На правах рукописи

Наташин Павел Викторович

РОЛЬ ОТДЕЛЬНЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ В БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ Ca^{2+}-РЕГУЛИРУЕМЫХ ФОТОПРОТЕИНОВ

03.01.02 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Красноярск – 2014

Работа выполнена на кафедре биофизики Института фундаментальной биологии и биотехнологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Сибирский федеральный университет» и в лаборатории фотобиологии Института биофизики СО РАН (г. Красноярск)

Научный руководитель:

Высоцкий Евгений Степанович – кандидат биологических наук, Институт биофизики СО РАН, заведующий лабораторией.

Официальные оппоненты:

Овчинников Сергей Геннадьевич – доктор физико-математических наук, профессор, Институт физики им. Л.В. Киренского СО РАН, заведующий лабораторией.

Савицкий Александр Павлович – доктор химических наук, профессор Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, заведующий лабораторией.

Ведущая организация:

Московский государственный университет им. М.И. Ломоносова, Химический факультет, Кафедра химической энзимологии.

Защита состоится «___»_____2014 г. в_____час. на заседании диссертационного совета Д003.007.01 при Институте биофизики СО РАН по адресу: 660036, г. Красноярск, Академгородок, д. 50, стр. 50. С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биофизики СО РАН

Электронная версия доступна по адресу:_____

Автореферат разослан «___»_____ 2014 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

доктор биологических наук Франк Л.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Биолюминесценция является широко распространенным в природе явлением. Светящиеся виды обнаружены среди живых организмов, различающихся не только средой обитания, но уровнем структурной организации. За последние время было сделано множество предположений о причинах возникновения биолюминесценции, а также важности данного явления для живых организмов.

К настоящему времени большинство охарактеризованных биолюминесцентных систем принадлежит к так называемому целентеразин-зависимому типу, где субстратом биолюминесцентной реакции является целентеразин. Наиболее изученными представителями целентеразин-зависимых систем являются Ca^{2+}-регулируемые фотопротеины морских кишечнополостных животных.

Большой интерес с теоретической и практической точки зрения вызывают результаты, полученные при изучении спектральных и кинетических свойств мутантов фотопротеинов с аминокислотными заменами в активном центре белка. Единичные замены определенных аминокислотных остатков в молекуле белка приводят к изменениям спектров биолюминесценции фотопротеинов и кинетики биолюминесцентной реакции. Исследования последних лет позволили высказать предположения относительно функции некоторых аминокислотных остатков в биолюминесценции фотопротеинов. Однако для более глубокого изучения данного вопроса целесообразно всесторонне исследовать свойства различных мутантов фотопротеинов, в том числе их пространственную организацию.

Выяснение особенностей протекания биолюминесцентной реакции Ca^{2+}-регулируемых фотопротеинов на молекулярном уровне, а именно установление конкретной роли аминокислот активного центра белка, является первоочередной задачей, поскольку это даст возможность вывести применение данных белков на совершенно новый качественный уровень, позволяя целенаправленно изменять биохимические свойства и создавать

биолюминесцентные белки с улучшенными или измененными характеристиками (увеличенная удельная активность, заданные спектральные свойства, измененная кинетика активности, термостабильность и т. д.) применительно к каждой конкретной задаче.

Цели и задачи исследования. Целью данной работы являлось выяснение функциональной роли отдельных аминокислот активного центра Ca^{2+}-регулируемых фотопротеинов в процессе биолюминесценции. Выполнение исследования требовало решения следующих задач:

1. Найти условия кристаллизации для мутантов обелина с заменой Tyr138 на Phe (Y138F) и Phe88 на Tyr (F88Y) для двух конформационных состояний – до и после биолюминесцентной реакции, т.е. связанных с субстратом, 2-гидропероксицелентеразином, и с продуктом реакции, целентерамидом, и ионами кальция, соответственно.
2. Получить дифракционные данные от кристаллов и построить модели кристаллических структур мутантных белков по установленной электронной плотности.
3. Исследовать биолюминесцентные свойства мутанта обелина Y138F.
4. Отработать технологию получения анаэробного комплекса апо-обелин–целентеразин и исследовать его свойства.

При решении поставленных задач были получены результаты, которые выносятся на защиту:

1. Пространственные структуры двух конформационных состояний (до и после биолюминесцентной реакции) мутанта обелина Y138F и его биолюминесцентные свойства доказывают участие молекулы воды, расположенной в субстрат-связывающей полости фотопротеинов, в реакции декарбоксилирования 2-гидропероксицелентеразина через протонирование диоксиэтанонового интермедиата. Остаток Tyr138 необходим для оптимальной ориентации молекулы воды относительно субстрата для обеспечения максимальной скорости биолюминесцентной реакции.

2. Пространственные структуры двух конформационных состояний (до и после биолюминесцентной реакции) мутанта обелина F88Y, имеющего спектр биолюминесценции, практически совпадающий со спектром биолюминесценции акворина, доказывают, что отличие спектров биолюминесценции этих Ca^{2+}-регулируемых фотопротеинов обусловлено различной организацией сети водородных связей около атома кислорода 6-(*n*-гидрокси)-фенильной группы 2-гидропероксицелентеразина, зависящей от присутствия Phe или Tyr в полости белка.
3. В анаэробных условиях апо-обелин и целентеразин образуют прочный комплекс. В анаэробном комплексе целентеразин связан в двух формах – протонированной и в форме C2(-)-аниона. Процесс образования активного фотопротеина при экспозиции анаэробного комплекса апо-обелин–целентеразин кислороду протекает в несколько стадий. His175 в обелине играет ключевую роль в формировании активного фотопротеина, выполняя функцию переносчика протона при образовании 2-гидропероксицелентеразина.

