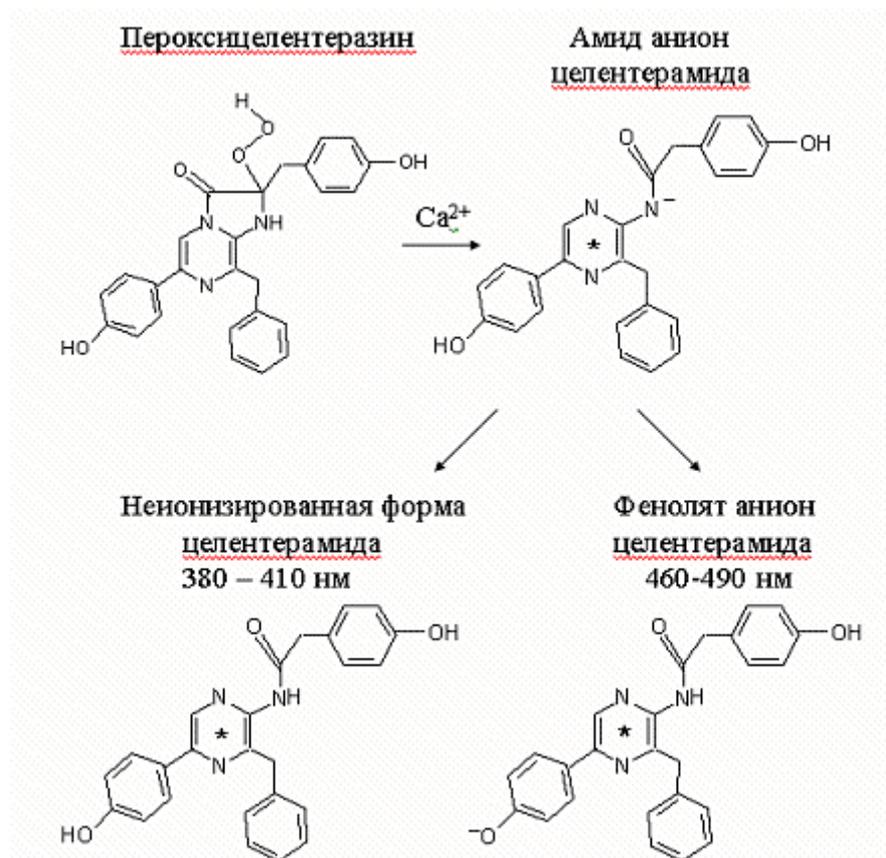


Рис. 2. Упрощенная схема биолюминесцентной реакции обелина. Интервалы длин волн для конечных форм целентерамида соответствуют положению максимумов спектров их биолюминесценции [7]

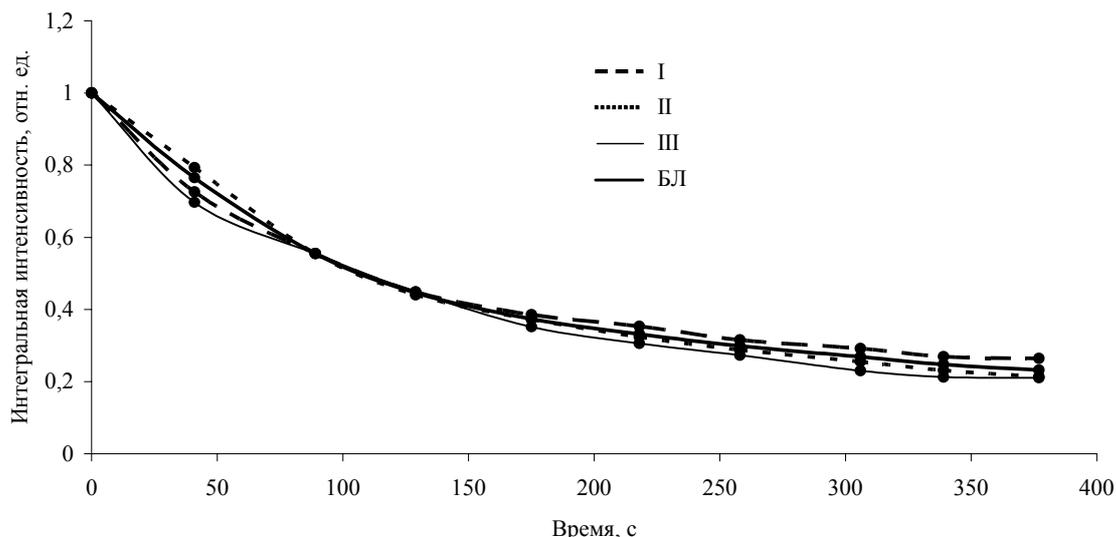


Рис. 3. Зависимости относительной интегральной интенсивности от времени суммарного спектра биолюминесценции «дикой» формы обелина (БЛ) и его компонентов (I, II, III)

