

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра биофизики

На правах рукописи

УДК 577.322.6

Наташин Павел Викторович

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

03.01.02 – биофизика

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

к.б.н. Е.С. Высоцкий

Красноярск, 2014

ВВЕДЕНИЕ		6
ГЛАВА 1	Биолюминесцентные белки.	
	Механизм биолюминесцентной реакции	12
1.1	Ca <sup>2+</sup> -регулируемые фотопротеины	12
1.2	Пространственная структура Ca <sup>2+</sup> -регулируемых фотопротеинов	16
1.3	Особенности пространственной структуры Ca <sup>2+</sup> -разряженного обелина	21
1.4	Возможные пути формирования 2-гидропероксицелентеразина	23
1.5	Функциональная роль остатков His и Trp в формировании активного фотопротеинового комплекса	26
1.6	Механизм биолюминесцентной реакции Ca <sup>2+</sup> -регулируемых фотопротеинов	31
1.7	Механизм биолюминесцентных реакций других целентеразин-зависимых систем	40
ГЛАВА 2	Материалы и методы	46
2.1	Клонирование, олигонуклеотид-направленный мутагенез	46
2.2	Выделение и очистка мутантов фотопротеина обелина Y138F и F88Y	46
2.3	Получение Ca <sup>2+</sup> -разряженных мутантов обелина Y138F и F88Y со связанным целентерамидом	48
2.4	Получение анаэробного апо-обелин–целентеразинового комплекса	48

2.5	Определение удельной биолюминесцентной активности, концентрации белка и измерение спектров биолюминесценции	49
2.6	Измерение спектра поглощения апо-обелин–целентеразинового комплекса	50
2.7	Кинетические измерения методом остановленной струи (stopped-flow)	51
2.8	Кристаллография	52
2.9	Программное обеспечение	52
2.10	Реактивы	53
ГЛАВА 3	Пространственные структуры обелина Y138F и Ca <sup>2+</sup> -разряженного обелина Y138F. Каталитическая функция молекулы воды и роль Tyr138 в биолюминесцентной реакции	54
3.1	Пространственные кристаллические структуры обелина Y138F со связанным 2-гидропероксицелентеразином и Ca <sup>2+</sup> -разряженного обелина Y138F со связанными целентерамидом и ионами Ca <sup>2+</sup>	54
3.1.1	Кристаллизация	54
3.1.2	Общая структура белков	55
3.1.3	«EF-hand» Ca <sup>2+</sup> -связывающие петли	60
3.1.4	Субстрат-связывающие полости	61
3.1.5	Спектральные и кинетические свойства обелина Y138F	67
3.2	Каталитическая функция молекулы воды и роль Tyr138 в биолюминесцентной реакции	69

ГЛАВА 4	Пространственные структуры обелина F88Y и Ca <sup>2+</sup> -разряженного обелина F88Y. Структурные основы особенностей спектров биолюминесценции Ca <sup>2+</sup> -регулируемых фотопротеинов	75
4.1	Пространственные кристаллические структуры обелина F88Y со связанным 2-гидропероксицелентеразином и Ca <sup>2+</sup> -разряженного обелина F88Y со связанными целентерамидом и Ca <sup>2+</sup>	75
4.1.1	Кристаллизация	75
4.1.2	Общая структура белков	76
4.1.3	«EF-hand» Ca <sup>2+</sup> -связывающие петли	80
4.1.4	Системы водородных связей в лиганд-связывающей полости обелина F88Y до и после биолюминесцентной реакции	81
4.2	Структурные основы особенностей спектров биолюминесценции Ca <sup>2+</sup> -регулируемых фотопротеинов	89
ГЛАВА 5	Анаэробный апо-обелин–целентеразиновый комплекс. Роль His 175 в процессе формирования активного фотопротеина	95
5.1	Взаимодействие целентеразина с апо-обелином	95
5.2	Спектры поглощения целентеразина в анаэробных условиях при различных рН	96
5.3	Взаимодействие свободного целентеразина с кислородом	97
5.4	Спектральные свойства анаэробного апо-обелин–целентеразинового комплекса. Кинетика превращения апо-обелин–целентеразинового комплекса в активный фотопротеин	99

5.5	Определение ионной формы целентеразина, связанного с анаэробным апо-обелин– целентеразиновым комплексом	104
5.6	His175 как возможный переносчик протона	105
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	109
	ВЫВОДЫ	111
	ЛИТЕРАТУРА	114

## ВВЕДЕНИЕ

Билюминесценция является широко распространенным в природе явлением. Светящиеся виды были обнаружены среди живых организмов, различающихся не только средой обитания, но и уровнем структурной организации. Билюминесцентные организмы можно встретить среди бактерий, грибов, простейших, кишечнополостных, червей, моллюсков, насекомых и рыб. Несмотря на то, что светящиеся организмы находятся на разных уровнях эволюционного пути, все они имеют одинаковую природу свечения. Фактически, билюминесценция – это хемиллюминесцентная реакция, которая протекает вследствие окисления субстрата – люциферина, специфическим ферментом – люциферазой. На самом деле, люциферины и люциферазы – это скорее собирательное и функциональное понятие, чем химическое, поскольку у разных организмов они являются соединениями различной структурной организации. Но, с другой стороны, это говорит о том, что билюминесценция многократно и независимо возникала в ходе эволюции. За последнее время было сделано множество предположений о причинах возникновения билюминесценции, а также важности данного явления для живых организмов. И, несмотря на то, что явление билюминесценции исследуется уже более 100 лет, интерес ученых со всего мира к изучению данного феномена не ослабевает. В большей степени это объясняется широкими перспективами использования билюминесцентных белков в аналитических целях. Поскольку современная техника обладает возможностями с высокой точностью регистрировать, измерять и характеризовать даже очень слабый световой сигнал, методы, основанные на использовании билюминесцентных белков, позволяют работать с микроскопическими объемами исследуемых веществ. По этой причине билюминесцентные методы нашли свое применение, например, в клеточной биологии для мониторинга внутриклеточных процессов, в экологии для изучения загрязнения окружающей среды и т.д. В наши дни

биолюминесцентные технологии стремительно развиваются, поскольку данные методы находят новые области применения для решения широкого спектра аналитических задач.

Большинство охарактеризованных биолюминесцентных систем, широко представленных среди морских организмов, принадлежит к так называемому целентеразин-зависимому типу, где субстратом биолюминесцентной реакции является целентеразин [Thompson et al., 1997]. Наиболее изученными представителями данных систем являются  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемые фотопротеины морских кишечнорастных животных.  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемые фотопротеины, в большей или меньшей степени исследованные на настоящий момент, демонстрируют высокую степень гомологии аминокислотных последовательностей, в пределах 65 – 75%, при этом практически все аминокислоты, формирующие субстрат-связывающую полость белка, консервативны. Фотопротеины представляют собой комплекс, состоящий из молекулы белка (~22 кДа) и «преактивированного» кислородом целентеразина (2-гидропероксицелентеразина), прочно, но не ковалентно связанного с белком [Shimomura, Johnson, 1978; Head et al., 2000; Liu et al., 2000]. Реакция биолюминесценции инициируется добавлением ионов кальция и является следствием декарбоксилирования «преактивированного» субстрата. В результате реакции образуется молекула целентерамида в возбужденном состоянии и  $\text{CO}_2$ . Переход целентерамида из возбужденного в основное состояние сопровождается излучением кванта света.

Сотрудниками лаборатории фотобиологии Института биофизики СО РАН были клонированы кДНК гены, созданы экспрессионные конструкции и проводятся всесторонние исследования ряда  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых целентеразин-зависимых белков, таких как: обелины из *Obelia longissima* и *Obelia geniculata*, клитин из *Clytia gregaria*, митрокомин *Mitrocoma cellularia*, светочувствительный фотопротеин беровин из гребневика *Beroe abyssicola*.

Большой интерес с теоретической и практической точек зрения вызывают результаты, полученные при изучении физико-химических свойств мутантов фотопротеинов с аминокислотными заменами в активном центре белка. Единичные замены некоторых аминокислотных остатков в субстрат-связывающей полости белковой молекулы приводят к существенным изменениям спектров биолюминесценции фотопротеинов [Deng et al., 2001; Malikova et al., 2003; Stepanyuk et al., 2005; Liu et al., 2006], кинетики формирования активного фотопротеина из целентеразина и апобелка [Eremeeva et al., 2009, 2013], а также кинетики реакции декарбоксилирования 2-гидропероксицелентеразина [Vysotski et al., 2003; Liu et al., 2006]. В связи с данными наблюдениями у научного сообщества сформировался вопрос о роли отдельных аминокислотных остатков в биолюминесцентной реакции.

За последние годы были определены кристаллические структуры для четырех конформационных состояний  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемого фотопротеина обелина [Liu et al., 2000; Deng et al., 2004; Deng et al., 2005; Liu et al., 2006], пространственные структуры ряда других фотопротеинов и их мутантов, например, акворина [Head et al., 2000] и клитина [Titushin et al., 2010]. Полученные структуры позволили высказать предположения относительно функции некоторых аминокислотных остатков в биолюминесценции фотопротеинов [Shimomura, 2006; Высоцкий и др., 2006; Vysotski, Lee, 2004; Vysotski, Lee, 2007]. Однако для более глубокого изучения данного вопроса является целесообразным осуществить всестороннее исследование свойств различных мутантов фотопротеинов, в том числе изучить их пространственную организацию.

Выяснение роли отдельных аминокислотных остатков активного центра  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемого фотопротеина в реакции биолюминесценции, безусловно, имеет и фундаментальное, и прикладное значение, так как является необходимым шагом в понимании явления биолюминесценции в



целом. В перспективе это будет способствовать существенному повышению эффективности аналитического применения фотопротеинов, например, при их использовании в качестве репортерных молекул *in vivo*.

Целью работы являлось выяснение функциональной роли отдельных аминокислот активного центра  $\text{Ca}^{2+}$ -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 диоксиэтанового интермедиата. Остаток Tyr138 необходим для оптимальной ориентации молекулы воды

относительно субстрата для обеспечения максимальной скорости билюминесцентной реакции.

2. Пространственные структуры двух конформационных состояний (до и после билюминесцентной реакции) мутанта обелина F88Y, имеющего спектр билюминесценции, практически совпадающий со спектром билюминесценции акворина, доказывают, что отличие спектров билюминесценции этих  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых фотопротеинов обусловлено различной организацией сети водородных связей около атома кислорода 6-(*n*-гидрокси)-фенильной группы 2-гидропероксицелентеразина, зависящей от присутствия Phe или Tug 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.

Все результаты, представленные в данной работе, получены впервые и имеют фундаментальный характер, поскольку добавляют новую информацию к пониманию роли отдельных аминокислотных остатков в процессе билюминесценции фотопротеинов кишечнополостных. В дальнейшем полученные результаты найдут свое применение в фундаментальных и прикладных исследованиях. Например, установление роли отдельных аминокислотных остатков в билюминесцентной реакции в будущем позволит сконструировать мутантные формы фотопротеинов с измененными физико-химическими свойствами (увеличенная удельная активность, определенные спектральные свойства, измененная кинетика

активности, термостабильность и т. д.) применительно к каждой конкретной задаче. Это, безусловно, найдет широчайшее применение при разработке новых биолюминесцентных технологий для биологии, медицины, фармацевтической промышленности.

Работа выполнена при поддержке Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», грантов РФФИ №09-04-00172, 12-04-00131 и 12-04-91153-ГФЕН, Программы Правительства РФ по привлечению ведущих ученых в образовательные учреждения (№11.G34.31.0058) и НШ №3951.2012.4.

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).

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

## ГЛАВА 1 Биолюминесцентные белки. Механизм биолюминесцентной реакции

### 1.1 $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемые фотопротеины

Биолюминесценция – повсеместно распространенное явление живой природы. В настоящее время известно огромное количество различных биолюминесцентных видов животных – несколько тысяч. На суше светящиеся организмы представлены в меньшей степени, чем в мировом океане. Это – бактерии, насекомые, черви и грибы. Но среди морских обитателей способность к самосвечению распространена более широко, для 90% жителей глубоководных районов океана она является неотъемлемой частью жизнедеятельности. Интересно, что при существовании различных биохимических механизмов биолюминесценции большое количество светящихся организмов использует один и тот же субстрат (и его производные) – целентеразин [Thompson et al., 1997].

На данный момент наиболее исследованы биолюминесцентные белки, использующие целентеразин как субстрат (рис. 1.1А). Такими белками являются  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемые фотопротеины [Shimomura, 2006; Высоцкий и др., 2006; Vysotski, Lee, 2004; Vysotski, Lee, 2007], ответственные за свечение морских кишечнополостных животных [Morin et al., 1971; Morin, 1974]. Термин “фотопротеины” был введен Шимомурой и Джонсоном [Shimomura, Jonson, 1966] как общее определение предварительно заряженных белков, не требующих для своей работы наличия молекул кислорода и излучающих свет при взаимодействии с ионами металлов. Энергия запасена в предварительно заряженном белке и излучается в ходе реакции. Поскольку в большинстве известных фотопротеиновых систем реакция запускается добавлением ионов кальция, Гастингсом и Мориным был предложен термин “ $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемые фотопротеины” [Hastings, Morin, 1969].

На сегодняшний день известно более 25-ти видов кишечнополостных животных, за свечение которых ответственны  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемые

фотопротеины. Но только для семи из них получены коплементарные ДНК, все они в разной степени исследованы и охарактеризованы: акворин [Prasher et al., 1985; Inouye et al., 1985], митрокомин [Fagan et al., 1993] и клитин [Inouye et al., 1993] из медуз *Aequorea*, *Mitrocoma (Halistaura)* и *Clytia (Phialidium)* [Shimomura, 1962; Shimomura, 2006]; обелины из гидроидов *Obelia geniculata* [Markova et al., 2002] и *Obelia longissima* [Campbell, 1974; Высоцкий и др., 1989]; мнемипсин и беровин из ктенофор (гребневиков) *Mnemiopsis* и *Beroe* [Ward, Seliger, 1974; Ward, Cormier, 1975].

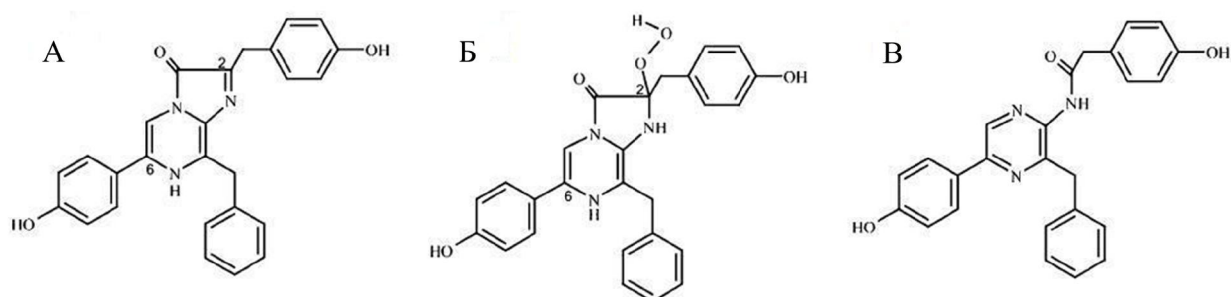


Рисунок 1.1 – Химическая структура целентеразина (А), 2-гидропероксицелентеразина (Б) и целентерамида (В).

$\text{Ca}^{2+}$ -регулируемые фотопротеины представляют собой стабильный в отсутствие ионов кальция фермент-субстратный комплекс, состоящий из апобелка и молекулы субстрата – преактивированного кислородом целентеразина, 2-гидропероксицелентеразина (рис. 1.1Б), прочно, но нековалентно связанного с белком [Shimomura et al., 1978, Hastings et al., 1963]. Биолюминесценция инициируется конформационными изменениями молекулы белка, опосредованными связыванием ионов кальция, и является следствием декарбоксилирования 2-гидропероксицелентеразина. Несмотря на то, что ионы кальция являются триггером биолюминесцентной реакции, для фотопротеинов также характерен очень низкий уровень самосвечения –  $\text{Ca}^{2+}$ -независимая люминесценция [Allen et al., 1977]. Продуктами реакции являются молекула целентерамида (рис. 1.1В) в возбужденном состоянии и

CO<sub>2</sub>. Переход целентерамида из возбужденного состояния в основное сопровождается излучением кванта света.

Биолюминесценция фотопротеинов наблюдается в диапазоне длин волн 465-490 нм и зависит от организма, из которого фотопротеин выделен [Shimomura et al., 1963; Ohmiya, Hirano, 1996; Vysotski, Lee, 2004].

Реакция биолюминесценции Ca<sup>2+</sup>-регулируемых фотопротеинов не зависит от каких либо дополнительных элементов, кроме кальция, в том числе молекулярного кислорода, который уже связан в форме 2-гидропероксипроизводного целентеразина [Shimomura et al., 1978]. Это свойство отличает фотопротеины от классических люциферин-люциферазных систем, которые способны функционировать только в присутствии молекулярного кислорода.

Ca<sup>2+</sup>-регулируемые фотопротеины, связанные с 2-гидропероксицелентеразином, не флуоресцируют. Яркую флуоресценцию можно наблюдать только после биолюминесцентной реакции, так как белок остается связанным с продуктом реакции – целентерамидом [Shimomura et al., 1962; Cormier et al., 1973]. Поэтому фотопротеин способен делать только один каталитический оборот. Эта особенность является еще одной отличительной характеристикой фотопротеиновой биолюминесцентной реакции в сравнении с классическими люциферин-люциферазными реакциями, в которых продукт высвобождается из активного центра белка после окончания реакции окисления.

Ca<sup>2+</sup>-регулируемые фотопротеины ответственны за свечение не только кишечнополостных животных – представителей класса Hydrozoa, но и морских гребневиков (ктенофор) *Mnemiopsis* и *Beroe* [Ward, Seliger, 1974; Ward, Seliger, 1976]. Ктенофорные фотопротеины по своей функции и свойствам во многом схожи с фотопротеинами кишечнополостных, несмотря на то, что аминокислотные последовательности показывают очень низкую степень гомологии. Наибольшее сходство первичных последовательностей

(примерно 28%) наблюдается только с обелином из *O. longissima*, причем практически все идентичные аминокислотные остатки относятся к высококонсервативным «EF-hand» последовательностям. Но, с другой стороны, фотопротеины ктенофор демонстрируют высокую гомологию аминокислотных последовательностей между собой. Например, между представителями отрядов *Beroidea* и *Lobata*, *Beroe abyssicola* и *Mnemiopsis leidyi*, соответственно, которые таксономически очень далеки, идентичность аминокислотных последовательностей составляет 90-95% [Ward, Seliger, 1974]. И если сравнивать с фотопротеинами кишечнорастных животных, то подобный уровень сходства наблюдается только для последовательностей у видов одного рода, например, у обелинов из *O. longissima* и *O. geniculata* он составляет 86% [Markova et al., 2002].

Экспериментальным путем было показано, что фотопротеины гребневиков, также как и фотопротеины кишечнорастных, в качестве субстрата биолюминесцентной реакции используют целентеразин [Ward, Seliger, 1974; Ward, Cormier, 1975; Hori et al., 1975]. Для запуска реакции биолюминесценции этих фотопротеинов также необходимы ионы кальция и не требуется наличие молекулярного кислорода. Но у ктенофор, в отличие от кишечнорастных, комплекс белка с «преактивированным» кислородом субстратом инактивируется светом [Ward, Cormier, 1975; Girsch et al., 1977]. Биолюминесценция гребневиков *in vivo* также ингибируется светом. Однако фотоинактивация *in vivo* обратима. Животные, пребывающие в темном помещении, через некоторое время восстанавливают способность к биолюминесценции [Ancil, Shimomura, 1984].

Фотоинактивирующим эффектом обладает свет как видимой (область поглощения целентеразина), так и ультрафиолетовой части спектра (250 – 280 нм, область поглощения ароматических аминокислот триптофана, тирозина и фенилаланина) [Ward, Seliger, 1976]. На примере мнemiопсина было показано, что за фотоинактивацию ответственен как белок (280 нм), так

и сам целентеразин (435 нм) в соотношении 0,8 и 0,2. Предполагается, что фотохимическая реакция сопровождается появлением активных форм кислорода, которые и приводят к необратимому разрушению 2-гидропероксицелентеразина. Но стоит отметить, что продукт данной реакции не был идентифицирован ни как целентеразин, ни как окисленный продукт, целентерамид. О механизме фотоинактивации фотопротеинов ктенофор на сегодняшний день известно очень мало, но предполагается, что он может быть похож на механизм фотолиза рибофлавина [Ahmad et al., 2006; Silva et al., 1999; Lu et al., 2002]. То есть фотоинаktivация происходит с участием активных форм кислорода и ароматических аминокислотных остатков, которые должны находиться в активном центре фотопротеина гребневигов.

Также интересен тот факт, что апоформа фотопротеина ктенофор обладает довольно высокой «люциферазной» активностью при значениях pH, близких к нейтральным (pH 6,5), т.е. способностью окислять целентеразин в отсутствие ионов кальция. Причем эффективное образование фотопротеинового комплекса происходит при pH 9,0 [Markova et al., 2012].

## 1.2 Пространственная структура $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых фотопротеинов

Все фотопротеины являются односубъединичными белками с молекулярной массой примерно 22 кДа и демонстрируют высокую степень гомологии как аминокислотных последовательностей (65 – 75%) (рис. 1.2) [Tsuji et al., 1995; Markova et al., 2002], так и пространственных структур [Liu et al., 2000; Deng et al., 2005; Liu et al., 2006; Titushin et al., 2010]. Фотопротеины имеют три активных  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих центра – «EF-hand» последовательности, характерные для семейства «EF-hand»  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих белков (рис. 1.2) [McPhalen et al., 1991; Falke et al., 1994]. Они



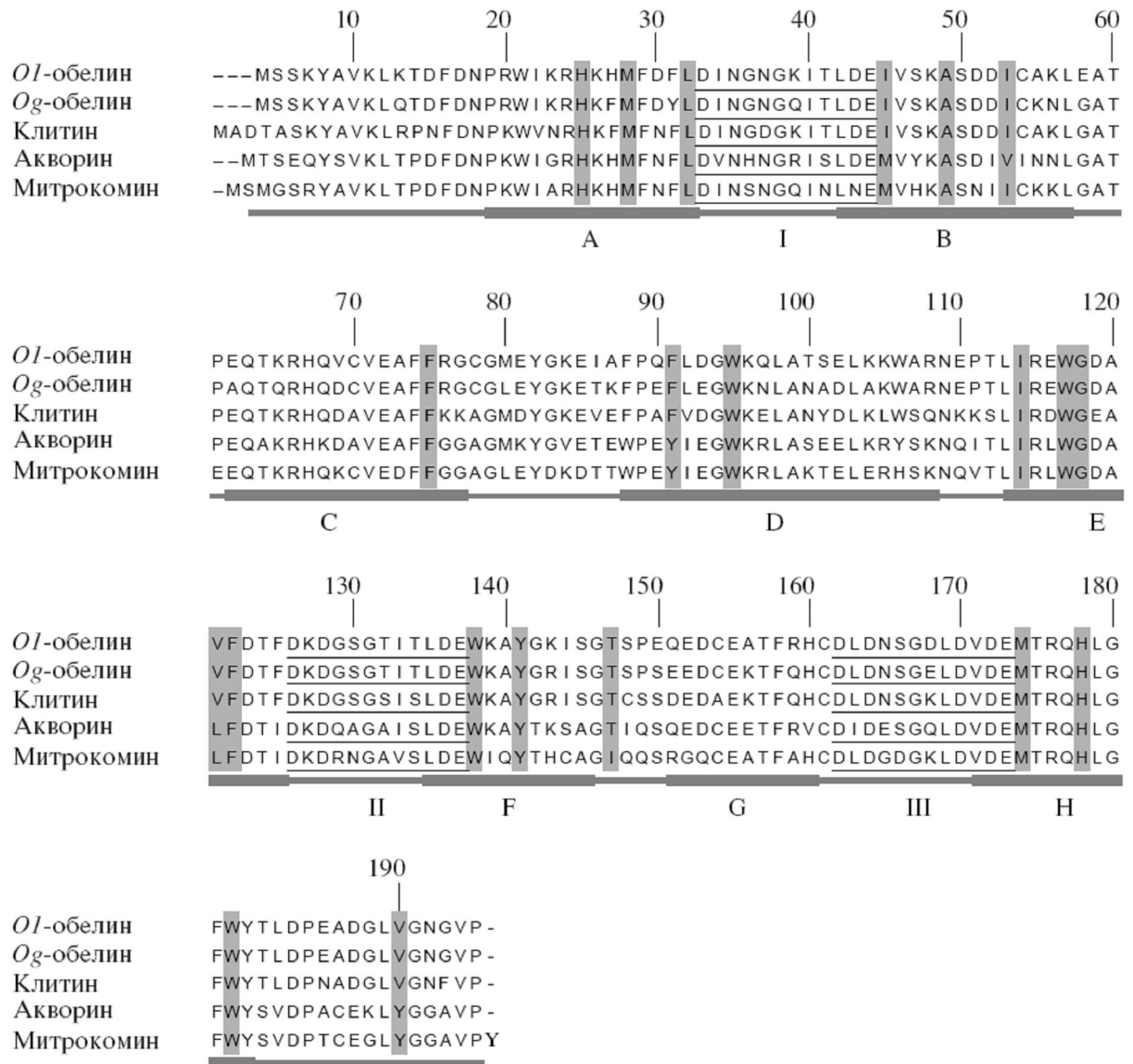


Рисунок 1.2 – Аминокислотные последовательности  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых фотопротеинов акворина, клитина, митрокомина и обелинов из *O. geniculata* и *O. longissima*. Вторичная структура представлена в соответствии с кристаллической структурой обелина из *O. longissima*;  $\alpha$ -спирали отмечены латинскими буквами (А-Н) и показаны в виде цилиндров серого цвета. Аминокислоты, образующие внутреннюю субстрат-связывающую полость, отмечены серым цветом.  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающие центры подчеркнуты и пронумерованы цифрами I, II и III [Высоцкий и др., 2006].

также имеют одну неактивную «EF-hand» последовательность, не способную связывать ионы кальция, так как она не содержит необходимых для выполнения этой функции аминокислотных остатков – аспарагиновую и глутаминовую кислоты [Strynadka et al., 1989].

В 2000 году были определены пространственные структуры двух «заряженных» (связанных с 2-гидропероксицелентеразином) фотопротеинов: акворина [Head et al., 2000] и обелина [Liu et al., 2000] (рис. 1.3), а 10-тью годами позже также для клитина [Titushin et al., 2010]. После анализа полученных рентгеноструктурных данных было определено, что молекула фотопротеина имеет компактную глобулярную структуру с радиусом около 25 Å, состоящую из двух доменов. Каждый домен содержит две «EF-hand» последовательности и может быть представлен в форме «чашки», внутренняя полость которой «выстлана» боковыми цепями гидрофобных аминокислот, расположенных во всех восьми α-спиралях белка. Также имеются четыре гидрофильных остатка (His22, Tyr138, His175, Tyr190), боковые цепи которых направлены внутрь полости [Liu et al., 2000]. «Чашки», соединяясь краями, образуют гидрофобную полость, в которой находится субстрат – 2-гидропероксицелентеразин. Такая защищенность субстрата от растворителя обеспечивает необходимые условия для образования продукта в возбужденном состоянии и дальнейшего его перехода в основное состояние с выделением кванта света. Также важен тот факт, что практически все аминокислоты, формирующие субстрат-связывающую полость, являются консервативными среди известных к настоящему времени  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых фотопротеинов [Vysotski, Lee, 2004].

Еще до определения пространственных структур был проведен ряд экспериментов, показавших важность некоторых аминокислотных остатков для биолюминесценции фотопротеинов. К примеру, мутант акворина с заменой триптофана на фенилаланин (W86F) имел бимодальный спектр излучения с максимумами при 455 и 400 нм [Ohmiya et al., 1992].

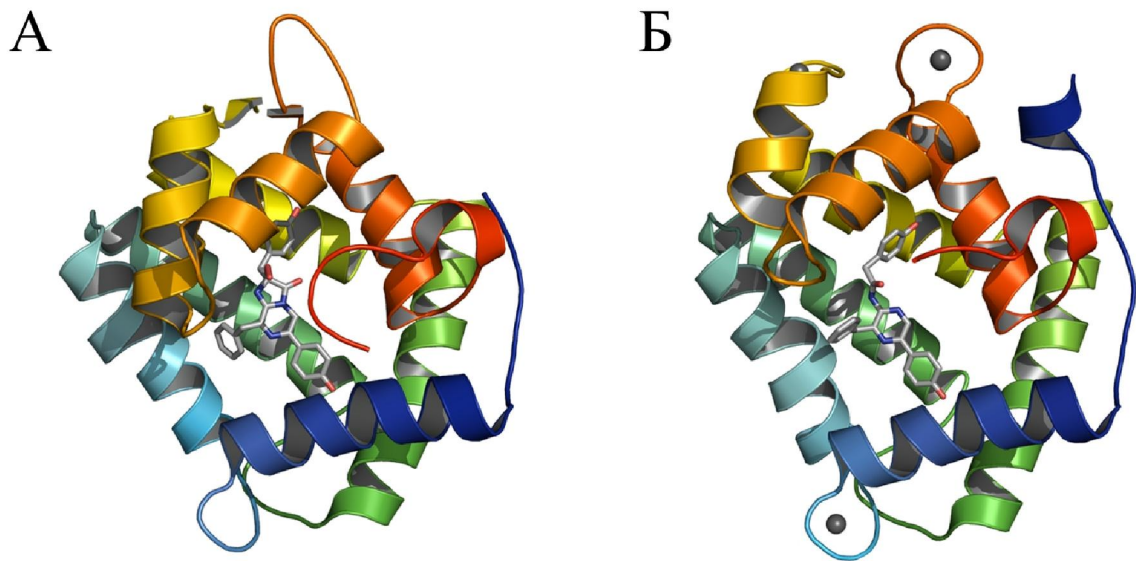


Рисунок 1.3 – Пространственные структуры обелина (А) и  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного обелина (Б).

Основываясь на полученных данных, было предположено, что Trp86 принимает участие в образовании эмиттера и находится в непосредственной близости от молекулы целентеразина. Также с помощью олигонуклеотид-направленного мутагенеза и химических модификаций было показано большое функциональное значение остатков гистидина [Ohmiya, Tsuji, 1993; Bondar et al., 1999]. Было продемонстрировано, что замена в акворине His169 на Ala, Trp или Phe ведет к полной потере активности белка, но в то же время мутанты с модификациями оставшихся четырех гистидинов сохраняют биолюминесцентную активность.

Спустя некоторое время анализ полученных рентгеноструктурных данных показал, что два гистидина и триптофан действительно находятся вблизи молекулы 2-гидропероксицелентеразина в активных центрах как обелина, так и акворина. Например, в обелине His175 образует водородную связь с ОН-группой Tyr190, а His22 и Trp92 формируют водородные связи с гидроксилом 6-(*n*-гидрокси)-фенильной группы (рис. 1.4).

Кроме отмеченных ранее аминокислот, водородные связи с атомами 2-гидропероксицелентеразина образуют Tyr138 и Tyr190 (рис. 1.4). Остаток Tyr138 формирует водородную связь с N1-атомом, а Tyr190 соединен с C2-гидроперокси группой. Предполагается, что водородная связь, образованная Tyr190, стабилизирует 2-гидропероксицелентеразин в активном центре фотопротеинов [Vysotski, Lee, 2004; Vysotski, Lee, 2007].

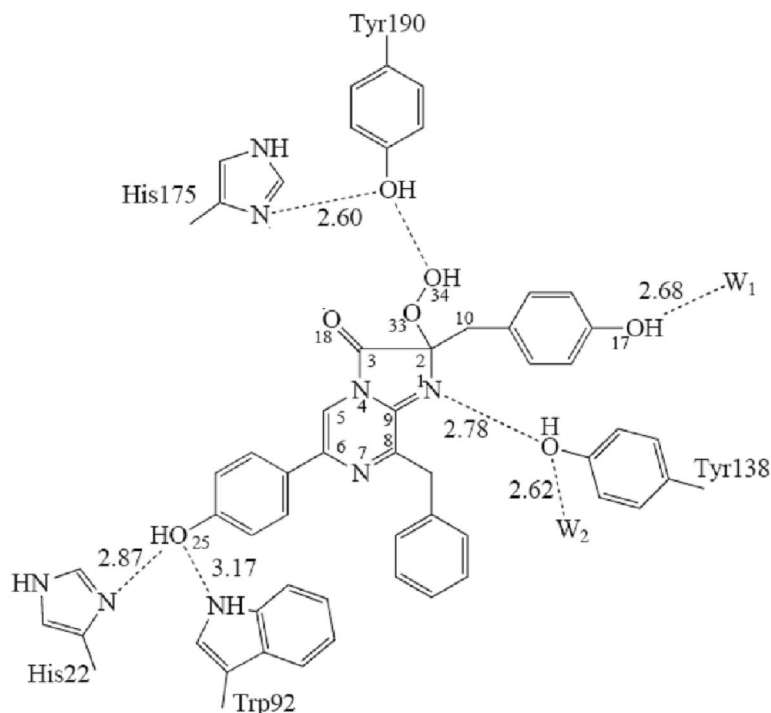


Рисунок 1.4 – Двухмерное изображение 2-гидропероксицелентеразина в молекуле обелина в окружении аминокислотных остатков, формирующих водородные связи с атомами субстрата. Водородные связи показаны пунктиром, расстояние указано в ангстремах.  $W_1$  и  $W_2$  – молекулы воды.

Следует отметить, что аминокислотный состав  $Ca^{2+}$ -регулируемых фотопротеинов и представителей семейства  $Ca^{2+}$ -связывающих белков «EF-hand» типа сильно различается, поскольку фотопротеины содержат довольно много остатков триптофана [Kretsinger, Nockolds, 1973]. Все фотопротеины, аминокислотные последовательности которых охарактеризованы на данный момент, содержат 6 остатков триптофана. Четыре из них (Trp92, Trp114,

Trp135, Trp179) находятся в целентеразин-связывающей полости, а Trp18 и Trp103 располагаются за ее пределами в первой и четвертой  $\alpha$ -спиралях, соответственно. Боковые цепи остатков Trp92 и Trp179 находятся по обе стороны от 6-(*n*-гидрокси)-фенильного кольца целентеразина; а боковые цепи Trp114 и Trp135 располагаются вблизи 2-(*n*-гидрокси)-бензильной группы целентеразина (рис. 1.5). Более того, атомы азота индольных колец Trp92 и Trp179 формируют водородные связи с атомами кислорода 6-(*n*-гидрокси)-фенильной группы и C3-карбонилем целентеразина [Vysotski, Lee, 2004; Vysotski, Lee, 2007].

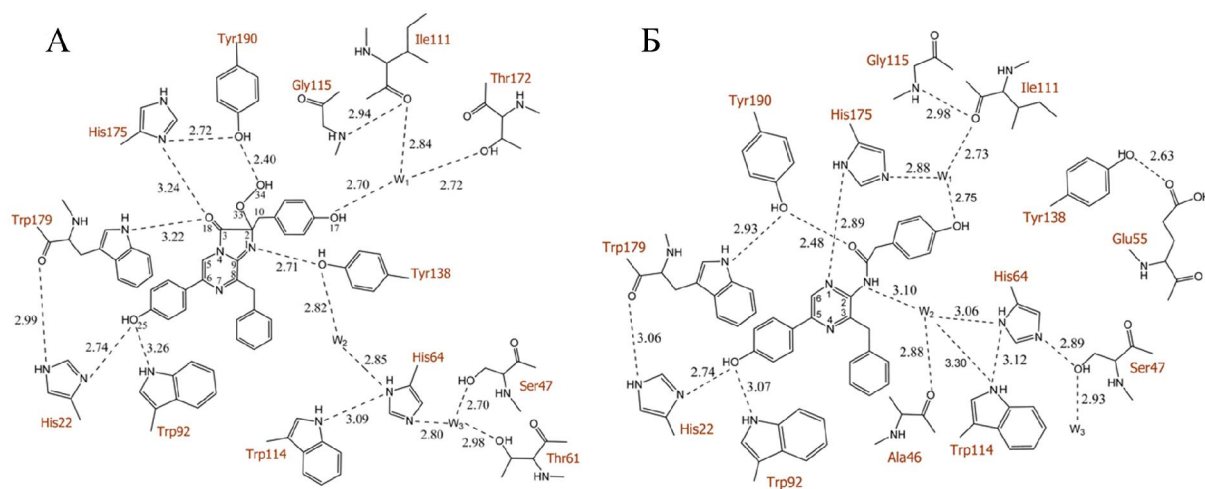


Рисунок 1.5 – Двухмерное изображение целентеразин-связывающей полости обелина (А) и  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного обелина (Б) [Liu et al., 2006].