Научная новизна и практическая ценность. Все результаты, представленные в данной работе, получены впервые и имеют фундаментальный характер, поскольку добавляют новую информацию к пониманию роли отдельных аминокислотных остатков в биолюминесценции фотопротеинов кишечнополостных. Они найдут свое применение в фундаментальных и прикладных исследованиях. Например, установление роли отдельных аминокислотных остатков в биолюминесценции фотопротеинов в будущем позволит повысить эффективность аналитического применения фотопротеинов, в особенности при их использовании в качестве репортерных молекул *in vitro* и *in vivo*, поскольку появится возможность конструировать мутантные формы фотопротеинов с заранее планируемыми физико-химическими свойствами применительно к каждой конкретной задаче при разработке новых биолюминесцентных технологий для биологии и медицины.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы докладывались на Международном симпозиуме SISCS' 2012 (г. Куньмин, КНР, 2012 г.), на семинарах лаборатории фотобиологии Института биофизики СО РАН, на объединенных биолюминесцентных семинарах Сибирского федерального университета и семинарах Национальной лаборатории биологических макромолекул Института биофизики Пекина (КНР).

Публикации. Результаты исследований опубликованы в 3-х статьях в рецензируемых журналах и включены в международную базу данных PDB.

Структура и объем работы. Работа изложена на 130 страницах машинописного текста и включает: введение, обзор литературы, описание методов исследования, изложение результатов исследования, заключение, выводы и список цитируемой литературы (134 источника). Диссертационная работа проиллюстрирована 39 рисунками, содержит 5 таблиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клонирование и конструирование экспрессионных плазмид для обелина из *Obelia longissima* и его мутантов Y138F и F88Y было выполнено старшим научным сотрудником лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН Марковой С.В. Олигонуклеотид-направленный мутагенез проводили методом ПЦР с использованием Quick-Change site-directed mutagenesis kit.

Трансформированные клетки *E. coli* (штаммы BL21-RIL и XL1-Blue) культивировали в LB-среде, содержащей ампициллин. Индукцию осуществляли добавлением ИПТГ. Выделение и очистку рекомбинантных белков, их мутантных форм проводили по схемам, разработанным в лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН. Апобелки выделяли из телец включений, проводили рефолдинг с субстратом целентеразином и очищали с помощью ионообменной хроматографии.

Измерение кинетики биолюминесценции обелина дикого типа и его мутанта Y138F с помощью метода остановленной струи проводили на приборе Applied Photophysics SX20 с объемом камеры 20 мкл и мертвым

временем 1,1 мс. Температурный контроль осуществлялся циркулированием воды через водную баню (20°C).

Поиск условий кристаллизации выполняли, используя 672 коммерческих раствора с помощью робота Mosquito и 96-луночного планшета методом сидячей капли. Дифракционные данные получали при облучении кристаллов длинной волны 0,9789 Å с использованием рентгеновского излучения синхротрона (BL17U1, SSRF, Китай). Фазы рассчитывали в программе PHASER методом молекулярных замещений с использованием структур обелина и Ca^{2+}-разряженного обелина из *O. longissima* (коды в PDB банке 1QV0 и 2F8P) в качестве модельных. Модели белков строили с помощью программы PHENIX. Расчет параметров модели и ее усовершенствование выполняли при помощи программ REFMAC5 (CCP4i) и COOT.

Для анаэробного эксперимента удаление молекулярного кислорода из образцов и растворов проводилось путем вакуумного дегазирования (10 – 15 циклов) с использованием азота в качестве газового заместителя. Все этапы получения анаэробного апо-обелин–целентеразинового комплекса были проведены внутри анаэробной камеры Forma Anaerobic Station, Thermo Fisher. Для получения апо-обелин–целентеразинового комплекса дегазированный апо-обелин в 6 М мочевине разводился в активационном растворе, содержащем целентеразин и инкубировался в анаэробной камере в течение ночи. Для очистки образца от несвязанного целентеразина проводилась ионообменная хроматография на колонке Q Sepharose Fast Flow. Фракции желтого цвета собирались и концентрировались с помощью центрифужных концентратрационных ячеек. Для инструментальных измерений образец полученного чистого анаэробного апо-обелин–целентеразинового комплекса помещали в кювету с герметично запечатываемой крышкой (#117.104-QS; Hellma Analytics) и плотно запечатывали во избежание проникновения кислорода в образец. Спектры поглощения апо-обелин–целентеразинового комплекса в отсутствие и при

наличии кислорода измеряли на двухлучевом спектрофотометре Hitachi U-2010 против чистого буфера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Пространственные структуры обелина Y138F (разрешение 1,72 Å) и Ca^{2+}-разряженного обелина Y138F (разрешение 1,3 Å). Каталитическая функция молекулы воды и роль Tyr138 в биолюминесцентной реакции

Кристаллические структуры обелина Y138F со связанным 2-гидропероксицелентеразином и Ca^{2+}-разряженного обелина Y138F со связанным целентерамидом сохраняют глобулярную пространственную организацию (рис. 1), характерную для всех Ca^{2+}-регулируемых фото-протеинов в аналогичных лиганд-зависимых конформационных состояниях. Среднеквадратичное отклонение (RMSD) атомов основной цепи обелина

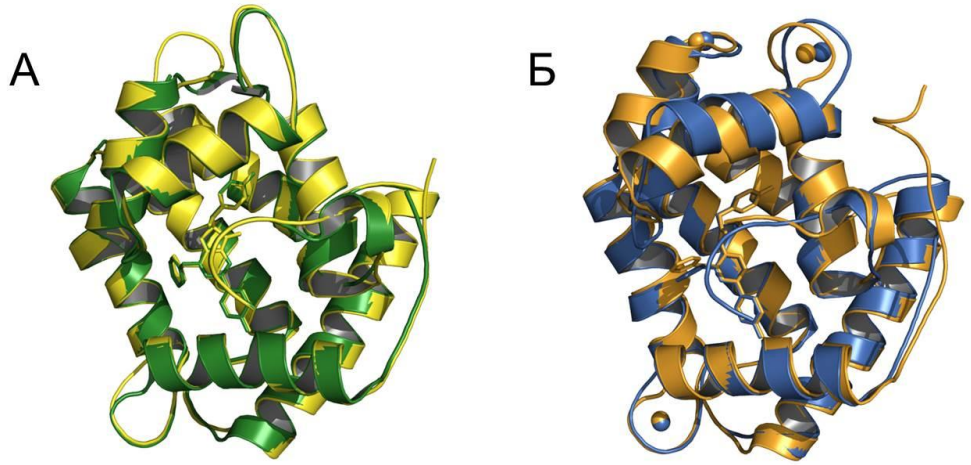

Рис. 1. А – структурное сравнение обелина Y138F (желтый) и дикого обелина (зеленый). 2-гидропероксицелентеразин показан в центре белковой глобулы;. **Б** – структурное сравнение Ca^{2+}-разряженного обелина Y138F (синий) и Ca^{2+}-разряженного дикого обелина (золотой). Целентерамид показан в центре белковой глобулы, Ca^{2+} – в виде сфер.

