

БИОФИЗИКА
(медицинская физика)

УДК 535.37: 53.072

**МОДЕЛИРОВАНИЕ КИНЕТИКИ ПЕРЕНОСА ЭНЕРГИИ ЭЛЕКТРОННОГО ВОЗБУЖДЕНИЯ
В БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ СИСТЕМЕ В ПРИСУТСТВИИ КСАНТЕНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ¹****М.А. Герасимова, А.Г. Сизых, Е.А. Слюсарева***

Создана кинетическая модель фотопроцессов, протекающих в системе: эмиттер биолюминесценции и акцептор энергии возбуждения (ксантеновый краситель). В модели рассмотрены: трехуровневый краситель, эмиттер биолюминесценции с химической накачкой, а также следующие процессы: биолюминесценция, ее тушение, абсорбция биолюминесценции красителем, безызлучательный перенос энергии от эмиттера к красителю, сенсibilизированная флуоресценция красителя. В квазистационарном приближении получено аналитическое решение для населенностей эмиттера биолюминесценции и красителя, позволяющее проанализировать экспериментальные данные и извлечь информацию о соотношении констант скоростей фотофизических процессов в системе.

Введение

Перенос электронной энергии возбуждения в биолюминесцентной системе является вероятным событием и реализуется при образовании межмолекулярного донорно-акцепторного комплекса на основе индуктивно-резонансной или обменно-резонансной связи. В качестве доноров могут выступать ароматические аминокислотные остатки ферментов, в частности триптофан, а акцепторов — эмиттер биолюминесценции или его высоковозбужденный предшественник. Эти компоненты биолюминесцентной системы используются как естественные флуоресцентные метки для слежения за процессами миграции энергии возбуждения. Так, в работе [1] исследован перенос энергии возбуждения между триптофаном и нековалентно связанной простетической группой флавиномононуклеотида (ФМН) в двух типах флаводоксина. Показано, что перенос энергии между этими хромофорами, разделенными расстоянием примерно 20 Å, характеризуется существенно различающимися значениями констант скоростей ($10^8 - 10^{12} \text{ с}^{-1}$) в зависимости от их взаимной ориентации. Этот случай может служить иллюстрацией аналогичной ситуации в биолюминесцентной системе.

Другой метод исследования базируется на получении информации с помощью специально вводимых флуоресцирующих акцепторов. По сути дела решение вопроса об уровне локализации первичного хемивозбуждения и маршруте его миграции к первому возбужденному (излучательному) состоянию эмиттера остается открытым. В нескольких ранних работах изучались вопросы, связанные с формированием положения полосы биолюминесценции в ряде бактериальных биолюминесцентных систем с добавками люмазинового белка (6,7-диметил-8-рибитиллюмазин на белке) [2, 3] или ФМН-Y1- и Rf-Y1-белков, имеющих максимум люминесценции в области 542 нм [4]. В первом случае максимум спектра биолюминесценции смещается в коротковолновую (475 нм), а во втором — в длинноволновую область (542 нм) от его естественного положения (496 нм). Авторы цитируемых работ объясняют наблюдаемые спектральные сдвиги безызлучательным переносом энергии возбуждения эмиттера биолюминесценции (4а-гидрокси-1,5-дигидро ФМН [3]) к добавкам, являющимся акцепторами возбуждения. Отмечается, что константа скорости переноса энергии на порядок и более превышает вероятность спонтанной дезактивации донора в отсутствие акцептора. Эксперимент, выполненный с люмазиновым белком [2, 3], можно считать одним из первых экспериментов по зондированию положения уровня первичного хемивозбуждения в биолюминесцентной реакции. Более детальное исследование в этом направлении осуществлено в работе [5]. По гипотезе авторов, эмиттер биолюминесцентной системы образуется в высоковозбужденном состоянии, а затем следует внутримолекулярная миграция энергии возбуждения в излучательное состояние. Путем подбора подходящих акцепторов найден вероятный интервал энергии локализации первичного хемивозбуждения ($26000 - 27000 \text{ см}^{-1}$).

Целесообразным является исследование отклика биолюминесцентной системы на введение люминесцирующих соединений, с одной стороны, играющих роль акцепторов энергии возбуждения эмиттера и дающих

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования Российской Федерации и Американского фонда гражданских исследований и развития, грант № RUX0-002-KR-06, программа «Фундаментальные исследования и высшее образование».