### 1.3 Особенности пространственной структуры $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного обелина

Кристаллическая структура  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного обелина из *O. longissima* со связанным целентерамидом и ионами  $\text{Ca}^{2+}$  имеет компактную глобулярную организацию, характерную для всех фотопротеинов (рис. 1.3) [Liu et al., 2006]. Общая пространственная структура  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного обелина сходна со структурой обелина до биолюминесцентной реакции (PDB код 1QV0), когда белок связан с молекулой 2-гидропероксицелентеразина.

Среднеквадратичное отклонение (RMSD) атомов основной цепи обелина и  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного обелина составляет всего 1,7 Å. Молекула продукта реакции, целентерамида, расположена в центре белковой глобулы в той же ориентации и положении, как и 2-гидропероксицелентеразин в молекуле обелина, и окружена аминокислотными остатками всех восьми  $\alpha$ -спиралей. Ионы кальция были обнаружены в каждом из предсказанных центров связывания кальция («EF-hand» петли I, III и IV) (рис. 1.3). «EF-hand» петля II в N-концевом домене белка не участвует в связывании кальция и не претерпевает существенных конформационных изменений [Liu et al., 2006].

В  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженном обелине С-концевая петля прикрывает внутреннюю субстрат-связывающую полость, таким образом обеспечивая для целентерамида гидрофобное окружение, недоступное растворителю. По всей видимости, это создает благоприятные условия для эффективного образования возбужденного электронного состояния целентерамида и излучения с высоким квантовым выходом [Vysotski, Lee, 2007].

В процессе связывания  $\text{Ca}^{2+}$  происходит изменение ориентации всех 12 аминокислот, формирующих  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающую петлю, при котором образуется оптимальная конформация данной петли, необходимая для связывания иона кальция. Связывание кальция вызывает сдвиг восьмой  $\alpha$ -спирали, приводящий к изменению ориентации His175, смещение имидазольного кольца которого и «запускает» биолюминесцентную реакцию  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых фотопротеинов, согласно предложенному механизму биолюминесцентной реакции [Liu et al., 2006; Vysotski, Lee, 2007].

Ион кальция во всех трех  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих петлях обелина координируется по схеме пентагональной бипирамиды, типичной для «EF-hand» белков [McPhalen et al., 1991; Kawasaki et al., 1998]. Во всех из них шестью кислородными координационными лигандами выступают карбоксильные группы боковых цепей Asp и Glu, карбонильные группы основной цепи или боковой цепи Asn, а также гидроксильные группы серина.

Седьмым лигандом, связывающим ион кальция, является атом кислорода молекулы воды. Длина координационных связей равна  $\sim 2,4 \text{ \AA}$  [Liu et al., 2006].

По окончании биолюминесцентной реакции практически все аминокислотные остатки субстрат-связывающей полости белка сохраняют свою прежнюю ориентацию и положение, за исключением Phe142, Phe111, Phe119, Trp135 и Tyr138, которые уходят из целентерамид-связывающей полости на поверхность белка, и, наоборот, Phe28, Gly143 и Thr172 перемещаются внутрь полости. Аминокислотные остатки, перемещающиеся в центр полости, в целом, более полярны, чем остатки, вытесненные из нее. Во внутренней полости  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного обелина располагаются две молекулы воды, как и в «заряженном» обелине, но одна из них, W2, меняет свое положение, сместившись на место гидроксильной группы Tyr138 (рис. 1.5). В  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженном обелине эта молекула воды образует водородную связь с атомом азота амидной группы 2-гидропероксицелентеразина [Liu et al., 2006; Vysotski, Lee, 2007].

#### 1.4 Возможные пути формирования 2-гидропероксицелентеразина

В составе  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых фотопротеинов молекула целентеразина находится в преактивированной кислородом форме, в виде 2-гидропероксицелентеразина [Head et al., 2000; Liu et al., 2003].

На основании результатов, полученных при исследовании хемиллюминесценции аналогов целентеразина в присутствии оснований в апротонных растворах, был предложен механизм окислительного декарбоксилирования целентеразина (рис. 1.6) [Goto, 1968; Goto et al., 1968; Kondo et al., 2005; Hirano et al., 2008].

Предложенный механизм был положен в основу гипотезы об одном из возможных путей формирования пероксипроизводных целентеразина. Согласно ей, первым этапом является депротонирование N7-атома азота

имидазолпиразинового кольца целентеразина, которое приводит к образованию целентеразин-аниона (рис. 1.6). На следующем этапе после переноса электрона с аниона целентеразина на кислород формируются короткоживущие целентеразин-радикал и супероксиданион-радикал  $O_2^{\bullet-}$ .

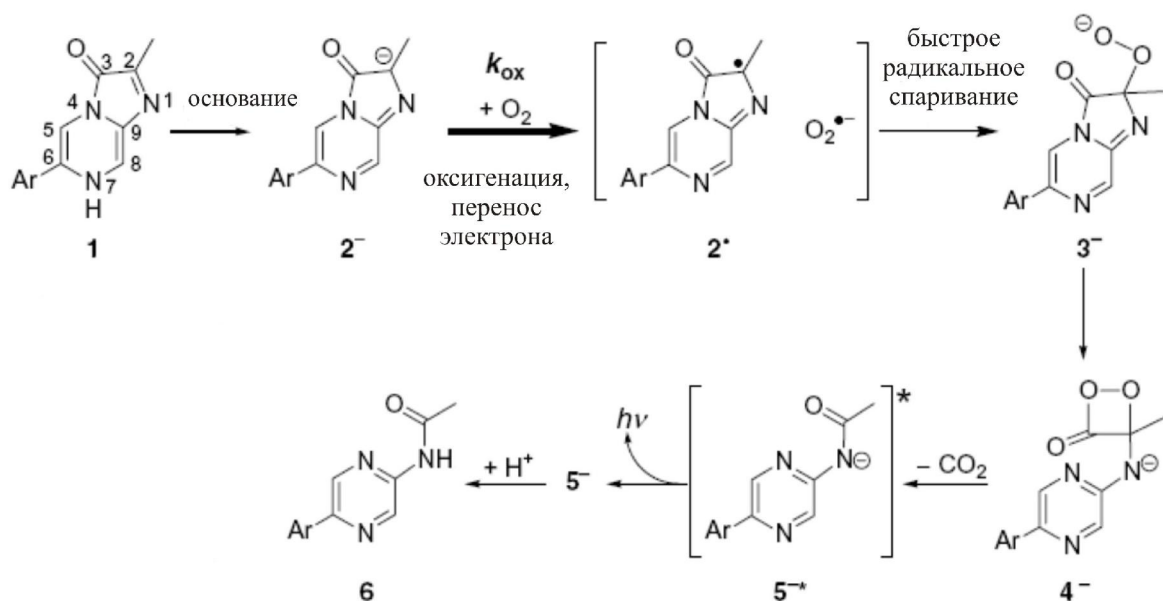


Рисунок 1.6 – Механизм хемилюминесценции аналогов люциферина из *Cypridina* [Kondo et al., 2005].

Скорее всего, перенос электрона – этап, лимитирующий скорость всего процесса. Радикальное спаривание целентеразин-радикала и супероксиданион-радикала приводит к образованию пероксид-аниона целентеразина. И, в случае люциферазной биолуминесцентной системы, на следующем этапе происходит циклизация пероксид-аниона, и образуется диоксиэтанон, в результате распада которого происходит формирование синглетного возбужденного состояния продукта и высвобождение CO<sub>2</sub>.

Хирано с соавторами, используя кинетику хемилюминесценции, рассчитали скорость реакции второго порядка для нескольких аналогов люциферина *Cypridina* в DMSO с 1,1,3,3–тетраметилгуанидином в качестве



основания [Kondo et al., 2005]. И согласно предложенному Гото механизму [Goto, 1968; Goto et al., 1968], данные константы скорости характеризуют процесс переноса электрона, так как именно этот этап является лимитирующим для всего процесса.

Основываясь на данных исследованиях, можно предположить, что механизм образования 2-гидропероксицелентеразина при формировании активного фотопротейна достаточно близок к вышеописанному (рис. 1.6), но с важным отличием: пероксид-анион целентеразина, образующийся в результате радикального спаривания, должен быть протонирован до этапа циклизации в диоксиэтанон.

Несмотря на то, что вышеописанный механизм является достаточно обоснованным, возможен и альтернативный механизм образования 2-гидропероксицелентеразина. Группа Кормьера провела подробное исследование влияния рН, а также протонных и апротонных растворов в анаэробных условиях, на спектральные свойства целентеразина и некоторых его аналогов [Nogi et al., 1975]. Оказалось, что изменения в видимой области спектра абсорбции целентеразина и его аналогов находятся в зависимости от полярности растворителя: максимум поглощения в метаноле равен 435 нм, тогда как в апротонном растворителе, диметилформамиде или DMSO, видимое поглощение смещалось к 454 нм. Исследователи отнесли максимумы поглощения на 435 и 454 нм к таутомерным формам целентеразина, протонированного по N7- и C2-атомам имидазол-пиразинового кольца, соответственно.

Как уже было сказано ранее, субстрат-связывающие полости акворина и обелина сформированы в основном гидрофобными боковыми цепями аминокислотных остатков [Head et al., 2000; Liu et al., 2000; Liu et al., 2003; Liu et al., 2006], следовательно, можно сделать вывод, что после быстрого связывания с апофотопротейном целентеразин подвергается таутомеризации, которая заключается в переносе протона с N7- в C2-положение. На

следующем этапе С2-таутомерная форма целентеразина взаимодействует с молекулярным кислородом, и в результате образуется 2-гидропероксицелентеразин, который затем стабилизируется водородной связью с гидроксильной группой тирозина [Vysotski, Lee, 2004; Vysotski, Lee, 2007].

Представленный механизм формирования 2-гидропероксицелентеразина в  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых фотопротеинах имеет полное право на существование, так как не требует дополнительных условий, вроде наличия основания или «обратного» переноса протона для продукции 2-гидропероксипроизводного, как в механизме, рассмотренном выше.

### 1.5 Функциональная роль остатков His и Tyr в формировании активного фотопротеинового комплекса

Согласно описанному выше предполагаемому механизму образования 2-гидропероксицелентеразина в субстрат-связывающей полости фотопротеина, на первом этапе этой реакции происходит депротонирование N7-атома азота целентеразина при участии основания (рис. 1.6). Но согласно пространственным структурам обелина [Liu et al., 2000; Liu et al., 2003] и акворина [Head et al., 2000], в непосредственной близости от N7-атома азота молекулы целентеразина нет ни одной боковой цепи аминокислотных остатков, которые могли бы выполнять функцию основания. Несмотря на это, формирование 2-гидропероксицелентеразина посредством оксигенации целентеразина, несомненно, происходит. Поэтому можно сделать вывод, что депротонирование N7-атома азота имеет место, скорее всего, до того, как целентеразин займет свое окончательное положение в субстрат-связывающей полости, т.е. в течение миллисекунд, за которые происходит его связывание. Поэтому вполне резонно предположить, что в этом процессе участвует один из остатков His, который может выступать в роли основания при нейтральных рН, особенно в паре с карбоксильной группой Glu или Asp. И так как, по предложенному гипотетическому механизму, депротонирование

не лимитирует скорость формирования 2-гидропероксицелентеразина, данное предположение выглядит достаточно обоснованным [Eremeeva et al., 2009; Eremeeva et al., 2013a,b] (рис. 1.6).

Боковая цепь гистидина представляет собой имидазольное кольцо, имеющее в своем составе два атома азота с различными свойствами. Один из атомов азота, связанный с атомом водорода, может отдавать свою неподеленную электронную пару имидазольному кольцу и вследствие этого проявлять свойства кислоты. В свою очередь, второй атом азота может отдавать ароматическому кольцу только один электрон и сохранять свободную неподеленную электронную пару, поэтому он является «основным». Благодаря этим свойствам гистидин может успешно осуществлять функцию переносчика протона [Eremeeva et al., 2013a,b].

После анализа пространственных структур субстрат-связывающей полости  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых фотопротеинов, а также данных, полученных при исследовании влияния различных мутаций His на образование активного фотопротеинового комплекса, и результатов квантово-химических расчетов было сделано предположение, что более вероятным кандидатом на роль основания в случае обелина является His175, который, кроме того, может выполнять двойную функцию [Eremeeva et al., 2009; Eremeeva et al., 2013a,b]. Схема предполагаемой функциональной роли His175 в образовании 2-гидропероксицелентеразина в субстрат-связывающей полости обелина показана на рисунке 1.7. На первом этапе в момент связывания целентеразина с апобелком протон от N7-атома азота целентеразина переходит на His175 посредством «основного» атома азота. Это приводит к формированию N7-целентеразин-аниона, который за счет быстрой перестройки системы связей превращается в C2-анион целентеразина (рис. 1.7). На следующем этапе положительно заряженный остаток His175 передает протон от своего «кислого» атома азота на C2-атом углерода аниона целентеразина с образованием целентеразина, протонированного по C2-атому углерода

(C2(H)-целентеразин). Из этого можно заключить, что His175 выполняет функцию переносчика протона (“proton shuttle mechanism”), на разных этапах реакции являясь и «основанием», и «кислотой» [Eremeeva et al., 2009; Eremeeva et al., 2013a,b] (рис. 1.7.).

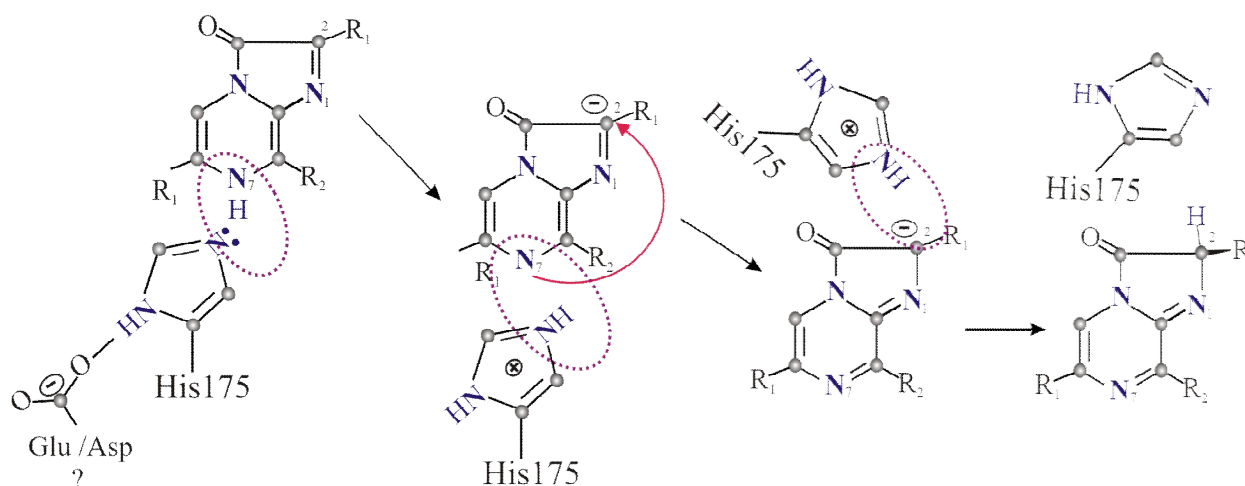


Рисунок 1.7 – Предполагаемая функция His175 в образовании активного фотопротеинового комплекса обелина.

Представленный механизм переноса протона при образовании 2-гидропероксицелентеразина в  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых фотопротеинах сходен с механизмом, предложенным для диоксигеназ из *Arthrobacter nitroguajacolicus* и *Pseudomonas putida*. Согласно ему, ключевая роль в переносе протона играет пара, состоящая из аминокислотного остатка, проявляющего свойства основания (His), и остатка, проявляющего свойства кислоты (Asp) [Steiner et al., 2010].

Стоит также отметить, что согласно квантово-химическим расчетам, энергия активации для депротонирования N7-атома азота целентеразина с участием His (рис. 1.7) составляет 11 кДж/моль [Tomilin et al., 2010]. И, вследствие того, что реакция не требует больших затрат энергии, она может протекать с довольно высокой скоростью. Кроме того, с помощью квантово-химических расчетов показано, что только целентеразин, протонированный по C2-атому углерода, геометрически соответствует аминокислотному

окружению субстрат-связывающей полости активного обелина, потому что при переходе от N7(H)- к C2(H)-целентеразину конфигурация C2-атома углерода изменяется с  $sp^2$  на  $sp^3$ . Изменяется и угол связи между имидазол-пиразиновым кольцом и 2-(*n*-гидрокси)-бензильной группой целентеразина таким образом, чтобы последняя могла поместиться в пространстве между боковыми цепями Trp135 и His175 [Tomilin et al., 2010] (рис. 1.8).

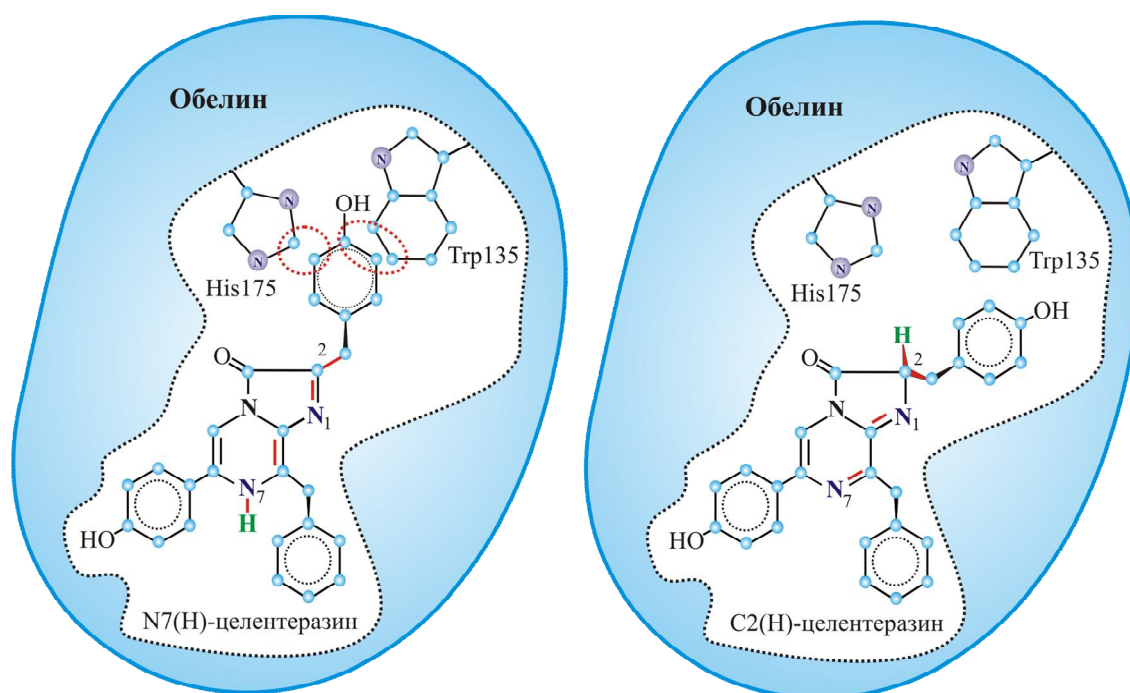


Рисунок 1.8 – Схематическое представление целентеразина, протонированного по N7-атому азота (N7(H)-целентеразин) и C2-атому углерода (C2(H)-целентеразин), в целентеразин-связывающей полости обелина.

На следующем этапе, после образования протонированного по C2-атому углерода целентеразина – C2(H)-целентеразина, происходит его взаимодействие с кислородом, в результате которого образуется 2-гидропероксицелентеразин. Предполагаемая функциональная роль Tyr138 в этом процессе схематически продемонстрирована на рисунке 1.9.

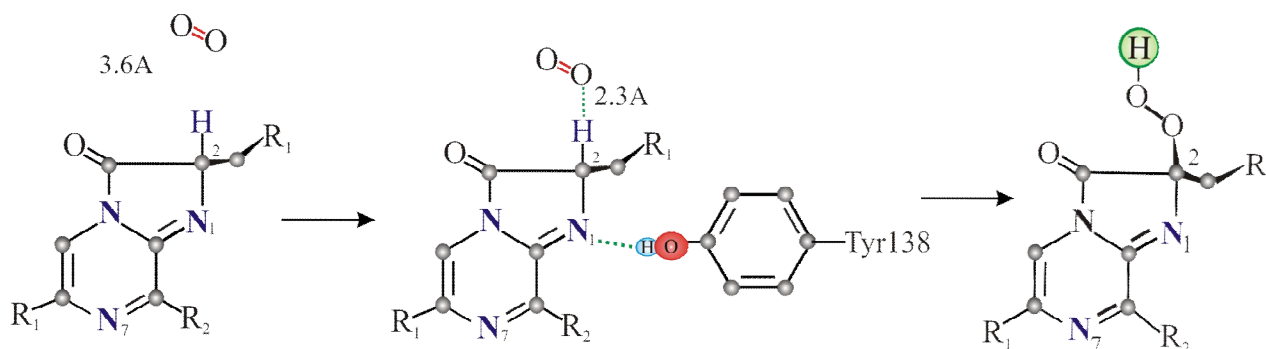


Рисунок 1.9 – Предполагаемая роль Tyr138 в образовании активного фотопротеинового комплекса обелина.

Дальнейшие квантово-химические вычисления [Tomilin et al., 2010] показали, что вероятность приближения молекулы кислорода к протонированному C2-атому углерода целентеразина на расстояние, необходимое для взаимодействия, сильно повышается при условии наличия полярной группы, например OH-группы Tyr138 или H<sub>2</sub>O, возле N1-атома азота имидазолпиразинового кольца. И, скорее всего, именно наличие полярной группы в непосредственной близости от имидазолпиразинового кольца C2(H)-целентеразина может приводить к поляризации его N1-атома азота. Также C2-H связь может поляризоваться в результате так называемого индукционного эффекта. Под воздействием дисперсионных сил молекула кислорода приближается к C2-атому целентеразина на расстояние 2,3 Å, что увеличивает вероятность инициации реакции образования 2-гидроперокси-производного [Eremeeva et al., 2013a,b].

Более того, важность Tyr138 для образования активного фотопротеина была подтверждена заменой Tyr на Phe. Но все же важно отметить, что, несмотря на существенное замедление скорости при замене Tyr, активный фотопротеиновый комплекс все же формируется. Скорее всего, присоединение кислорода является процессом вероятностным, и поляризация C2-H связи просто увеличивает эту вероятность.

По причине того, что кристаллическая структура апофотопротеина до сих пор не определена, для моделирования аминокислотного окружения

целентеразина в субстрат-связывающей полости была использована пространственная структура активного обелина, т.е. обелина, связанного с 2-гидропероксицелентеразином [Liu et al., 2000; Liu et al., 2003]. В итоге было предположено, что основные конформационные изменения в молекуле апообелина происходят в процессе связывания целентеразина, протекающем за несколько миллисекунд, и далее, в процессе активации связанного целентеразина кислородом, существенного изменения кристаллической структуры субстрат-связывающей полости уже не происходит. Данное предположение вполне правдоподобно, учитывая тот факт, что нестабильное 2-гидропероксипроизводное целентеразина должно быть незамедлительно стабилизировано сетью водородных связей с аминокислотными остатками субстрат-связывающей полости фотопротеина [Tomilin et al., 2010; Ereemeeva et al., 2013a,b].

#### 1.6 Механизм биolumинесцентной реакции $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых фотопротеинов

В ряде экспериментальных исследований было показано, что в водных растворах целентеразин нестабилен и со временем медленно самоокисляется [Shimomura, 2006]. Более того, установлен тот факт, что в органических растворителях его устойчивость еще меньше, целентеразин может вступать в реакцию с кислородом, которая сопровождается излучением с низким квантовым выходом. На основании исследований хемилуминесценции аналогов целентеразина в апротонных растворах было сделано предложение о механизме его окисления, в соответствии с которым кислород взаимодействует с неустойчивой формой целентеразин-N7-аниона, которая образуется при щелочных значениях pH [Goto, 1968; McCapra et al., 1967]. Согласно данному механизму, окислительное декарбоксилирование целентеразина происходит через образование нескольких интермедиатов (рис. 1.10). В результате взаимодействия целентеразина с кислородом

формируется первичный окисленный продукт – С2-гидроксипероксид. В апротонных растворителях, например, в диметилсульфоксиде (DMSO), при наличии сильного основания реакция протекает с образованием диоксиэтанона (этап 1), затем происходит отщепление молекулы  $\text{CO}_2$  (этап 2) и образование амид-аниона (этап 4) в возбужденном состоянии. Переход молекулы в основное состояние сопровождается излучением света ( $\lambda_{\text{max}} = 455$  нм) (рис. 1.10). МакКапра и Чанг предложили этот механизм для использующих целентеразин в качестве субстрата биоломинесцентных систем ( $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемые фотопротеины, *Renilla* люцифераза).

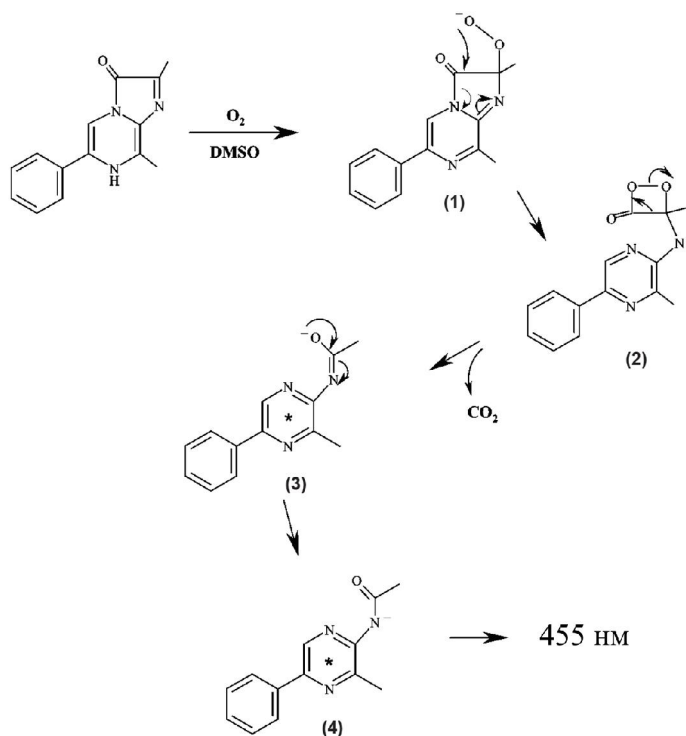


Рис.1.10 – Механизм образования возбужденного состояния, который предложили МакКапра и Чанг [McCarra et al., 1967] для биоломинесцентных систем, использующих целентеразин в качестве субстрата.

Но некоторое время спустя данная модель была расширена благодаря исследованиям хемилюминесцентных свойств ряда аналогов целентеразина [Hori et al., 1973]. На основании спектрального сходства биоломинесценции



акворина и флуоресценции амид-аниона был сделан вывод о том, что именно амид-анион в возбужденном состоянии является эмиттером при биолюминесценции акворина.

В работе Шимомуры и Тераниши [Shimomura, Teranishi, 2000] об аналогах целентерамида было показано, что целентерамид может образовывать пять различных возбужденных состояний (рис. 1.11): нейтральное, амид-анион, резонансные структуры фенолят/пиразин-N4-аниона и ионную пару с акцептором протона. Также описывалось, что добавление *n*-бутиламина к раствору целентерамида в бензоле приводит к появлению бимодального спектра флуоресценции с максимумами при 397 и 467 нм. Возбужденное состояние ионной пары было соотнесено с флуоресценцией на 467 нм. В основном состоянии гидроксильная группа фенола образует водородную связь с амином без ионной диссоциации, следовательно, максимумы возбуждения при 302 и 337 нм близки максимумам возбуждения нейтрального целентерамида. При возбуждении протон фенольной ОН-группы переходит на амин, это приводит к тому, что флуоресценция вновь образованной ионной пары (465 – 479 нм) становится очень близка излучению фенолят-аниона (480 – 490 нм). Факт того, что в возбужденном состоянии гидроксильная группа фенола является гораздо более сильной кислотой, чем в основном состоянии, делает такой перенос протона возможным [Shimomura, Teranishi, 2000].

В своем исследовании флуоресценции аналогов целентерамида Хирано с соавторами [Imai et al., 2001] пришли к схожему заключению относительно формирования ионной пары с аминами и предположили, что, скорее всего, данная конфигурация фенолят-аниона является эмиттером в биолюминесценции акворина.

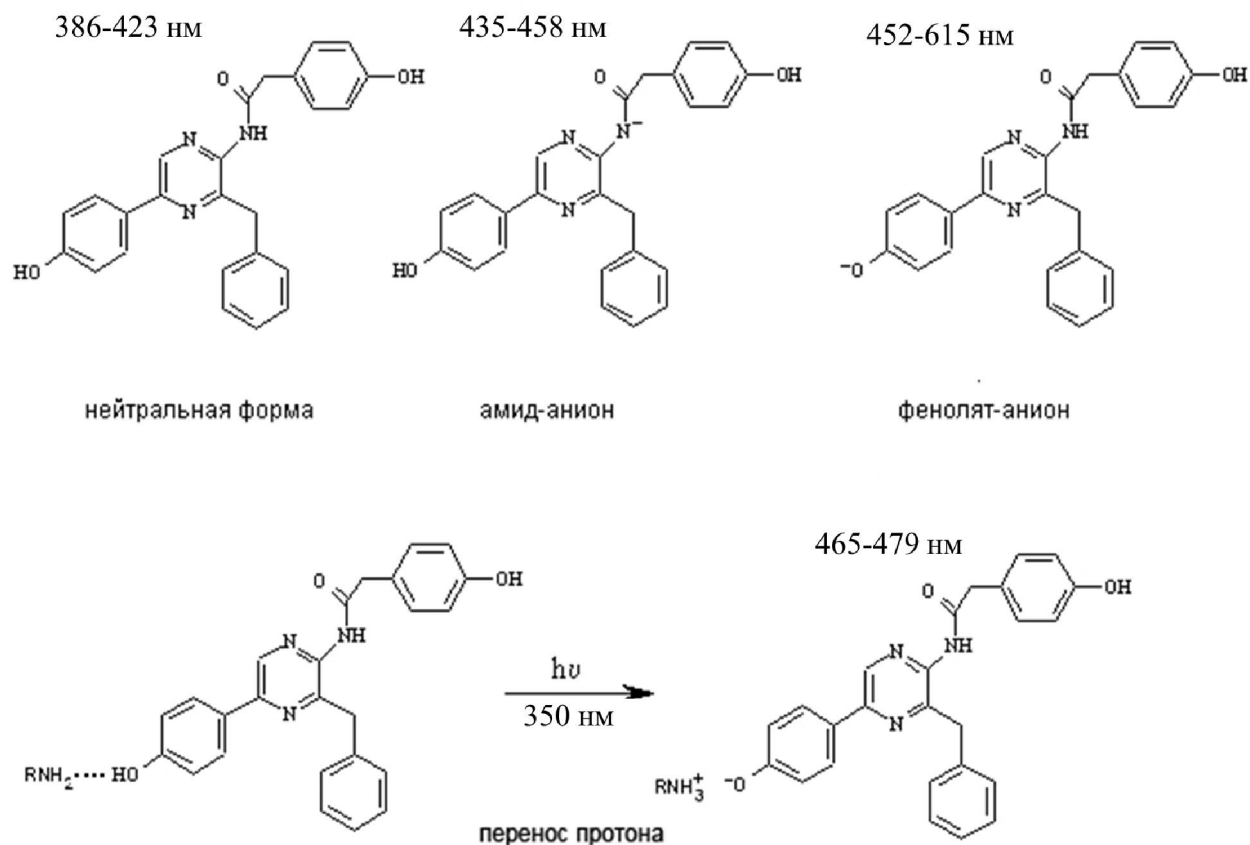


Рисунок 1.11 – Различные ионные формы целентерамида  
[Shimomura, Teranishi, 2000].

В предложенном МакКапрой и Чангом [McCapra et al., 1967] модельном механизме образования возбужденного состояния целентерамида при окислительном декарбоксилировании целентеразина первичным эмиттером является амид-анион целентерамида. Но важен тот факт, что при биолюминесценции фотопротеинов, в отличие от модельных экспериментов, целентеразин располагается в активном центре белка в окружении аминокислотных остатков и взаимодействует с ними через систему водородных связей. И в таких условиях довольно вероятен перенос протона, который изменит структуру молекулы-излучателя. На основании подробного анализа кристаллических структур фотопротеинов дикого типа [Liu et al., 2003; Deng et al., 2004; Deng et al., 2005; Liu et al., 2006] и мутанта обелина W92F [Deng et al., 2001; Vysotski et al., 2003] в различных лиганд-зависимых

конформационных состояниях, а также данных, полученных при исследовании хемилюминесценции и флуоресценции аналогов целентеразина и целентерамида [McCapra et al., 1967; Usami, Isobi, 1996; Shimomura Teranishi, 2000; Imai et al., 2001] была предложена гипотеза (“proton-relay mechanism”) о роли аминокислотных остатков субстрат-связывающей полости в реакции окислительного декарбоксилирования и в формировании эмиттера биолюминесценции фотопротеинов [Vysotski, Lee, 2004; Vysotski, Lee, 2007].

При исследовании пространственных структур обелина и акворина обнаружено, что в обоих случаях Tyr138 связан водородной связью с N1-атомом 2-гидропероксицелентеразина [Head et al., 2000; Liu et al., 2000], однако в Ca<sup>2+</sup>-разряженном обелине этот остаток располагается за пределами субстрат-связывающей полости, и его боковая цепь формирует водородную связь с поверхностным Glu55 [Liu et al., 2006] (рис. 1.5). В разряженном белке Tyr138 замещается молекулой воды (W<sub>2</sub>), которая может служить донором водородной связи для атома азота амидной группы целентеразина.

Усами и Изоби [Usami, Isobe, 1996] в экспериментах по исследованию хемилюминесценции целентеразина в неполярных растворителях, моделирующих окружение связывающей полости фотопротеинов, наблюдали хемилюминесценцию после фотоокисления целентеразина при низких температурах (-78°C). Методом низкотемпературного ядерного магнитного резонанса они определили структуру интермедиата и выяснили, что данное соединение является производным диоксиэтанола. Распад интермедиата с образованием возбужденного состояния нейтрального целентерамида и испусканием света в коротковолновой области спектра (400 нм) наблюдался при более низкой температуре нагревания, нежели хемилюминесценция от возбужденного состояния целентерамид-аниона (475 нм). Следовательно, целентерамид-анион является более стабильным соединением. Из этого авторами был сделан вывод, что декарбоксилирование целентеразина может

происходить и из нейтрального диоксиэтанона, и из диоксиэтанон аниона, и что переход аниона в нейтральное состояние не осуществляется при низких температурах. Также на основе данных исследований был сделан ряд предположений о функции молекулы воды  $W_2$  [Vysotski, Lee, 2004; Vysotski, Lee, 2007].

Механизм образования возбужденного состояния целентерамида при окислительном декарбоксилировании целентеразина [McCapra et al., 1967] предполагает, что биолюминесценция инициируется в результате небольшого сдвига His175, расположенного в восьмой  $\alpha$ -спирали (рис. 1.2), который происходит после связывания иона кальция с белком. В результате уменьшается расстояние между остатками His175 и Tyr190, что делает возможным перенос протона от гидроксильной группы Tyr190 на His175 и, как следствие, образование пероксианиона (рис. 1.12, шаг 1).

Затем пероксианион «атакует» C3-положение целентеразина с образованием диоксиэтананового интермедиата [Vysotski, Lee, 2007] (рис. 1.12, шаг 2). Сравнение кристаллических структур обелина до и после биолюминесцентной реакции подтверждает правдоподобность данного механизма, так как на них хорошо видно, что His175 немного смещается по направлению к Tyr190, а его имидазольное кольцо поворачивается на  $90^\circ$  [Liu et al., 2006]. Диоксиэтанановый интермедиат довольно нестабильное соединение и, согласно гипотезе МакКапра и Чанга, должен распадаться с образованием  $CO_2$  и амид-аниона целентерамида в возбужденном состоянии.

Поскольку *pK* N-аниона в данном окружении выше, чем у соседней молекулы воды ( $W_2$ ), его протонирование за счет молекулы воды (рис. 1.12, шаг 3) приводит к образованию диоксиэтанона в нейтральном состоянии. Протонированная форма гистидина энергетически более выгодна, и поэтому His64, в свою очередь, может отдавать протон на молекулу воды ( $W_2$ ) (рис. 1.12, шаг 3А).