Y138F и дикого обелина всего 0,3 Å. Для структур Ca^{2+}-разряженных конформационных состояний обелина Y138F и дикого обелина RMSD атомов основной цепи – 1,52 Å. RMSD атомов основной цепи обелина Y138F и Ca^{2+}-разряженного обелина Y138F составляет 2,46 Å, что несколько

больше, чем отклонение, получаемое при сравнении структур дикого обелина в тех же конформационных состояниях, равное 1,92 Å. Несмотря на это, в пространственных структурах дикого обелина и его мутанта Y138F происходят практически одинаковые изменения в ответ на связывание ионов Ca^{2+}, например, конформационная трансформация С-концевого домена гораздо выше, чем N-концевого домена.

Организация субстрат-связывающей полости обелина Y138F, связанного с 2-гидропероксицелентеразином, аналогична таковой у обелина дикого типа. Более того, все аминокислотные остатки имеют схожее местоположение (рис. 2). Есть только одно, но очень важное отличие – во внутренней полости обелина Y138F отсутствует молекула воды, обозначенная в положении W_2 у дикого обелина (рис. 2).

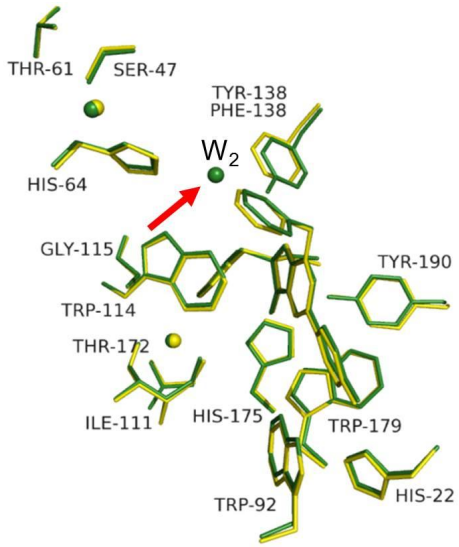

Рис. 2. Изображение структурного наложения 2-гидропероксицелентеразина в окружении ключевых аминокислотных остатков активного центра обелина дикого типа (зеленый) и обелина Y138F (желтый). Молекулы воды показаны в виде сфер соответствующего цвета.

В целентерамид-связывающей полости Ca^{2+}-разряженного обелина Y138F, в сравнении с обелином дикого типа в соответствующей конформации, практически все аминокислотные остатки сохраняют свое положение. Наиболее важной находкой в структуре целентерамид-связывающей полости Ca^{2+}-разряженного обелина Y138F (рис. 3) является молекула воды W_2, которая, как было описано выше, отсутствует в структуре обелина Y138F со связанным 2-гидропероксицелентеразином (рис. 2).

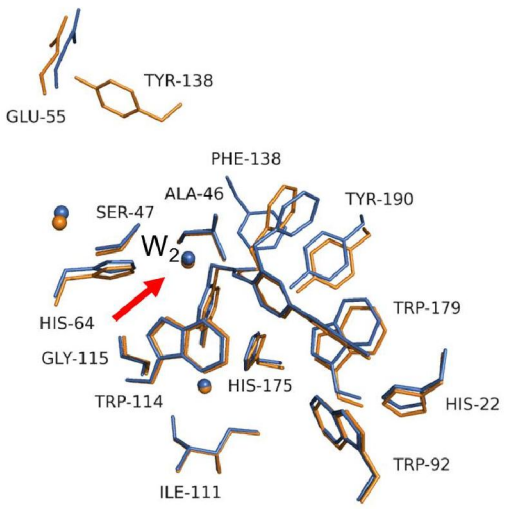

Рис. 3. изображение структурного наложения целентерамида в окружении ключевых аминокислотных остатков активного центра обелина дикого типа (золотой) и обелина Y138F (синий). Молекулы воды показаны в виде сфер соответствующего цвета.

На рисунке 4 показаны поверхности белковых глобул обелина Y138F и обелина дикого типа в двух конформационных состояниях, до и после биолюминесцентной реакции. Несмотря на то, что связывание ионов Ca^{2+} незначительно влияет на пространственную структуру фотопротеинов, этих изменений вполне достаточно для образования открытого растворителю отверстия на поверхности белковой глобулы (рис. 4Б), что, по-видимому, связано со смещением остатков Lys45 и Ser142. Вероятнее всего, молекула воды W_2 попадает внутрь целентерамид-связывающей полости Ca^{2+}-разряженного мутанта через данное отверстие.

Замена Tyr на Phe в 138 положении не приводит к потере функциональной активности обелина, но некоторые биолюминесцентные характеристики меняются заметно. Значение константы подъема кинетики биолюминесцентной реакции уменьшается с 476,5±1,4 $сек^{-1}$ у дикого обелина до 305,3±1,4 $сек^{-1}$ у обелина Y138F. То есть мутационная замена остатка Tyr снижает скорость подъема кинетики биолюминесцентной реакции в 1,5 раза.

Значение констант спада кинетики биолюминесцентной реакции обелина Y138F также уменьшается: k_1 и k_2 для обелина дикого типа равны 43,6±0,23 $сек^{-1}$ и 5,0±0,01 $сек^{-1}$, соответственно, тогда как у описываемого мутанта 13,7±0,3 $сек^{-1}$ и 0,06±0,0003 $сек^{-1}$. Кроме того, мутация повышает вклад «быстрой» и уменьшает вклад «медленной» компоненты на фазе спада.