*© М.А. Герасимова, А.Г. Сизых, Е.А. Слюсарева, Красноярский государственный университет, 2006; E-mail: marina_2506@mail.ru

информацию об эволюции спектральных и кинетических характеристик системы, а с другой — являющихся вероятными ингибиторами биолюминесцентной реакции. В настоящей работе анализируется роль ряда ксантеновых красителей (флуоресцеин, эозин, эритрозин) как акцепторов, которые различаются величиной спин-орбитального взаимодействия. Перераспределение вероятностей излучательных и безызлучательных процессов в красителе-акцепторе при переходе от флуоресцеина к эритрозину не только уменьшает среднее время жизни возбужденного синглетного состояния красителя [6], но также может влиять на скорость безызлучательного переноса энергии.

В настоящее время накоплен большой экспериментальный материал по кинетике биолюминесценции в отсутствие и присутствии красителей ксантенового ряда с различной концентрацией [7], а также хроноскопии эффектов взаимодействия ксантеновых красителей с ферментами [6]. Из этих исследований можно заключить:

1. В отсутствие добавок интенсивность биолюминесценции представляет собой затухающую со временем функцию, которая описывается суммой двух экспонент. Параметры спада зависят от соотношения концентраций между компонентами биферментной биолюминесцентной реакции. При оптимальном подборе этих условий характерное время высвечивания системы составляет несколько десятков минут.

2. В присутствии красителя меняются кинетические характеристики и интегральный выход биолюминесценции. С увеличением концентрации добавки-красителя биолюминесценция тушится и этот эффект нарастает при переходе от флуоресцеина к эритрозину. Кинетика биолюминесценции в присутствии красителя также описывается двухэкспоненциальной функцией.

3. Межмолекулярное взаимодействие («связывание») с ферментом проявляют красители, имеющие высокий выход в триплетное состояние. При этом уменьшается скорость интеркомбинационной конверсии красителя (примерно в два раза) и увеличивается время жизни возбужденного состояния. Вероятно, изменяется активность фермента, влияющая на ход биолюминесцентной реакции. Флуоресцеин, не имеющий тяжелых атомов, такого эффекта не демонстрирует.

Моделирование тушения биолюминесценции

Известно, что максимум спектра бактериальной биолюминесценции в буферном растворе находится в области 495-505 нм [8]. Люминесцирует промежуточный короткоживущий продукт, именуемый в дальнейшем эмиттером биолюминесценции (E). Затухание интенсивности биолюминесценции связано с расходом компонента и функционально определяется кинетикой реакции [8, 9], моделирование которой является отдельной задачей. Ввиду сложности решения полной кинетической задачи с целью определения населенности эмиттера введем в рассмотрение функцию химической накачки эмиттера $F(t)$, которая определяет зависимость населенности эмиттера биолюминесценции от времени $E(t)$:

$$E(t) = A_1 \exp(-k_1 t) + A_2 \exp(-k_2 t), \quad (1)$$

где A_1 , A_2 , k_1 , k_2 — эмпирические константы. Данная зависимость отражает результат протекания биферментной биолюминесцентной реакции и при совпадении начальных условий характеризуется функциональной воспроизводимостью.

Ксантеновые красители (A) имеют широкий спектр поглощения с максимумами для флуоресцеина 490 нм, эозина 516 нм, эритрозина 526 нм [10]. В совместной кинетической схеме учтены: биолюминесценция и ее тушение, флуоресценция, фосфоресценция и интеркомбинационная конверсия красителя, абсорбция биолюминесценции красителем, синглет-синглетный перенос энергии возбуждения от эмиттера биолюминесценции (донора) к красителю (акцептору). Последние процессы играют важную роль благодаря существенному перекрытию спектров биолюминесценции и поглощения красителя.

Межмолекулярное взаимодействие фермент-краситель и влияние красителя на субстраты биолюминесцентной реакции может быть учтено косвенным образом через коррекцию функции химической накачки.

Схема энергетических уровней и совокупность излучательных и безызлучательных процессов представлена на рис. 1. $[E]$, $[S_0]$, $[S_1]$, $[T_1]$ — населенности возбужденного состояния эмиттера, основного и первого синглетных, а также триплетного состояний красителя соответственно. На схеме введены следующие обозначения констант скоростей: k_{bl} — биолюминесценции эмиттера, k_q — тушения эмиттера, k_f — флуоресценции красителя, k_{isc} — интеркомбинационной конверсии красителя в триплетное состояние, k_{ph} — фосфоресценции, k_{abs} — абсорбции биолюминесценции, k_{et}^* — переноса энергии.