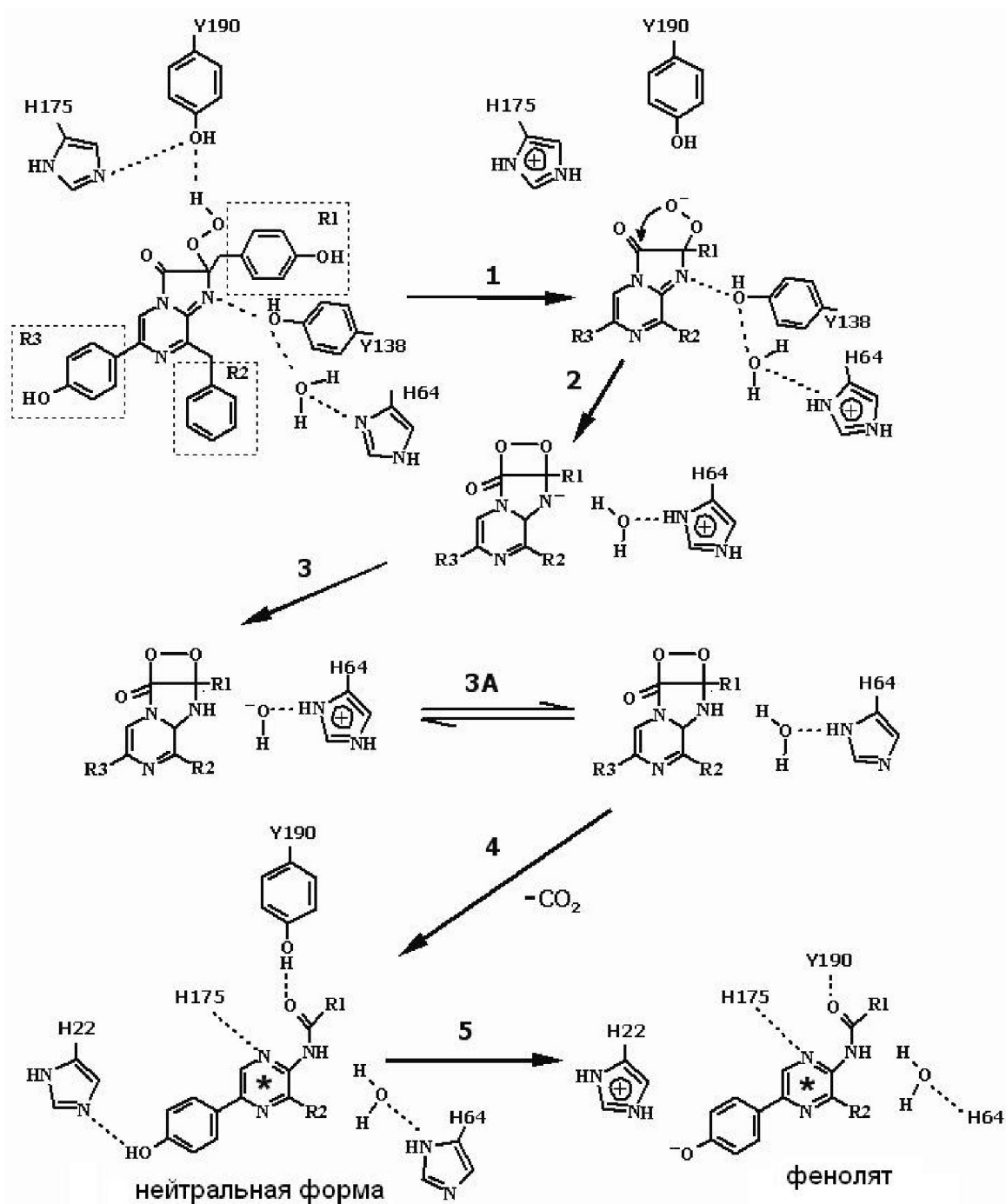


Рисунок 1.12 – Механизм переноса протона, инициируемый связыванием ионов кальция, и формирования эмиттера биоломинесценции [Vysotski, Lee, 2007].

Таким образом, молекула воды  $W_2$  катализирует реакцию декарбоксилирования 2-гидропероксицелентеразина через протонирование диоксиэтанон-аниона. В результате формируется нейтральный целентерамид

в возбужденном состоянии, являющийся первичным эмиттером биолюминесценции фотопротеинов.

Предположение о том, что именно нейтральная форма целентерамида является первичным эмиттером, может объяснить многие свойства целентеразин-зависимой биолюминесценции *in vitro*. И для целентеразин-зависимых люцифераз, и для  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых фотопротеинов характерен максимум биолюминесценции в диапазоне 460 – 495 нм. Флуоресценция аналогов целентерамида в растворах различной полярности в присутствии сильных оснований также наблюдается в сходном диапазоне [Shimomura, Teranishi, 2000; Imai et al., 2001]. Спектр биолюминесценции обелина имеет максимум при 485 нм с небольшим плечом на 400 нм [Markova et al., 2002], которое соответствует излучению от нейтральной формы целентерамида и усиливается в случае некоторых мутантов обелина и акворина [Ohmiya et al., 1992; Malikova et al., 2003; Deng et al., 2001; Vysotski et al., 2003]. Но амид-анион излучает при 435-458 нм (рис. 1.11).

Следовательно, амид-анион не может претендовать на роль первичного возбужденного состояния в биолюминесцентной реакции фотопротеинов, так как в противном случае сложно объяснить появление более высокоэнергетических состояний, характерных для нейтральной формы возбужденного целентерамида.

Шаг 5 на рисунке 1.12 объясняет образование возбужденных состояний целентерамида, которые излучают в более длинноволновой области спектра (вторичный эмиттер биолюминесценции). После переноса протона на His22 образуется фенолят-анионная форма целентерамида в возбужденном состоянии, за счет излучения которого возникает биолюминесценция в длинноволновой области спектра. Этот остаток гистидина находится на расстоянии длины водородной связи от гидроксильной группы как в структуре заряженного, так и разряженного обелина (рис. 1.5). Поскольку  $pK$  5-(*n*-гидрокси)-фенильной группы

целентерамида в возбужденном состоянии [Ireland, Wyatt, 1976] может быть меньше 6,5, то становится возможен переход протона на гистидин, который приводит к формированию фенолята в возбужденном состоянии. Согласно экспериментам Мори с соавторами [Mori et al., 2006], фенолят-анионная форма целентерамида может существовать в различных резонансных формах в зависимости от полярности растворителя. Максимумы флуоресценции различных ионных форм фенолят-аниона в растворе варьируют в диапазоне от 452 до 615 нм (рис. 1.13), что включает в себя диапазон биолюминесценции различных фотопротеинов (465-495 нм) [Vysotski, Lee, 2004; Vysotski, Lee, 2007].

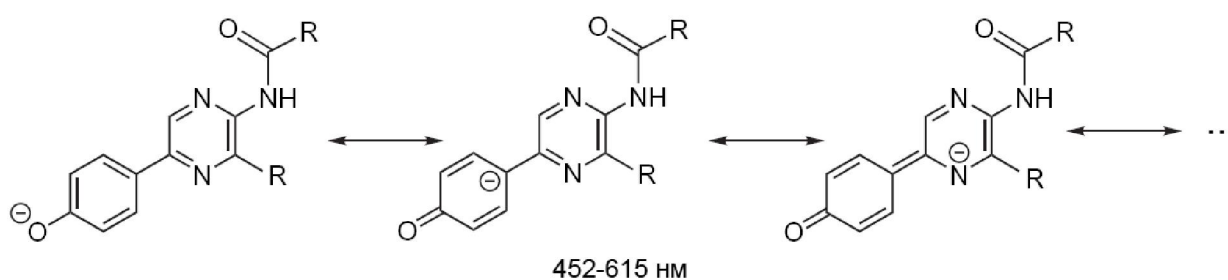


Рисунок 1.13 – Резонансные формы фенолят-аниона целентерамида [Mori et al., 2006].

Водородная связь, образованная Trp92 (рис. 1.5), возможно, стабилизирует возбужденный целентерамид в форме фенолят-аниона, и по этой причине обелин показывает низкую интенсивность биолюминесценции в коротковолновой области от нейтрального целентерамида, а в спектре излучения фотопротеина акворина плечо на 400 нм отсутствует полностью. При мутационной замене Trp92 на фенилаланин, которая приводит к исчезновению водородной связи, происходит замедление переноса протона, и поэтому увеличивается вероятность излучения от нейтральной формы целентерамида, что выражается в бимодальном спектре биолюминесценции мутанта [Vysotski et al., 2003]. Так как в акворине Tyr82 образует

дополнительную водородную связь с 5-(*n*-гидрокси)-фенильной группой целентерамида, то даже в случае замены Trp86 (Trp92 в обелине) перенос протона происходит достаточно эффективно, и поэтому вклад коротковолновой полосы излучения у W86F акворина меньше, чем у W92F обелина [Deng et al., 2001].

Из сказанного выше можно сделать вывод о том, что формирование эмиттера билюминесцентной реакции  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых фотопротеинов происходит, скорее всего, через образование ряда промежуточных короткоживущих соединений, сопровождается переносом протона и протекает при непосредственном участии аминокислотных остатков активного центра белка [Vysotski, Lee, 2004; Vysotski, Lee, 2007].

#### 1.7 Механизм билюминесцентных реакций других целентеразин-зависимых систем

Кальмары *Watasenia scintillans* и *Symplectoteuthis oualaniensis*, в отличие от целентеразин-зависимых билюминесцентных систем кишечнорастворимых, сцифоидных медуз, копепод и коралла *Renilla*, используют производные целентеразина – целентеразин дисульфат и дегидроцелентеразин, соответственно.

На рисунке 1.14 представлена схема билюминесцентной реакции, предложенная для *W. scintillans* [Tsuji, 2002, Tsuji, 2005]. В отличие от других целентеразин-зависимых люцифераз, люциферазе кальмара *Watasenia* кроме целентеразин дисульфата и молекулярного кислорода для билюминесцентной реакции также необходимы  $\text{Mg}^{2+}$  и АТФ. Согласно предложенной схеме, на первом этапе реакции в активном центре люциферазы образуется целентеразинаденилат дисульфат.



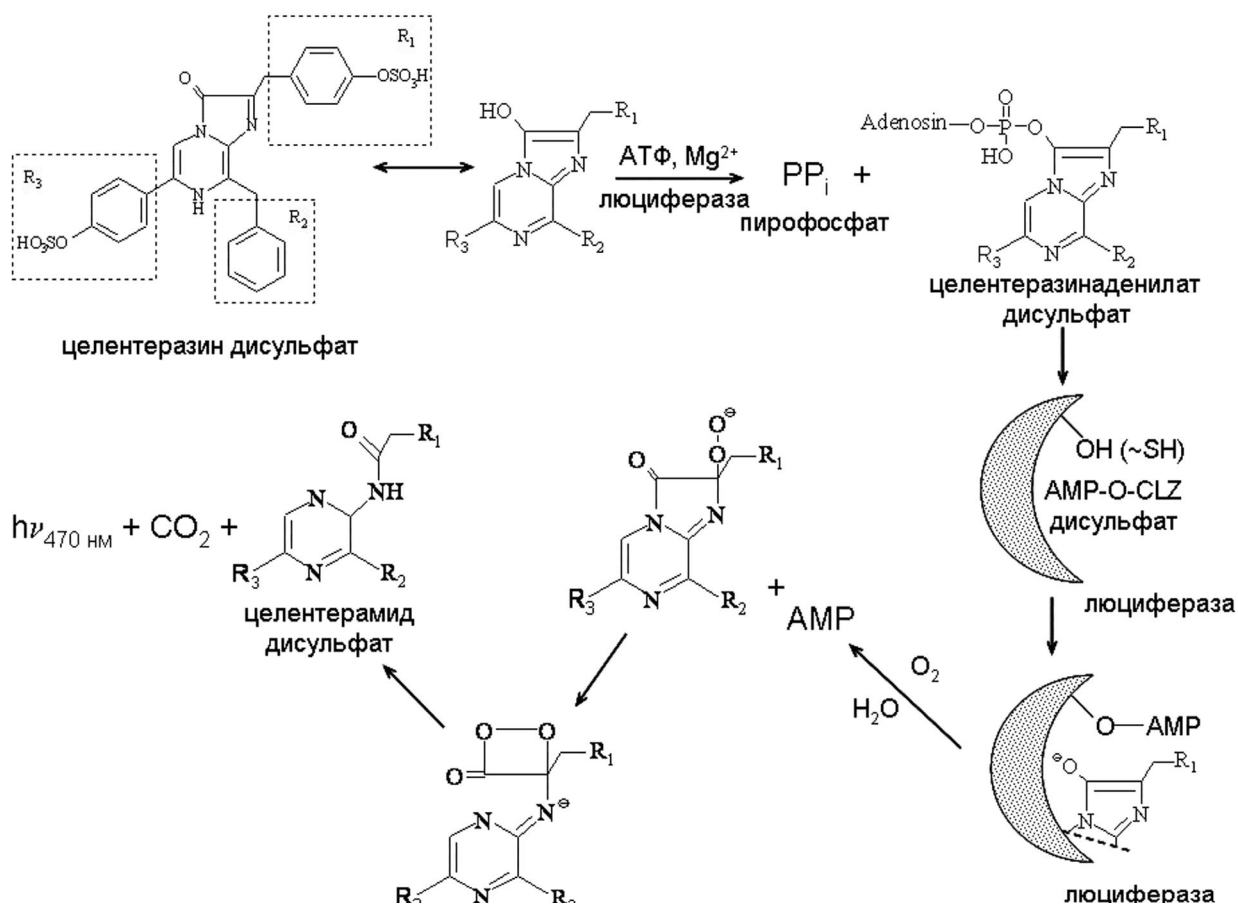


Рисунок 1.14 – Предложенный механизм билюминесцентной реакции кальмара *Watasenia scintillans* [Tsuji, 2002].

На следующем этапе, еще до присоединения кислорода, происходит отщепление аденозинмонофосфата. Следовательно, целентеразинаденилат дисульфат не участвует в образовании эмиттера, что отличает билюминесцентную реакцию, катализируемую люциферазой *Watasenia*, от таковой у светляков.

Представленный механизм в целом объясняет имеющиеся экспериментальные данные. Однако его нельзя считать окончательным, поскольку функциональная роль аденилирования субстрата еще не полностью выяснена. Считается маловероятным, что это требуется только для правильного позиционирования субстрата в активном центре фермента, потому что эту функцию обычно выполняет белок [Tsuji, 2002; Tsuji, 2005].

Механизм биолюминесцентной реакции мембрансвязанного фотопротейна симплектина из кальмара *Symplectoteuthis oualaniensis* представлен на рисунке 1.15 [Tsuji, Leisman, 1981; Isobe et al., 1998]. В отличие от  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых фотопротейнов кишечнорастворимых, симплектин в качестве субстрата использует дегидроцелентеразин.

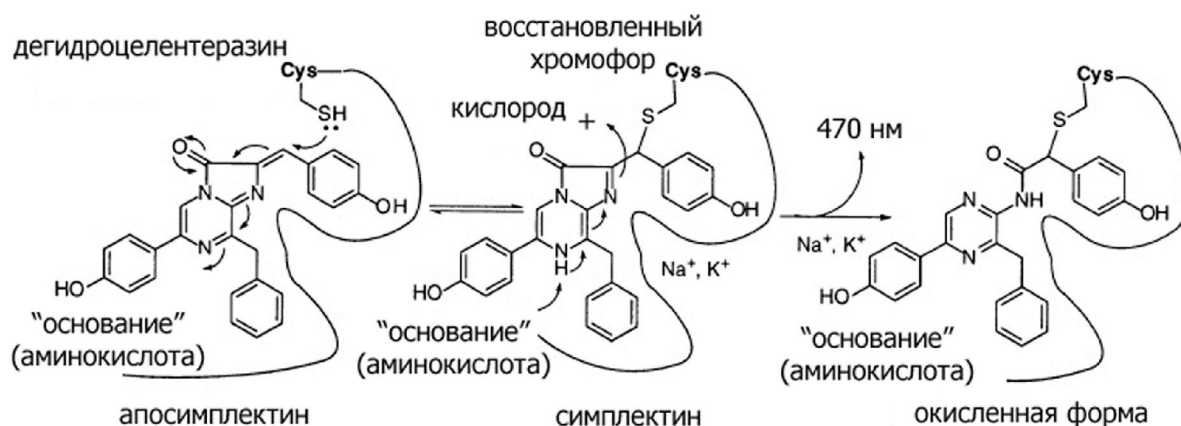


Рисунок 1.15 – Предложенный механизм биолюминесцентной реакции кальмара *Symplectoteuthis oualaniensis* [Tsuji, Leisman, 1981].

На первом этапе дегидроцелентеразин взаимодействует с SH-группой цистеина апобелка, в процессе чего образуется активный фотопротейн. Далее взаимодействие кислорода с С2-атомом целентеразина приводит к формированию пероксид-аниона и, следовательно, продукту реакции, целентерамиду, в возбужденном состоянии. Целентерамид, оставаясь связанным с белком, является эмиттером данной биолюминесцентной реакции, одной из важных особенностей которой является ее зависимость от одновалентных катионов  $\text{K}^+$  и  $\text{Na}^+$ . На данный момент это единственный пример среди всех изученных биолюминесцентных систем [Tsuji, Leisman, 1981; Isobe et al., 1998].

Механизм биолюминесцентной реакции кальмара *Symplectoteuthis*, аналогично рассмотренному ранее биолюминесцентному механизму кальмара *Watasenia*, нуждается в дополнительных исследованиях, поскольку

недостаточно понятна роль в каталитической реакции одновалентных катионов  $K^+$  и  $Na^+$ , отдельных аминокислотных остатков активного центра, да и самой белковой молекулы.

Среди целентеразин-зависимых биолюминесцентных белков, помимо  $Ca^{2+}$ -регулируемых фотопротеинов, также достаточно охарактеризована люцифераза из морского светящегося мягкого коралла *Renilla* [Matthews et al., 1977]. Биолюминесценция *Renilla* контролируется нервной системой и инициируется в результате увеличения концентрации внутриклеточного кальция [Hastings, Morin, 1969] в ответ на механическую стимуляцию. В биолюминесцентную реакцию *Renilla in vivo* вовлечено как минимум три белка:  $Ca^{2+}$ -регулируемый целентеразин-связывающий белок (СВР), люцифераза и зеленый флуоресцентный белок (GFP). В конце 1970-х годов все три белка были выделены, очищены и охарактеризованы [Matthews et al., 1977; Ward, Cormier, 1976; Charbonneau, Cormier, 1979].

Люцифераза *Renilla reniformis* – это односубъединичный белок (~36 кДа), состоящий из 311 аминокислотных остатков с большим содержанием ароматических и гидрофобных аминокислот [Lorenz et al., 1991]. Люцифераза катализирует окислительное декарбоксилирование целентеразина с образованием комплекса люцифераза-целентерамид в возбужденном состоянии, переход которого в основное состояние сопровождается излучением света в голубой области спектра ( $\lambda_{max} = 480$  нм) [Hori et al., 1973; Charbonneau et al., 1979]. Биолюминесценция полипа *in vivo* в зеленой области спектра ( $\lambda_{max} = 509$  нм) объясняется резонансным переносом энергии от биолюминесцентного донора (люциферазы) к флуоресцентному акцептору (GFP) в результате образования белок-белкового комплекса между люциферазой и GFP [Ward et al., 1976]. СВР является односубъединичным белком, состоящим из 184 аминокислотных остатков, принадлежит к семейству  $Ca^{2+}$ -связывающих белков «EF-hand» типа и, подобно  $Ca^{2+}$ -регулируемым фотопротеинам, содержит три  $Ca^{2+}$ -

связывающих петли (I, III, IV) [Kumar et al., 1990]. И хотя СВР, как и  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемые фотопротейны, связывает целентеразин, аминокислотные последовательности этих белков показывают очень низкую гомологию (22%), которая, главным образом, обусловлена консервативными аминокислотными последовательностями  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих петель. СВР содержит одну молекулу прочносвязанного целентеразина, которая становится доступной для реакции с люциферазой и  $\text{O}_2$  только после связывания  $\text{Ca}^{2+}$  с СВР [Charbonneau et al., 1979].

Несмотря на то, что для люциферазы *R. reniformis* была определена кристаллическая структура [Loening et al., 2007], это не позволило однозначно локализовать активный центр фермента, поскольку структура была без субстрата или продукта реакции. По этой причине оказалось затруднительным применение сайт-направленного мутагенеза для определения функции отдельных аминокислотных остатков в каталитическом окислении целентеразина и в формировании эмиттера.

Таким образом, анализ литературных данных показывает, что на настоящий момент известно достаточно много совершенно не похожих друг на друга биолюминесцентных систем, использующих целентеразин в качестве субстрата. При этом механизмы его окисления в большинстве систем слабо изучены. Исключение составляют лишь  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемые фотопротейны кишечнорастворимых животных, в исследовании которых в последнее время удалось достичь больших успехов, сделавших возможным использование фотопротейнов при разработке новых биолюминесцентных технологий для биологии, медицины, фармацевтической промышленности. Но несмотря на это, детальное выяснение механизма биолюминесцентной реакции  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых фотопротейнов на молекулярном уровне, а именно установление конкретной роли аминокислот активного центра белка, является первоочередной задачей, поскольку это сделает возможным 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.

Поэтому целью данной работы является выяснение функциональной роли отдельных аминокислот активного центра  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых фотопротеинов кишечнорастворимых животных в процессе биолюминесценции.

## ГЛАВА 2 Материалы и методы

### 2.1 Клонирование, олигонуклеотид-направленный мутагенез

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 (Stratagene, США) в соответствии с протоколом на экспрессионной плазмиде pET19-OL8, содержащей ген апо-обелина дикого типа из *O. longissima*. Олигонуклеотидные праймеры были сконструированы так, чтобы получить мутантные варианты обелина с единичными заменами Tyr183 на фенилаланин и Phe88 на тирозин. Наличие мутаций было подтверждено секвенированием ДНК. Препаративное выделение плазмидной ДНК проводили щелочным методом с использованием E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit (Omega Bio-Tek, США).

### 2.2 Выделение и очистка мутантов фотопротеина обелина Y138F и F88Y

Трансформированные клетки *E. coli* (штамм RIL (DE3)) культивировали в LB-среде, содержащей ампициллин (250 мг/мл) при 37°C. Синтез белка индуцировали добавлением в среду ИПТГ в конечной концентрации 1 мМ при достижении клетками оптической плотности OD<sub>600</sub> 0,6 – 0,8. После индукции клетки выращивали еще в течение 3 часов при интенсивном перемешивании. Выделение и очистку обелина и его мутантных форм проводили по схеме, описанной в работах [Illarionov et al., 2000; Vysotski et al., 2001] с небольшими модификациями. Клеточный осадок ресуспендировали в пятикратном объеме 20 мМ Трис-HCl, pH 7,0 и

разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора UD-20 (Techpan, Польша) шестикратной обработкой в течение 25 секунд с интервалами по 40 секунд на льду. Затем образец центрифугировали (14000 об/мин, 10 мин), осадок промывали, последовательно ресуспендируя в 20 mM Трис-HCl pH 7,0 с 0,9% NaCl, а затем с 0,1% Тритон X-100 (трижды). Полученные тельца включений растворяли в растворе 6 M мочевины в 20 mM Трис-HCl (1:10; w/v) при 4°C в течение ночи. Затем образец центрифугировали 5 минут при 8000 об/мин, осадок отбрасывали, а супернатант использовали для хроматографической очистки.

Белок, экстрагированный из телец включений мочевиной, чистили методом ионообменной хроматографии на колонке с DEAE-Sepharose Fast Flow (Amersham-Biosciences, США) с помощью системы Bio-Rad (США). Элюцию белков с колонки проводили градиентом концентрации ацетата натрия (0 – 1 M) в буфере 20 mM Трис-HCl pH 7,0, содержащем 6 M мочевины, при скорости 2 мл/мин. Рефолдинг белка проводили разведением в буфере, содержащем 5 mM ДТТ и избыток целентеразина (JNC Corporation, Япония), с последующей инкубацией в течение ночи при 4°C. Затем образец «заряженного» фотопротеина дочищали с помощью ионообменной хроматографии на колонке Mono Q и гель-фильтрацией на колонке Superdex 75 (GE Healthcare, Великобритания), уравновешенной 2 mM ЭДТА, 150 mM NaCl, 20 mM Трис-HCl pH 7,0. В результате были получены мутанты обелина Y138F и F88Y высокой степени чистоты. Для кристаллизации мутанты обелина Y138F и F88Y были сконцентрированы до 18 мг/мл и 16 мг/мл, соответственно, с помощью центрифужных концентраторов (Millipore, США). Выход «заряженного» целентеразином белка обычно составлял 25 – 30 мг с 1 г сырой биомассы клеток.

### 2.3 Получение $\text{Ca}^{2+}$ -разряженных мутантов обелина Y138F и F88Y со связанным целентерамидом

$\text{Ca}^{2+}$ -разряженные образцы мутантов обелина со связанным целентерамидом для кристаллизации получали добавлением кальция ацетата в 10 мМ Бис-Трис буфере (pH 6,5) в раствор белка (0,5 – 1,0 мг/мл) в том же буфере до финальной концентрации 4 мМ. При возбуждении ближним UV-светом растворы  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженных мутантов обелина проявляли зеленую флуоресценцию. Это однозначно показывает, что целентерамид остается связанным с белком. Для кристаллизации белки были сконцентрированы до 12 мг/мл для обелина Y138F и 10 мг/мл для обелина F88Y с помощью центрифужных концентраторов (Millipore, США).

### 2.4 Получение анаэробного апо-обелин–целентеразинового комплекса

Для удаления молекулярного кислорода образцы и растворы для эксперимента подвергались 10 – 15 циклам вакуумного дегазирования с использованием азота в качестве газового заместителя. Все этапы получения анаэробного апо-обелин–целентеразинового комплекса были проведены внутри специальной анаэробной камеры Forma Anaerobic Station (Thermo Fisher, США).

На первом этапе дегазированные растворы помещались в анаэробную камеру и исследовались на наличие кислорода. Переход апо-обелина в активный фотопроtein является индикатором кислорода, так как кислород используется в биолюминесцентной реакции. Аликвоты (15 мкл) дегазированных растворов внутри рабочей камеры (буфер для ионообменной хроматографии – 20 мМ Трис-HCl pH 7,0, 2 мМ ЭДТА; буфер для элюции белка с хроматографической колонки – 20 мМ Трис-HCl pH 7,0, 2 мМ ЭДТА, 300 мМ NaCl; буфер для промывки колонки – 20 мМ Трис-HCl pH 7,0, 2 мМ ЭДТА, 1 М NaCl) были смешаны с концентрированным апо-обелином (5 мкл) и 5 мкл активационного буфера (20 мМ Трис-HCl pH 7,0, 2 мМ ЭДТА, 5 мМ



ДТТ с избытком целентеразина). Через 15 минут инкубации растворов к ним добавлялось 2 мкл раствора кальция (100 мМ Трис-НСl pH 7,0, 100 мМ CaCl<sub>2</sub>). Отсутствие видимой биолюминесцентной реакции говорило о достаточной дегазированнойности образцов.

На втором этапе получения апо-обелин–целентеразинового комплекса дегазированный апо-обелин в 6 М мочеvine объемом ~2 мл и концентрацией 2 мг/мл был разведен в активационном растворе, содержащем целентеразин (с молярным избытком к белку в соотношении 1:1,1), и оставлен инкубироваться в анаэробной камере в течение ночи.

Для очистки образца от несвязанного целентеразина была проведена ионообменная хроматография на колонке Q Sepharose Fast Flow (Amersham-Biosciences, США), уравновешенной буфером для хроматографии. Образец смывали буфером для элюции. Фракции желтого цвета собирались и концентрировались с помощью центрифужных концентраторов.

Для измерения спектров поглощения полученного чистого апо-обелин–целентеразинового комплекса образец помещали в специальную кювету с герметично запечатываемой крышкой (#117.104-QS; Hellma Analytics, Германия) и плотно запечатывали во избежание проникновения кислорода в образец.

На финальном этапе образец в запечатанной кювете был извлечен из анаэробной камеры.

## 2.5 Определение удельной биолюминесцентной активности, концентрации белка и измерение спектров биолюминесценции

Концентрацию белка определяли спектрофотометрически, используя реагент DC protein assay (Bio-Rad, США) и бычий сывороточный альбумин как стандарт, а также коэффициенты экстинкции для апофотопротеинов, рассчитанные из аминокислотных последовательностей белков с помощью

программы ProtParam tool (<http://us.expasy.org/tools/protparam-doc.html>), использующей при расчете метод Эделхоха [Edelhoch, 1967].

Спектры поглощения белков определяли с помощью спектрофотометра UVIKON 943 (Kontron Instruments, Италия).

Относительную удельную биолюминесцентную активность (относительно фотопротеинов дикого типа) мутантов обелина определяли с помощью планшетного люминометра Luminoskan Ascent (Thermo Electron, Финляндия). Для этого в лунки непрозрачного планшета вносили по 50 мкл раствора фотопротеина в 20 мМ Трис-НСI буфере рН 7,0, содержащем 5 мМ ЭДТА и 0,2 М NaCl. Реакцию инициировали впрыскиванием в каждую лунку планшета 50 мкл 100 мМ Трис-НСI буфера рН 8,8, содержащего 100 мМ CaCl<sub>2</sub>. Приведенные значения представляют собой среднее 3-х независимых измерений.

Спектры биолюминесценции и флуоресценции были измерены на флуоресцентном спектрофотометре Varian Cary Eclipse (Varian Medical Systems, США) и скорректированы на чувствительность ФЭУ к различным длинам волн с помощью программного обеспечения прибора. Спектры биолюминесценции фотопротеинов измеряли в растворах, содержащих 1 мМ ЭДТА, 50 мМ Бис-Трис пропан рН 7,0. В том же буфере инициировали биолюминесценцию, используя CaCl<sub>2</sub>. Спектры флуоресценции были записаны для Ca<sup>2+</sup>-разряженных мутантов фотопротеинов при 10-кратном разбавлении концентрированных белковых растворов в 50 мМ Бис-Трис пропан буфере (рН 7,0), содержащем 1 мМ CaCl<sub>2</sub>.

Все спектральные измерения выполнены при комнатной температуре.

## 2.6 Измерение спектра поглощения апо-обелин–целентеразинового комплекса

Спектры поглощения апо-обелин–целентеразинового комплекса в отсутствие и при наличии кислорода измеряли на двухлучевом

спектрофотометре U-2010 (Hitachi, Япония) против чистого буфера для элюции белка (20 mM Трис-НСl pH 7,0, 2 mM ЭДТА, 300 mM NaCl).

Спектры поглощения анаэробных образцов целентеразина с различными pH (2 mM ЭДТА, 300 mM NaCl, 20 mM Трис-НСl pH 7,0; 2 mM ЭДТА, 300 mM NaCl, 20 mM Трис-НСl pH 10,0; 2 mM ЭДТА, 300 mM NaCl, 50 mM Бис-Трис-НСl pH 6,5) были промерены против соответствующих буферов. pH всех исследуемых растворов был проверен перед добавлением целентеразина. Объемная доля этанола в исследуемых образцах не превышала 1 %.

Спектры поглощения апо-обелин–целентеразинового комплекса и целентеразина, характеризующие процесс насыщения образца кислородом, были получены путем измерения поглощения образца в открытой доступу кислорода кювете против аналогичного образца в закрытой кювете. Измерения проводились каждые 5 минут в течение первых 30 минут, затем каждые 15 минут в течение 7 часов. Измерения проводились при комнатной температуре.

## 2.7 Кинетические измерения методом остановленной струи (stopped-flow)

Измерение кинетики биолюминесценции обелина дикого типа и его мутантов Y138F и F88Y с помощью метода остановленной струи проводили на приборе Applied Photophysics SX20 (Великобритания) с объемом камеры 20 мкл и мертвым временем 1,1 миллисекунды. Температурный контроль осуществлялся циркулированием воды через водную баню. Измерения проводились при 20°C. Шприцы для впрыскивания растворов содержали образец белка в 1 mM ЭДТА, 20 mM Трис-НСl pH 7,2 и 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM Трис-НСl pH 7,2. Растворы смешивались в камере за одинаковое время. Константы кинетик подъема и спада биолюминесцентных реакций были

рассчитаны с помощью программы Sigma Plot 2012. Приведенные значения представляют собой среднее 3-х независимых измерений.

## 2.8 Кристаллография

Первоначальный поиск условий кристаллизации белков выполняли с использованием 672 коммерческих растворов при помощи робота Mosquito (TTP Labtech, Великобритания) и 96-луночного планшета Greiner CrystalQuick (Германия) методом сидячей капли: 0,3 мкл раствора белка смешивали с 0,3 мкл раствора для кристаллизации. После этого планшеты запаивали герметичной пленкой и хранили при 4° и 16°C.

Кристалл вынимали из лунки при помощи волокняной петли, удаляя избыток жидкости прикосновением к покровному стеклу. После этого кристалл быстро замораживали в жидком азоте.

Дифракционные данные для мутантов обелина Y138F и F88Y со связанным 2-гидропероксицелентеразином, а также Ca<sup>2+</sup>-разряженных мутантов со связанными ионами кальция и целентерамидом были получены при облучении кристаллов длиной волны 0,9789 Å с использованием рентгеновского излучения синхротрона (BL17U1, Shanghai Synchrotron Radiation Facility, Китай).

Рентгеновскую дифракцию кристалла записывали с помощью Quantum 315r CCD камеры (расстояние от кристалла до камеры 200-250 мм, время экспозиции 1 секунда, вращение кристалла 360° с шагом 1°).

## 2.9 Программное обеспечение

Дифракционные данные обрабатывали с помощью программы HKL2000. Фазы были рассчитаны программой PHASER по методу молекулярных замещений с использованием структур обелина и Ca<sup>2+</sup>-разряженного обелина из *O. longissima* (идентификационные номера в PDB банке 1QV0 и 2F8P, соответственно) в качестве модельных. Модели

белков были автоматически построены с помощью программы PHENIX. Расчет параметров модели и ее усовершенствование выполняли при помощи программ REFMAC5 (CCP4i) и COOT.

Для визуализации белковых молекул использовали 3D графическую программу RYMOL (0,99).

Для построения графиков использовались пакеты Microsoft Excel 2007 и Sigma Plot 2012.

Расчет углов между  $\alpha$ -спиралями выполнен с использованием программы Interhlx (<http://nmr.uhnres.utoronto.ca/ikura/interhlx/>).

## 2.10 Реактивы

В работе были использованы следующие реактивы: ампициллин (Sigma Aldrich, США), триптон (Sigma Chemical Co, США), дрожжевой экстракт (Becton Dickinson, США), LB среда (Fisher Scientific, UK), изопропил- $\beta$ -D-тиогалактопиранозид (СибЭнзим, Новосибирск, Россия), Трис (Fluka, Швейцария), Бис-Трис (Sigma Chemical Co, США), мочевины (USB Corp), додецилсульфат натрия, ЭДТА-натриевая соль, дитиотреитол (Aldrich Chemical Co., США), синтетический целентеразин (JNC Corporation, Япония), бычий сывороточный альбумин (Pierce, США), кальций хлорид (JT Backer, США), кальций ацетат (EMD Chemicals, США), растворы для кристаллизации (Hampton Research, США; Emerald BioSystems, США).

Все остальные использованные реактивы относились к категории ХЧ или ЧДА.

## ГЛАВА 3 Пространственные структуры обелина Y138F и Ca<sup>2+</sup>-разряженного обелина Y138F. Каталитическая функция молекулы воды и роль Tug138 в биолюминесцентной реакции

3.1 Пространственные кристаллические структуры обелина Y138F со связанным 2-гидропероксицелентеразином и Ca<sup>2+</sup>-разряженного обелина Y138F со связанными целентерамидом и ионами Ca<sup>2+</sup>

### 3.1.1 Кристаллизация

Для кристаллизации обелина Y138F после хроматографической очистки был переведен в буфер, содержащий 2 mM ЭДТА, 10 mM Бис-Трис pH 6,5, и сконцентрирован до концентрации 18 мг/мл.