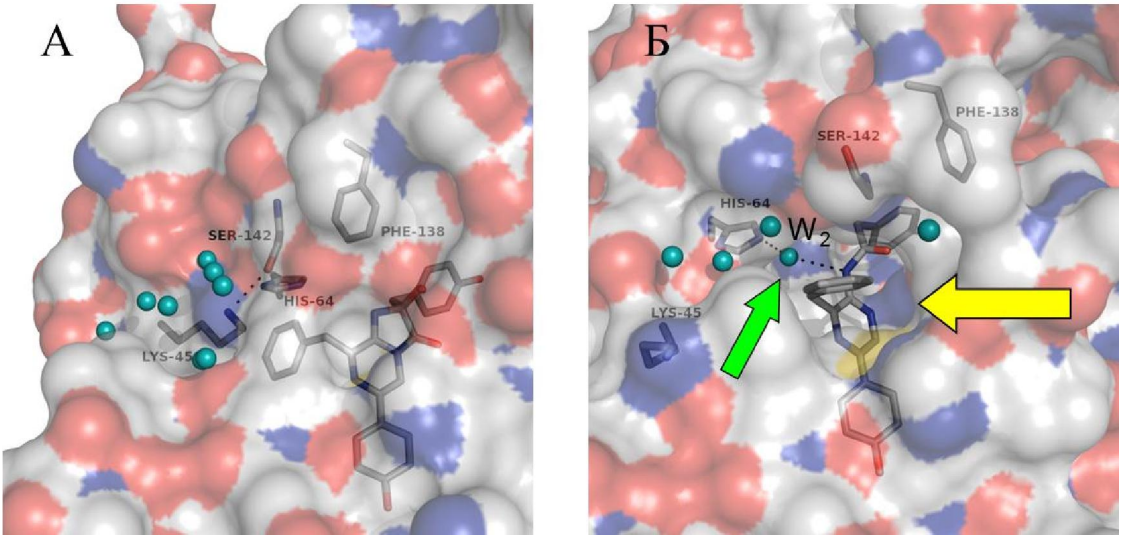

Рис. 4. Изображение поверхностей белковых глобул обелина Y138F в двух конформационных состояниях. **А** – обелин Y138F (с 2-гидроперокси-целентеразином). **Б** – Ca^{2+}-разряженный обелин Y138F. Доступное растворителю отверстие на поверхности показано желтой стрелкой. 2-гидропероксицелентеразин и аминокислотные остатки показаны в виде серых палочек. Молекулы воды показаны в виде сфер голубого цвета.

Максимум спектра биолюминесценции дикого обелина составляет 480 нм с небольшим плечом на 400 нм. Замена Tyr на Phe приводит к смещению максимума биолюминесценции в длинноволновую область на 10 нм и снижению интенсивности сигнала на 400 нм. Тем не менее, оба обелина в Ca^{2+}-разряженном состоянии имеют сходные спектры флуоресценции с максимумом примерно 510 нм.

Таким образом, учитывая полученные данные по спектрам, кинетике и кристаллическим структурам исследуемых белков, мы можем сделать вывод, что отсутствие молекулы воды W_2 во внутренней полости обелина Y138F в начальный момент после связывания Ca^{2+} является причиной снижения скорости биолюминесцентной реакции. Поскольку молекула воды W_2 появляется в полости, скорее всего, путем диффузии через открывающееся отверстие на поверхности белковой молекулы, биолюминесцентная реакция все же происходит, но с замедленной кинетикой по сравнению с обелином дикого типа, в котором данная молекула воды изначально находится в положении около амидного азота целентерамида. Полученные результаты

подтверждают гипотезу о том, что молекула воды выполняет каталитическую функцию в реакции декарбоксилирования 2-гидропероксицелентеразина через протонирование диоксиэтанон-аниона перед его распадом с образованием CO_2 и возбужденного амид-аниона целентерамида. Остаток Tyr138 необходим для оптимальной ориентации молекулы воды относительно субстрата для обеспечения максимальной скорости биолюминесцентной реакции.

2. Пространственные структуры обелина F88Y (разрешение 2,09 Å)и Ca^{2+}-разряженного обелина F88Y (разрешение 1,5 Å). Структурные основы особенностей спектров биолюминесценции Ca^{2+}-регулируемых фотопротеинов

Кристаллические структуры обелина F88Y со связанным 2-гидро-пероксицелентеразином и Ca^{2+}-разряженного обелина F88Y со связанным целентерамидом и Ca^{2+} имеют компактную глобулярную пространственную организацию. Обе описываемые структуры идентичны пространственным структурам дикого обелина в тех же конформационных состояниях. RMSD атомов основной цепи обелина F88Y и дикого обелина составляет 0,36 Å, а для структур Ca^{2+}-разряженных конформационных состояний данных белков – 1,71 Å, при этом практически все основные различия отмечаются в районе «EF-hand» петли III С-концевого домена. Дикий обелин и его мутант F88Y показывают одинаковые изменения пространственной организации в ответ на связывание Ca^{2+}. Следует отметить, что RMSD атомов основной цепи для обелина F88Y и дикого акворина равно 0,78 Å, что почти идентично значению для дикого обелина и дикого акворина (0,8 Å).

На рисунке 5А показана сеть водородных связей, образованная между атомами 2-гидропероксицелентеразина и некоторых ключевых аминокислот обелина F88Y. Остатки His22 и Tyr88 связаны водородными связями с кислородом 6-(*n*-гидрокси)-фенильной группы целентеразина, а Nε-атом Trp92 связан с гидроксильной группой Tyr88, тогда как в обелине дикого типа кислород 6-(*n*-гидрокси)-фенильной группы целентеразина образует

водородную связь только с His22. В то же время системы водородных связей акворина и обелина F88Y практически идентичны. Сеть водородных связей в акворине, формируемая триадой His16–Tyr82–Trp86, подобна системе связей у обелина F88Y (His22–Tyr88–Trp92) и имеет аналогичные обелину F88Y отличия от обелина дикого типа.