Таблица 1

Параметры зависимости (1) контуров I, II, III в спектре биолюминесценции «дикой» формы обелина

Параметры уравнения (1)	I контур	II контур	III контур	Суммарный контур
$I_{\infty}$	$3600 \pm 120$	$3400 \pm 260$	$600 \pm 50$	$7300 \pm 250$
$I_0$	$10300 \pm 160$	$14400 \pm 300$	$2600 \pm 70$	$26600 \pm 320$
$k$	$(1,02 \pm 0,04) \cdot 10^{-2}$	$(0,87 \pm 0,05) \cdot 10^{-2}$	$(0,90 \pm 0,06) \cdot 10^{-2}$	$(0,92 \pm 0,03) \cdot 10^{-2}$
R	0,999	0,984	0,998	0,999

Таблица 2

Параметры зависимости (2) контуров I, II, III в спектре биолюминесценции мутанта обелина Y138F

Параметры уравнения (2)	I контур	II контур	III контур	Суммарный контур
$I_{01}$	$2500 \pm 80$	$4000 \pm 60$	$1000 \pm 50$	$7500 \pm 130$
$k_1$	$(2,8 \pm 0,2) \cdot 10^{-2}$	$(4,3 \pm 0,2) \cdot 10^{-2}$	$(2,7 \pm 0,3) \cdot 10^{-2}$	$(3,4 \pm 0,1) \cdot 10^{-2}$
$I_{02}$	$4900 \pm 75$	$5400 \pm 50$	$1200 \pm 40$	$11500 \pm 110$
$k_2$	$(1,40 \pm 0,07) \cdot 10^{-3}$	$(1,70 \pm 0,03) \cdot 10^{-3}$	$(1,20 \pm 0,01) \cdot 10^{-3}$	$(1,50 \pm 0,03) \cdot 10^{-3}$
R	0,999	0,999	0,999	0,999

Из табл. 1 видно, что величины константы скорости  $k$  для трех спектральных составляющих и суммарного контура близки. Спад интенсивности биолюминесценции определяется истощением химической накачки энергии возбуждения эмиттера.

Аналогичными методами исследована реакция, катализируемая мутантной формой обелина Y138F. Зависимости относительной интегральной интенсивности биолюминесценции от времени для трех выделенных составляющих и суммарного контура приведены на рис. 4. Из рисунка видно, что зависимость относительной интегральной интенсивности контуров (общий, I, II, III) от времени не описывается простой экспоненциальной зависимостью, как это было в случае «дикой» формы обелина (рис. 3), а аппроксимируются суммой двух экспонент:

$$I = I_{01} \cdot \exp(-k_1 t) + I_{02} \cdot \exp(-k_2 t). \quad (2)$$

Функциональная форма зависимости интегральной интенсивности биолюминесценции от времени (в рамках наших экспериментов) для обеих форм обелина уверенно фиксируется после 10–20 с от начала запуска реакции. В связи с этим можно полагать, что различие в кинетике биолюминесценции разных форм обелина в целом не искажено.

Проверка воспроизводимости функциональной зависимости спада интенсивности биолюминесценции показала, что для десяти случаев запуска реакции «дикой» формы обелина сохраняется экспоненциальный характер спада, но константа скорости варьируется в пределах от  $1 \cdot 10^{-2}$  до  $5 \cdot 10^{-2} \text{ с}^{-1}$ .