Для приготовления Ca<sup>2+</sup>-разряженного обелина Y138F образец заряженного белка при температуре 4°C был разведен раствором, содержащем 4 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Бис-Трис pH 6,5, до финальной концентрации примерно 1 мг/мл. Во время данной процедуры наблюдалось биолюминесцентное свечение светло-зеленого цвета. После окончания биолюминесцентного свечения белковый раствор сменил желтую окраску на бесцветную, что говорит о превращении целентеразина в целентерамид. Для проверки присутствия связанного с белком целентерамида в растворе был измерен флуоресцентный спектр образца. Затем образец Ca<sup>2+</sup>-разряженного обелина Y138F был сконцентрирован для постановки кристаллизации до 12 мг/мл.

Кристаллы обелина Y138F были выращены в течение 5 дней после постановки кристаллизации при 4°C в 2,1 M яблочной кислоте. Кристаллы имели желтый окрас и палочковидную форму (рис. 3.1А).

Большой бесцветный кристалл Ca<sup>2+</sup>-разряженного обелина Y138F выращивали в течение 7 дней при следующих условиях: 0,2 M нитрат аммония, 20% PEG 3350, при 16°C (рис. 3.1Б).

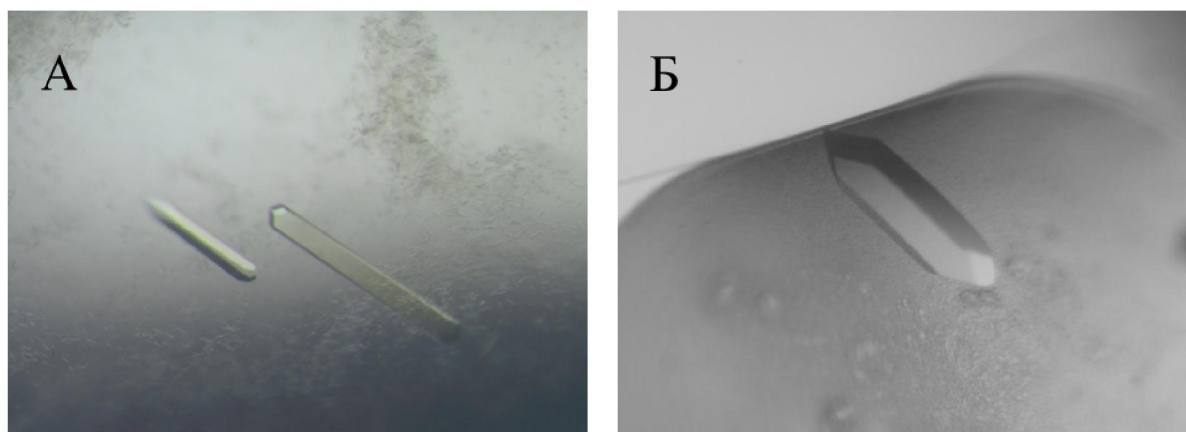


Рисунок 3.1 – А – кристаллы обелина Y138F со связанным 2-гидропероксицелентеразином. Б – кристалл  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного обелина Y138F со связанным целентерамидом и ионами  $\text{Ca}^{2+}$ .

При облучении кристалла  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного обелина Y138F ультрафиолетом можно было наблюдать зеленую флуоресценцию, показывающую, что целентерамид прочно связан с белком.

В таблице 3.1 приведена кристаллографическая статистика после обработки дифракционных данных и построения пространственных моделей белков. Пространственные модели для обелина Y138F со связанным 2-гидропероксицелентеразином и  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного обелина Y138F со связанным целентерамидом и ионами  $\text{Ca}^{2+}$  были помещены в базу данных кристаллических структур белков [Berman et al., 2000] с PDB кодами 4MRX и 4MRY, соответственно.

### 3.1.2 Общая структура белков

Кристаллические структуры обелина Y138F со связанным 2-гидропероксицелентеразином и  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного обелина Y138F со связанным целентерамидом сохраняют компактную глобулярную пространственную организацию (рис. 3.2), характерную для всех лиганд-

Таблица 3.1

Кристаллографическая статистика для обелина Y138F со связанным 2-гидропероксицелентеразином и Ca<sup>2+</sup>-разряженного обелина Y138F со связанным целентерамидом

Название белка	Обелин Y138F	Ca <sup>2+</sup> -разряженный обелин Y138F
<b>Обработка данных</b>		
предел разрешения, Å	50,00-1,72 (1,78-1,72)	50,00-1,30 (1,32-1,30)
длина волны, Å	0,9789	0,9789
пространственная группа	P41	P212121
размеры элементарной ячейки, Å	a=73,49 b=73,49 c=53,74	a=43,61 b=57,11 c=68,26
углы элементарной ячейки, °	$\alpha = 90,0$ $\beta = 90,0$ $\gamma = 90,0$	$\alpha = 90,0$ $\beta = 90,0$ $\gamma = 90,0$
уникальные отражения (свободные)	30654 (3020)	40375 (1295)
завершенность (%)	100 (100)	94,4 (61,0)
I/ $\sigma$ (I)	30,38 (4,10)	53,05 (5,12)
$R_{\text{merge}}$ (%)	6,8 (45,1)	4,4 (20,9)
сокращение	7,3 (7,4)	5,9 (2,6)
<b>Усовершенствование модели</b>		
предел разрешения, Å	50,00–1,72	34,663–1,299
использованные отражения (несвязанные)	30630 (1998)	40315 (2000)
$R_{\text{work}}$ ( $R_{\text{free}}$ )	14,0% (16,92%)	17,4% (19,31%)
атомы белка	1601	1623
атомы растворителя	299	309
атомы лигандов	34	34
средний B-фактор, Å <sup>2</sup>	21,28	10,24
RMSD длины связей, Å	0,018	0,007
RMSD углов связей, °	1,735	1,139



зависимых конформационных состояний  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых фотопротеинов [Head et al., 2000; Liu et al., 2000; Liu et al., 2006; Titushin et al., 2010]. Кроме того, обе описываемые структуры очень похожи на пространственные структуры дикого обелина в тех же конформационных состояниях (рис. 3.2). Среднеквадратичное отклонение (RMSD) атомов основной цепи обелина Y138F и дикого обелина (рис. 3.2; табл. 3.2) составляет всего 0,3 Å. Для структур  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженных конформационных состояний обелина Y138F и дикого обелина RMSD атомов основной цепи составляет 1,52 Å (рис. 3.2; табл. 3.2), при этом С-концевой домен имеет более значительные конформационные различия, чем N-концевой домен.

RMSD атомов основной цепи обелина Y138F и  $\text{Ca}^{2+}$ -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 [Liu et al., 2006]. Несмотря на это, в пространственных структурах дикого обелина и его мутанта Y138F происходят практически одинаковые изменения в ответ на связывание  $\text{Ca}^{2+}$ , например, конформационная трансформация С-концевого домена гораздо выше, чем N-концевого домена.

В  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых фотопротеинах С-концевая петля закрывает внутреннюю субстрат-связывающую полость, обеспечивая для субстрата неполярное и недоступное растворителю окружение. Это условие, по всей вероятности, способствует эффективному образованию возбужденного электронного состояния целентерамида и излучению с высоким квантовым выходом [Head et al., 2000; Liu et al., 2000; Liu et al., 2003; Titushin et al., 2010].

## Сравнение конформационных состояний обелина Y138F и дикого обелина

Структурные элементы фотопротеинов	Обелин Y138F/ Ca <sup>2+</sup> -разряженный обелин Y138F	Обелин Y138F/ дикий обелин	Ca <sup>2+</sup> -разряженный обелин Y138F/ Ca <sup>2+</sup> -разряженный дикий обелин
	среднеквадратичное отклонение (RMSD) основной/боковой цепи (Å)		
Общая структура	2,46/3,26	0,30/1,08	1,52/2,62
N-концевой домен	1,44/2,04	0,30/1,20	0,54/1,70
C-концевой домен	2,62/3,80	0,24/0,89	1,91/3,20
Ca <sup>2+</sup> -связывающая петля I	1,74/2,20	0,23/0,76	0,36/1,24
Ca <sup>2+</sup> -связывающая петля II	0,67/1,68	0,22/1,17	0,40/1,54
Ca <sup>2+</sup> -связывающая петля III	1,80/3,19	0,19/0,54	1,40/3,48
Ca <sup>2+</sup> -связывающая петля IV	1,94/3,72	0,20/1,02	0,57/1,74

Схожая картина наблюдается и в случае мутанта обелина Y138F. Исходя из анализа пространственных структур, недоступность продукта биолюминесцентной реакции растворителю обеспечивается за счет формирования водородных связей между аминокислотными остатками, расположенными в  $\alpha$ -спиралях A и H (рис. 3.2), а также в C-концевой петле. Атомы N $\epsilon_2$  His22 и His24, находящиеся в  $\alpha$ -спирали A, формируют водородные связи с атомами кислорода карбонильных групп Trp179 ( $\alpha$ -спираль H) и Gly193 (C-концевая петля), а атомы N $\eta_1$  и N $\eta_2$  Arg21, также расположенного в  $\alpha$ -спирали A, – с атомами кислорода карбонильной группы Phe178 ( $\alpha$ -спираль H), O $\delta_1$  Asp187 и C-концевого терминирующего Pro195. Ca<sup>2+</sup>-разряженный обелин Y138F сохраняет все описанные водородные связи

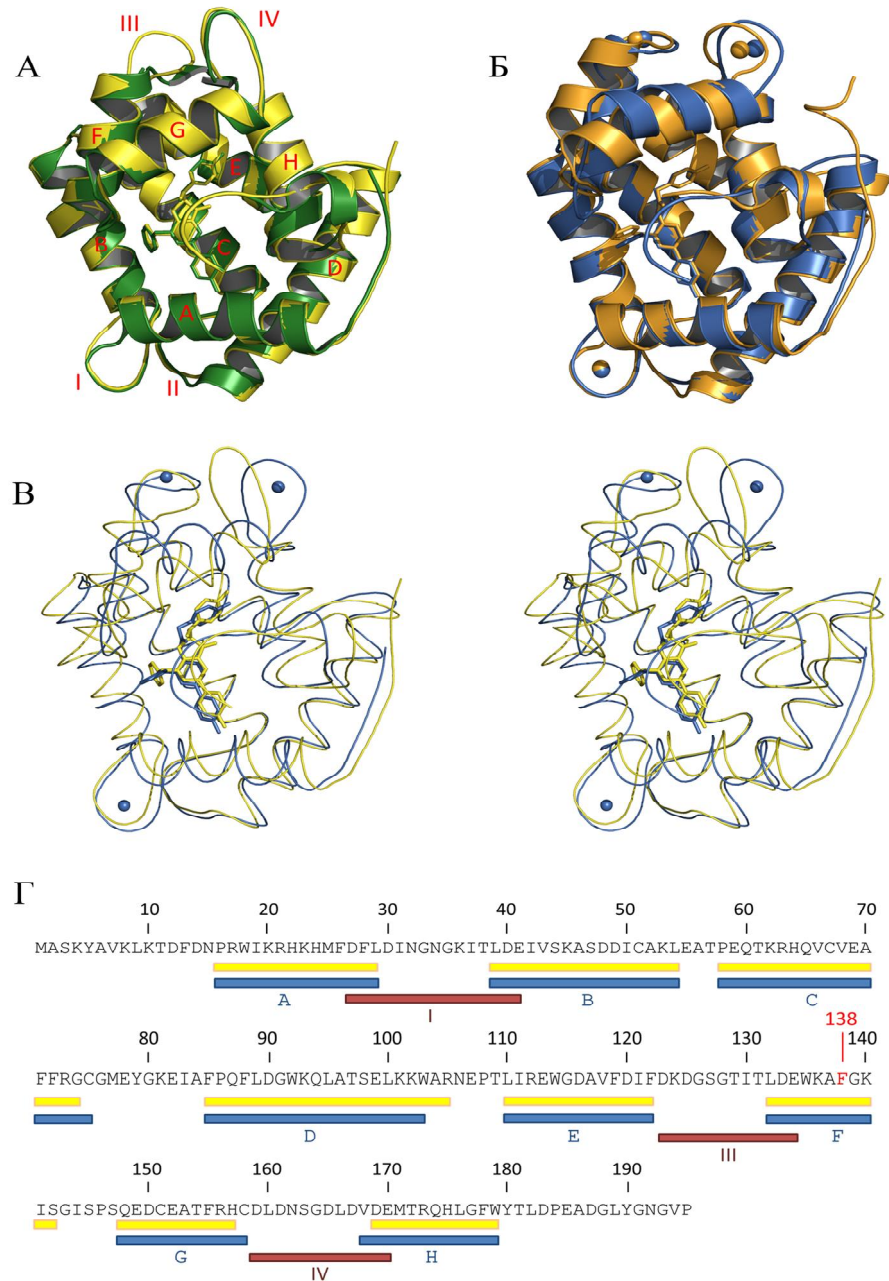


Рисунок 3.2 – А – структурное сравнение обелина Y138F (желтый) и дикого обелина (зеленый). 2-гидропероксицелентеразин показан в центре белковой глобулы;  $\alpha$ -спирали обозначены латинскими буквами А-Н; Ca<sup>2+</sup>-связывающие петли обозначены цифрами I-IV. Б – структурное сравнение Ca<sup>2+</sup>-разряженного обелина Y138F (синий) и Ca<sup>2+</sup>-разряженного дикого обелина (золотой). Целентерамид показан в центре белковой глобулы, Ca<sup>2+</sup> – в виде сфер. В – стереоизображение структурного сравнения обелина Y138F (желтый) и Ca<sup>2+</sup>-разряженного обелина Y138F (синий). Г – аминокислотная последовательность обелина из *O. longissima*. Место мутационной замены выделено красным.  $\alpha$ -спирали показаны желтыми и синими прямоугольниками, в соответствии со структурами обелина Y138F и Ca<sup>2+</sup>-разряженного обелина Y138F. Ca<sup>2+</sup>-связывающие петли показаны красными прямоугольниками.

и, кроме того, образует одну новую между  $N\eta_2$  атомом Arg17 ( $\alpha$ -спираль A) и  $O\delta_1$  кислородом Asp187. Описанные системы водородных связей практически идентичны у обелина Y138F и обелина дикого типа [Liu et al., 2000; Liu et al., 2003; Liu et al., 2006].

### 3.1.3 «EF-hand» $Ca^{2+}$ -связывающие петли

Строение  $Ca^{2+}$ -связывающих петель обелина Y138F и все изменения, происходящие с ними в процессе биолюминесцентной реакции, практически полностью повторяют данные, описанные для обелина дикого типа [Liu et al., 2006]. В структуре  $Ca^{2+}$ -разряженного обелина Y138F ионы кальция найдены в каждом из предполагаемых центров связывания кальция («EF-hand» петли I, III и IV) (рис. 3.2).  $Ca^{2+}$ -связывающая петля II в N-концевом домене белка не участвует в связывании кальция из-за отсутствия в ее составе определенных аминокислотных остатков и поэтому не претерпевает существенных конформационных изменений. Наиболее существенные конформационные изменения после связывания ионов кальция происходят в  $Ca^{2+}$ -связывающей «EF-hand» петле IV (табл. 3.2). Изменение ориентации всех 12 аминокислот, составляющих  $Ca^{2+}$ -связывающую петлю, до оптимальной конформации, делает возможным связывание иона  $Ca^{2+}$ . В структуре  $Ca^{2+}$ -разряженного обелина Y138F ион кальция во всех трех  $Ca^{2+}$ -связывающих петлях координируется по типичной схеме пентагональной бипирамиды. Шестью координационными лигандами выступают атомы кислорода карбоксильной группы боковых цепей Asp и Glu, карбонильные группы основной цепи или боковой цепи Asn, а также гидроксильные группы серина. Седьмым лигандом для связывания кальция является атом кислорода молекулы воды. Длина координационных связей составляет  $\sim 2,4 \text{ \AA}$ .

Данные, полученные при сравнении кристаллических структур описываемых конформационных состояний обелина Y138F с соответствующими им структурами дикого обелина, говорят о том, что

мутационная замена тирозина на фенилаланин в 138 положении не оказывает никакого эффекта на структуру  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих петель и их конформационную реорганизацию, связанную со связыванием  $\text{Ca}^{2+}$ .

### 3.1.4 Субстрат-связывающие полости

Аминокислотные остатки, формирующие субстрат-связывающую полость в обелине Y138F, то есть аминокислоты в пределах 4 Å вокруг 2-гидропероксицелентеразина, относятся ко всем 8  $\alpha$ -спиралям:  $\alpha$ -спираль А (His22, Met25, Phe28, Leu29),  $\alpha$ -спираль В (Lys45 и Ile50),  $\alpha$ -спираль С (Phe72),  $\alpha$ -спираль D (Phe88 и Trp92),  $\alpha$ -спираль E (Ile111, Trp114, Gly115, Phe119),  $\alpha$ -спираль F (Trp135 и Phe138),  $\alpha$ -спираль H (Met171, His175, Trp179). Кроме того, Ile144 из петли между  $\alpha$ -спиралями F и G, а также Tyr190, находящийся на С-конце белка. Набор аминокислотных остатков в субстрат-связывающих полостях обелина Y138F и обелина дикого типа (PDB код 1QV0) практически идентичен. Но все же структура обелина Y138F обладает некоторыми отличиями. В структуре мутанта Ile42, входящий в состав  $\alpha$ -спирали В, из-за небольшого смещения не входит в зону 4 Å вокруг целентеразина. И, конечно же, главным отличием является замена Tyr138 на Phe138.

Системы водородных связей в обелине дикого типа и обелине Y138F, формируемые 2-гидропероксицелентеразином и некоторыми ключевыми аминокислотными остатками активного центра, показаны на рисунке 3.3А. В диком обелине (рис. 3.3А, слева) His22 и Trp92 находятся на расстоянии водородной связи от кислорода 6-(*n*-гидрокси)-фенильной группы, Tyr190 образует водородную связь с пероксидной группой, His175 формирует водородную связь с Tyr190 и С3 карбонильным кислородом, атом N $\epsilon$  Trp179 также находится на расстоянии водородной связи от С3 карбонильного кислорода, в свою очередь, Tyr138 связан с N1-атомом 2-гидропероксицелентеразина.

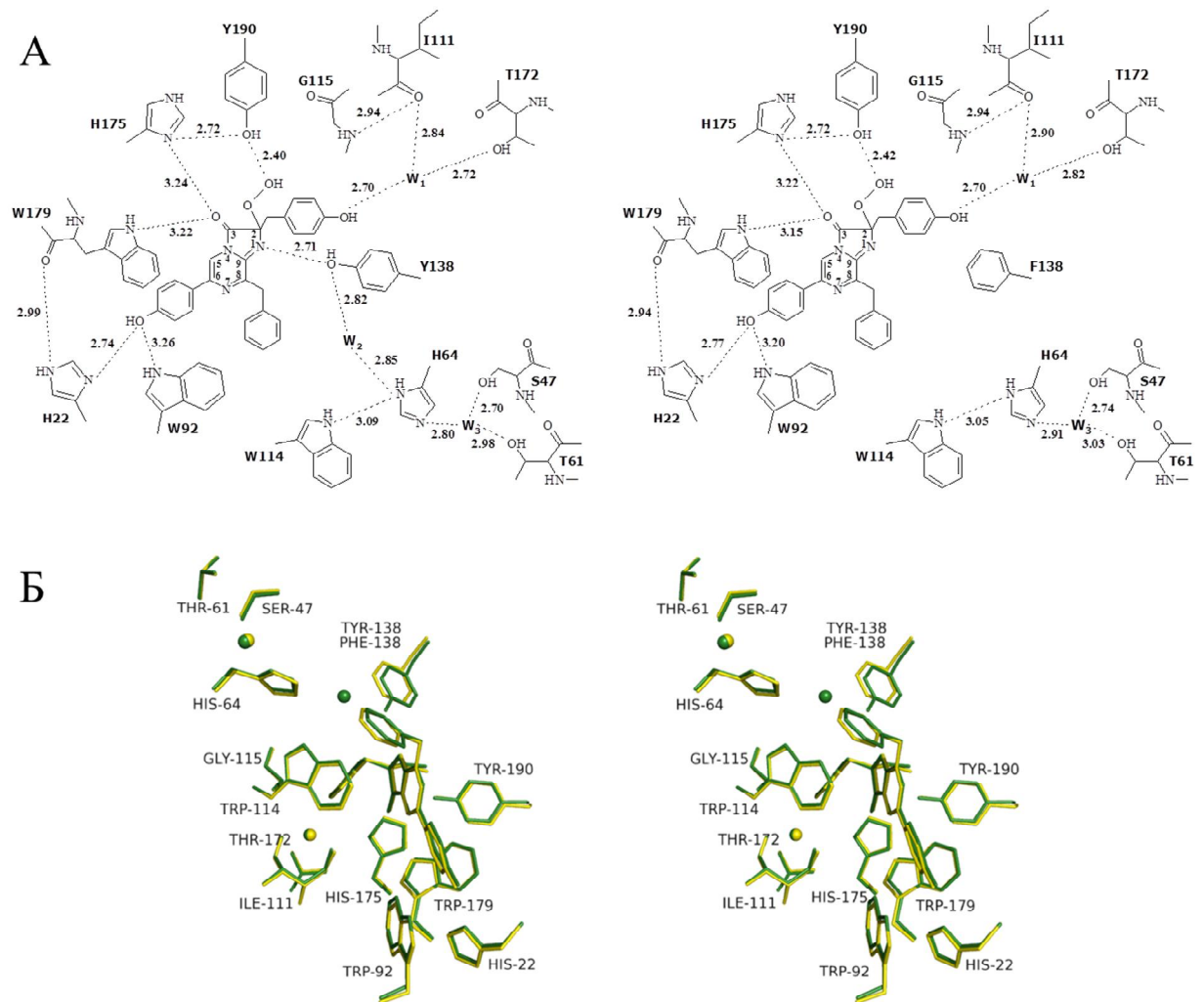


Рисунок 3.3 – А – схематическое изображение 2-гидропероксицелентеразин-связывающих полостей в обелине дикого типа (слева) и обелина Y138F (справа). Б – стереоизображение структурного наложения 2-гидропероксицелентеразина в окружении ключевых аминокислотных остатков активного центра обелина дикого типа (зеленый, PDB код 1QV0) и обелина Y138F (желтый). Молекулы воды показаны в виде сфер соответствующего цвета.

Кроме того, в полости находятся две молекулы воды, W<sub>1</sub> и W<sub>2</sub>, положение которых стабилизировано водородными связями с окружающими аминокислотными остатками и субстратом. Третья молекула воды (W<sub>3</sub>) ориентирована ближе к поверхности белковой молекулы и удерживается водородными связями с His64, Ser47, Thr61 и азотом основной цепи Gln65

(рис. 3.3А, слева). Важно отметить, что обелин Y138F, связанный с 2-гидропероксицелентеразином, имеет аналогичную организацию субстрат-связывающей полости. Более того, все аминокислотные остатки имеют схожее местоположение (рис. 3.3Б). Есть только одно, но очень важное отличие – во внутренней полости обелина Y138F отсутствует молекула воды, обозначенная в  $W_2$  положении у дикого обелина (рис. 3.3).

Аминокислотные остатки, формирующие субстрат-связывающую полость в  $Ca^{2+}$ -разряженном обелине Y138F и находящиеся в непосредственной близости от целентерамида, относятся к  $\alpha$ -спирали А (His22, Met25, Phe28, Leu29),  $\alpha$ -спирали В (Ala46 и Ile50),  $\alpha$ -спирали С (Phe72),  $\alpha$ -спирали D (Phe88 и Trp92),  $\alpha$ -спирали Е (Trp114, Gly115, Val118),  $\alpha$ -спирали F (Phe138) и  $\alpha$ -спирали Н (Met171, His175, Trp179). В формировании полости также принимает участие Ile141, находящийся в петле между  $\alpha$ -спиралями F и G, и Trp190, расположенный на С-конце белка. То есть, фактически все те же аминокислоты, что и в обелине Y138F, связанном с 2-гидропероксицелентеразином, за исключением Lys45, Ile111, Phe119, Trp135, Ile144, которые уходят из полости, и Ala46, Val118, Ile141, которые перемещаются в полость  $Ca^{2+}$ -разряженного белка. Также стоит отметить, что аминокислотный состав целентерамид-связывающих полостей в обелине Y138F и обелине дикого типа практически идентичен, за исключением двух различий. Во внутренней полости  $Ca^{2+}$ -разряженного обелина Y138F были найдены остатки Phe138 и Ile141 вместо Gly143.

Двухмерные изображения систем водородных связей, образованных между целентерамидом и ключевыми аминокислотными остатками внутренних полостей  $Ca^{2+}$ -разряженного дикого обелина и  $Ca^{2+}$ -разряженного обелина Y138F, показаны на рисунке 3.4А.

В  $Ca^{2+}$ -разряженном обелине дикого типа боковые цепи His22 и Trp92, до реакции находившиеся на расстоянии водородной связи от кислорода 6-(*n*-гидрокси)-фенильной группы 2-гидропероксицелентеразина (рис. 3.3А),

располагаются на примерно той же дистанции от кислорода 5-(*n*-гидрокси)-фенильной группы целентерамида. Атом Nε Trp179 формировал водородную связь с кислородом С3-карбонильной группы, но после реакции он соединен с гидроксилом Tyr190 (рис. 3.4А).

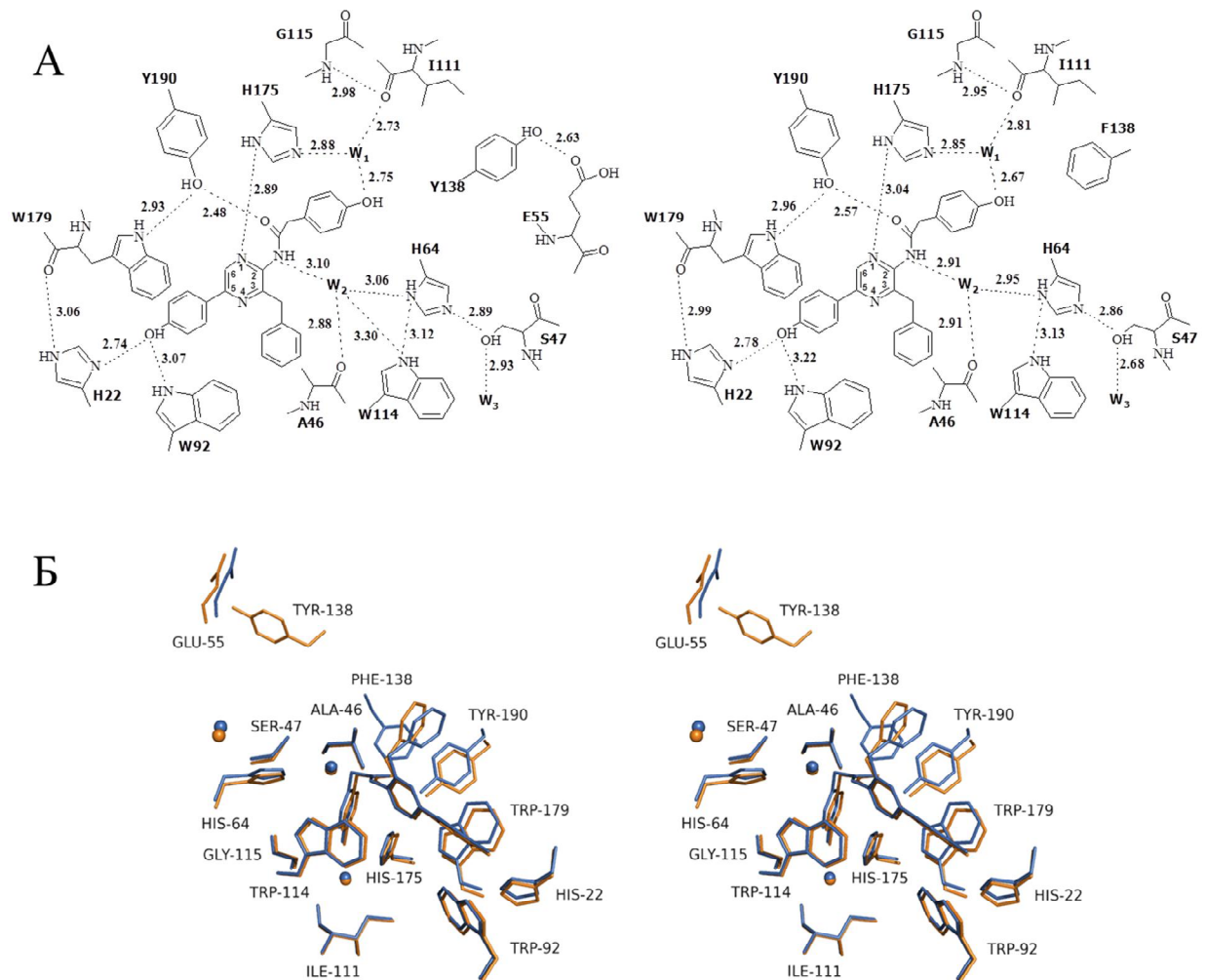


Рисунок 3.4 – Внутренние полости  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженных обелина дикого типа и обелина Y138F. А – схематическое изображение целентерамид-связывающих полостей в  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженных обелине дикого типа (слева) и обелине Y138F (справа). Б – стереоизображение структурного наложения целентерамида в окружении ключевых аминокислотных остатков активного центра обелина дикого типа (золотой, PDB код 2F8P) и обелина Y138F (синий). Молекулы воды показаны в виде сфер соответствующего цвета.



Более того, Tyr190, который ранее стабилизировал пероксидную группу производного целентеразина и был связан с His175, после реакции теряет водородную связь с His175, но образует новую с карбонильным кислородом целентерамида. Остаток His175 также формирует новую водородную связь с N1 атомом целентерамида и молекулой воды  $W_1$ , которая изменяет положение по причине смещения 2-(*n*-гидрокси)-бензильной группы целентерамида. Из-за смены местоположения молекула воды  $W_1$  сохраняет водородную связь только с Ile111. Гидроксильная группа Tyr138, изначально образовавшая водородную связь с N1 атомом субстрата, теперь формирует водородную связь с Glu55 на поверхности белковой молекулы (рис. 3.4А). Очевидно, что Tyr138 замещается молекулой воды  $W_2$ , которая до реакции соединяла Tyr138 с His64 (рис. 3.3А). В результате остаток His64 также немного смещается к целентерамиду и сохраняет водородную связь с  $W_2$ . Кроме того, после реакции  $W_2$  также связана с карбонильным кислородом Ala46. Несмотря на то, что His64 изменил свое местоположение, молекула воды  $W_3$  сохраняет водородную связь с Ser47 и образует новые с атомами кислорода Asp48 и Gln65 (рис. 3.4А, слева). В целентерамид-связывающей полости  $Ca^{2+}$ -разряженного обелина Y138F все аминокислотные остатки находятся практически в тех же положениях (рис. 3.4А, справа). Небольшое отличие наблюдается в системе связей молекулы воды  $W_3$ . В структуре обелина Y138F молекула воды  $W_3$  формирует водородные связи только с Ser47 и Asp48, тогда как в обелине дикого типа есть еще одна связь с Gln65. Также исчезает водородная связь между атомом Nε Trp114 и  $W_2$ .

Наиболее важной находкой в структуре целентерамид-связывающей полости  $Ca^{2+}$ -разряженного обелина Y138F является молекула воды  $W_2$  (рис. 3.4А, справа), которая, как было описано выше, исчезла в структуре обелина Y138F со связанным 2-гидропероксицелентеразином (рис. 3.3А, справа). На рисунке 3.5 показаны поверхности белковых глобул обелина Y138F и обелина дикого типа в двух конформационных состояниях, до и после био-

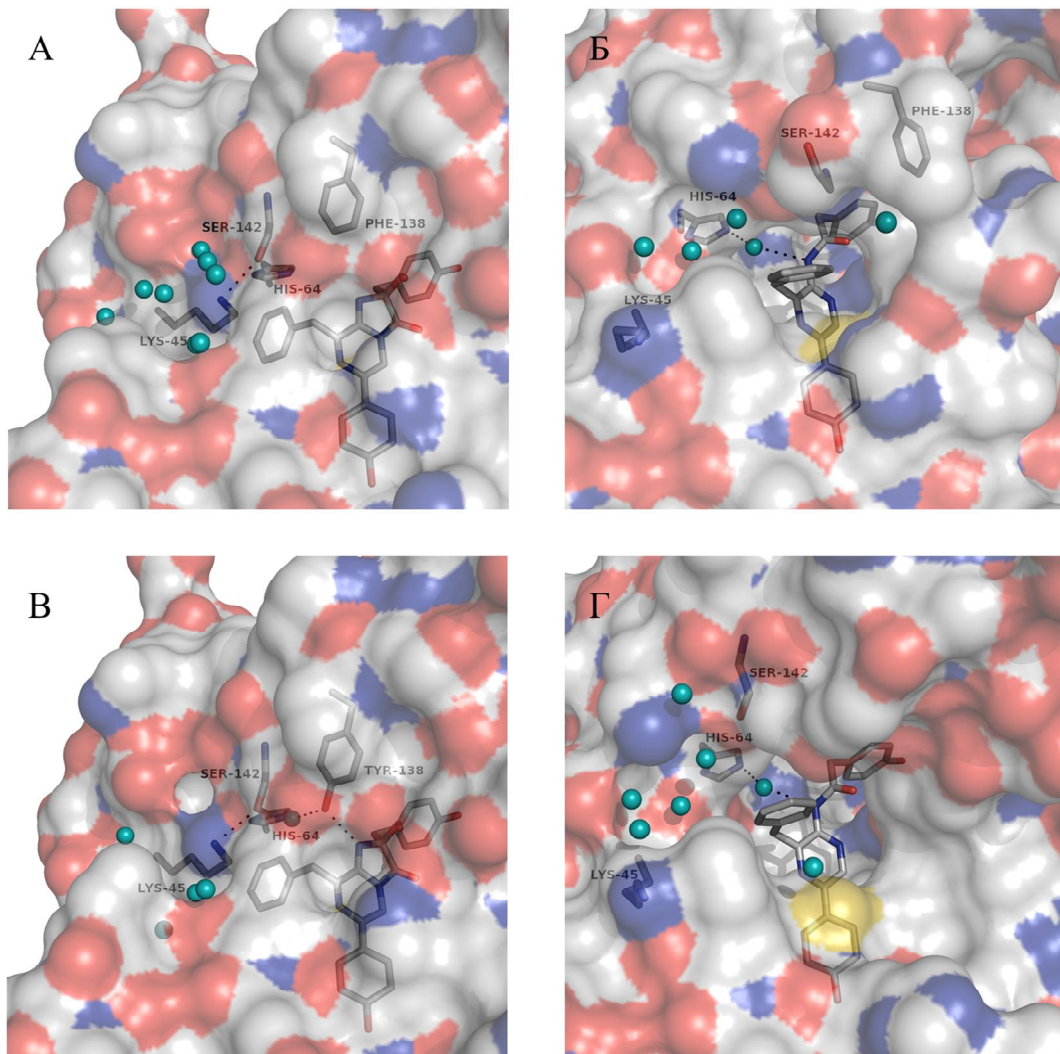


Рисунок 3.5 – Изображение поверхностей белковых глобул обелина Y138F и обелина дикого типа в двух конформационных состояниях. А – обелин Y138F (с 2-гидропероксицелентеразином). Б –  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженный обелин Y138F. В – обелин дикого типа (с 2-гидропероксицелентеразином). Г –  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженный дикий обелин. Доступные растворителю отверстия на поверхности  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного обелина Y138F (Б) и дикого обелина (Г) показаны в центре. 2-гидропероксицелентеразин, целентерамид и аминокислотные остатки показаны в виде серых палочек. Молекулы воды показаны в виде сфер голубого цвета. Все структуры в одинаковой ориентации. Водородные связи показаны в виде прерывистых черных линий. На белковой поверхности атомы углерода обозначены светло-серым цветом, азота – синим, кислорода – красным и серы – желтым.

люминесцентной реакции. Несмотря на то, что связывание ионов  $\text{Ca}^{2+}$  незначительно влияет на пространственную структуру фотопротеинов (табл. 3.2), этих изменений вполне достаточно для образования открытого растворителю отверстия на поверхности белковой глобулы (рис. 3.5), что, по-видимому, связано со смещением остатков Lys45 и Ser142.

### 3.1.5 Спектральные и кинетические свойства обелина Y138F

Замена Tyr на Phe в 138 положении не приводит к таким существенным изменениям функциональной активности обелина (табл. 3.3), как замена некоторых других аминокислотных остатков субстрат-связывающей полости фотопротеинов [Ohmiya, Tsuji, 1993; Eremeeva et al., 2013]. Но некоторые биолюминесцентные характеристики меняются заметно. На рисунке 3.6 отображены кинетики биолюминесцентных реакций обелина дикого типа и обелина Y138F, измеренные методом остановленной струи.