Система водородных связей, образованная между целентерамидом и ключевыми аминокислотными остатками Ca^{2+}-разряженного обелина F88Y, показана на рисунке 5Б. После биолюминесцентной реакции His22 и Tyr88 сохраняют свое местоположение и образуют водородные связи с атомом кислорода уже 5-(*n*-гидрокси)-фенильной группы целентерамида, а Trp92 остается связанным с Tyr88. То есть можно сказать, что система водородных связей, образованная данной триадой аминокислотных остатков, идентична системе связей в структуре белка до биолюминесцентной реакции. В Ca^{2+}-разряженном диком обелине His22, Phe88 и Trp92 также остаются на своих местах, а His22 образует водородную связь с кислородом 5-(*n*-гидрокси)-фенильной группы целентерамида. Поэтому можно заключить, что изменения, происходящие в данной части субстрат-связывающей полости обелина F88Y в ответ на связывание Ca^{2+} и последующего декарбоксилирования целентеразина, идентичны изменениям, происходящим в молекуле дикого обелина.

Ранее было показано, что замена Phe88 на Tyr влияет на спектры биолюминесценции обелина F88Y (λ_{max}=453 нм) и флуоресценции его Ca^{2+}-разряженного состояния (λ_{max}=487 нм), которые сдвигаются в синюю сторону. Хотя при этом и не наблюдается полное совпадение, спектры обелина F88Y становятся похожи на спектры акворина (λ_{BLmax}=469 нм, λ_{FLmax}=466 нм). Предполагалось, что эти изменения обусловлены наличием дополнительной водородной связи, сформированной между гидроксильной группой Tyr и атомом кислорода 6-(*n*-гидрокси)-фенильной группы целентеразина.

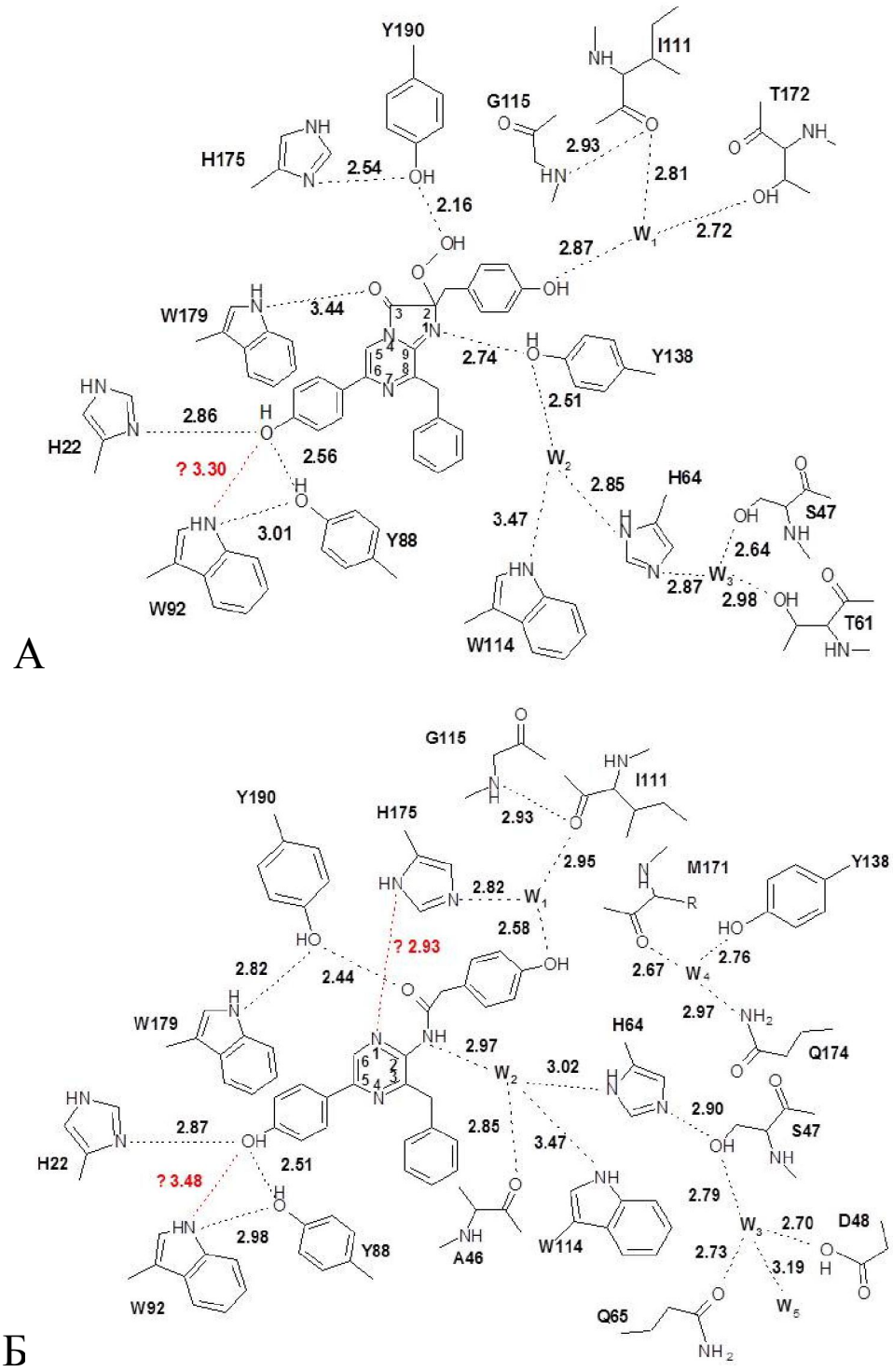

Рис.5. Схематическое изображение: **А** – 2-гидропероксицелентеразин-связывающей полости в обелине F88Y, **Б** – целентерамид-связывающей полости в Ca^{2+}-разряженном обелине F88Y. Водородные связи показаны пунктирными линиями, расстояние – в Å.

Таким образом, представленные в данном исследовании кристаллические структуры двух конформационных состояний мутанта обелина F88Y подтверждают предложенную гипотезу и дают молекулярное

объяснение различию спектров биолюминесценции и флуоресценции обелина и акворина. Поэтому, исходя из данных анализа пространственных структур обелина F88Y и их сравнения с уже имеющимися структурами обелина и акворина, можно сделать вывод, что основной причиной отличия спектральных характеристик этих фотопротеинов является различная организация сетей водородных связей около атома кислорода 6-(*n*-гидрокси)-фенильной группы 2-гидропероксицелентеразина, в зависимости от присутствия Phe или Tyr в полости белка.