В теории безызлучательного переноса энергии [11] используются два типа констант скоростей: мономолекулярная k_{et}^* , c^{-1} и бимолекулярная k_{et} , $M^{-1}c^{-1}$. В кинетической схеме нашей задачи используется независимая от концентрации акцептора бимолекулярная константа переноса энергии.

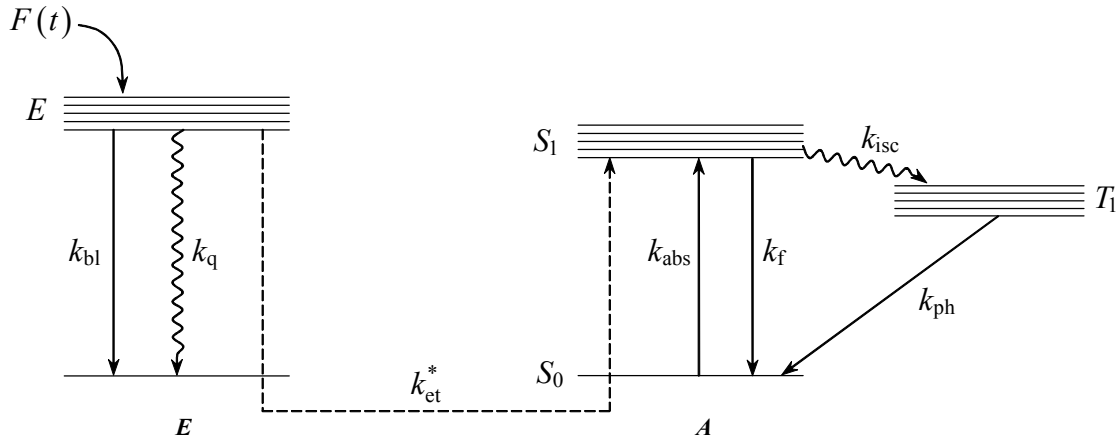


Рис. 1. Схема энергетических уровней и фотопроцессов в системе эмиттер-краситель

Решение системы кинетических уравнений в квазистационарном приближении

В отсутствие красителя уравнение материального баланса для населенности эмиттера биолюминесценции выглядит следующим образом:

$$\frac{d[E]}{dt} = F(t) - (k_{bl} + k_q)[E]. \quad (2)$$

Подставляя зависимость (1) в формулу (2), можно получить явный вид функции химической накачки:

$$F(t) = A_1(k_{bl} + k_q - k_1)\exp(-k_1t) + A_2(k_{bl} + k_q - k_2)\exp(-k_2t). \quad (3)$$

Напишем уравнения материального баланса для системы эмиттер-краситель. При этом учтем, что $[S_0] = [N_0] - [S_1] - [T_1]$, где $[N_0]$ — населенность красителя в смеси.

$$\begin{aligned} \frac{d[E]}{dt} = & A_1(k_{bl} + k_q - k_1)\exp(-k_1t) + A_2(k_{bl} + k_q - k_2)\exp(-k_2t) - (k_{bl} + k_q)[E] - \\ & - k_{et}[E]([N_0] - [S_1] - [T_1]), \end{aligned} \quad (4)$$

$$\frac{d[S_1]}{dt} = \gamma[E]([N_0] - [S_1] - [T_1]) - (k_f + k_{isc})[S_1] + k_{et}[E]([N_0] - [S_1] - [T_1]), \quad (5)$$

$$\frac{d[T_1]}{dt} = k_{isc}[S_1] - k_{ph}[T_1]. \quad (6)$$

Константа скорости абсорбции k_{abs} представляет собой произведение квантовой интенсивности биолюминесценции и сечения поглощения на первом синглет-синглетном переходе красителя. В уравнении (5) она заменена произведением населенности эмиттера и размерного коэффициента γ , $M^{-1}c^{-1}$.

Порядок величин кинетических констант фотофизических процессов выглядит следующим образом: $k_{bl} \cong k_q \cong k_f \cong k_{et}^* \cong 10^8 \text{ c}^{-1}$ [12, 13]. Эмпирические константы k_1 и k_2 равны $10^{-2} - 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ [7], что значительно меньше фотофизических констант на 10-12 порядков.

Система нелинейных дифференциальных уравнений (4-6) с коэффициентами, зависящими от времени, может быть решена с применением численных методов. Однако такой результат не является наглядным и удобным в интерпретации экспериментальных результатов.