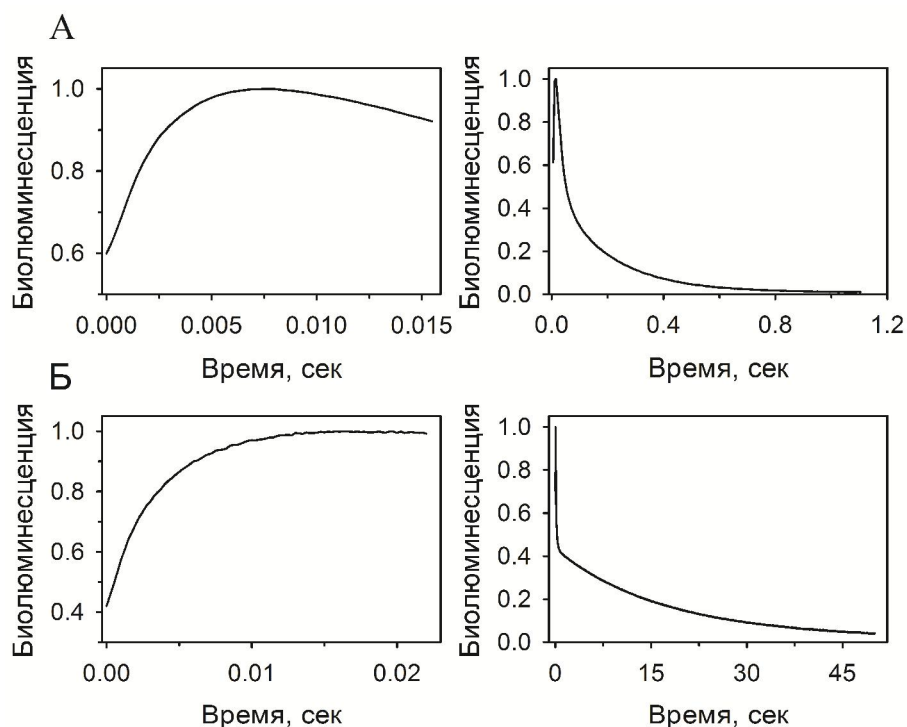


Рисунок 3.6 – Кинетики подъема (слева) и спада (справа) биолюминесцентной реакции дикого обелина (А) и обелина Y138F (Б). Концентрация белка – 4,5 мкМ. Каждый график – отдельное измерение.

При сравнении полученных данных, мы обнаружили, что значение константы подъема кинетики биолюминесцентной реакции (рис. 3.6) уменьшилось с  $476,5 \pm 1,4 \text{ сек}^{-1}$  у дикого обелина до  $305,3 \pm 1,4 \text{ сек}^{-1}$  у обелина Y138F (табл. 3.3). То есть мутационная замена остатка Тирг снижает скорость подъема кинетики биолюминесцентной реакции в 1,5 раза по сравнению с обелином дикого типа.

Таблица 3.3

## Спектральные и кинетические характеристики обелина Y138F

Обелин		дикий тип	Y138F
Удельная активность, (% от активности дикого обелина)		100	60
Максимум спектра биолюминесценции, $\lambda_{\text{max}}/\lambda_{\text{плечо}}$ , нм		480/400	490/400
Максимум спектра флуоресценции, $\lambda_{\text{max}}$ , нм		512	510
Константа подъема, $\text{сек}^{-1}$		$476,5 \pm 1,4$	$305,3 \pm 1,4$
Константы спада, $\text{сек}^{-1}$	$k_1$	$43,6 (0,66) \pm 0,23$	$13,7 (0,8) \pm 0,3$
	$k_2$	$5,0 (0,34) \pm 0,01$	$0,06 (0,2) \pm 0,0003$

Значение констант спада кинетики биолюминесцентной реакции обелина Y138F также уменьшается:  $k_1$  и  $k_2$  для обелина дикого типа равны  $43,6 \pm 0,23 \text{ сек}^{-1}$  и  $5,0 \pm 0,01 \text{ сек}^{-1}$ , соответственно, тогда как у описываемого мутанта  $13,7 \pm 0,3 \text{ сек}^{-1}$  и  $0,06 \pm 0,0003 \text{ сек}^{-1}$  (табл. 3.3). Кроме того, мутация повышает вклад «быстрой» и уменьшает вклад «медленной» компоненты на фазе спада (табл. 3.3).

Максимум спектра биолюминесценции дикого обелина составляет 480 нм с небольшим плечом на 400 нм (рис. 3.7А, табл. 3.3). Замена тирозина на фенилаланин приводит к смещению максимума биолюминесценции в длинноволновую область на 10 нм и снижению интенсивности сигнала на

400 нм (рис. 3.7А, табл. 3.3). Тем не менее, оба обелина в  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженном состоянии имеют сходные спектры флуоресценции с максимумом примерно 510 нм (рис. 3.7Б, табл. 3.3).

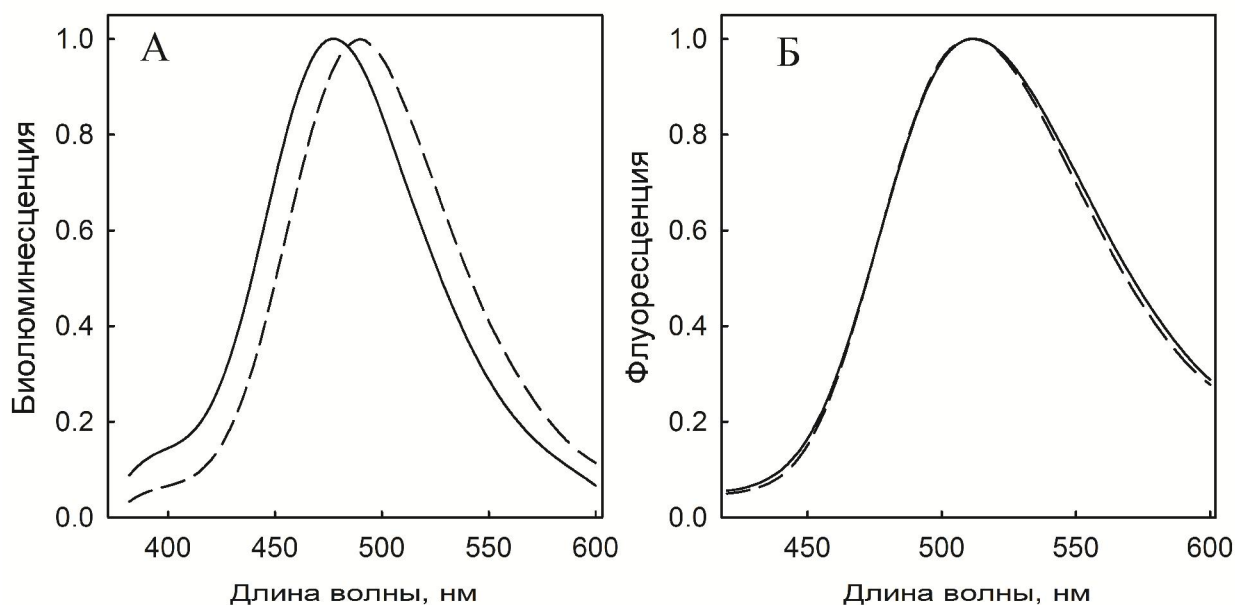


Рисунок 3.7 – Спектры билюминесценции (А) и флуоресценции (Б) дикого обелина (сплошная линия) и обелина Y138F (пунктирная линия).

### 3.2 Каталитическая функция молекулы воды и роль Tyr138 в билюминесцентной реакции

Как уже было сказано выше, на основе анализа полученных пространственных структур нескольких  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых фотопротеинов [Head et al., 2000; Liu et al., 2000; Liu et al., 2003; Titushin et al., 2010] и их различных лиганд-зависимых конформационных состояний [Deng et al., 2004; Deng et al., 2005; Liu et al., 2006], а также данных, полученных при исследовании свойств различных мутантов фотопротеинов, были сделаны предположения о роли различных аминокислотных остатков в билюминесценции фотопротеинов. Предполагается, что система водородных связей, формируемая остатками His175 и Tyr190 (His169 и Tyr184 в акворине), стабилизирует молекулу 2-гидропероксицелентеразина, причем роль His критична для билюминесцентной реакции, потому что его

замена приводит к практически полной потере биолюминесцентной активности [Ohmiya, Tsuji, 1993; Ereemeeva et al., 2013a]. Факт перемещения His после связывания ионов кальция фотопротеином позволил предположить, что His может служить своеобразным «спусковым крючком» биолюминесцентной реакции [Liu et al., 2006; Vysotski, Lee, 2007]. Более того, His может быть ключевым аминокислотным остатком в процессе формирования активного фотопротеина из апобелка, целентеразина и кислорода [Ereemeeva et al., 2013b; Ereemeeva et al., 2013c]. Боковые цепи His22, Trp92 в обелине и His16, Tyr82 и Trp86 в акворине находятся на расстоянии водородной связи от гидроксила 6-(*n*-гидрокси)-фенильной группы 2-гидропероксицелентеразина. Система водородных связей, формируемая этими остатками, имеет большое значение для формирования эмиттера биолюминесценции, потому что их замена приводит к изменению спектра излучения [Ohmiya et al., 1992; Deng et al., 2001; Vysotski et al., 2003; Malikova et al., 2003; Stepanyuk et al., 2005; Frank et al., 2008]. Это объясняется тем, что целентеразин имеет диссоциируемую 6-(*n*-гидрокси)-фенильную группу, и излучение в длинноволновой части спектра возникает от возбужденной формы фенолят аниона после переноса протона на His22 в обелине (His16 в акворине) [Vysotski, Lee, 2004; Vysotski, Lee, 2007; Tomilin et al., 2008; van Oort et al., 2009].

В диком обелине Tyr138 (Tyr132 в акворине) располагается на расстоянии водородной связи от N1-атома 2-гидропероксицелентеразина (рис. 3А, слева) и также формирует водородную связь с молекулой воды  $W_2$ , которая, в свою очередь, связана с His64. Основываясь на данных, полученных при анализе кристаллической структуры  $Ca^{2+}$ -разряженного обелина (рис. 3.4А, слева), было предположено, что  $W_1$  катализирует реакцию декарбоксилирования путем протонирования диоксиэтанового аниона (рис. 1.12) [Liu et al., 2006; Vysotski, Lee, 2007].

Для подтверждения данного предположения, были получены

пространственные структуры обелина Y138F в двух лиганд-зависимых конформационных состояниях – до и после биолюминесцентной реакции. Также были проведены исследования спектральных и кинетических свойств этого мутанта. Как уже было сказано ранее, обе структуры обелина Y138F имеют схожую пространственную организацию с уже охарактеризованными кристаллическими структурами обелина дикого типа. Аминокислотные остатки, формирующие субстрат-связывающую полость в обелине дикого типа, связанном с 2-гидропероксицелентеразином, найдены в тех же положениях и в обелине Y138F (рис. 3.3Б). Есть только одно важное отличие – молекула воды, находящаяся в положении  $W_2$  в структуре обелина дикого типа (рис. 3.3А, слева), отсутствует в обелине Y138F (рис. 3.3А, справа). Сходство целентерамид-связывающих полостей  $Ca^{2+}$ -разряженных дикого обелина и обелина Y138F также очень высоко (рис. 3.4), но в случае обелина Y138F боковая цепь Phe138 остается ориентированной внутрь белковой полости, тогда как в диком обелине боковая цепь Tyr138 уходит на поверхность молекулы (рис. 3.4). Очень важным является тот факт, что во внутренней полости  $Ca^{2+}$ -разряженного обелина Y138F молекула воды  $W_2$  найдена в том же положении, что и в  $Ca^{2+}$ -разряженном диком обелине. Скорее всего, она попадает внутрь целентерамид-связывающей полости через отверстие, открывающееся на поверхности молекулы фотопротеина (рис. 3.5Б) в результате небольших конформационных изменений структуры белка во время связывания ионов  $Ca^{2+}$ .

Гидроксильная группа Tyr138 образует водородную связь с N1-азотом 2-гидропероксицелентеразина (рис. 3.3А, слева). Остаток Tyr138 не является строго необходимым для биолюминесцентной реакции, так как его замена на Phe не приводит к потере функциональной активности белка. Обелин Y138F сохраняет 60% активности от активности обелина дикого типа (табл. 3.3). Сравнение биолюминесцентных спектров дикого обелина и его мутанта показывает, что замена Tyr138 влияет на образование эмиттера

биолюминесценции, поскольку максимум спектра биолюминесценции обелина Y138F сдвигается на 10 нм в длинноволновую часть спектра. Более того, уменьшение интенсивности «плеча» на 400 нм может говорить о снижении количества целентерамида в нейтральном возбужденном состоянии в сравнении с обелином дикого типа (рис. 3.7, слева). С другой стороны, замена Tyr на Phe также приводит к существенному замедлению кинетики биолюминесцентной реакции, потому что константы подъема и спада, рассчитанные для обелина Y138F, имеют меньшее значение, чем аналогичные константы для дикого обелина (табл. 3.3). В 4-этапной кинетической модели, предложенной для описания биолюминесцентной реакции фотопротеина акворина [Hastings et al., 1969; Blinks et al., 1982], константы подъема и спада были отнесены к этапам, описывающим окислительное декарбоксилирование субстрата и конформационные перестройки фотопротеиновой молекулы после связывания  $\text{Ca}^{2+}$ , соответственно. Поэтому, учитывая полученные данные по кинетике и кристаллическим структурам, мы можем сделать заключение о том, что отсутствие молекулы воды  $\text{W}_2$  во внутренней полости обелина Y138F в начальный момент после связывания  $\text{Ca}^{2+}$  является причиной снижения скорости биолюминесцентной реакции. Поскольку молекула воды  $\text{W}_2$  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.

Таким образом, данные результаты подтверждают гипотезу [Liu et al., 2006; Vysotski, Lee, 2007] о том, что молекула воды выполняет функцию катализатора реакции декарбоксилирования 2-гидропероксицелентеразина путем протонирования диоксиэтанового аниона прежде, чем он сможет перейти в возбужденную форму амид-аниона [Usami, Isobe, 1996].  $pK$  амида,



вероятнее всего, выше, чем у молекулы воды, что может быть иницирующей движущей силой переноса протона от растворителя через «протонный канал», формируемый молекулами воды  $W_2$  и  $W_3$ , His64, Ser47, Asp48 и Gln65 (рис. 3.8).

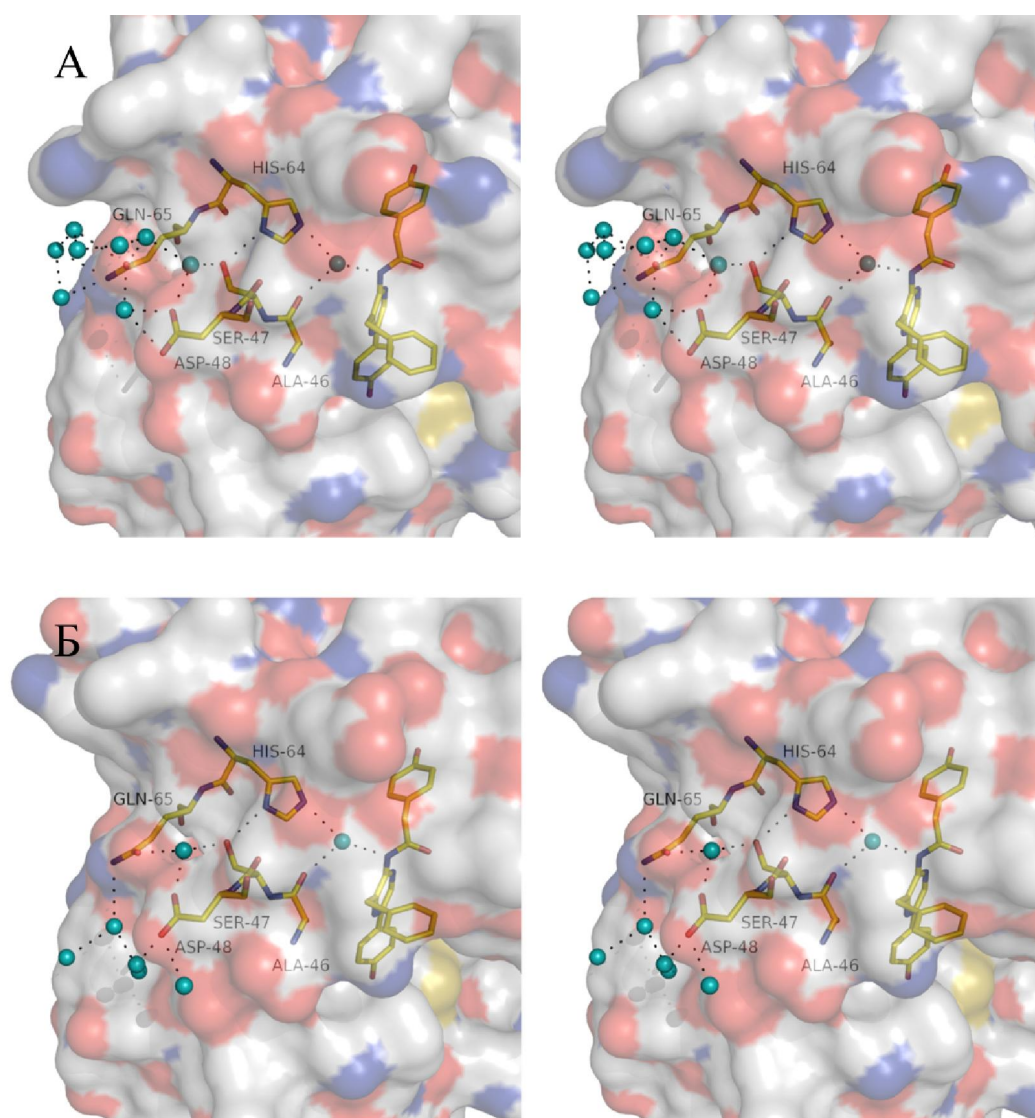


Рисунок 3.8 – Стереобразожение «протонного канала» в  $Ca^{2+}$ -разряженных обелине Y138F (А) и обелине дикого типа (Б). Молекула целентерамида и аминокислотные остатки показаны в виде желтых палочек. Молекулы воды представлены в виде сфер голубого цвета. Водородные связи показаны в виде пунктирных линий. Пространственные структуры в одинаковой ориентации.

Следует отметить, что организация этого «протонного канала», соединяющего поверхность белка с его внутренней полостью, аналогична для  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженных обелина Y138F и обелина дикого типа. Разница, наблюдаемая в спектрах излучения дикого обелина и обелина Y138F, может быть следствием небольших вариаций размеров водородных связей внутри субстрат-связывающих полостей двух белков. Это может влиять на эффективность переноса протона от диссоциируемой 6-(*n*-гидрокси)-фенильной группы возбужденного целентерамида нейтральной формы на His22, выражающуюся в длинноволновом излучении фенолят-аниона целентерамида.

Таким образом, описанные в этой главе результаты исследования пространственных структур двух конформационных состояний, а также биолюминесцентных свойств мутанта обелина Y138F и обелина дикого типа позволили сделать большой шаг в понимании молекулярного механизма биолюминесцентной реакции  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых фотопротеинов и функции аминокислотных остатков, формирующих субстрат-связывающую полость в этом процессе.

## ГЛАВА 4 Пространственные структуры обелина F88Y и Ca<sup>2+</sup>-разряженного обелина F88Y. Структурные основы особенностей спектров биолюминесценции Ca<sup>2+</sup>-регулируемых фотопротеинов

4.1 Пространственные кристаллические структуры обелина F88Y со связанным 2-гидропероксицелентеразином и Ca<sup>2+</sup>-разряженного обелина F88Y со связанными целентерамидом и Ca<sup>2+</sup>

### 4.1.1 Кристаллизация

Для кристаллизации обелина F88Y после хроматографической очистки был переведен в буфер, содержащий 2 мМ ЭДТА, 10 мМ Бис-Трис pH 6,5 и сконцентрирован до концентрации 16 мг/мл.

Для приготовления Ca<sup>2+</sup>-разряженного обелина F88Y образец заряженного белка при температуре 4°C разводили раствором, содержащим 4 мМ CaCl<sub>2</sub>, 10 мМ Бис-Трис pH 6,5, до финальной концентрации примерно 1 мг/мл. Во время данной процедуры наблюдалось биолюминесцентное свечение голубого цвета. По окончании биолюминесцентной реакции белковый раствор сменил желтую окраску на бесцветную, что является индикатором превращения целентеразина в целентерамид. Для проверки присутствия связанного с белком целентерамида в растворе был измерен флуоресцентный спектр образца. Затем образец Ca<sup>2+</sup>-разряженного обелина F88Y был сконцентрирован для постановки кристаллизации до 10 мг/мл.

Кристаллы обелина F88Y были выращены в течение 3-х дней после постановки кристаллизации при 16°C в 2,1 М яблочной кислоте, имели желтый окрас и палочковидную форму (рис. 4.1А).

Большой бесцветный кристалл Ca<sup>2+</sup>-разряженного обелина F88Y был выращен в течение 2-х недель с начала кристаллизации при следующих условиях: 2,2 сульфат аммония, 2% PEG 400, 0,1 М HEPES-Na, pH 7,5, 4°C (рис. 4.1Б).

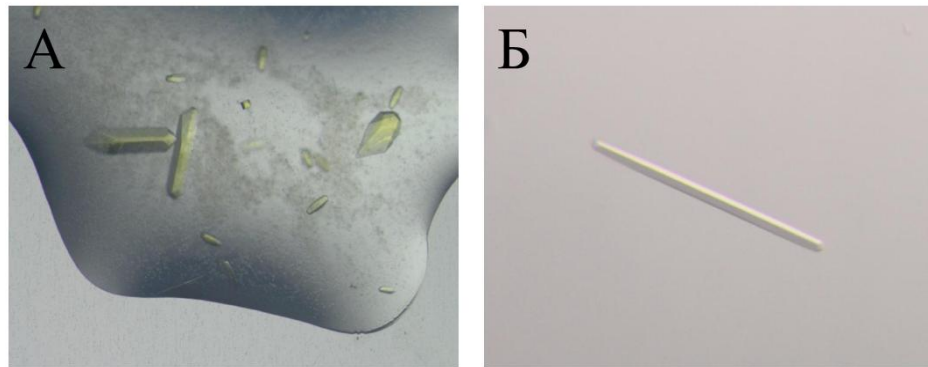


Рисунок 4.1 – А – Кристаллы обелина F88Y со связанным 2-гидропероксицелентеразином; Б – Кристалл  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного обелина F88Y со связанным целентерамидом и ионами  $\text{Ca}^{2+}$ .

При облучении кристалла  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного обелина F88Y ультрафиолетом наблюдалась зеленая флуоресценция показывающая, что целентерамид прочно связан с белком.

В таблице 4.1 приведена кристаллографическая статистика после обработки дифракционных данных и построения пространственных моделей белков. Пространственные модели для обелина F88Y со связанным 2-гидропероксицелентеразином и  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного обелина F88Y со связанным целентерамидом и ионами  $\text{Ca}^{2+}$  были помещены в базу данных кристаллических структур белков [Berman et al., 2000] с PDB кодами 4N1F и 4N1G, соответственно.

#### 4.1.2 Общая структура белков

Кристаллические структуры обелина F88Y со связанным 2-гидропероксицелентеразином и  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного обелина F88Y со связанным целентерамидом сохраняют компактную глобулярную пространственную организацию (рис. 4.2), характерную для всех лиганд-зависимых конформационных состояний  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых фотопротеинов [Head et al., 2000; Liu et al., 2000; Liu et al., 2006; Titushin et al., 2010]. Более того, обе описываемые структуры очень похожи на пространственные структуры дикого обелина в

Таблица 4.1

Кристаллографическая статистика для обелина F88Y со связанным 2-гидропероксицелентеразином и Ca<sup>2+</sup>-разряженного обелина F88Y со связанным целентерамидом

Название белка	Обелин F88Y	Ca <sup>2+</sup> -разряженный обелин F88Y
<b>Обработка данных</b>		
предел разрешения, Å	50,00-2,09 (2,16-2,09)	50,00-1,50 (1,55-1,50)
длина волны, Å	0,9789	0,9789
пространственная группа	P41	P212121
размеры элементарной ячейки, Å	a=73,33 b=73,33 c=53,08	a=60,92 b=85,13 c=90,09
углы элементарной ячейки, °	$\alpha=90,0$ $\beta=90,0$ $\gamma=90,0$	$\alpha=90,0$ $\beta=90,0$ $\gamma=90,0$
уникальные отражения (свободные)	16926 (1713)	58909 (641)
завершенность (%)	99,88 (99,12)	77,78 (8,61)
I/ $\sigma$ (I)	22,94 (6,38)	25,85 (1,75)
$R_{\text{merge}}$ (%)	6,7 (37,1)	6,3 (44,3)
сокращение	7,2 (7,4)	5,6 (1,1)
<b>Усовершенствование модели</b>		
предел разрешения, Å	42,996–2,087	49,541–1,500
использованные отражения (несвязанные)	16906 (1691)	58830 (2001)
$R_{\text{work}}$ ( $R_{\text{free}}$ )	17,16% (19,92%)	16,88% (20,89%)
атомы белка	1512	3153
атомы растворителя	164	566
атомы лигандов	34	68
средний B-фактор, Å <sup>2</sup>	41,80	22,60
RMSD длины связей, Å	0,01	0,02
RMSD углов связей, °	1,05	1,73

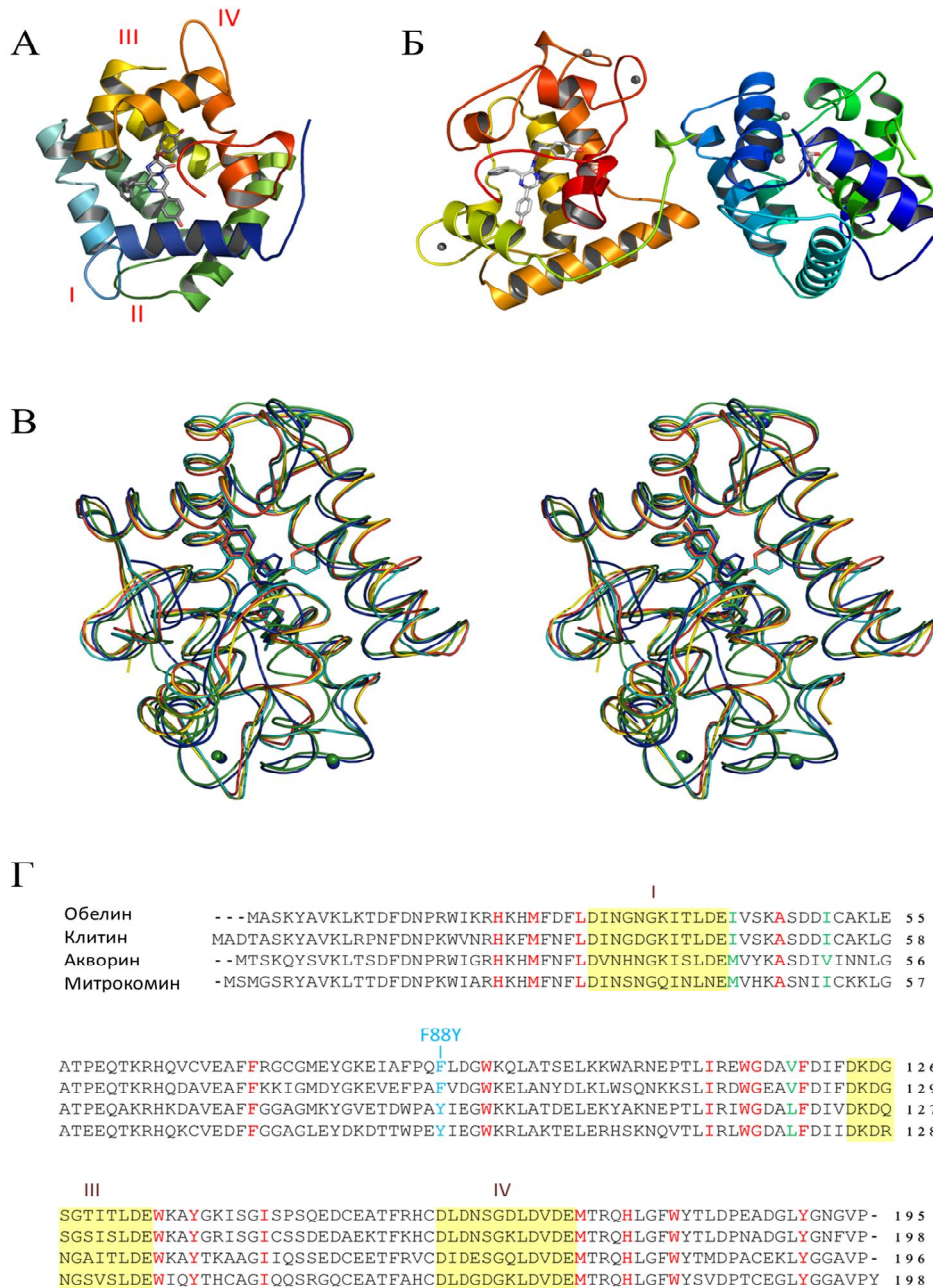


Рисунок 4.2 – А – Пространственная структура обелина F88Y. 2-гидроперокси-целентеразин показан в центре белковой глобулы;  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающие петли обозначены цифрами I-IV. Б – Пространственная структура  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного обелина F88Y. Целентерамид показан в центре глобулы,  $\text{Ca}^{2+}$  – в виде сфер. В – Стереоизображение структурного сравнения обелина F88Y (желтый),  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного обелина F88Y (синий), дикого обелина (красный),  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного дикого обелина (зеленый), дикого акворина (голубой). Г – Сравнение аминокислотных последовательностей обелина, клитина, акворина и митрокомина. Место мутационной замены выделено синим. Строго консервативные аминокислотные остатки активного центра показаны красным, переменные остатки – зеленым.  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающие петли выделены желтым.

тех же конформационных состояниях (рис. 4.2). RMSD атомов основной цепи обелина F88Y и дикого обелина (рис. 4.2; табл. 4.2.) составляет всего 0,36 Å. Для структур  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженных конформационных состояний обелина F88Y и дикого обелина RMSD атомов основной цепи составляет 1,71 Å (рис. 4.2; табл. 4.2.), при этом практически все основные различия отмечаются в районе «EF-hand» петли III С-концевого домена.

Таблица 4.2

Сравнение конформационных состояний обелина F88Y и дикого обелина

Структурные элементы фотопротеинов	Обелин F88Y / $\text{Ca}^{2+}$ -разряженный обелин F88Y	Обелин F88Y / дикий обелин	$\text{Ca}^{2+}$ -разряженный обелин F88Y / $\text{Ca}^{2+}$ -разряженный дикий обелин	Обелин F88Y / дикий акворин
	среднеквадратичное отклонение (RMSD) основной/боковой цепи (Å)			
Общая структура	2,24/3,11	0,36/1,06	1,71/2,65	0,78
N-концевой домен	1,23/2,12	0,31/1,15	0,50/1,54	0,82
C-концевой домен	2,82/3,87	0,34/0,90	2,37/3,53	0,62
$\text{Ca}^{2+}$ -связывающая петля I	1,42/2,27	0,24/1,02	0,35/1,35	1,05
$\text{Ca}^{2+}$ -связывающая петля II	0,49/1,56	0,25/0,99	0,20/1,19	0,45
$\text{Ca}^{2+}$ -связывающая петля III	2,07/3,14	0,39/1,16	2,17/3,66	0,72
$\text{Ca}^{2+}$ -связывающая петля IV	2,05/3,68	0,25/0,82	0,84/2,03	0,39

RMSD атомов основной цепи обелина F88Y и  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного обелина F88Y составляет 2,24 Å, что несколько больше, чем отклонение, получаемое при сравнении структур дикого обелина в тех же



конформационных состояниях, равное 1,92 Å [Liu et al., 2006]. Несмотря на это, дикий обелин и его мутант F88Y показывают практически идентичные изменения пространственных структур в ответ на связывание  $\text{Ca}^{2+}$ , например, конформационная трансформация С-концевого домена гораздо выше, чем N-концевого домена. Также следует отметить, что RMSD атомов основной цепи обелина F88Y и дикого акворина равна 0,78 Å, что почти идентично значению для дикого обелина и дикого акворина (0,8 Å).

#### 4.1.3 «EF-hand» $\text{Ca}^{2+}$ -связывающие петли

Строение  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих петель обелина F88Y и все изменения, происходящие с ними в процессе биолюминесцентной реакции, практически идентичны обозначенным в диком обелине [Liu et al., 2006]. В структуре  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного обелина F88Y ионы кальция найдены в каждом из предполагаемых центров связывания кальция («EF-hand» петли I, III и IV) (рис. 4.2).  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающая петля II в N-концевом домене белка не принимает участие в связывании кальция по причине отсутствия в ее составе определенных аминокислотных остатков и поэтому не претерпевает существенных конформационных изменений.

Наиболее существенные конформационные изменения после связывания  $\text{Ca}^{2+}$  происходят в  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающей «EF-hand» петле IV (табл. 4.2). Изменение ориентации всех 12 аминокислот, составляющих  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающую петлю, до оптимальной конформации делает возможным связывание  $\text{Ca}^{2+}$ . В структуре  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного обелина F88Y ион кальция во всех трех  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих петлях координируется по типичной схеме пентагональной бипирамиды. Шестью координационными лигандами выступают атомы кислорода карбоксильной группы боковых цепей Asp и Glu, карбонильные группы основной цепи или боковой цепи Asn, а также гидроксильные группы серина. Седьмым лигандом для связывания кальция



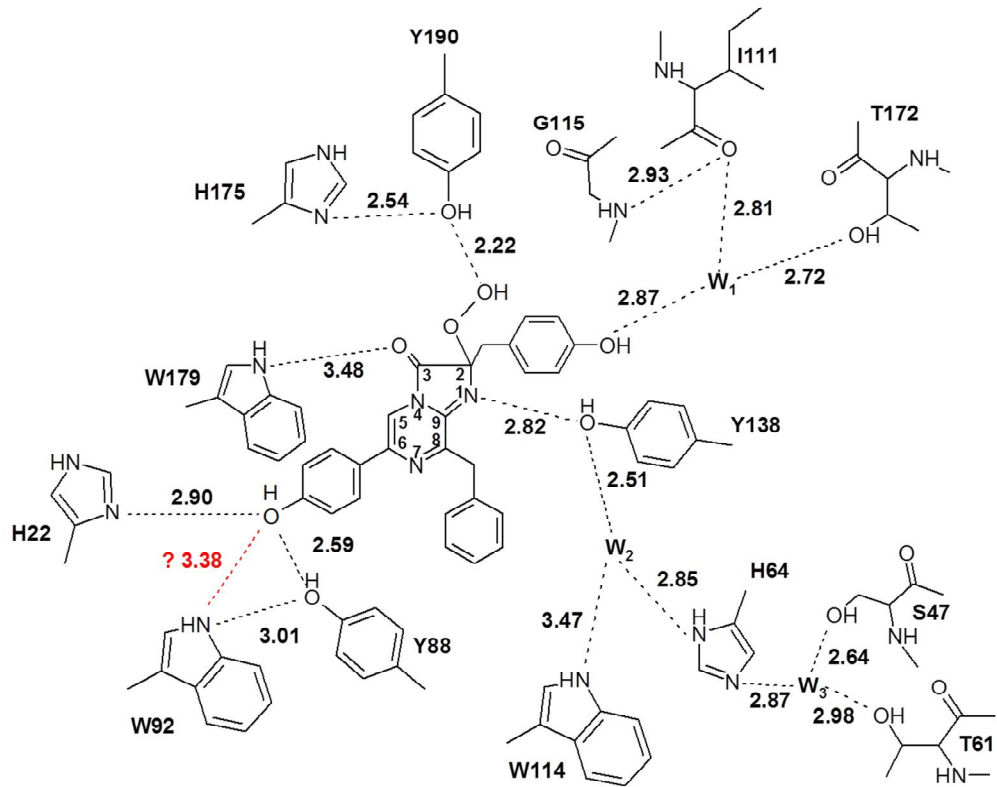
является атом кислорода молекулы воды. Длина координационных связей составляет  $\sim 2,4 \text{ \AA}$ .