3. Анаэробный апо-обелин–целентеразиновый комплекс. Роль His 175 в процессе формирования активного фотопротеина

Совсем недавно, с помощью метода тушения собственной флуоресценции белков было продемонстрировано, что связывание целентеразина с апофотопротеином протекает в течение нескольких миллисекунд, при том, что последующее формирование активного фотопротеинового комплекса занимает несколько часов. Было установлено, что лимитирующим этапом в образовании активного фотопротеина является превращение целентеразина в его пероксипроизводное, происходящее внутри субстрат-связывающей полости. Однако было не совсем понятно, что происходит с целентеразином после его связывания с апобелком и какие целентеразиновые интермедиаты предшествуют 2-гидропероксицелентеразину. Для решения этих вопросов был поставлен эксперимент для изучения взаимодействия апо-обелина с целентеразином в анаэробных условиях.

Анаэробный апо-обелин–целентеразиновый комплекс был получен согласно методике, описанной в разделе «методы и материалы исследований». Успешная очистка данного комплекса с помощью ионообменной хроматографии свидетельствует об образовании устойчивого комплекса между апофотопротеином и целентеразином еще до образования пероксипроизводного целентеразина под действием кислорода.

Апо-обелин имеет спектр поглощения в ультрафиолетовом и видимом диапазонах, типичный для белков, не связанных с органическим лигандом, с

максимумом на 280 и плечом на 295 нм. Активный обелин, связанный с 2-гидропероксицелентеразином, имеет максимум поглощения на 470 и плечо на 310 нм. Спектр поглощения анаэробного апо-обелин–целентеразинового комплекса имеет максимум на 355 и плечо на 400 нм (рис. 6).

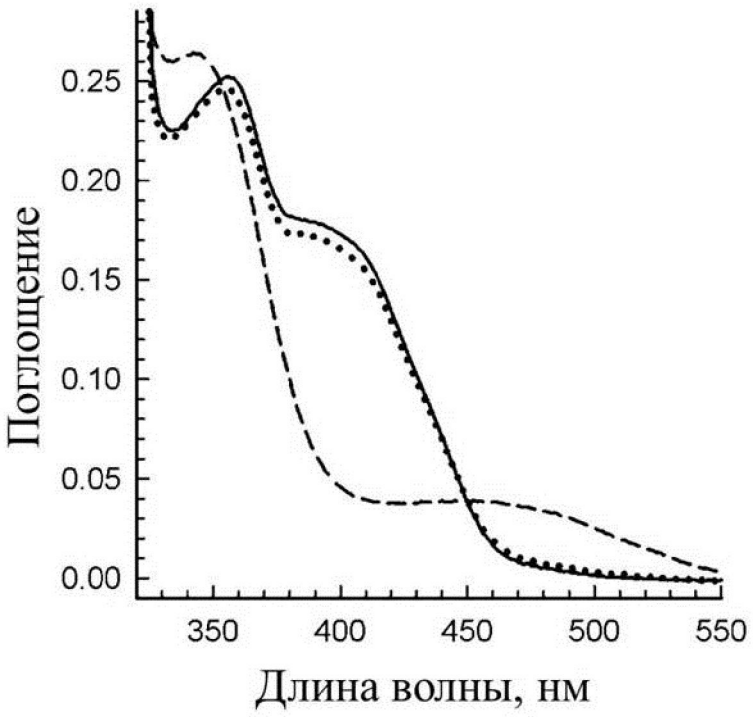

Рис. 6. Спектры поглощения: анаэробного апо-обелин–целентеразинового комплекса в закрытой кювете (сплошная линия), анаэробного апо-обелин–целентеразинового комплекса в закрытой кювете спустя 435 минут (точечная линия) и образца в открытой кювете спустя 435 минут (пунктирная линия).

Учитывая результаты исследований Хори и Накаи, а также данные о спектральных свойствах целентеразина в анаэробных условиях при различных pH растворителя, поглощение на 355 нм можно отнести к поглощению N7-протонированной формы целентеразина, а на 400 нм – C2-анионной. Т.е. можно заключить, что целентеразин, связанный в анаэробном комплексе, находится в равновесии между этими двумя формами.

Дифференциальные спектры записывались с целью изучения изменения поглощения апо-обелин–целентеразинового комплекса в процессе насыщения образца атмосферным кислородом (в открытой кювете). В качестве контроля использовался аналогичный образец, который находился в

запечатанной кювете, то есть без доступа кислорода. Во время проведения эксперимента отмечены факты исчезновения плеча на 400 нм, смещения максимума поглощения с 355 до 345 нм, а также появления нового пика поглощения на ~470 нм, который объясняется наличием 2-гидро-пероксицелентеразина (рис. 7).