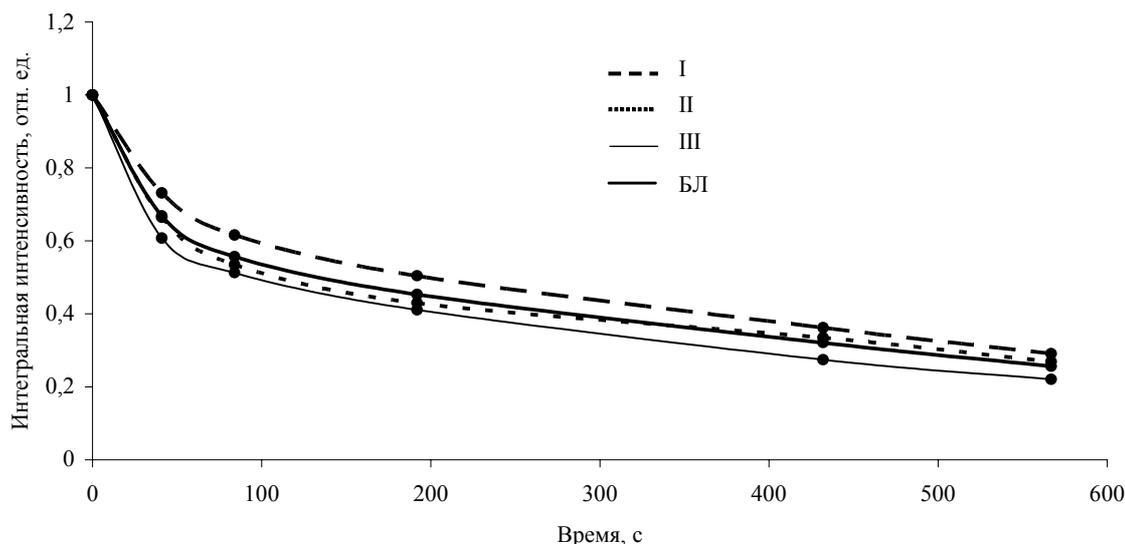


Рис. 4. Зависимости относительной интегральной интенсивности от времени для суммарного спектра биолюминесценции мутанта обелина Y138F (БЛ) и его компонентов (I, II III)

Из сопоставления данных табл. 1 и 2 следует, что для мутанта обелина константа скорости  $k_1$  в несколько раз выше, а  $k_2$  существенно ниже величины  $k$  для реакции, катализируемой «дикой» формой обелина.

По нормированным спектрам биолюминесценции обоих типов обелина было найдено изменение вклада компонент (контуры I, II, III на рис. 1) в суммарный контур в ходе протекания биолюминесцентной реакции. Из рис. 5 а и б видно, что в обоих случаях интегральная интенсивность первого контура возрастает с течением времени, а второго и третьего падает. Увеличение вклада флуоресценции продукта (I контур) в общий спектр биолюминесценции связано с его накоплением в ходе биолюминесцентной реакции.

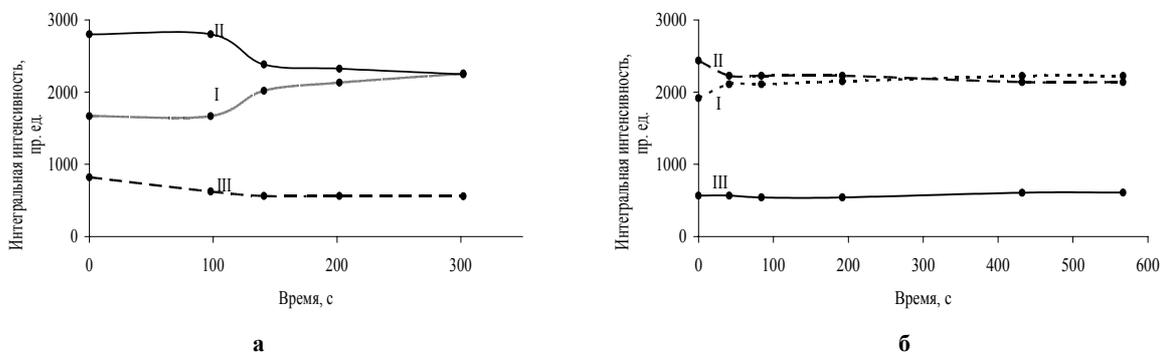


Рис. 5. Изменение интегральной интенсивности контуров (I, II, III) в нормированных спектрах биолюминесценции «дикой» формы обелина (а) и мутанта обелина Y138F (б) в ходе реакции

Измерение ширины контура биолюминесценции и анализ изменения формы контуров I, II и III в зависимости от времени реакции показали, что уменьшение на  $480 \text{ см}^{-1}$  ширины контура биолюминесценции в случае «дикой» формы обелина до значения  $4050 \text{ см}^{-1}$ , наблюдаемого для мутанта, обусловлено в основном перераспределением интегральных интенсивностей контуров I и II (рис.5).

По результатам выполненной работы можно сделать выводы.

1. Исследована структура спектров биолюминесценции и зависимости интегральной интенсивности от времени протекания реакции для двух форм обелина.

2. Проведено разделение сложного спектра на составляющие. Показано, что спектр биолюминесценции состоит из трех контуров, два из которых соответствуют эмиттерам биолюминесценции (фенолят аниону целентерамида и его неионизированной форме), а третий - представляет флуоресценцию продукта реакции.

3. Показано, что кинетика спада интегральных интенсивностей компонент спектра биолюминесценции мутанта обелина, в отличие от его дикой формы, характеризуется более сложной, двухэкспоненциальной зависимостью и различием констант скоростей высвечивания.