Данные, полученные при сравнении кристаллических структур описываемых конформационных состояний обелина F88Y с соответствующими им структурами дикого обелина, говорят о том, что мутационная замена фенилаланина на тирозин в 88 положении не оказывает никакого эффекта на структуру  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих петель и их конформационную реорганизацию, связанную со связыванием  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### 4.1.4 Системы водородных связей в лиганд-связывающей полости обелина F88Y до и после биолюминесцентной реакции

На рисунке 4.3 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. Гидроксильная группа Tyr190 образует сильную водородную связь с пероксидной группой субстрата, а His175 формирует связь с Tyr190, в свою очередь, Nε-атом Trp179 связан водородной связью с кислородом C3 карбонильной группы. Кислород гидроксильной группы Tyr138 образует водородную связь с N1-атом 2-гидропероксицелентеразина. Также в полости находятся две молекулы воды,  $W_1$  и  $W_2$ , стабилизированные водородными связями с окружающими их аминокислотными остатками и субстратом. Третья молекула воды ( $W_3$ ) найдена недалеко от поверхности фотопротеиновой молекулы и удерживается водородными связями с His64, Ser47 и Thr61. Таким образом, существует заметная разница между системами водородных связей в обелине F88Y (рис. 4.3) и обелине дикого типа (рис. 4.4). В обелине дикого типа кислород 6-(*n*-гидрокси)-фенильной группы целентеразина образует водородную связь только с His22. Несмотря на то Nε атом Trp92 находится

А



Б

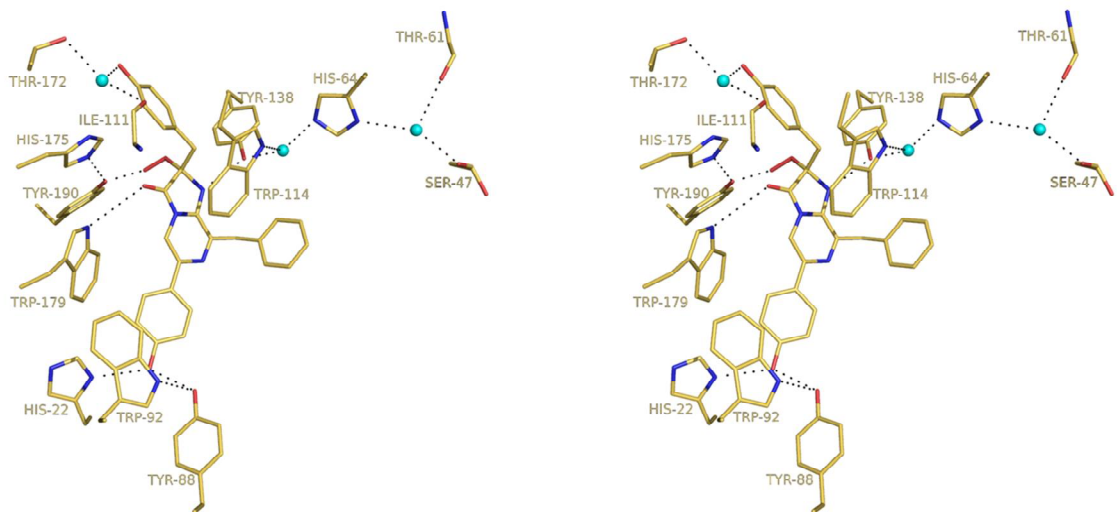
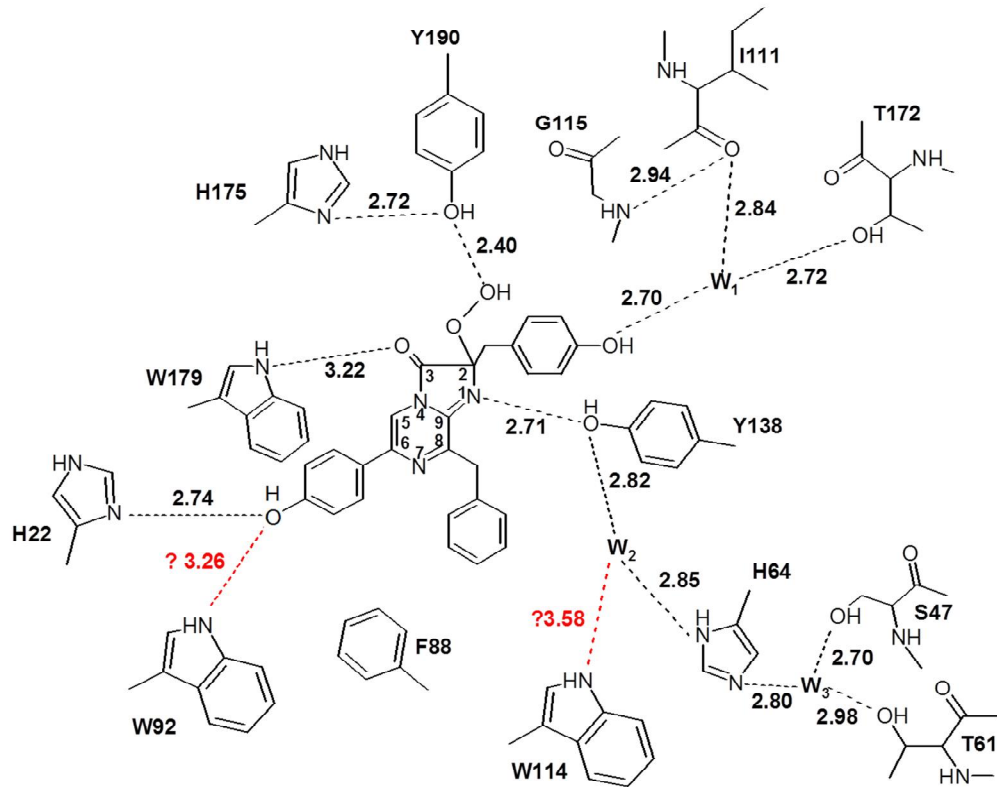


Рисунок 4.3 – Двухмерный рисунок сети водородных связей (А) и стереоизображение молекулы 2-гидропероксицелентеразина в окружении ключевых аминокислотных остатков субстрат-связывающей полости (Б) обелина F88Y (PDB код 4N1F). Водородные связи показаны пунктирными линиями. Расстояния даны в ангстремах. Молекулы воды показаны в виде сфер голубого цвета.

А



Б

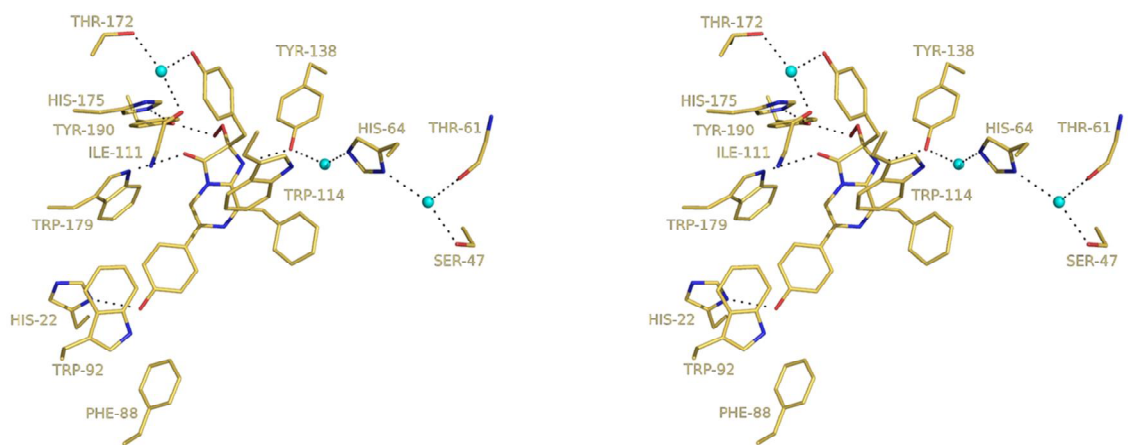
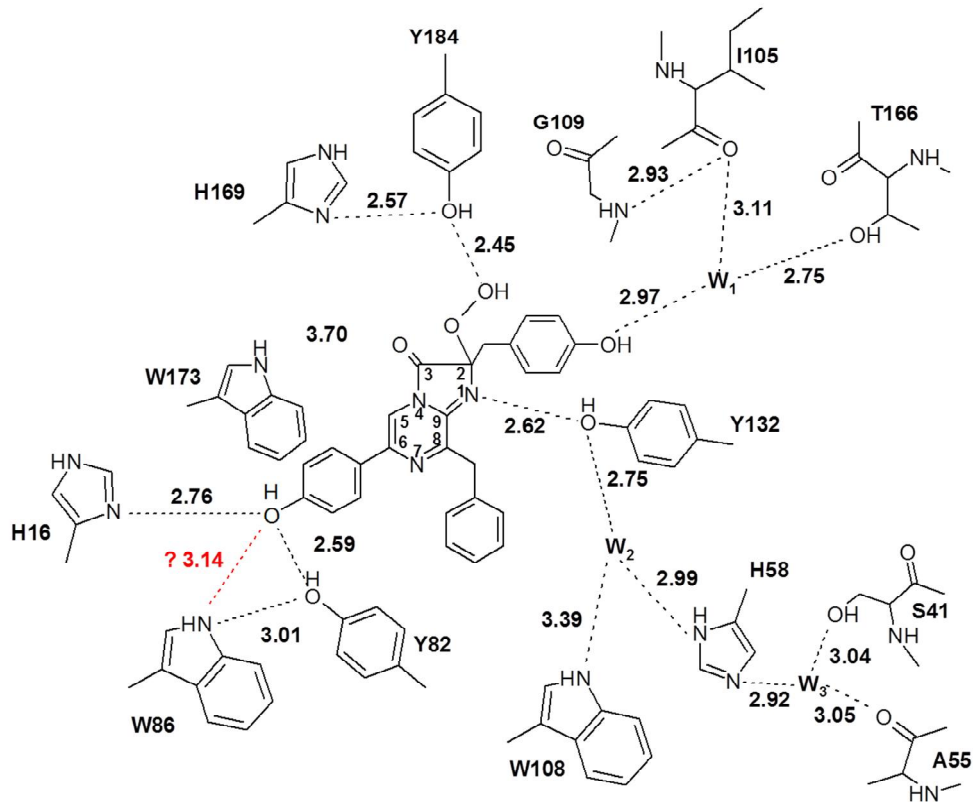


Рисунок 4.4 – Двухмерный рисунок сети водородных связей (А) и стереоизображение молекулы 2-гидропероксицелентеразина в окружении ключевых аминокислотных остатков субстрат-связывающей полости (Б) дикого обелина (PDB код 1QV0). Водородные связи показаны пунктирными линиями. Расстояния даны в ангстремах. Молекулы воды показаны в виде сфер голубого цвета.

недалеко (3.26 Å) от этого кислорода (рис. 4.4), водородная связь между ними не была идентифицирована с помощью программы PyMOL. Скорее всего, это связано с тем, что данная возможная водородная связь не соответствует определенным параметрам, заложенным в алгоритм программы. В дополнение стоит сказать, что в обелине F88Y Nε-атом Trp114 образует слабую водородную связь с молекулой воды W<sub>2</sub> (рис. 4.3A), тогда как в обелине дикого типа подобная водородная связь не была найдена (рис. 4.4). На рисунке 4.5 показана сеть водородных связей в субстрат-связывающей полости дикого акворина. Системы водородных связей акворина и обелина F88Y практически идентичны. За одним исключением – в обелине F88Y остаток Trp179 связан водородной связью с кислородом карбонильной группы 2-гидропероксицелентеразина, тогда как у акворина аналогичная связь с Trp173 отсутствует. Также следует отметить, что сеть водородных связей, 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<sup>2+</sup>-разряженного обелина F88Y, показана на рисунке 4.6. 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. Стоит отметить, что в Ca<sup>2+</sup>-разряженном диком обелине, возможно, появляется новая слабая водородная связь между Trp92 и кислородом 5-(*n*-гидрокси)-фенильной группы целентерамида (рис. 4.7). Атом азота Nε остатка Trp179, ранее связанный с кислородом C3-карбонильной группы (рис. 4.3), после реакции формирует новую водородную связь с Tyr190. Остаток Tyr190, до

А



Б

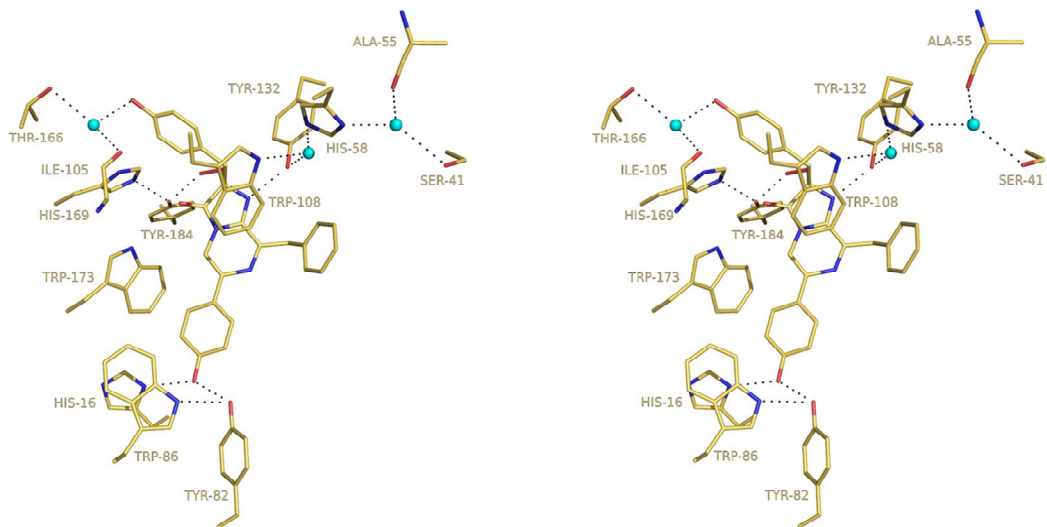
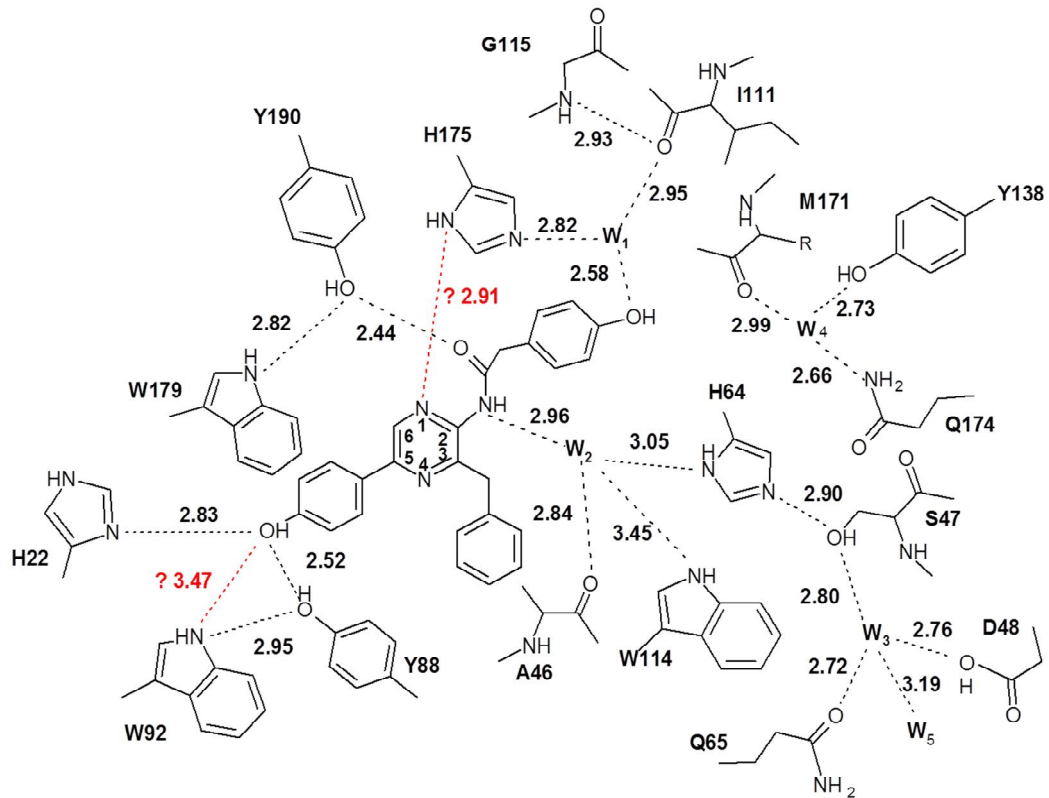


Рисунок 4.5 – Двухмерный рисунок сети водородных связей (А) и стереоизображение молекулы 2-гидропероксицелентеразина в окружении ключевых аминокислотных остатков субстрат-связывающей полости (Б) дикого акворина (PDB код 1EJ3). Водородные связи показаны пунктирными линиями. Расстояния даны в ангстремах. Молекулы воды показаны в виде сфер голубого цвета.

А



Б

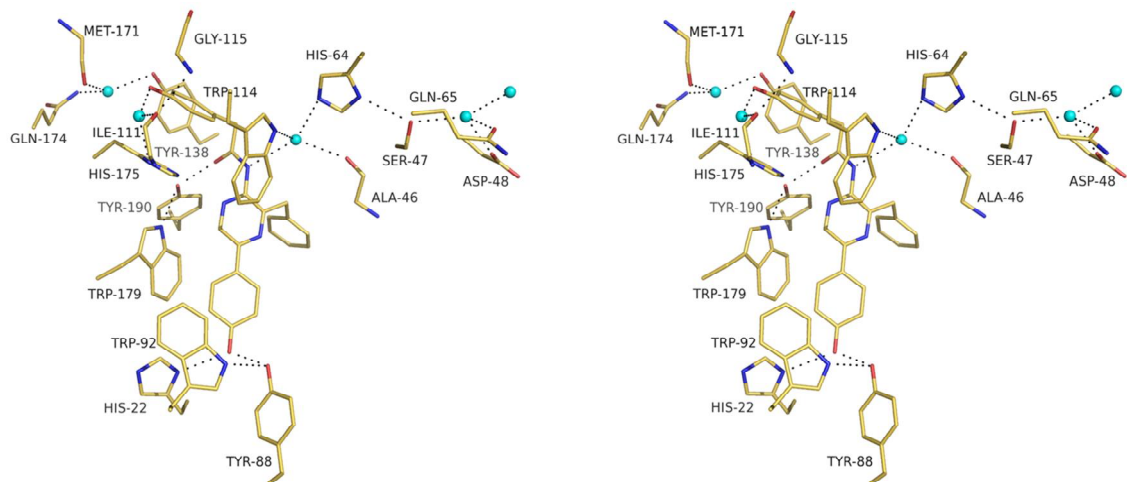
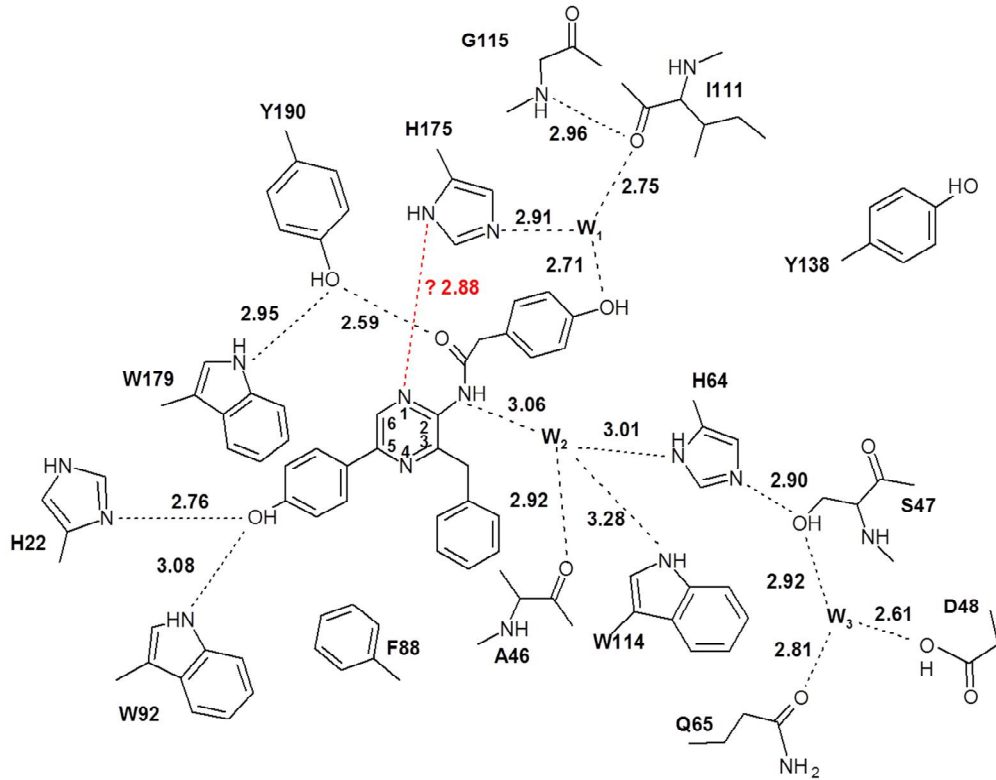


Рисунок 4.6 – Двухмерный рисунок сети водородных связей (А) и стереоизображение молекулы целентерамида в окружении ключевых аминокислотных остатков субстрат-связывающей полости (Б)  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного обелина F88Y (PDB код 4N1G). Водородные связи показаны пунктирными линиями. Расстояния даны в ангстремах.

Молекулы воды показаны в виде сфер голубого цвета.

А



Б

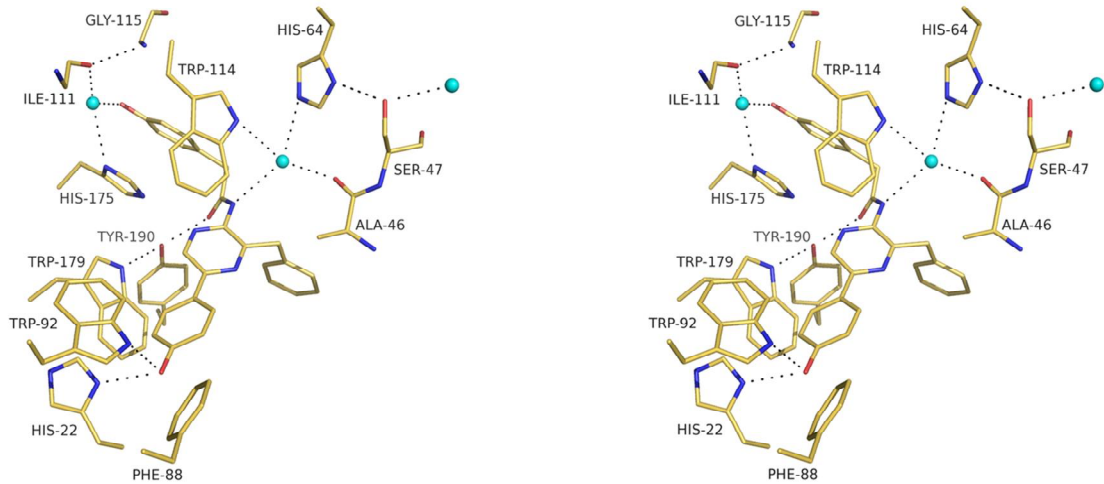


Рисунок 4.7 – Двухмерный рисунок сети водородных связей (А) и стереоизображение молекулы целентерамида в окружении ключевых аминокислотных остатков субстрат-связывающей полости (Б)  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного дикого обелина (PDB код 2F8P). Водородные связи показаны пунктирными линиями. Расстояния даны в ангстремах. Молекулы воды показаны в виде сфер голубого цвета.

этого связанный с пероксидной группой целентеразина и с His175, теряет эти связи и образует новую с кислородом карбонильной группы целентерамида. His175 также образует новую водородную связь с молекулой воды  $W_1$ , сменившую местоположение по причине переориентации 2-(*n*-гидрокси)-бензильной группы целентерамида. То есть,  $W_1$  сохраняет водородные связи только с кислородом карбонильной группы Ile111 и кислородом 2-(*n*-гидрокси)-бензильной группы продукта реакции. Поэтому можно заключить, что изменения, происходящие в данной части субстрат-связывающей полости в ответ на связывание  $Ca^{2+}$  и последующего декарбоксилирования целентеразина, идентичны изменениям, происходящим при разрядке дикого обелина (рис. 4.7). Атом кислорода остатка Tyr138, изначально связанный водородной связью с N1-атомом 2-гидроперокси-целентеразина (рис. 4.3), теперь замещен молекулой воды  $W_2$  (рис. 4.6), которая до реакции образовывала связи с Tyr138 и His64. Остаток His64, также немного сдвинутый по направлению к целентерамиду, сохраняет водородную связь с  $W_2$ . Кроме того,  $W_2$ , сохраняя водородную связь с Trp114, также формирует новую с кислородом карбонильной группы Ala46, появляющимся в полости после реакции. Так как His64 смещен, молекула воды  $W_3$ , сохраняя водородную связь с Ser47, формирует новые связи с атомами кислорода Asp48 и Gln65 (рис. 4.6). Несмотря на то, что система водородных связей в этой части белковой молекулы выглядит одинаковой в  $Ca^{2+}$ -разряженных обелине F88Y и обелине дикого типа, есть одно очень важное отличие. В то время как в  $Ca^{2+}$ -разряженном диком обелине Tyr138 уходит на поверхность фотопротеиновой молекулы [Liu et al., 2006], в  $Ca^{2+}$ -разряженном обелине F88Y этот аминокислотный остаток остается внутри полости и образует новую водородную связь с молекулой воды  $W_4$ . Данная молекула воды тоже располагается внутри белковой глобулы, но расстояние до молекулы целентерамида составляет примерно 4 Å (рис 4.6). Также эта молекула воды ( $W_4$ ) формирует водородные связи с Met171 и Gln174.



## 4.2 Структурные основы особенностей спектров биолюминесценции $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых фотопротеинов

Определение пространственных структур ряда  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых фотопротеинов [Head et al., 2000; Liu et al., 2000; Titushin et al., 2010] в их различных конформационных состояниях [Deng et al., 2004; Deng et al., 2005; Liu et al., 2006], а также мутантов обелина с измененными спектральными характеристиками [Deng et al., 2001; Vysotski et al., 2003], позволило сформулировать гипотезу о механизме переноса протона («proton relay mechanism») и формирования эмиттера [Vysotski, Lee, 2004; Vysotski, Lee, 2007] биолюминесцентной реакции морских кишечнополостных.

В соответствии с предложенным механизмом, возбужденный целентерамид нейтральной формы является первичным продуктом в фотопротеиновой биолюминесценции, в то время как спектр излучаемого света соответствует фенолят-анионной форме возбужденного целентерамида, образующейся после переноса протона на His22, находящегося на расстоянии водородной связи от гидроксильной группы 6-(*n*-гидрокси)-фенильного заместителя целентеразина. Хорошо известно, что  $pK^*$  фенольной группы в возбужденном состоянии должна быть на несколько единиц ниже  $pK$  основного состояния [Ireland, Wyatt, 1976]. И если значение  $pK^*$  опускается значительно ниже 6,5, что является ожидаемым  $pK$  His, то быстрая диссоциация протона с его смещением в сторону атома N происходит одновременно с образованием возбужденного фенолят аниона. К тому же, времени его флуоресцентной жизни, составляющей 5-6 нс [van Oort et al., 2009], более чем достаточно для диссоциации протона. Однако, помимо остатка His, атом кислорода 6-(*n*-гидрокси)-фенильной группы целентеразина находится на расстоянии водородной связи с остатками Trp и Tug в акворине и митрокомине или Trp и Phe в обелине и клитине. Все эти аминокислотные остатки влияют на спектр биолюминесценции фотопротеинов. Замена Trp92 в обелине [Deng et al., 2001; Vysotski et al., 2003] и Trp86 в акворине [Ohmiya

et al., 1992] на Phe приводит к появлению бимодального спектра с максимумами излучения на 410 и 470 нм для обелина W92F или 400 и 465 нм для акворина W86F. Для обоих мутантов вклад фиолетовой полосы, относящейся к излучению нейтральной формы целентерамида (400 – 410 нм), практически равен вкладу излучения на длинноволновом участке описываемого спектра (465 – 470 нм). Поскольку пространственная структура обелина W92F [Deng et al., 2001; Vysotski et al., 2003] не имеет значительных отличий как в общей организации белковой глобулы, так и в строении субстрат-связывающей полости от кристаллической структуры дикого обелина, появление фиолетовой полосы в спектре биолюминесценции может объясняться наличием водородной связи между Nε-атомом Trp и атомом кислорода 6-(*p*-гидрокси)-фенильной группы целентеразина. Также следует отметить, что двойной мутант обелина W92F/H22E имеет мономодальный спектр биолюминесценции с максимумом излучения на 390 нм [Frank et al., 2008]. Это может говорить о том, что данные аминокислотные замены препятствуют диссоциации протона гидроксильной группы 6-(*n*-гидрокси)-фенильного заместителя. Вероятнее всего, причинами являются отсутствие водородной связи, которую формирует Trp92, и неподходящие донорно-акцепторные свойства боковой цепи Glu по сравнению с His. Тем не менее, в отсутствие данных об особенностях пространственной структуры этого мутанта, мы можем предложить только вероятные механизмы для объяснения наблюдаемого эффекта.

Как уже было сказано выше, замена Phe88 на Tug влияет на спектр биолюминесценции обелина F88Y ( $\lambda_{\max} = 453$  нм) и флуоресцентный спектр его Ca<sup>2+</sup>-разряженного состояния ( $\lambda_{\max} = 487$  нм), которые сдвигаются в синюю сторону. Хотя при этом и не наблюдается полное совпадение, спектры обелина F88Y становятся похожи на спектры акворина ( $\lambda_{\text{BL max}} = 469$  нм,  $\lambda_{\text{FL max}} = 466$  нм) [Stepanyuk et al., 2005]. Была выдвинута гипотеза, что эти изменения обусловлены наличием дополнительной

водородной связи, сформированной, предположительно, между гидроксильной группой Tyr и атомом кислорода 6-(*n*-гидрокси)-фенильной группы целентеразина [Stepanyuk et al., 2005].

Представленные пространственные структуры обелина F88Y и его Ca<sup>2+</sup>-разряженного конформационного состояния подтверждают предложенный механизм и дают молекулярное объяснение различию спектров биолюминесценции и флуоресценции различных фотопротеинов. В акворине гидроксил 6-(*n*-гидрокси)-фенильной группы целентеразина располагается в центре треугольника, составленного из аминокислот триады Tyr–Trp–His, и формирует водородные связи с кислородом фенольной группы Tyr82 и атомом азота His16 (рис. 4.5). Nε-атом Trp86 также может быть связан с атомом кислорода Tyr82 (рис. 4.5). Несмотря на то, что водородная связь между Trp86 и кислородом 6-(*n*-гидрокси)-фенильной группы не обнаружена программой PyMOL, мы не можем исключать ее существование, так как ее длина укладывается в рамки допустимых значений (3,14 Å) (рис. 4.5), к тому же, при комнатной температуре вероятность этого возрастает в связи со структурными колебаниями белковой молекулы. В диком обелине Phe88 находится на позиции, характерной для Tyr82 в акворине. Следовательно, система водородных связей 6-(*n*-гидрокси)-фенильного заместителя целентеразина у обелина резко отличается от системы связей в акворине – была найдена только водородная связь с атомом азота His22 (рис. 4.4). Следует отметить, что, несмотря на допустимое расстояние Nε-O (3,26 Å), водородная связь, как в молекуле акворина, между Trp92 и кислородом 6-(*n*-гидрокси)-фенильной группы в молекуле дикого обелина не была обнаружена (рис. 4.4). Поскольку замена Phe88 на Tyr в молекуле обелина приводит к образованию системы водородных связей (рис. 4.3), точно совпадающей с системой связей в молекуле акворина (рис. 4.5), мы можем обоснованно заключить, что дополнительная водородная связь, образованная между гидроксильной группой Tyr и атомом кислорода

6-(*n*-гидрокси)-фенильного заместителя целентеразина, отвечает за различие биолюминесцентных спектров акворина и дикого обелина. Следует отметить, что в  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженном обелине F88Y сеть водородных связей, образованная триадой Tyr88–Trp92–His22, в целом соответствует подобной системе в молекуле обелина F88Y до реакции (рис. 4.6). Это позволяет нам обоснованно предположить, что в случае  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного акворина будет наблюдаться точно такая же картина.

Как уже отмечалось выше, наиболее изученными  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемыми фотопротеинами морских кишечнорастных животных [Morin, 1974], являются акворин, обелин, клитин и митрокомин (рис. 4.2Г). Данные фотопротеины имеют высокую степень гомологии аминокислотных последовательностей (65 – 75%) [Vysotski et al., 2006]. Аминокислотные остатки, выстилающие субстрат-связывающую полость, в своем большинстве консервативны (рис. 4.2Г). Несмотря на это, наблюдаются различия в максимумах спектров биолюминесценции для рекомбинантных акворина и митрокомина в пределах 462 – 470 нм [Shimomura, 2006; Fagan, et al., 1993; Stepanyuk et al., 2005], а для обелина и клитина – 475 – 495 нм [Markova et al., 2002; Markova et al., 2010]. Кроме того, в отличие от акворина и митрокомина, в спектрах обелина и клитина присутствует плечо на 400 нм.

Спектры флуоресценции  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженных акворина и митрокомина совпадают с их биолюминесцентными спектрами [Shimomura, 2006; Stepanyuk et al., 2005], тогда как у  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженных обелина и клитина спектры флуоресценции смещены в длинноволновую часть [Markova et al., 2002; Markova et al., 2010]. Также важным различием между этими двумя группами является то, что у обелина и клитина в 88 и 91 положении, соответственно, найден Phe, тогда как у акворина и митрокомина в аналогичном положении стоит Tyr (рис. 4.2Г). С учетом пространственных структур двух конформационных состояний обелина F88Y и квантово-молекулярных вычислений, показывающих, что длина волны испускаемого

цвета строго зависит от расстояния расположения протона по отношению к атому кислорода 5-(*n*-гидрокси)-фенильного заместителя [Tomilin et al., 2008], мы можем обоснованно предположить, что различная организация системы водородных связей приводит к различным вариантам расположения протона между атомом азота His и кислородом 5-(*n*-гидрокси)-фенильной группы возбужденного целентерамида и, следовательно, к различию спектров излучения (рис. 4.8). Также, поскольку в клитине и митрокоmine остатки Phe и Tyr найдены в тех же положениях, что в обелине и акворине, соответственно, мы можем предположить, что у клитина механизм образования длинноволнового излучения света соответствует такому механизму обелина, тогда как у митрокомина данный механизм похож на аквориновый.

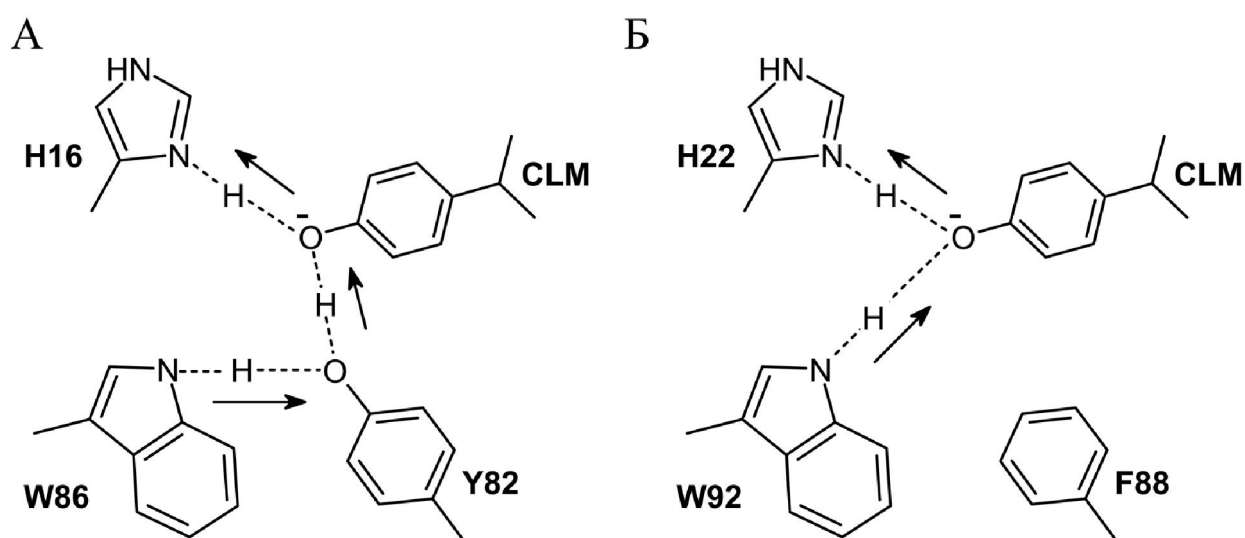


Рисунок 4.8 – Двухмерное изображение системы водородных связей и предполагаемое направление движения протона в процессе формирования возбужденной фенолят анионной формы целентерамида (CLM) в  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженных фотопротеинах «акворинового» (А) и «обелинового» (Б) типов. Предполагаемое направление переноса протона показано стрелками.