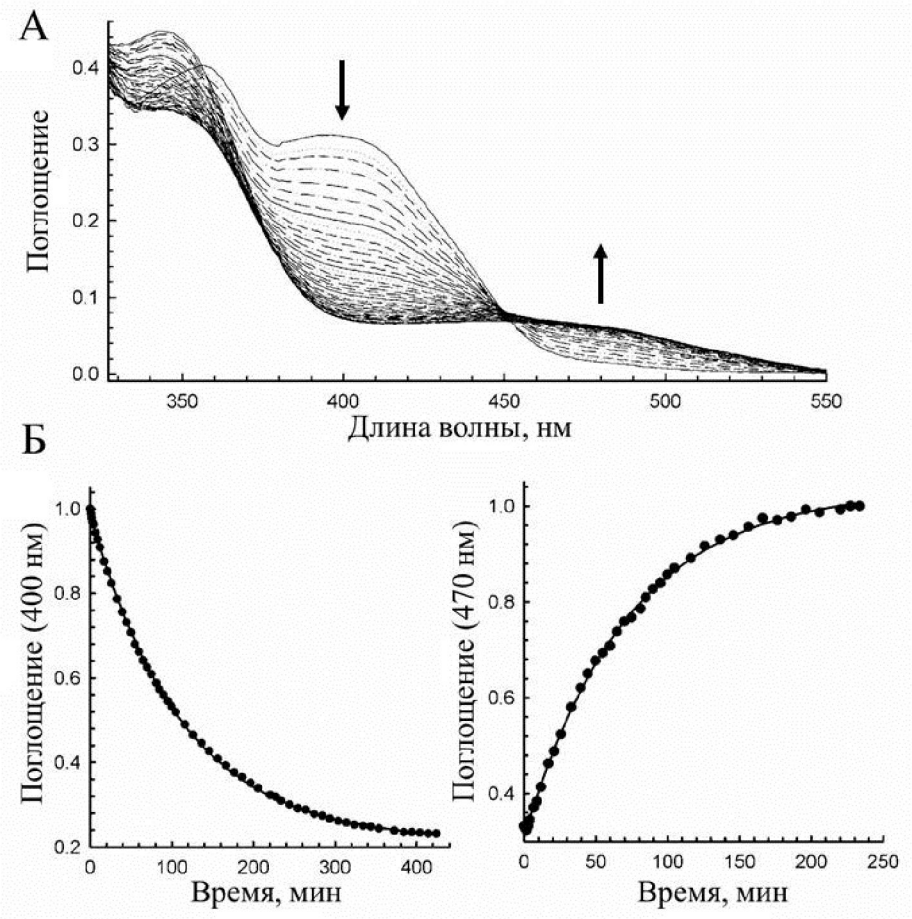

Рис. 7. Взаимодействие анаэробного апо-обелин–целентеразинового комплекса с кислородом. **А** – Изменения спектра поглощения образца в процессе его насыщения кислородом (430 минут). **Б** – Кинетика превращения комплекса в активный фотопротеин, измеренная при поглощении на 400 нм (слева) и на 470 нм (справа).

Кажущиеся константы скорости, рассчитанные, исходя из изменения поглощений на 400 и 470 нм, имеют значения $k_{400нм} = 9.0 \pm 0.05 \times 10^{-3}$ мин$^{-1}$ и $k_{470нм} = 14.0 \pm 0.3 \times 10^{-3}$ мин$^{-1}$.

Поскольку увеличение поглощения на 470 нм соответствует накоплению 2-гидропероксицелентеразина в субстрат-связывающей полости

обелина, мы сравнили кинетику образования активного обелина по поглощению при 470 нм с данными, определенными по уровню биолюминесценции. На основе полученных данных была построена кинетика и рассчитана кажущаяся константа скорости образования активного фотопротеинового комплекса по биолюминесцентному сигналу (k_{BL}=24.7±1.4×10^{-3} min^{-1}).

Поскольку активный фотопротеин образуется при нейтральном pH из апобелка, целентеразина и кислорода, вполне вероятно, что аминокислотные остатки активного центра белка выступают в качестве кислоты или основания в процессе формирования 2-гидропероксицелентеразина. Данные, полученные при анализе кристаллической структуры обелина, показали, что His175 в обелине находится недалеко от C2-атома целентеразина. Этот His остаток имеет решающее значение для биолюминесценции фотопротеинов, т.к. его замена на Ala, Phe или Trp приводит к полной потере активности белка. В нескольких кофактор-независимых оксидазах и оксигеназах, в том числе в люциферазе из коралла *Renilla*, активация субстрата для последующей вставки кислорода происходит с привлечением гистидина. В этих ферментах гистидин играет ключевую роль в системе передачи протона, действуя в качестве сильного основания и донора/акцептора протонов.

Исследование зависимости скорости образования активного фотопротеинового комплекса от pH показало, что при кислых и близких к физиологическим значениям pH скорость образования активного фотопротеина находится на максимальном уровне, тогда как при щелочных pH заметно снижается (рис. 8).

Как известно, имидазольное кольцо гистидина протонируется уже при слабокислых значениях pH, то есть в диапазоне pH 5–6 гистидин существует в протонированном состоянии. Поэтому, принимая во внимание информацию о свойствах мутантов обелина с заменой His175, а также результаты квантово-химического моделирования образования активного фотопротеина, можно сделать заключение, что в Ca^{2+}-регулируемых фотопротеинах His

играет ключевую роль в образовании активного фотопротеина, выполняя функцию переносчика протона от N7-атома целентеразина на пероксид-анион с образованием 2-гидропероксицелентеразина. Описанный процесс сопровождается конформационными перестройками молекулы белка, приводящими к формированию активного фотопротеина.

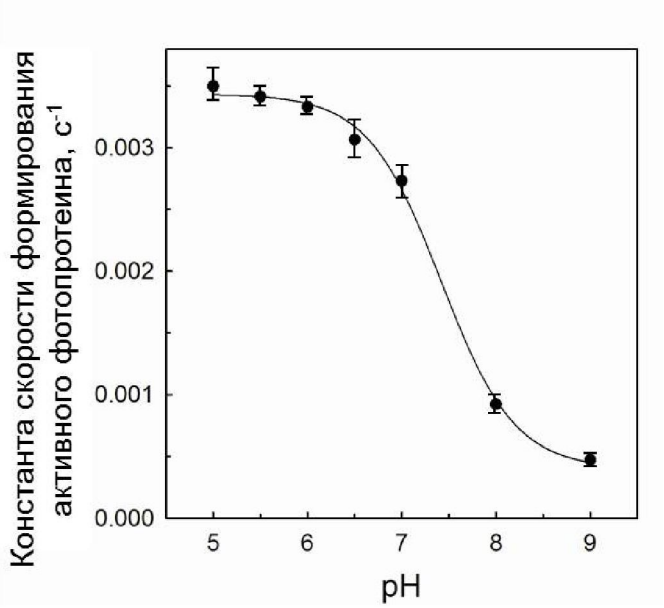

Рис. 8. – Скорость образования активного фотопротеинового комплекса в зависимости от pH.

Таким образом, в этой работе были впервые получены данные, характеризующие особенности взаимодействия между апофотопротеином и целентеразином в анаэробных условиях. Проведенное исследование вносит существенный вклад в дальнейшее понимание механизма образования активного фотопротеинового комплекса из апобелка, целентеразина и кислорода.