Для получения аналитического решения воспользуемся контрастом эмпирических (k_1 и k_2) и фотофизических (k_{bl} , k_q , k_f , k_{et}) констант скоростей. Тогда эволюция системы будет описываться двумя стадиями: сначала релаксация системы к некоторому квазистационарному состоянию (при этом первые два слагаемых в уравнении (4) можно считать не зависящими от времени), затем медленная релаксация из квазистационарного состояния со скоростями k_1 и k_2 .

Найдем точку этого квазистационарного состояния. Приравняем к нулю левые части уравнений (4-6) и константы k_1 и k_2 . Сведем систему уравнений (4-6) к системе из двух алгебраических уравнений, выразив населенность $[T_1]$ из (6). Слагаемые, содержащие произведение $[E][S_1]$, меньше остальных примерно на два порядка, поэтому при решении системы их можно опустить. Решение для точки квазистационарного состояния выглядит следующим образом:

$$[E] = \frac{(k_{bl} + k_q)(A_1 + A_2)}{k_{bl} + k_q + k_{et}[N_0]}, \quad (7)$$

$$[S_1] = \frac{(k_{bl} + k_q)(A_1 + A_2)}{(k_f + k_{isc})(k_{bl} + k_q + k_{et}[N_0])} (\gamma + k_{et}) [N_0]. \quad (8)$$

Для учета медленной релаксации восстановим временную зависимость при коэффициентах A_1 и A_2 в уравнениях (7-8):

$$[E] = \frac{(A_1 \exp(-k_1 t) + A_2 \exp(-k_2 t))}{1 + \frac{k_{et}}{k_{bl} + k_q} [N_0]}, \quad (9)$$

$$[S_1] = \frac{(A_1 \exp(-k_1 t) + A_2 \exp(-k_2 t)) (\gamma + k_{et})}{\left(1 + \frac{k_{et}}{(k_{bl} + k_q)} [N_0]\right) (k_f + k_{isc})} [N_0]. \quad (10)$$

Проанализируем полученные результаты. Уравнение (9) описывает кинетику тушения биолюминесценции в присутствии красителя, а уравнение (10) — кинетику разгорания сенсibilизированной люминесценции красителя. Легко видеть, что при $[N_0] = 0$ населенность эмиттера описывается функцией химической накачки, а сенсibilизированная люминесценция обесценивается. Функциональное соответствие гиперболической зависимости населенности эмиттера биолюминесценции от концентрации тушителя (9), аналогичное соотношению Штерна-Фольмера, экспериментально может подтвердить факт безызлучательного переноса энергии в системе.

В области малых значений населенности красителя ($[k_{et}/(k_{bl} + k_q)][N_0] \ll 1$) уравнение (10) можно записать в следующем виде:

$$[S_1] = (A_1 \exp(-k_1 t) + A_2 \exp(-k_2 t)) \alpha [N_0], \quad (11)$$

где $\alpha = (\gamma + k_{et}) / (k_f + k_{isc})$ — тангенс угла наклона прямой в области малых концентраций акцептора.

При больших значениях населенности красителя ($[k_{et}/(k_{bl} + k_q)][N_0] \gg 1$) в выражении (10) зависимость от $[N_0]$ исчезает, населенность $[S_1]$ стремится к насыщению.

Информативность модели

Кинетическая модель позволяет получить информацию о соотношении констант скоростей фотофизических процессов, происходящих в эмиттере биолюминесценции и красителя, путем сопоставления результатов расчета с экспериментальными данными. А именно из уравнения (9) можно найти соотношение констант скоростей $k_{et}/(k_{bl} + k_q)$, а из уравнения (10) при малых $[N_0]$ — соотношение констант $(\gamma + k_{et}) / (k_f + k_{isc})$. Определение константы скорости переноса энергии k_{et} возможно лишь при знании констант других фотофизических процессов, определяемых из независимых экспериментов. Взяв отношение $[S_1]/[E]$, можно определить величину $(\gamma + k_{et}) / (k_f + k_{isc})$ независимо от выбора области $[N_0]$.

Роль красителя как ингибитора биолюминесцентной реакции в модели не представлена, но может быть выяснена в процессе дальнейшего развития модели.