Таким образом, в данной главе представлены кристаллические структуры двух конформационных состояний мутанта обелина F88Y, имеющего схожие свойства спектров биолюминесценции с акворином. Исходя из данных анализа пространственных структур мутанта обелина F88Y и их сравнения с уже имеющимися структурами обелина и акворина, показано, что основной причиной отличия спектральных характеристик этих фотопротеинов является различная организация сетей водородных связей около атома кислорода 6-(*n*-гидрокси)-фенильной группы 2-гидроперокси-целентеразина, в зависимости от присутствия Phe или Trp в полости белка.

## ГЛАВА 5 Анаэробный апо-обелин–целентеразиновый комплекс. Роль His 175 в процессе формирования активного фотопротеина

### 5.1 Взаимодействие целентеразина с апо-обелином

Совсем недавно, с помощью метода тушения собственной флуоресценции белков было продемонстрировано, что связывание целентеразина с апофотопротеином протекает в течение нескольких миллисекунд, притом что последующее формирование активного фотопротеинового комплекса занимает несколько часов [Егемеева et al., 2009]. Также было установлено, что лимитирующим этапом в образовании активного фотопротеина является превращение целентеразина в его перокси-производное, происходящее внутри субстрат-связывающей полости. Однако, до сих пор не совсем понятно, что происходит с целентеразином после его связывания с апобелком и неизвестно, какие целентеразиновые интермедиаты предшествуют 2-гидропероксицелентеразину.

Взаимодействие целентеразина с апо-обелином значительно понижает собственную флуоресценцию белка, которая зависит от концентрации добавляемого целентеразина [Егемеева et al., 2009]. Экспериментально было показано, что при разбавлении образца, содержащего апофотопротеин (апо-обелин или апо-акворин) и целентеразин, в 2 раза, уровень собственной флуоресценции образца снижался ровно в 2 раза, поэтому можно с уверенностью утверждать, что целентеразин остается связанным с апофотопротеином [Егемеева et al., 2009]. Прочная связь целентеразина с апобелком является следствием гидрофобного взаимодействия целентеразина и неполярных аминокислотных остатков, выстилающих субстрат-связывающую полость. Успешная очистка апо-обелин–целентеразинового комплекса с помощью ионообменной хроматографии свидетельствует об образовании устойчивого комплекса между апофотопротеином и

целентеразином еще до образования пероксипроизводного целентеразина под действием кислорода.

## 5.2 Спектры поглощения целентеразина в анаэробных условиях при различных рН

В растворах с различным значением рН целентеразин имеет спектры поглощения с максимумами на ~265, 345 и 430 нм при рН 6,5; на ~268, 340 и 410 нм при рН 7,8; на 290 и 390 нм при рН 10,0 (рис. 5.1). Такие спектральные сдвиги показывают, что вид ионизированного состояния целентеразина зависит от рН раствора. Основываясь на исследованиях

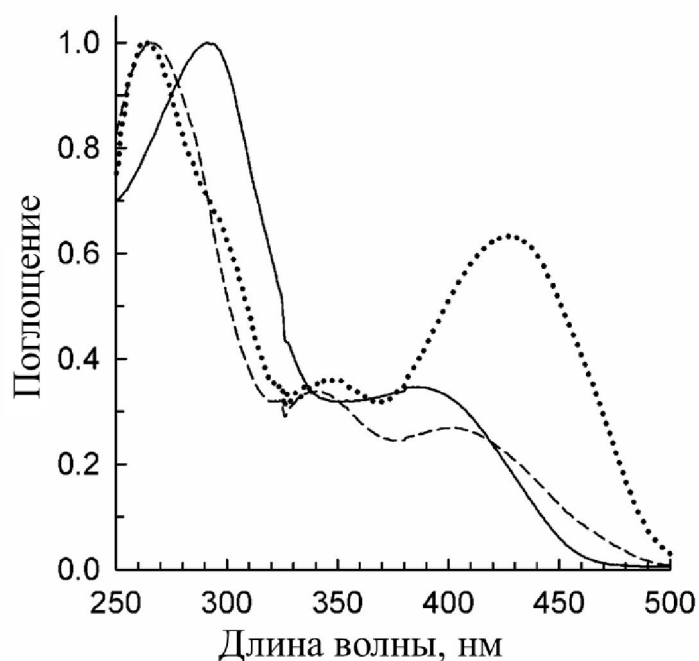


Рисунок 5.1 – Спектр поглощения целентеразина в анаэробных условиях при рН 6,5 (точечная линия), рН 7,8 (пунктирная линия) и рН 10,0 (сплошная линия). Спектры были измерены в: 20 мМ Трис-НСl буфере (рН 7,8 или 10,0), содержащем 0,3 М NaCl и 5 мМ ЕДТА, а также 50 мМ Бис-Трис-НСl буфере (рН 6,5), содержащем 0,3 М NaCl и 5 мМ ЕДТА. Концентрация целентеразина 25 мкМ.



зависимостей спектральных свойств производных целентеразина от растворителя и значения pH, спектры поглощения при pH 6,5 и 10,0 можно отнести к протонированным N7- и C2(-)-анионным формам целентеразина [Hori et al., 1975; Nakai et al., 2003] (рис. 5.2А). Так как спектр поглощения целентеразина при pH 7,8 напоминает наложение спектров при pH 6,5 и 10,0, будет резонно предположить, что в анаэробных условиях при pH 7,8 целентеразин в образце присутствует как смесь двух форм: N7-протонированных и C2(-)-анионной (рис. 5.1).

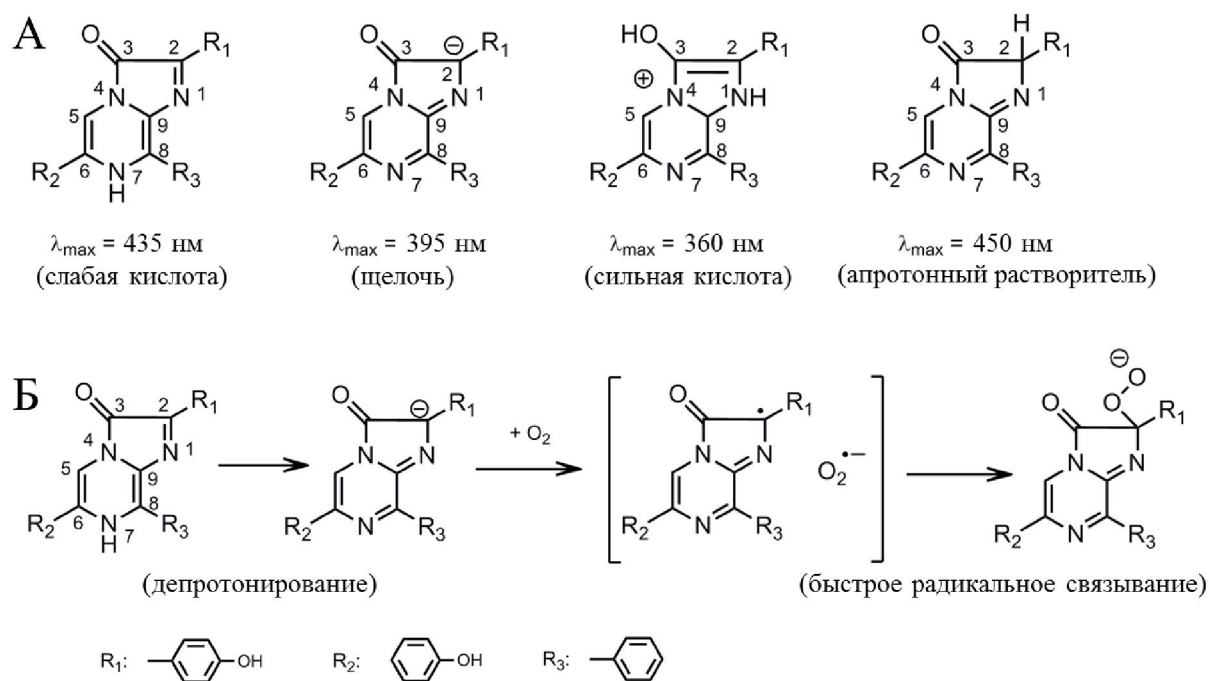


Рисунок 5.2 – А – Таутомерные и ионные формы целентеразина в различных растворителях с разным уровнем pH [Hori et al., 1975].

Б – Предполагаемый механизм формирования пероксид-аниона целентеразина [Kondo et al., 2005].

### 5.3 Взаимодействие свободного целентеразина с кислородом

Целентеразин излучает свет в присутствии кислорода при растворении в апротонных растворителях, содержащих следовые количества основания. Было предположено, что первым шагом в этом процессе является

депротонирование основанием целентеразина в N7-положении, с образованием его C2(-)-анионной формы [Goto, 1968; Kondo et al., 2005]. Затем кислород связывается с C2-углеродом целентеразина, что приводит к образованию пероксид-аниона (рис. 5.2Б), который после циклизации превращается в диоксиэтанон. Причем последний быстро разлагается с выделением  $\text{CO}_2$ , генерируя тем самым синглетное возбужденное состояние продукта [Kondo et al., 2005].

На рисунке 5.3 показаны изменения в спектре поглощения целентеразина при pH 7,8, после того как образец стал доступен кислороду.

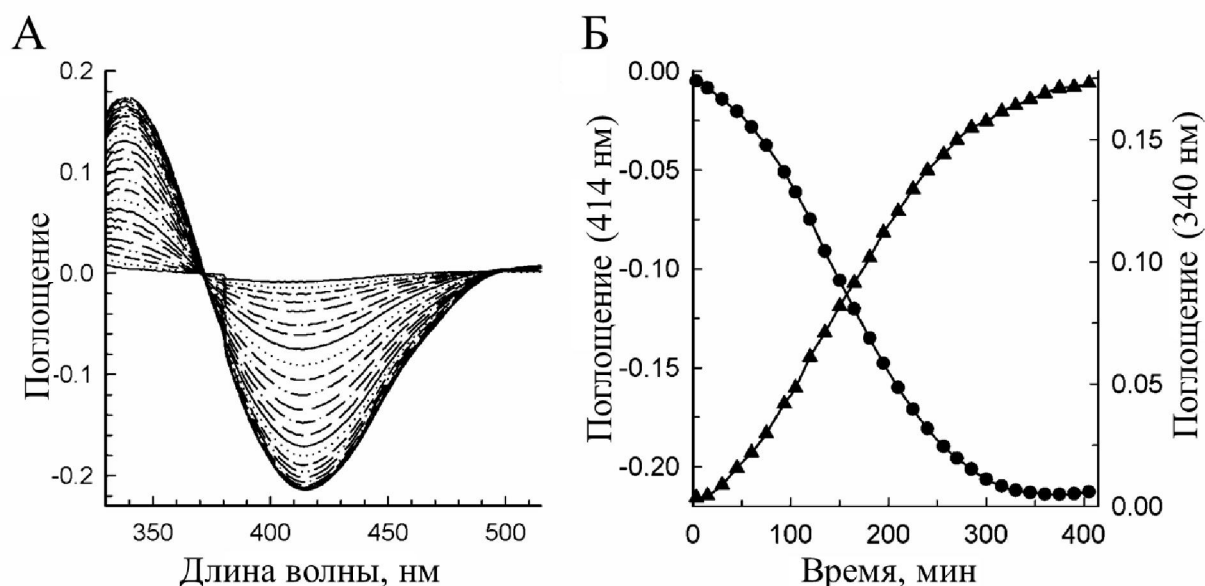


Рисунок 5.3 – Изменение таутомерной формы целентеразина в присутствии кислорода при pH 7,8. А – Дифференциальный спектр поглощения.

Б – Кинетика преобразования целентеразина при 340 нм (▲) и 414 нм (●).

Спектральные измерения проводились в течение 435 минут (первые 30 минут через каждые 5 минут, затем через каждые 15 минут). Проводились измерения образца в открытой кювете против анаэробного образца в закрытой кювете. Перед измерениями образец тщательно перемешивали для насыщения раствора кислородом. Концентрация целентеразина 25 мкМ.

После контакта с воздухом в растворе целентеразина увеличивается поглощение на  $\sim 340$  нм, которое, по сути, отображает появление хемиллюминесцентного продукта реакции, целентерамида. С другой стороны, происходит уменьшение поглощения на 414 нм, которое описывает снижение количества некоторых таутомерных форм целентеразина при pH 7,8 (рис. 5.2А).

Также необходимо отметить, что кинетика изменения спектра поглощения (рис. 5.3) сигмоидная. Протонированная таутомерная форма целентеразина, которая присутствует в растворе при pH 6,5 (в соответствии со спектральными данными, рис. 5.1), тоже взаимодействует с кислородом. Когда анаэробный целентеразин в растворе с pH 6,5 стал доступен кислороду, на  $\sim 340$  нм максимум спектра поглощения увеличился, а на 430 нм – уменьшился (спектральные данные не приведены).

5.4 Спектральные свойства анаэробного апо-обелин–целентеразинового комплекса. Кинетика превращения апо-обелин–целентеразинового комплекса в активный фотопротеин

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 [Eremeeva et al., 2009]. Активный обелин, связанный с 2-гидропероксицелентеразином, имеет максимум поглощения на 470 и плечо на 310 нм [Eremeeva et al., 2009]. Спектр поглощения анаэробного апо-обелин–целентеразинового комплекса имеет максимум на 355 и плечо на 400 нм, которое может быть объяснено связанным целентеразином (рис. 5.4А). В анаэробных условиях в запечатанной кювете спектр поглощения не претерпел сильных изменений даже после нескольких часов инкубирования (рис. 5.4А).



максимума поглощения с 355 до значения 345 нм, а также появления нового пика поглощения на ~470 нм, который объясняется наличием 2-гидропероксицелентеразина (рис. 5.4Б). Кажущиеся константы скорости, рассчитанные, исходя из изменения поглощений на 400 и 470 нм, имеют значения  $k_{400\text{нм}} = (5.3 \pm 0.3) \times 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$  и  $k_{470\text{нм}} = (8.6 \pm 0.6) \times 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$ . Для исключения возможного лимитирующего эффекта на скорость образования активного фотопротеина, вызванного скоростью диффузии кислорода в образец, также был проведен дополнительный эксперимент с альтернативным способом насыщения образца кислородом. Для этого концентрированный анаэробный образец апо-обелин–целентеразинового комплекса был в 10 раз разведен буфером, насыщенным кислородом, а полученная смесь тщательно перемешана. После этого был измерен дифференциальный спектр поглощения полученного образца против буфера, в котором проводилось разбавление (рис. 5.5А).

Полученные результаты позволили сделать заключение об отсутствии значимых различий между двумя проведенными экспериментами по активации анаэробного комплекса кислородом (рис. 5.4 и рис. 5.5А). В обоих случаях плечо на 400 нм со временем исчезает, происходит смещение максимума поглощения с 355 до 345 нм, а также появляется новый пик поглощения на ~470 нм. Однако кажущиеся константы скорости  $k_{400\text{нм}}$  и  $k_{470\text{нм}}$ , определенные с использованием результатов второго эксперимента ( $9.0 \pm 0.05 \times 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$  и  $14.0 \pm 0.3 \times 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$ , соответственно, рис. 5.5Б), превышают значения, рассчитанные по представленным на рисунке 5.4Б данным. Это указывает на зависимость кажущейся скорости от концентрации кислорода. Следует отметить, что соотношение  $k_{400\text{нм}}/k_{470\text{нм}}$  примерно одинаково в обоих случаях, то есть кажущиеся константы скорости, вычисленные по изменению абсорбции при 470 нм в 1,5 – 1,6 раза выше, чем определенные по изменению абсорбции при 400 нм.

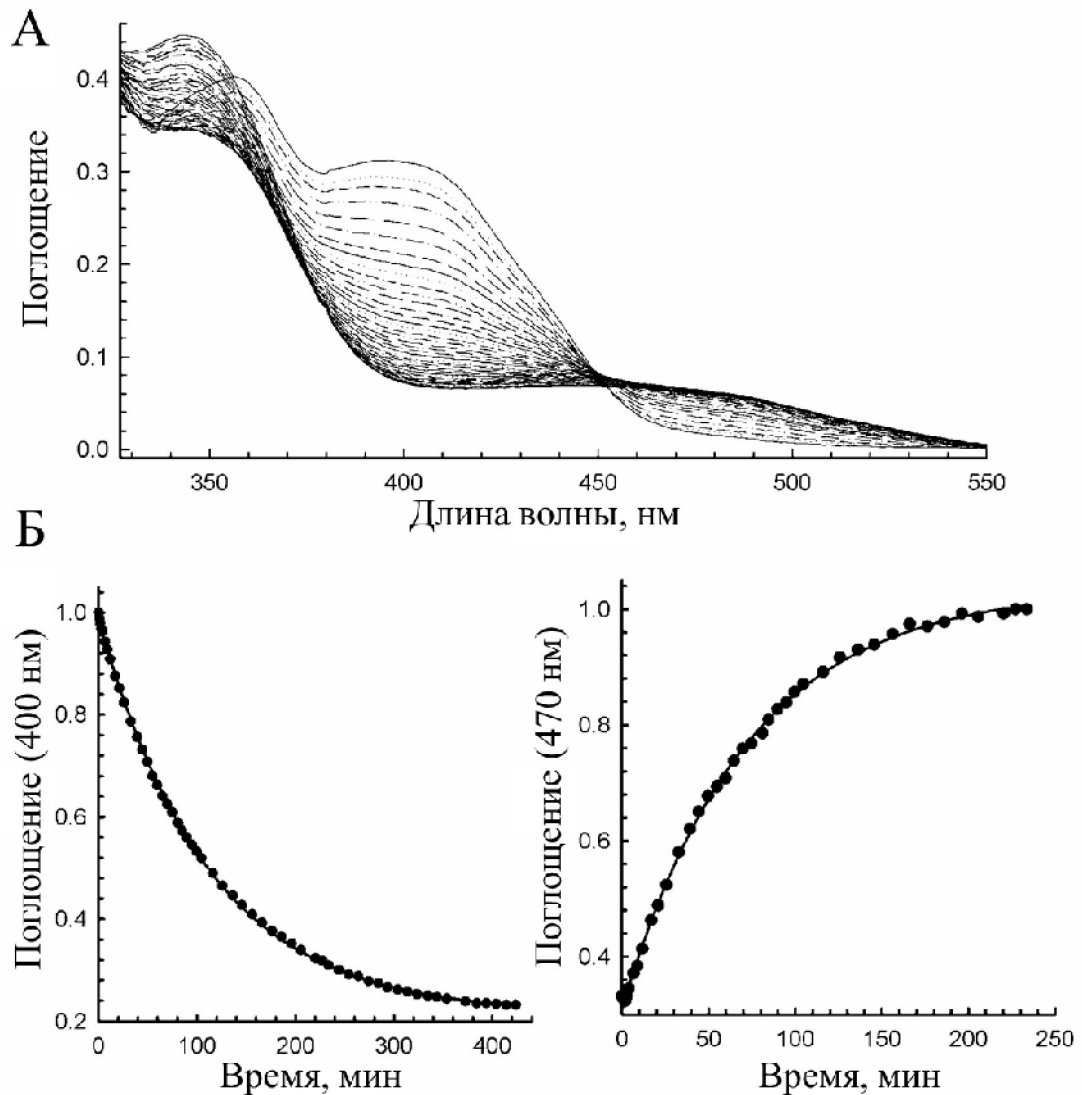


Рисунок 5.5 – Взаимодействие анаэробного апо-обелин–целентеразинового комплекса с кислородом. А – Изменения спектра поглощения образца в процессе его насыщения кислородом. Спектральные измерения проводились в течение 430 минут (первые 10 минут через каждую минуту, затем через каждые 10 минут). Б – Кинетика превращения комплекса в активный фотопроtein, измеренная при поглощении на 400 нм (слева) и на 470 нм (справа). Концентрация анаэробного комплекса 68 мкМ.

Поскольку увеличение поглощения на 470 нм соответствует накоплению 2-гидропероксицелентеразина в субстрат-связывающей полости обелина, мы сравнили кинетику образования активного обелина, отслеживаемую по

поглощению при 470 нм, с данными, определенными по уровню биолюминесценции (рис. 5.6). Концентрированный анаэробный образец апо-обелин–целентеразинового комплекса был разбавлен в 10 раз буфером, насыщенным кислородом, а полученная смесь тщательно перемешана. Затем через равные промежутки времени бралась аликвота, и измерялся уровень биолюминесцентного сигнала. По полученным данным была построена кинетика образования активного фотопротеинового комплекса. Кажущаяся константа скорости образования активного фотопротеинового комплекса по биолюминесцентному сигналу ( $k_{BL}$ ) равна  $24.7 \pm 1.4 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ , что несколько выше, чем константа образования активного фотопротеинового комплекса, рассчитанная по изменению поглощения на 470 нм ( $14.0 \pm 0.3 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ).

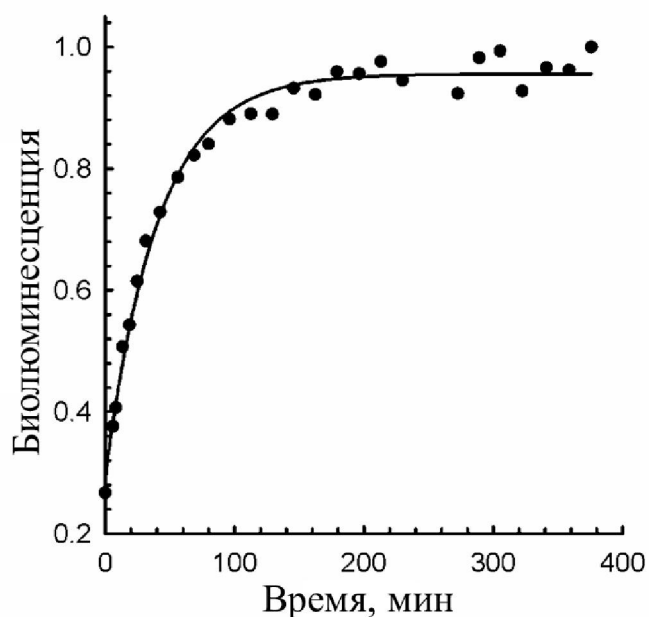


Рисунок 5.6 – Кинетика превращения апо-обелин–целентеразинового комплекса в активный фотопроtein, построенная по уровню биолюминесцентного сигнала образца. Концентрация анаэробного комплекса 74 мкМ.

## 5.5 Определение ионной формы целентеразина, связанного с анаэробным апо-обелин–целентеразиновым комплексом

Сравнение спектральных свойств свободного целентеразина и апо-обелин–целентеразинового комплекса при рН 7,8 позволило сделать некоторые предположения о молекулярной структуре производного целентеразина, связанного с анаэробным комплексом. Спектры поглощения свободного целентеразина при рН 7,8 в анаэробных условиях (рис. 5.1) и анаэробного апо-обелин–целентеразинового комплекса (рис. 5.4А) очень похожи, но не идентичны. Максимум спектра поглощения свободного анаэробного целентеразина наблюдается при  $\sim 410$  нм, в свою очередь, анаэробный апо-обелин–целентеразиновый комплекс имеет максимум при  $\sim 400$  нм. Спектр поглощения целентеразина при рН 7,8, как принято считать, представляет собой смесь протонированных и ионных форм, поэтому можно предположить, что целентеразин, связанный в анаэробном комплексе, может находиться в равновесии между N7-протонированной и C2-анионной формами.

В ходе превращения апо-обелин–целентеразинового комплекса в активный обелин появилась новая полоса поглощения на  $\sim 470$  нм, характерная для 2-гидропероксицелентеразина. Также исчезло плечо на 400 нм (рис. 5.4 Б), что может быть связано с уменьшением количества целентеразина, связанного в анаэробном апо-обелин–целентеразиновом комплексе. Кажущиеся константы скорости  $k_{400\text{нм}}$  и  $k_{470\text{нм}}$  в обоих поставленных экспериментах различны (рис. 5.4Б и рис. 5.5Б). Тем не менее, соотношение  $k_{400\text{нм}}/k_{470\text{нм}}$  не зависит от концентрации кислорода, так как кажущиеся константы скорости, определенные из изменений поглощения при 470 нм, примерно в 1,5 выше, чем при 400 нм. Если целентеразин, связанный в анаэробном комплексе, представляет собой смесь C2(-)-анионной и N7-протонированной форм и  $k_{400\text{нм}}$  медленнее, чем  $k_{470\text{нм}}$ , можно предположить, что оба этапа кислород-зависимые, и что



формирование 2-гидропероксицелентеразина может смещать равновесие между исходными формами. Процесс взаимодействия фотопротеина с кислородом является довольно медленным [Shimomura, Johnson, 1975] и, очевидно, зависит от способа приготовления белкового образца и условий реакции. В противоположность этому, многие монооксигеназы и оксидазы, как правило, очень быстро реагируют с кислородом [Massey, 1994]. Превращение апо-обелин–целентеразинового комплекса в фотопротеин зависит от концентрации кислорода, поэтому диффузия  $O_2$  в сайт связывания может быть фактором, определяющим скорость процесса. Хотя диффузия кислорода в воде происходит достаточно быстро [Lakowicz, 2006], диффузия кислорода через белковые каналы фермента может быть значительно затруднена в силу стерических ограничений. [Klinman, 2007; Leferink et al., 2009] В случае апо-обелин–целентеразинового комплекса диффузия кислорода может быть дополнительно ограничена отсутствием дискретных кислородных каналов, ведущих к внутреннему целентеразин-связывающему сайту. [Liu et al., 2000; Head et al., 2000; Liu et al., 2003] Таким образом, образование активного обелина включает быстрое связывание и повторное уравнивание таутомерных форм целентеразина с последующим медленным введением молекулярного кислорода и формированием 2-гидропероксицелентеразина.

#### 5.6 His175 как возможный переносчик протона

Так как активный фотопротеин образуется при нейтральном рН из апобелка, целентеразина и кислорода, вполне вероятно, что аминокислотные остатки активного центра белка могут выступать в качестве кислоты или основания в процессе формирования 2-гидропероксицелентеразина. В соответствии с данными, полученными при анализе кристаллических структур обелина и акворина [Liu et al., 2000; Head et al., 2000; Liu et al., 2003], His175 в обелине (His169 в акворине) находится недалеко от C2-атома

целентеразина в С-концевой спирали, которая, взаимодействуя с N-концевой спиралью, закрывает субстрат-связывающую полость (рис. 5.7). Этот His остаток имеет решающее значение для биолюминесценции фотопротеинов, поскольку его замена на Ala, Phe или Trp приводила к полной потере активности биолюминесценции. В то же время, после модификации других гистидиновых остатков были получены мутантные фотопротеины с различным уровнем биолюминесцентной активности. [Ohmiya, Tsuji, 1993; Ereemeeva et al., 2007]. 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 [Prokop et al., 2003; Steiner et al., 2010; Fetzner et al., 2010]. В этих ферментах гистидин играет ключевую роль в системе передачи протона, действуя в качестве сильного основания и донора/акцептора протонов.

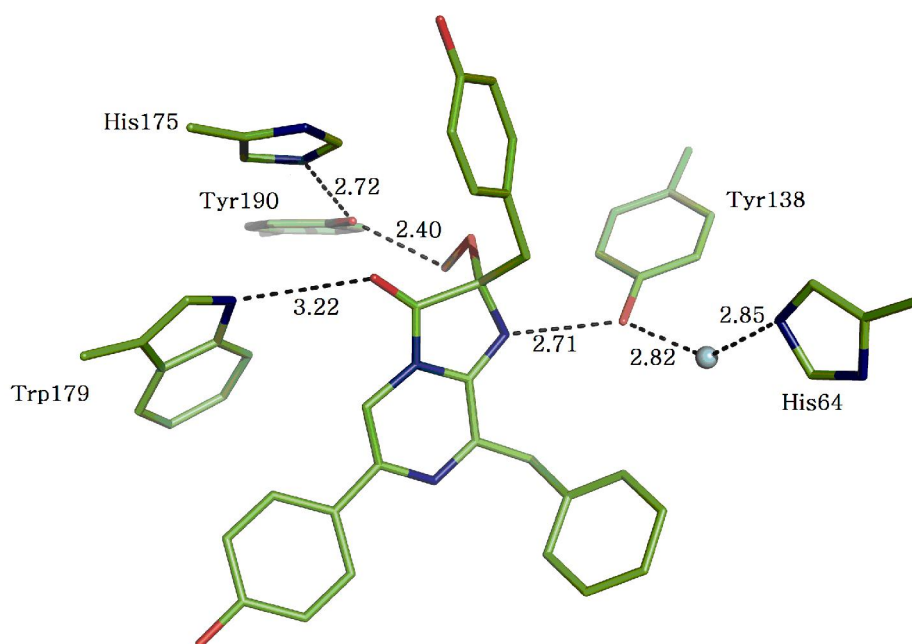


Рисунок 5.7 – Аминокислотные остатки, окружающие 2-гидропероксицелентеразин в молекуле обелина (PDB код 1QV0). Молекула воды показана в виде сферы серого цвета. Водородные связи показаны в виде пунктирных линий. Расстояния даны в ангстремах.

Исследование зависимости скорости образования активного фотопротеинового комплекса от рН показало, что при кислых и близких к физиологическим значениям рН скорость образования активного фотопротеина находится на максимальном уровне, тогда как при щелочных рН заметно снижается (рис. 5.8).

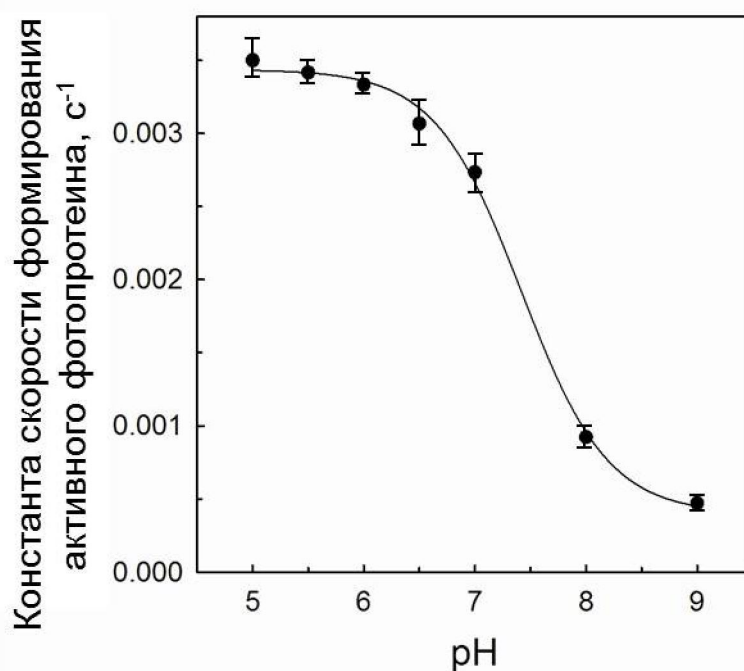


Рисунок 5.8 – Скорость образования активного фотопротеинового комплекса в зависимости от рН.

Как известно, имидазольное кольцо гистидина протонируется уже при слабокислых значениях рН, то есть в диапазоне рН 5 – 6 гистидин существует в протонированном состоянии. Поэтому, принимая во внимание информацию о свойствах мутантов обелина с заменой His175 [Eremeeva et al., 2013], а также результаты квантово-химического моделирования образования активного фотопротеина [Tomilin et al., 2010; Tomilin et al., 2012], можно сделать заключение, что в  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых фотопротеинах His играет ключевую роль в образовании активного фотопротеина, выполняя функцию переносчика протона от N7-атома целентеразина на пероксид-анион

(рис. 5.2Б) с образованием 2-гидропероксицелентеразина. Описанный процесс сопровождается конформационными перестройками молекулы белка, приводящими к формированию активного фотопротеина.

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.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленная работа посвящена выяснению роли отдельных аминокислотных остатков активного центра  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых фотопротеинов в реакции билюминесценции.

Билюминесцентная реакция  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых фотопротеинов фактически является процессом, включающим две стадии. На первом этапе происходит формирование активного фотопротеинового комплекса из апофотопротеина и целентеразина, в процессе которого связанный целентеразин конвертируется в 2-гидропероксицелентеразин. Второй этап представляет собой индуцируемый ионами кальция процесс декарбоксилирования 2-гидропероксицелентеразина, связанного в активном центре белка, который сопровождается образованием продукта в возбужденном состоянии и излучением кванта света.

В результате проведения оригинальных экспериментов в анаэробных условиях была впервые показана возможность формирования прочного комплекса между апофотопротеином и целентеразином в отсутствие кислорода. Также были получены данные о спектральных особенностях анаэробного апо-обелин–целентеразинового комплекса и измерена кинетика формирования активного фотопротеина в процессе взаимодействия данного комплекса кислородом. Полученные данные позволили дополнить и уточнить гипотезу об образовании активного фотопротеинового комплекса и выделить ключевую роль His175 как переносчика протона в этом процессе.

В результате проведенных экспериментов были впервые определены и охарактеризованы пространственные кристаллические структуры мутантов обелина Y138F и F88Y в двух конформационных состояниях – до и после билюминесцентной реакции, т.е. соответственно со связанными субстратом, 2-гидропероксицелентеразином, и продуктом, целентерамидом, и ионами кальция. Анализ пространственных структур мутанта обелина Y138F и исследование его билюминесцентных свойств показали, что молекула воды,

расположенная в субстрат-связывающей полости фотопротеинов, необходима для реакции декарбоксилирования 2-гидропероксицелентеразина и формирования первичного эмиттера в биолюминесценции фотопротеинов кишечнорастворимых, а также позволили сделать заключение, что Tyr138 необходим для оптимального позиционирования молекулы воды относительно субстрата для обеспечения максимальной скорости биолюминесцентной реакции. Анализ пространственных структур мутанта обелина F88Y и их сравнение 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, которая определяется присутствием в полости белка Phe или Tyr.

Таким образом, результаты исследований, описанные в данной работе, вносят вклад в детальное понимание механизма биолюминесцентной реакции  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых фотопротеинов, а также в установление функциональной роли отдельных аминокислот активного центра в этом процессе. В дальнейшем полученные результаты могут найти применение в фундаментальных и прикладных исследованиях.

В заключение выражаю глубокую благодарность своему научному руководителю к.б.н. Е.С. Высоцкому, а также моим коллегам из лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН за помощь в постановке и проведении экспериментов, интерес к работе и обсуждение полученных результатов.