ВЫВОДЫ

1. Впервые получены кристаллы мутанта обелина Y138F в двух конформационных состояниях – до и после биолюминесцентной реакции, т.е. связанных, соответственно, с субстратом, 2-гидропероксицелентеразином, и продуктом реакции, целентерамидом, и Ca^{2+}. С разрешением 1,72 Å и 1,30 Å определены их пространственные структуры. Показано, что кристаллические структуры обелина Y138F высоко гомологичны структурам соответствующих конформационных состояний обелина дикого типа.
2. При сравнении кристаллической структуры мутанта обелина Y138F, связанного с 2-гидропероксицелентеразином, со структурой соответствующего конформационного состояния обелина дикого типа установлено, что замена Tyr138 на Phe, хотя и не меняет общую структуру фотопротеина и положение основных аминокислот активного центра, но приводит к исчезновению молекулы воды из субстрат-связывающей полости обелина. На основе анализа структуры субстрат-связывающей полости Ca^{2+}-разряженного мутанта обелина Y138F и ее сравнения с таковой Ca^{2+}-разряженного обелина дикого типа установлено, что молекула воды вновь появляется в субстрат-связывающей полости после биолюминесцентной реакции и обнаруживается в том же положении, что и в Ca^{2+}-разряженном обелине дикого типа. В результате анализа структуры Ca^{2+}-разряженного мутанта обелина Y138F сделано заключение, что молекула воды появляется во внутренней полости молекулы мутанта обелина через соединя-ющее внутреннюю полость с растворителем «отверстие», возникающее вследствие небольших конформационных изменений в ходе биолюминесцентной реакции, инициированной связыванием ионов кальция.
3. Показано, что замена Tyr138 на Phe в обелине приводит к снижению удельной биолюминесцентной активности на 40%, смещению спектра биолюминесценции в коротковолновую область на 10 нм (λ_{max}=490 нм) и уменьшению в 1,6 раза константы скорости подъема (k_{rise}=305,3±1,4 c^{-1}) биолюминесцентного сигна-ла. На основании пространственных структур двух конформационных состояний мутанта обелина Y138F и обелина дикого типа, а также биолюминесцентных свойств мутанта и обелина дикого типа сделан вывод, что молекула воды выполняет каталитическую функцию в реакции декарбоксилирования 2-гидропероксицелентеразина через протонирование диоксиэтанонового интермедиата. Сделано заключение, что остаток Tyr138 необходим для оптимальной

ориентации молекулы воды относительно субстрата для обеспечения максимальной скорости биолюминесцентной реакции.

4. Впервые получены кристаллы и определены пространственные структуры обелина F88Y со связанным 2-гидропероксицелентеразином с разрешением 2,09 Å и Ca^{2+}-разряженного обелина F88Y со связанным целентерамидом и ионами Ca^{2+} с разрешением 1,50 Å. Показано, что пространственные структуры мутанта обелина F88Y высоко гомологичны структурам соответствующих конформационных состояний обелина дикого типа и акворина.
5. Сравнение пространственных структур двух конформационных состояний мутанта обелина F88Y с соответствующими структурами обелина и акворина позволило сделать вывод, что отличия спектральных свойств этих фотопротеинов обусловлены различной организацией сети водородных связей около атома кислорода 6-(*n*-гидрокси)-фенильной группы 2-гидропероксицелентеразина, зависящей от присутствия Phe или Tyr в полости белка.
6. Впервые получен прочный комплекс апо-обелина и целентеразина в анаэробных условиях. На основании спектров поглощения анаэробного комплекса и анаэробных спектров поглощения целентеразина при различных pH сделан вывод, что целентеразин, связанный в анаэробном комплексе, представляет собой смесь N7-протонированной и C2(-) анионной форм.
7. Исследована кинетика формирования активного фотопротеина в процессе насыщения кислородом анаэробного комплекса апо-обелин–целентеразин двумя способами: спектроскопическим методом по изменению поглощения при 400 нм и 470 нм и по изменению биолюминесцентного сигнала. Показано, что процесс образования активного обелина описывается тремя константами: $k_{400нм}$=9,0± 0,05 $\times10^{-3}$ мин$^{-1}$, $k_{470нм}$=14,0±0.3$\times10^{-3}$ мин$^{-1}$ и k_{BL}=24,7±1,4$\times10^{-3}$ мин$^{-1}$. Сделан вывод, что процесс образования активного фотопротеина протекает в несколько стадий.
8. Исследована скорость образования активного фотопротеинового комплекса из апо-обелина, целентеразина и кислорода в зависимости от pH. Установлено, что максимальная скорость наблюдается в диапазоне pH 5–6. Исходя из результатов по скорости формирования активного фотопротеинового комплекса, донорно-акцепторных свойств His при различных pH, а также данных по свойствам мутантов с заменой His175 в обелине, сделан вывод, что данный His играет ключевую роль в формировании активного фотопротеина, выполняя функцию переносчика протона при образовании 2-гидропероксицелентеразина.

Опубликованные статьи:

1. **Natashin P.V.** Crystal structures of the Ca^{2+}-regulated photoprotein obelin Y138F mutant before and after bioluminescence support a catalytic function of a water molecule in the reaction / P.V. Natashin, W. Ding, E.V. Eremeeva, S.V. Markova, J. Lee, E.S. Vysotski, Z.J. Liu // *ACTA Crystallogr. D.* – 2014. – D70. – doi:10.1107/S1399004713032434.

2. **Natashin P.V.** Crystal structures of F88Y obelin mutant before and after the bioluminescence reveal molecular insight into spectral tuning among hydromedusan photoproteins / P.V. Natashin, S.V. Markova, J. Lee, E.S. Vysotski, Z.J. Liu // *FEBS Journal*. – 2014. – doi:10.1111/febs.12715.

3. Eremeeva E.V. Oxygen activation of apo-obelin-coelenterazine complex / E.V. Eremeeva, **P.V. Natashin**, W.J.H. van Berkel, E.S. Vysotski, Z.J. Liu // *Chembiochem*. – 2013. Vol.14. – P. 739-745.