В рассмотренной модели зависимость от константы скорости интеркомбинационной конверсии k_{isc} содержится в уравнении (10), что отражает внутренний эффект тяжелого атома красителя. В области малых значений населенности красителя модель предсказывает уменьшение эффективности разгорания сенсibilизированной люминесценции красителя при переходе от флуоресцеина к эритрозину. Однако этот же тяжелый атом может стимулировать интеркомбинационную конверсию и в эмиттере биолюминесценции. Косвенный учет этого обстоятельства может быть произведен через изменение константы тушения k_q люминесценции эмиттера.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Leenders H.R.M. Time-resolved fluorescence studies of flavodoxin. Fluorescence decay of tryptophan in *Desulfovibrio flavodoxins* / H.R.M. Leenders, J. Vervoort, A. van Hoek, A.J.W.G. Visser // *Eur. Biophys. J.* – 1990. – V. 18. – P. 43-55.
2. Lee J. Electronic excitation transfer in the complex of lumazine protein with bacterial bioluminescence intermediates / J. Lee, Y. Wang, B.G. Gibson // *Biochemistry.* – 1991. – V. 30. – № 28. – P. 6825-6835.
3. Lee J. Lumazine protein and the excitation mechanism in bacterial bioluminescence / J. Lee // *Biophys. Chem.* – 1993. – V. 48. – P. 149-158.

- Petushkov V.N. Direct measurement of excitation transfer in the protein complex of bacterial luciferase hydroxyflavin and the associated yellow fluorescence proteins from *Vibrio fishery* Y1 / V.N. Petushkov, B.G. Gibson, J. Lee // *Biochemistry*. – 1996. – V. 35. – № 25. – P. 8413-8418.
- Kudryasheva N.S. Estimation of energy of the upper electron-excited states of the bacterial bioluminescent emitter / N.S. Kudryasheva, E.V. Nemtseva, A.G. Sizykh, V.A. Kratasjuk, A.J.W.G. Visser // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* – 2002 – V. 68. – P. 88-92.
- Герасимова М.А. Хроноскопическое исследование взаимодействия ксантеновых красителей с ферментами: бактериальной люциферазой и НАДН:ФМН-оксидоредуктазой / М.А. Герасимова, А.Г. Сизых, Н.С. Кудряшева // *Вестник КрасГУ, сер. физ.-мат. науки.* – 2005. – № 1. – С. 58-70.
- Герасимова М.А. Экспериментальное исследование спектральных и кинетических характеристик биolumинесценции в присутствии красителей с различной величиной спин-орбитальной связи / М.А. Герасимова, А.Г. Сизых, Е.А. Слюсарева // *Вестник КрасГУ, сер. физ.-мат. науки.* – 2006. – Данный выпуск.
- Hastings J.W. Chemistries and colors of bioluminescent reactions: a review / J.W. Hastings // *Gene*. – 1996. – V. 173. – P. 5-11.
- Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики / Э. Корниш-Боуден. – М.: Мир, 1979. – 282 с.
- Fleming R. Picosecond fluorescence studies of xanthenes dyes / R. Fleming, A.W.E. Knight, J.M. Morris, R.J.S. Morrison, G.W. Robinson // *J. Am. Chem. Soc.* – 1977. – V. 99. – P. 4306-4311.
- Ермолаев В.Л. Безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения / В.Л. Ермолаев, Е.Н. Бодунов, Е.Б. Свешникова, Т.А. Шахвердов. – Л.: Наука, 1977. – 311 с.
- Gratz H. Triplet-triplet absorption of some organic molecules determined by picosecond laser excitation and time-delayed picosecond light continuum probing / H. Gratz, A. Penzkofer // *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* – 1999. – V. 127. – P. 21-30.
- Kennis J.T.M. Primary reactions of the LOV2 domain of phototropin, a plant blue-light photoreceptor / J.T.M. Kennis, S. Crosson, M. Gauden, I.H.M. van Stokkum, K. Moffat, R. van Grondelle // *Biochemistry*. – 2003. – V. 42. – № 12. – P. 3385-3392.

SIMULATION OF KINETICS OF ELECTRON EXCITATION ENERGY TRANSFER OF BIOLUMINESCENT SYSTEM IN THE PRESENCE OF XANTHENE DYES

M.A. Gerasimova, A.G. Sizykh, E.A. Slyusareva

The present paper reports the kinetic model of photoprocesses which occur in the system of the emitter of bioluminescence and excitation energy acceptor (xanthene dye). The model includes a three-level representation of dye and bioluminescence emitter with a chemical pumping as well as following processes: bioluminescence and its quenching, absorption of bioluminescence by dye, nonradiative energy transfer from emitter to dye, dye sensitized fluorescence. The analytical solution was derived from quasi-stationary approach for populations of bioluminescence emitter and dye. This solution allows analysing the experimental results and getting the information about rate constants' relation of photophysical processes in system.