## 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  $\text{Ca}^{2+}$ . 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 фотопротейна и положение основных аминокислот активного центра, но приводит к исчезновению молекулы воды из субстрат-связывающей полости обелина. На основе анализа структуры субстрат-связывающей полости  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного мутанта обелина Y138F и ее сравнения с таковой  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженном обелине дикого типа. В результате анализа структуры  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного мутанта обелина Y138F сделано заключение, что молекула воды появляется во внутренней полости молекулы мутанта обелина через соединяющее 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 ( $\lambda_{\max} = 490$  нм) и уменьшению в 1,6 раза константы скорости подъема ( $k_{\text{rise}} = 305,3 \pm 1,4 \text{ c}^{-1}$ ) биолюминесцентного сигнала. 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 диоксиэтанового 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  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного обелина F88Y со связанным целентерамидом и ионами  $\text{Ca}^{2+}$  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 рН 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:  $k_{400\text{нм}} = 9,0 \pm 0,05 \times 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$ ,  $k_{470\text{нм}} = 14,0 \pm 0,3 \times 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$  и  $k_{\text{BL}} = 24,7 \pm 1,4 \times 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$ . 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 рН. Установлено, что максимальная скорость наблюдается в диапазоне рН 5 – 6. Исходя из результатов по скорости формирования активного фотопротеинового комплекса, донорно-акцепторных свойств His при различных рН, 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.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бондарь, В.С. Физико-химические свойства фотопротейна из гидроидного полипа *Obelia longissima* / В.С. Бондарь, К.П. Трофимов, Е.С. Высоцкий // Биохимия. – 1992. – Т. 57. – С. 1481-1490.
2. Высоцкий, Е.С. Выделение и очистка  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого фотопротейна – обелина из гидроидных полипов *Obelia longissima* / Е.С. Высоцкий, В.С. Бондарь, В.Н. Летунов // Биохимия. – 1989. – Т. 54. – С. 965-973.
3. Высоцкий, Е.С. Кальций-регулируемые фотопротейны морских кишечнополостных / Е.С. Высоцкий, С.В. Маркова, Л.А. Франк // Молекулярная биология. – 2006. – Т. 40, №3. – С. 404-417.
4. Илларионов, В.А. Клонирование и экспрессия кДНК кальций-активируемого фотопротейна из гидроидного полипа *Obelia longissima* / В.А. Илларионов, С.В. Маркова, В.С. Бондарь, Е.С. Высоцкий, И.И. Гительзон // Докл. Акад. наук. – 1992. – Т. 326. – С.911-913.
5. Adams, P.D. PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination / P.D. Adams, R.W. Grosse-Kunstleve, L.W. Hung, T.R. Ioerger, A.J. McCoy, N.W. Moriarty, R.J. Read, J.C. Sacchettini, N.K. Sauter, T.C. Terwilliger // Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. – 2002. – V. 58 (Pt 11). – P. 1948-1954.
6. Adams, P.D. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution / P.D. Adams, P.V. Afonine, G. Bunkóczy, V.B. Chen, I.W. Davis, N. Echols, J.J. Headd, L.-W. Hung, G.J. Kapral, R.W. Grosse-Kunstleve, A.J. McCoy, N.W. Moriarty, R. Oeffner, R.J. Read, D.C. Richardson, J.S. Richardson, T.C. Terwilliger, P.H. Zwart // Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. – 2010. – V. 66(Pt 2). – P. 213-221.
7. Ahmad, I. Effect of light intensity and wavelengths on photodegradation reactions of riboflavin in aqueous solution / I. Ahmad, Q. Fasihullah, F.H. Vaid // J. Photochem. Photobiol. B. – 2006. – V. 82. – P. 21-27.

8. Allen, D.G. Aequorin luminescence: relation of light emission to calcium concentration - a calcium independent component / D.G. Allen, J.R. Blinks, F.G. Prendergast // *Science*. – 1977. – V. 195. – P. 996-998.
9. Alvarez, J. Measuring [Ca<sup>2+</sup>] in the endoplasmic reticulum with aequorin / J. Alvarez, M. Montero // *Cell Calcium*. – 2002. – V. 32(5-6). – 251-260.
10. Aghamaali, M.R. Cloning, sequencing, expression and structural investigation of mnemiopsin from *Mnemiopsis leidyi*: an attempt toward understanding Ca<sup>2+</sup>-regulated photoproteins / M.R. Aghamaali, V. Jafarian, R. Sariri, M. Molakarimi, B. Rasti, M. Taghdir, R.H. Sajedi, S. Hosseinkhani // *Protein J*. – 2011. – V. 30(8). – P. 566-574.
11. Anctil, M. Mechanism of photoinactivation and re-activation in the bioluminescence system of the ctenophore *Mnemiopsis* / M. Anctil, O. Shimomura // *Biochem. J*. – 1984. – V. 221. – P. 269-272.
12. Berman, H.M. The Protein Data Bank / H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne // *Nucleic Acids Res*. – 2000. – V. 28. – P. 235-242.
13. Blinks, J.R. Measurement of Ca<sup>2+</sup> concentrations in living cells / J.R. Blinks, W.G. Wier, P. Hess, F.G. Prendergast // *Prog Biophys Mol Biol*. – 1982. – V. 40(1-2). – P. 1-114.
14. Blinks, J.R. Sarcoplasmic reticulum function in intact cells: information from intracellular Ca<sup>2+</sup> indicators / J.R. Blinks // *Sarcoplasmic Reticulum in Physiology, Muscle*. – 1986. – V. 2. – P. 73-107.
15. Bondar V.S. Bioluminescent activity of the recombinant obelin after chemical modification of histidine and cysteine residues / V.S. Bondar, L.A. Frank, N.P. Malikova, E.V. Inzhevatkin, V.A. Illarionova, E.S. Vysotski // In: *Bioluminescence and Chemiluminescence: Perspectives for the 21st century*. Eds Roda A., Pazzagli M., Kricka L.J., Stanley P.E. Chichester: John Wiley & Sons, – 1999. – P. 400-403.

16. Campbell, A. K. Extraction, partial purification and properties of obelin, the calcium-activated luminescent protein from the hydroid *Obelia geniculata* / A. K. Campbell // *Biochem. J.* – 1974. – V. 143. – P. 411-418.
17. Charbonneau, H.  $\text{Ca}^{2+}$ -induced bioluminescence in *Renilla reniformis*. Purification and characterization of a calcium-triggered luciferin-binding protein / H. Charbonneau, M.J. Cormier // *J. Biol. Chem.* – 1979. – V. 254. – P. 769-780.
18. Charbonneau, H. Amino acid sequence of the calcium-dependent photoprotein aequorin / H. Charbonneau, K.A. Walsh, R.O. McCann, F.G. Prendergast, M.J. Cormier, T.C. Vanaman // *Biochemistry.* – 1985. – V. 24. – P. 6762-6771.
19. Cormier, M.J. Evidence for identity of the luminescent system of *Porichthys porosissimus* (fish) and *Cypridina hilgendorffii* (crustacean) / M.J. Cormier, J.M. Crane, Y. Nakano // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1967. – V. 29. – P. 747-752.
20. Cormier, M.J. Evidence for similar biochemical requirements for bioluminescence among the coelenterates / M. J. Cormier, K. Hori, Y.D. Karkhanis, J.M. Anderson, J.E. Wampler, J.G. Morin, J.W. Hastings // *J. Cell. Physiol.* – 1973. – V. 81. – P. 291-297.
21. Deng, L. Structural basis for the emission of violet bioluminescence from a W92F obelin mutant / L. Deng, E.S. Vysotski, Z.-J. Liu, S.V. Markova, N.P. Malikova, J. Lee, J. Rose, B.-C. Wang // *FEBS Lett.* – 2001. – V. 506. – P. 281-285.
22. Deng, L. Crystal structure of a  $\text{Ca}^{2+}$ -discharged photoprotein: implications for mechanisms of the calcium trigger and bioluminescence / L. Deng, S.V. Markova, E.S. Vysotski, Z.-J. Liu, J. Lee, J. Rose, B.-C. Wang // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – P. 33647-33652.
23. Deng, L. Preparation and X-ray crystallographic analysis of the  $\text{Ca}^{2+}$ -discharged photoprotein obelin / L. Deng, S.V. Markova, E.S. Vysotski, Z.-

- J. Liu, J. Lee, J. Rose, B.-C. Wang // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* – 2004. – V. 60(Pt 3). – P. 512-514.
24. Deng, L. All three Ca<sup>2+</sup>-binding loops of photoproteins bind calcium ions: the crystal structures of calcium-loaded apo-aequorin and apo-obelin / L. Deng, E. S.Vysotski, S. V Markova, Z.-J. Liu, J. Lee, J. Rose, B.-C. Wang // *Protein Sci.* – 2005. – V. 14. – P. 663-675.
25. Emsley P. Coot: model-building tools for molecular graphics / P. Emsley, K. Cowtan // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* – 2004. – V. 60(Pt 12 Pt 1). – P. 2126-2132.
26. Ereemeeva, E.V. The main function of His175, Trp179 and Tyr190 residues of the obelin binding site is to stabilize the hydroperoxy-coelenterazine intermediate / E.V. Ereemeeva, S.V. Markova, L.A. Frank, E.S. Vysotski // *In Bioluminescence & Chemiluminescence: Chemistry, Biology and Application* (Szalay, A.A., Hill, P.J., Kricka, L.J. and Stanley, P.E., eds.). – Singapore, World Scientific. – 2007. – P. 7-10.
27. Ereemeeva, E.V. The intrinsic fluorescence of apo-obelin and apo-aequorin and use of its quenching to characterize coelenterazine binding / E.V. Ereemeeva, S.V. Markova, A.H. Westphal, A.J. Visser, W.J. van Berkel, E.S. Vysotski // *FEBS Lett.* – 2009. – V. 583(12). – P. 1939-44.
28. Ereemeeva, E.V. Ligand binding and conformational states of the photoprotein obelin / E.V. Ereemeeva, E.S. Vysotski, A.H. Westphal, C.P. van Mierlo, W.J. van Berkel // *FEBS Lett.* – 2012. – V. 586(23). – P. 4173-4179
29. Ereemeeva, E.V. Role of key residues of obelin in coelenterazine binding and conversion into 2-hydroperoxy adduct / E.V. Ereemeeva, S.V. Markova, W.J. van Berkel, E.S. Vysotski // *J Photochem Photobiol B.* – 2013. – V. 127. – P. 133-139.
30. Ereemeeva, E.V. Bioluminescent and spectroscopic properties of His-Trp-Tyr triad mutants of obelin and aequorin / E.V. Ereemeeva, S.V. Markova, L.A.

- Frank, A.J. Visser, W.J. van Berkel, E.S. Vysotski // *Photochem Photobiol Sci.* – 2013. – V. 12(6). – P. 1016-1024.
31. Fagan, T.F. Cloning, expression and sequence analysis of cDNA for the Ca<sup>2+</sup>-binding photoprotein, mitrocomin / T.F. Fagan, Y. Ohmiya, J.R. Blinks, S. Inouye, F.I. Tsuji // *FEBS Lett.* – 1993. – V. 1. – P. 301-305.
32. Falke, J. J. Molecular tuning of ion binding to calcium signaling proteins / J.J. Falke, S.K. Drake, A.L. Hazard, O.B. Peersen // *Quart. Rev. Biophys.* – 1994. – V. 27. – P. 219-290.
33. Fetzner, S. Cofactor-independent oxidases and oxygenases / S. Fetzner, R.A. Steiner // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – V. 86. – P. 791-804.
34. Frank, L.A. Violet and greenish photoprotein obelin mutants for reporter applications in dual-color assay / L.A. Frank, V.V. Borisova, S.V. Markova, N.P. Malikova, G.A. Stepanyuk, E.S. Vysotski // *Anal Bioanal Chem.* – 2008. – V. 391(8). – P. 2891-2896.
35. Girsch, S.J. The properties of mnemiopsin, a bioluminescent and light sensitive protein purified by hollow fiber techniques / S.J. Girsch, J.W. Hastings // *Mol. Cell. Biochem.* – 1978. – V. 19. – P. 113-124.
36. Goto, T. Chemistry of bioluminescence / T. Goto // *Pure Appl. Chem.* – 1968. – V. 17. – P. 421-441.
37. Goto, T. Cypridina bioluminescence. IV. Synthesis and chemiluminescence of 3,7-dihydroimidazo[1,2-a]pyrazin-3-one and its 2-methyl derivative / T. Goto, S. Inoue, S. Sugiura // *Tetrahedron Lett.* – 1968. – P. 3873-3876.
38. Haddock, S.H. Bioluminescence in the sea / S.H. Haddock, M.A. Moline, J.F. Case // *Ann Rev Mar Sci.* – 2010. – V. 2. – P. 443-493.
39. Hastings, J.W. Intermediates in the bioluminescent oxidation of reduced flavin mononucleotide / J.W. Hastings, Q.H. Gibson // *J. Biol.Chem.* – 1963. – V. 238. – P. 2537-2554.

40. Hastings, J.W. Calcium-triggered light emission in *Renilla*. A unitary biochemical scheme for coelenterate bioluminescence / J.W. Hastings, J.G. Morin // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1969. – V. 37. – P. 493-498.
41. Hastings, J.W. Response of aequorin bioluminescence to rapid changes in calcium concentration / J.W. Hastings, G. Mitchell, P.H. Mattingly, J.R. Blinks, M. Van Leeuwen // *Nature.* – 1969. – V. 222 (5198). – P. 1047-1050.
42. Head, J.F. The crystal structure of the photoprotein aequorin at 2.3 Å resolution // J.F. Head, S. Inouye, K. Teranishi, O. Shimomura // *Nature.* – 2000. – V. 405. – P. 372-376.
43. Hirano, T. The reaction mechanism for the high quantum yield of *Cypridina* (*Vargula*) bioluminescence supported by the chemiluminescence of 6-aryl-2-methylimidazo[1,2-a]pyrazin-3(7H)-ones (*Cypridina* luciferin analogues) / T. Hirano, Y. Takahashi, H. Kondo, S. Maki, S. Kojima, H. Ikeda, H. Niwa // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2008. – V. 7. – P. 197-207.
44. Hori, K. Identification of the product excited states during the chemiluminescent and bioluminescent oxidation of *Renilla* (sea pansy) luciferin and certain of its analogs / K. Hori, J.E. Wampler, J.C. Matthews, M.J. Cormier // *Biochemistry.* – 1973. – V. 12. – P. 4463-4468.
45. Hori, K. *Renilla* luciferin as the substrate for calcium induced photoprotein bioluminescence. Assignment of luciferin tautomers in aequorin and mnemiopsis / K. Hori, J.M. Anderson, W.W. Ward, M.J. Cormier // *Biochemistry.* – 1975. – V.14. – P. 2371-2376.
46. Hori, K. Structure of native *Renilla reniformis* luciferin / K. Hori, H. Charbonneau, R.C. Hart, M.J. Cormier // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1977. – V. 74. – P. 4285-4287.
47. Illarionov B.A. Sequence of the cDNA encoding the Ca<sup>2+</sup>-activated photoprotein obelin from the hydroid polyp *Obelia longissima* / B.A.

- Illarionov, V.S. Bondar, V.A. Illarionova, E.S. Vysotski. // Gene. – 1995. – V. 153. – P.273-274.
48. 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 // Methods of enzymology. – 2000. – V. 305. – P. 223-249.
49. Imai, Y. Fluorescence properties of phenolate anions of coelenteramide analogues: the light-emitter structure in aequorin bioluminescence / Y. Imai, T. Shibata, S. Maki, S. Niwa, M. Ohashi, T. Hirano // Photochem. Photobiol. A. – 2001. – V. 146. – P. 95-107.
50. Inouye, S. Cloning and sequence analysis of cDNA for the luminescent protein aequorin / S. Inouye, M. Noguchi, Y. Sakaki, Y. Takagi, T. Miyata, S. Iwanaga, T. Miyata, F.I. Tsuji // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1985. – V. 82. – P. 3154-3158.
51. Inouye, S. Expression of apoaequorin complementary DNA in *Escherichia coli*. / S. Inouye, Y. Sakaki, Y. Goto, F.H. Tsuji // Biochemistry. – 1986. – V. 25. – P. 8425-8429.
52. Inouye, S. Cloning and sequence analysis of cDNA for the Ca<sup>(2+)</sup>-activated photoprotein, clytins / S. Inouye, F.I. Tsuji // FEBS Lett. – 1993. – V. 11. – P.343-346.
53. Inouye, S. Cloning, expression, purification and characterization of an isotype of clytin, a calcium-binding photoprotein from the luminous hydromedusa *Clytia gregarium* / S. Inouye // J Biochem. – 2008. – V. 143(5). – P. 711-717.
54. Ireland J.F. Acid–base properties of electronically excited states of organic molecules / J.F. Ireland, P.A.H. Wyatt // Adv. Phys. Org. Chem. – 1976. – V. 12. – P. 131-221.



55. Isobe, M. Synthesis of  $^{13}\text{C}$ -dehydrocoelenterazine and model studies on *Symplectoteuthis* squid bioluminescence / M. Isobe, M. Kuse, Y. Yasuda, H. Takahashi // *Bioorg Med Chem Lett.* – 1998. – V. 8(20). – P. 2919-2924.
56. Kawasaki, H. Classification and evolution of EF-hand proteins / H. Kawasaki, S. Nakayama, R.H. Kretsinger // *Biometals.* – 1998. – V. 11. – P. 277-295.
57. Klinman, J.P. How do enzymes activate oxygen without inactivating themselves? / J.P. Klinman // *Acc. Chem. Res.* – 2007. – V. 40. – P. 325-333.
58. Knight, M.R. Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium / M.R. Knight, A.K. Campbell, S.M. Smith, A.J. Trewavas // *Nature.* – 1991. – V. 352. P. 524-526.
59. Kretsinger, R. H. Carp muscle calcium binding protein. II. Structure determination and general description / R.H. Kretsinger, C.E. Nockolds // *J. Biol. Chem.* – 1973. – V. 248. – P. 3313-3326.
60. Kondo, H. Substituent effects on the kinetics for the chemiluminescence reaction of 6-arylimidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-ones (*Cypridina* luciferin analogues): support for the single electron transfer (SET)–oxygenation mechanism with triplet molecular oxygen / H. Kondo, T. Igarashi, S. Maki, H. Niwa, H. Ikeda, T. Hirano // *Tetrahedron Letters.* – 2005. – V. 46. – P. 7701-7704.
61. Kumar, S. Amino acid sequence of the  $\text{Ca}^{2+}$ -triggered luciferin binding protein of *Renilla reniformis* / S. Kumar, M. Harrylock, K.A. Walsh, M.J. Cormier, H. Charbonneau // *FEBS Lett.* – 1990. – V. 268. – P. 287-290.
62. Lakowicz, J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy / J.R. Lakowicz // Third Edition, Springer, Singapore. – 2006.
63. Leferink, N.G. Identification of a gatekeeper residue that prevents dehydrogenases from acting as oxidases / N.G. Leferink, M.W. Fraaije, H.J.

- Joosten, P.J. Schaap, A. Mattevi, W.J.H. van Berkel // J. Biol. Chem. – 2009. – V. 284. – P. 4392-4397.
64. 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. Rose, J. Lee, B.-C. Wang // Protein Sci. – 2000. – V. 9. – P. 2085-2093.
65. Liu, Z. J. Atomic resolution structure of obelin: soaking with calcium enhances electron density of the second oxygen atom substituted at the C2-position of coelenterazine / Z.J. Liu, E.S. Vysotski, L. Deng, J. Lee, J. Rose, B.C. Wang // –Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2003. – V. 311. – P. 433-439.
66. 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 // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2006. – V. 103. – P. 2570-2575.
67. Loening, A.M. Crystal structures of the luciferase and green fluorescent protein from *Renilla reniformis* / A.M Loening, T.D. Fenn, S.S. Gambhir // J Mol Biol. – 2007. – V. 374(4). –P. 1017-1028.
68. Lorenz, W.W. Isolation and expression of a cDNA encoding *Renilla reniformis* luciferase / W.W. Lorenz, R.O. McCann, M. Longiaru, M.J. Cormier // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1991. – V. 88. – P. 4438-4442.
69. Lu, C.Y. Electron transfer oxidation of tryptophan and tyrosine by triplet states and oxidized radicals of flavin sensitizers: a laser flash photolysis study / C.Y. Lu C, Y.Y. Liu // Biochem. Biophys. Acta. – 2002. – V. 1571. – P. 71-76.
70. Malikova, N. P. Spectral tuning of obelin bioluminescence by mutations of Trp92 / N.P. Malikova, G.A. Stepanyuk, L.A. Frank, S.V. Markova, E.S. Vysotski, J. Lee // FEBS Lett. – 2003. – V. 554. – P. 184-188.

71. Malikova, N.P. Green-fluorescent protein from the bioluminescent jellyfish *Clytia gregaria* is an obligate dimer and does not form a stable complex with the Ca(2+)-discharged photoprotein clytin / N.P. Malikova, N.V. Visser, A. van Hoek, V.V. Skakun, E.S. Vysotski, J. Lee, A.J. Visser // *Biochemistry*. – 2011. – V. 50. – P. 4232-4241.
72. Markova, S.V. Obelin hyperexpression in *E. coli*, purification and characterization // S.V. Markova, E.S. Vysotski, J. Lee // In *Bioluminescence and Chemiluminescence* (J.F. Case, P.J. Herring, B.H. Robison, S.H.D. Haddock, L.J. Kricka, P.E. Stanley, eds). – 2001. – P. 115-119. World Scientific Publishing Co., Singapore.
73. Markova, S.V. Obelin from the bioluminescent marine hydroid *Obelia geniculata*: cloning, expression, and comparison of some properties with those of other Ca<sup>2+</sup>-regulated photoproteins / S.V. Markova, E.S. Vysotski, J.R. Blinks, L.P. Burakova, B.-C. Wang, J. Lee // *Biochemistry*. – 2002. – V. 41. – P. 2227-2236.
74. Markova, S.V. Cloning and expression of cDNA for a luciferase from the marine copepod *Metridia longa* / S.V. Markova, S. Golz, L.A. Frank, B. Kalthof, E.S. Vysotski // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – P. 3212-3217.
75. Markova, S.V., Green-fluorescent protein from the bioluminescent jellyfish *Clytia gregaria*: cDNA cloning, expression, and characterization of novel recombinant protein / S.V. Markova, L.P. Burakova, L.A. Frank, S. Golz, K.A. Korostileva, E.S. Vysotski // *Photochem Photobiol Sci.* – 2010. – V. 9, – P. 757-765.
76. Markova, S.V. The light-sensitive photoprotein berovin from the bioluminescent ctenophore *Beroe abyssicola*: a novel type of Ca<sup>2+</sup>-regulated photoprotein / S.V. Markova, L.P. Burakova, S. Golz, N.P. Malikova, L.A. Frank, E.S. Vysotski // *FEBS J.* – 2012 – V. 279(5). – P. 856-870.
77. Massey, V. Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins / V. Massey // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269. P. 22459-22462.

78. Matthews, J.C. Purification and properties of *Renilla reniformis* luciferase / J.C. Matthews, K. Hori, M.J. Cormier // *Biochemistry*. – 1977. – V. 16. – P. 85-91.
79. McCapra, F. The chemiluminescence of *Cypridina* analogue / F. McCapra, Y.C. Chang // *Chem. Commun.* – 1967. – P. 1011-1012.
80. McCoy, A.J. Phaser crystallographic software / A.J. McCoy, R.W. Grosse-Kunstleve, P.D. Adams, M.D. Winn, L.C. Storoni, R.J. Read // *J Appl Crystallogr.* – 2007. – V. 40(Pt 4). – P. 658-674.
81. McPhalen, C. A. Calcium-binding sites in proteins: a structural perspective / C.A. McPhalen, N.C.J. Strynadka, M.N.G. James // *Advan. Protein Chem.* – 1991. – V. 42. – P. 77-144.
82. Mori, K. Real light emitter in the bioluminescence of the calcium-activated photoproteins aequorin and obelin: light emission from the singlet-excited state of coelenteramide phenolate anion in a contact ion pair / K. Mori, S. Maki, H. Niwa, H. Ikeda, T. Hirano // *Tetrahedron*. – 2006. – V. 62. – P. 6272-6288.
83. Morin, J.G. Biochemistry of the bioluminescence of colonial hydroids and other coelenterates / J.G. Morin, J.W. Hastings // *J. Cell. Physiol.* – 1971. – V. 77. – P. 305-312.
84. Morin, J.G. Coelenterate bioluminescence / J.G. Morin; edited by L. Muscatine, H.M. Lenhoff // *Coelenterate Biology: Reviews and New Perspectives*. – New York: Academic press, 1974. – P. 397-438.
85. Murshudov, G.N. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures / G.N. Murshudov, P. Skubák, A.A. Lebedev, N.S. Pannu, R.A. Steiner, R.A. Nicholls, M.D. Winn, F. Long, A.A. Vagin // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* – 2011. – V. 67(Pt 4). – P. 355-367.
86. Nakai, S. Fundamental studies on the structures and spectroscopic properties of imidazo[1,2-a]pyrazin-3(7H)-one derivatives / S. Nakai, M. Yasui, M.

- Nakazato, F. Iwasaki, S. Maki, H. Niwa, M. Ohashi, T. Hirano // Bull. Chem. Soc. Jpn. – 2003. – V. 76. – P. 2361-2387.
87. Nelson, M. R. Structures of EF-hand  $\text{Ca}^{2+}$ -binding proteins: diversity in the organization, packing and response to  $\text{Ca}^{2+}$  binding / M.R. Nelson, W.J. Chazin // Biometals. – 1998. – V. 11. – P. 297-318.
88. Ohmiya, Y. Two excited states in aequorin bioluminescence induced by tryptophan modification / Y. Ohmiya, M. Ohashi, F.I. Tsuji // FEBS Lett. – 1992. – V. 301. – P. 197-201.
89. Ohmiya Y. Bioluminescence of the  $\text{Ca}^{2+}$  binding photoprotein, aequorin, after histidine modification / Y. Ohmiya, F.I. Tsuji // FEBS Lett. – 1993. – V. 320. – P. 267-70.
90. Ohmiya, Y. Mass spectrometric evidence for a disulfide bond in aequorin regeneration / Y. Ohmiya, S. Kurono, M. Ohashi, T.F. Fagan, F.I. Tsuji // FEBS Lett. – 1993. – V. 332. – P. 225-228.
91. Ohmiya, Y. Shining the light: the mechanism of the bioluminescence reaction of calcium-binding photoproteins / Y. Ohmiya, T. Hirano // Chem. Biol. – 1996. – V. 3. – P. 337-347.
92. Otwinowski, Z. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode / Z. Otwinowski, W. Minor // Methods Enzymol. – 1997. – V. 276. – P. 307-326.
93. Powers, M.L. Expression and characterization of the calcium-activated photoprotein from the ctenophore *Bathocyroe fosteri*: insights into light-sensitive photoproteins / M.L. Powers, A.G. McDermott, N.C. Shaner, S.H. Haddock // Biochem Biophys Res Commun. – 2013. – V. 431(2). – P. 360-366.
94. Prasher, D. Cloning and expression of the cDNA coding for aequorin, a bioluminescent calcium-binding protein / D. Prasher, R.O. McCann, M.J. Cornier // Biochem.Biophys.Res.Comm. – 1985. – V. 126. – P.1259-1268.

95. Prasher, D.C. Sequence comparisons of complementary DNAs encoding aequorin isotypes / D.C. Prasher, R.O. McCann, M. Longiaru, M.J. Cormier // *Biochemistry*. – 1987. – V. 26(5). – P. 1326-1332.
96. Prokop, Z. Catalytic mechanism of the maloalkane dehalogenase LinB from *Sphingomonas paucimobilis* UT26 / Z. Prokop, M. Monincová, R. Chaloupková, M. Klvana, Y. Nagata, D.B. Janssen, J. Damborský // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278. P. 45094-45100.
97. Schnitzler, C.E. Genomic organization, evolution, and expression of photoprotein and opsin genes in *Mnemiopsis leidyi*: a new view of ctenophore photocytes / C.E. Schnitzler, K. Pang, M.L. Powers, A.M. Reitzel, J.F. Ryan, D. Simmons, T. Tada, M. Park, J. Gupta, S. Y. Brooks, R.W. Blakesley, S. Yokoyama, S.H. Haddock, M.Q. Martindale, A.D. Baxevanis // *BMC Biol.* – 2012. – V. 10. – P. 107.
98. Shimomura, O. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea* / O. Shimomura, F.H. Johnson, Y. Saiga // *J. Cell. Comp. Physiol.* – 1962. – V. 59. – P. 223-239.
99. Shimomura, O. Extraction, purification and properties of halistaurin, a bioluminescent protein from hydromedusan, *Halistaura* / O. Shimomura, F.H. Johnson, Y. Saiga // *J. Cell Comp. Physiol.* – 1963. – V. 62. – P.9-15.
100. Shimomura, O. Partial purification and properties of the *Chaetopterus* luminescence system / O. Shimomura, F.H. Johnson // *Bioluminescence in progress*. – Princeton, 1966. – P.495-521.
101. Shimomura, O Structure of the light-emitting moiety of aequorin / O. Shimomura, F.H. Johnson // *Biochemistry*. – 1972. – V. 11. – P. 1602-1608.
102. Shimomura, O. Regeneration of the photoprotein aequorin / O. Shimomura , F.H. Johnson // *Nature*. – 1975. – V. 256. – P. 236-238.

103. Shimomura, O. Peroxidized coelenterazine, the active group in the photoprotein aequorin / O. Shimomura, F.H. Johnson // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1978. – V. 75. – P. 2611-2615.
104. Shimomura, O. Light-emitters involved in the luminescence of coelenterazine / O. Shimomura, K. Teranishi // Luminescence. – 2000. – V. 15. – P. 51-58.
105. Shimomura, O. Isolation and properties of the luciferase stored in the ovary of the scyphozoan medusa *Periphylla periphylla* / O. Shimomura, P.R. Flood, S. Inouye, B. Bryan, A. Shimomura // Biol. Bull. – 2001. - V. 201. – P. 339-347.
106. Shimomura, O. Bioluminescence: Chemical Principles and Methods / O. Shimomura. – Singapore: World Scientific Publishing Co., 2006. – p. 470.
107. Silva, E. Riboflavin-sensitized photoprocesses of tryptophan / E. Silva, R. Ugarte, A. Andrade, A.M. Edwards // J. Photochem. Photobiol. B. – 1994. – V. 23. – P. 43-48.
108. Steiner R.A. Structural basis for cofactor-independent dioxygenation of N-heteroaromatic compounds at the  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold // R.A. Steiner, H.J. Janssen, P. Roversi, A.J. Oakley, S. Fetzner // PNAS. – 2010. – V. 107. – P. 657-662.
109. Stepanyuk, G.A. Interchange of aequorin and obelin bioluminescence color is determined by substitution of one active site residue of each photoprotein / G.A. Stepanyuk, S. Golz, S.V. Markova, L.A. Frank, J. Lee, E.S.Vysotski // FEBS Lett. – 2005. – V. 579(5). – P. 1008-1014.
110. Stepanyuk, G.A. Spatial structure of the novel light-sensitive photoprotein berovin from the ctenophore *Beroe abyssicola* in the Ca(2+)-loaded apoprotein conformation state / G.A. Stepanyuk, Z.J. Liu, L.P. Burakova, J. Lee, J. Rose, E..S Vysotski, B.C. Wang // Biochim Biophys Acta. – 2013. – V. 1834(10). – P. 2139-2146.

111. Strynadka, N.C.J. Crystal structures of the helix-loop-helix calcium-binding proteins / N.C.J. Strynadka, M.N.G. James // *Annu. Rev. Biochem.* – 1989. – V. 58. – P. 951-998.
112. Thompson, E.M. Induction of bioluminescence in the marine fish *Porichthys* by Vargula (crustacean) luciferin. Evidence for de novo synthesis or recycling of luciferin / E.M. Thompson, B.G. Nafpaktitits, F.I. Tsuji // *Photochem. Photobiol.* – 1987. – V. 45. – P. 529-533.
113. Thomson, C.M. The widespread occurrence and tissue distribution of the imidazolopyrazine luciferins / C.M. Thomson, P.J. Herring, A.K. Campbell // *J. Biolum. Chemilum.* – 1997. – V. 12. – P. 87-91.
114. Titushin, M.S. NMR-derived topology of a GFP-photoprotein energy transfer complex / M.S. Titushin, Y. Feng, G.A. Stepanyuk, Y. Li, S.V. Markova, S. Golz, B.C. Wang, J. Lee, J. Wang, E.S. Vysotski, Z.J. Liu // *J. Biol Chem.* – 2010. – V. 285(52). – P. 40891-40900.
115. Titushin, M.S. Protein-protein complexation in bioluminescence / M.S. Titushin, Y. Feng, J. Lee, E.S. Vysotski, Z.J. Liu // *Protein Cell.* – 2011. – V. 2. – P. 957-972.
116. Tomilin, F.N. Fluorescence of calcium-discharged obelin: the structure and molecular mechanism of emitter formation / F.N. Tomilin, L.Y. Antipina, E.S. Vysotski, S.G. Ovchinnikov, I.I. Gitzelzon // *Dokl Biochem Biophys.* – 2008. – V. 422. – P. 279-284.
117. Tomilin F.N. Quantum chemical study of mechanism of active photoprotein generation / F.N. Tomilin, L.U. Antipina, E.V. Eremeeva, S.G. Ovchinnikov, E.S. Vysotski // *Luminescence.* – 2010. – V. 25. – P. 210-211.
118. Tsuji, F.I. K/Na-triggered bioluminescence in the oceanic squid *Symplectoteuthis oualaniensis* / F.I. Tsuji, G.B. Leisman // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1981. – V. 78(11). – P. 6719-6723.



119. Tsuji, F.I. ATP-dependent bioluminescence in the firefly squid, *Watasenia scintillans* / F.I. Tsuji // Proc Natl Acad Sci USA. – 1985. – V. 82(14). – P. 4629-4632.
120. Tsuji, F.I. Molecular evolution of the Ca<sup>2+</sup>-binding photoproteins of the Hydrozoa / F.I. Tsuji, Y. Ohmiya, T.F. Fagan, H. Toh, S. Inouye // Photochem. Photobiol. – 1995. – V. 62. – P. 657-661.
121. Tsuji, F.I. Bioluminescence reaction catalyzed by membrane-bound luciferase in the "firefly squid," *Watasenia scintillans* / F.I. Tsuji // Biochim Biophys Acta. – 2002 – V. 1564(1). – P. 189-197.
122. Tsuji, F.I. Role of molecular oxygen in the bioluminescence of the firefly squid, *Watasenia scintillans* / F.I. Tsuji // Biochem Biophys Res Commun. – 2005. – V. 338(1). – P. 250-253.
123. Usami, K. Low-temperature photooxygenation of coelenterate luciferin analog synthesis and proof of 1,2-dioxetanone as luminescence intermediate / K. Usami, M. Isobe // Tetrahedron. – 1996. – V. 52. – P. 12061-12090.
124. van Oort, B. Picosecond fluorescence relaxation spectroscopy of the calcium-discharged photoproteins aequorin and obelin / B. van Oort, E.V. Eremeeva, R.B. Koehorst, S.P. Laptinok, H. van Amerongen, W.J. van Berkel, N.P. Malikova, S.V. Markova, E.S. Vysotski, A.J. Visser, J. Lee // Biochemistry. – 2009. – V. 48. – P. 10486-10491.
125. Vysotski, E.S. Preparation and preliminary study of crystals of the recombinant calcium-regulated photoprotein obelin from the bioluminescent hydroid *Obelia longissima* / E.S. Vysotski, Z.J. Liu, J. Rose, B.C. Wang, J. Lee // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. – 1999. – V. 55(Pt 11). – P. 1965-1966.
126. Vysotski, E.S. Preparation and X-ray crystallographic analysis of recombinant obelin crystals diffracting to beyond 1.1 Å. / E.S. Vysotski, Z.J. Liu, J. Rose, B.C. Wang, J. Lee // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. – 2001. – V. 57. – P. 1919-1921.

127. Vysotski, E.S. Violet bioluminescence and fast kinetics from W92F obelin: Structure-based proposals for the bioluminescence triggering and the identification of the emitting species / E.S. Vysotski, Z.J. Liu, S.V. Markova, J.R. Blinks, L. Deng, L.A. Frank, M. Herko, N.P. Malikova, J.P. Rose, B.C. Wang, J. Lee // *Biochemistry*. – 2003. – V. 42. – P. 6013-6024.
128. Vysotski, E.S. Ca<sup>2+</sup>-regulated photoproteins: structural insight into the bioluminescence mechanism / E.S. Vysotski, J. Lee // *Acc. Chem. Res.* – 2004. – V. 37. – P. 405-415.
129. Vysotski, E.S. Bioluminescent mechanism of Ca<sup>2+</sup>-regulated photoproteins from three-dimensional structures / E.S. Vysotski, J. Lee // in *Luciferases and Fluorescent Proteins: Principles and Advances in Biotechnology and Bioimaging* (Viviani, V.R. and Ohmiya Y., eds) Transworld Research Network, Kerala, India. – 2007. – P. 19-41.
130. Ward, W.W. Properties of mneopsin and berovin, calcium-activated photoproteins from the ctenophores *Mnemiopsis sp.* / W.W. Ward, H.H. Seliger // *Biochemistry*. – 1974. – V.13. – P.1500-1510.
131. Ward, W.W. Extraction of *Renilla*-type luciferin from calcium-activated photoprotein aequorin, mnemiopsin, and berovin / W.W. Ward, M.J. Cormier // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 1975. – V. 72. – P. 2530-2534.
132. Ward, W.W. Action spectrum and quantum yield for the photoinactivation of mnemiopsin, a bioluminescent photoprotein from the ctenophore *Mnemiopsis sp.* / W.W. Ward, H.H. Seliger // *Photochemistry and photobiology*. – 1976. – V. 23. – P. 351-363.
133. Ward, W.W. *In vivo* energy transfer in *Renilla* bioluminescence / W.W. Ward, M.J. Cormier // *J. Phys. Chem.* – 1976. – V. 80. – P. 2289-2291.
134. Widder, E.A. Bioluminescence in the ocean: origins of biological, chemical, and ecological diversity / E.A. Widder // *Science*. – 2010. – V. 328. – P. 704-708.