4. Анализ зависимостей от времени интегральной интенсивности контуров I, II, III нормированного суммарного спектра биолюминесценции «дикой» формы обелина и его мутанта Y138F показал, что изменение формы суммарного контура биолюминесценции в процессе реакции обусловлено перераспределением интегральной интенсивности контуров I, II, III. Доминантой в этом процессе является уменьшение ширины контура II.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Matz M.V, Fradkov A.F., Labas Y.A. // Nature Biotechnol. -1999. -Vol. 17, № 10. -P. 969 – 973.
2. Бондарь В.С. Физико-химические свойства фотопротейна из гидроидного полипа *Obelia longissima* / В.С. Бондарь К.П. Трофимов, Е.С. Высотский // Биохимия. -1992. -№ 57. -С 1020-1027.
3. Illarionov B.A. 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 // Methods Enzymol. -2000. -№ 305. -P 223-249.
4. Illarionov B.A. Sequence of the CDNA encoding the  $Ca^{2+}$ -activated photoprotein obelin from the hydroid polyp *Obelia longissima* / B.A. Illarionov, V.A. Illarionova, V.S. Bondar, E.S. Vysotski, J.R. Blinks // Gene. -1995. - № 153. -P 223.-249.
5. Liu Z.-J. Structure of the  $Ca^{2+}$ -regulated photoprotein obelin at 1,7 E resolution determines directly from its sulfur substructure / Z.-J.Liu, E.S. Vysotski, C.-J. Chen, J.P. Rose, J. Lee, B.-C. Wang. // Protein structure. -2000. - № 9. -P. 2085-2093.
6. Markova S.V. Obelin from the Bioluminescent Marine Hydroid *Obelia geniculata*: Cloning, Expression, and Comparison of Some Properties with Those of Other  $Ca^{2+}$ -regulated Photoproteins / S.V. Markova, E.S. Vysotski, J.R. Blinks, L.P. Burakova, B-C. Wang, J. Lee. // Biochemistry. -2002. -№ 41. -P 2227-2236.
7. Vysotski E. S.  $Ca^{2+}$ -Regulated Photoproteins: Structural Insight into the Bioluminescence Mechanism / E. S. Vysotski, J. Lee // Acc. Chem. Rec. -2004. -№ 37. -P 405-415.
8. Белогурова Н.В. Спектральный и кинетический анализ биолюминесцентной реакции морского кишечного *Obelia Longissima* / Н.В Белогурова // Сборник тезисов одиннадцатой всерос. науч. конф. студентов-физиков. – Екатеринбург, 2005. -С.401-402.
9. Яцимирский К. Б. Рациональный спектрофотометрический метод определения состава и устойчивости комплексных соединений / К.Б. Яцимирский, Т.В. Малькова // Спектроскопические методы в химии комплексных соединений. -М.-Л.:Химия, 1984. –С. 102-116.
10. Кучеренко Б.И. О разложении сложного спектрального контура на индивидуальные полосы / Б.И. Кучеренко // Журн. прикладн. спектроскопии. - 1975. - Т. 23, вып. 2. -С. 352-355.
11. Михайленко В.И. Разделение перекрытых асимметричных полос / В.И. Михайленко, Ю.П. Редкин // Журн. прикладн. спектроскопии. - 1979. -Т. 31, вып.5. -С. 919-921.
12. Deng L. Structural basis for the emission of violet bioluminescence from a W92F obelin mutant / L. Deng, E.S. Vysotski, Z.J. Lui, S.V. Markova, N.P. Malikova, J Lee., J. Rose, B.C. Wang // J. FEBS Letters. -2001. - № 506. -P. 281.- 285.
13. Kudryasheva N.S. Mechanisms of xenobiotics' effects on bacterial bioluminescence / N.S. Kudryasheva // Luminescence. -1999. -Vol. 14. -P. 199.-200.
14. Chiesa A. Recombinant aequorin and green fluorescent protein as valuable tools in the study of cell signaling. Review / A. Chiesa, E. Rapizzi, V. Tosello, P. Pinton, M. de Virgilio, K.E Fogarty, R. Rizzuto // Biochem. - 2001. -№ 355. –P. 1-12.
15. Ohmiya Y. Shining the light: the mechanism of the bioluminescence reaction of calcium-binding proteins / Y. Ohmiya, T. Hirano // Chem.Biol. -1996. -№ 3. –С. 337-347.

### SPECTRAL AND KINETIC STUDY OF BIOLUMINESCENT REACTION OF MARINE COELENTERATE *OBELIA LONGISSIMA*

N.V. Belogurova, N.S. Kudryasheva  
A.G. Sizykh

*UV and visible spectroscopy techniques were applied to study bioluminescent reaction of marine hydroid *Obelia Longissima*. Identification of the components of the bioluminescence spectra was provided; the spectrum was found to integrate three individual spectral components. It was found, for two modifications of obelin similar spectral characteristic there is difference in kinetic of bioluminescent glow.*