

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

Алиева Роза Ришатовна

**ВЛИЯНИЕ ВНЕШНИХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА
СПЕКТРАЛЬНО-ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА РАЗРЯЖЕННОГО
ФОТОПРОТЕИНА ОБЕЛИНА**

03.01.02 – биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор физико-математических наук,
профессор Кудряшева Надежда Степановна

Красноярск – 2016

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	5
Глава 1. ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ БЕЛКИ: СТРУКТУРА, СВОЙСТВА И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ.....	12
1.1 Представители флуоресцентных белков.....	12
1.2 Целентерамид-содержащие флуоресцентные белки (разряженные фотопротеины).....	17
1.2.1 Разряженные фотопротеины как продукты биолюминесцентных реакций кишечнорастворимых; механизмы этих реакций.....	17
1.2.2 Спектрально-люминесцентные и фотохимические свойства целентерамида – флуорофора разряженных фотопротеинов.....	31
1.3 Флуоресцентные свойства ароматических аминокислот в белках.....	38
1.4 Влияние физико-химических факторов на свойства флуоресцентных белков.....	43
1.4.1 Зависимость спектров флуоресценции флуоресцентных белков от энергии фотовозбуждения.....	43
1.4.2 Физико-химические механизмы воздействия экзогенных соединений на биологическую люминесценцию.....	46
1.4.3 Влияние условий получения разряженного обелина на его флуоресцентные характеристики.....	48
Глава 2. Материалы и методы.....	51
2.1 Реактивы.....	51
2.2 Приборы и установки.....	51
2.3 Методика эксперимента.....	52
2.3.1 Условия экспериментов.....	52
2.3.1.1 Воздействие экзогенных веществ на флуоресценцию разряженного обелина.....	52

2.3.1.2	Воздействие температуры на флуоресценцию разряженного обелина.....	53
2.3.2	Изучение флуоресцентных характеристик свободного целентерамида.....	53
2.3.2.1	Регистрация спектров	53
2.3.2.2	Квантово-химические расчеты.....	54
2.3.2.3	Расчет квантового выхода флуоресценции	56
2.4	Математическая обработка спектров флуоресценции.....	57
Глава 3. Зависимость флуоресценции разряженного фотопротейна обелина от энергии фотовозбуждения.....		60
3.1	Спектры флуоресценции разряженных фотопротейнов при различных длинах волн возбуждения.....	60
3.2	Спектрально-люминесцентные свойства целентерамида – флуорофора разряженных фотопротейнов.....	62
Заключение по главе 3.....		69
Глава 4. Влияние деструктивных физико-химических факторов на флуоресценцию разряженного фотопротейна обелина.....		70
4.1	Воздействие экзогенных соединений на флуоресценцию разряженного фотопротейна обелина.....	72
4.1.1	Влияние на интенсивность флуоресценции	72
4.1.2	Влияние на спектральный состав флуоресценции	76
4.2	Хроническое воздействие повышенной температуры на флуоресценцию разряженного обелина.....	80
4.2.1	Влияние на интенсивность флуоресценции.....	80
4.2.2	Влияние на спектральный состав флуоресценции.....	84
Заключение по главе 4.....		87
Выводы.....		90
Список сокращений.....		92
Список литературы.....		93

Приложение А.....	109
Приложение Б.....	111
Приложение В.....	114
Приложение Г.....	117
Приложение Д.....	119
Приложение Е.....	120

ВВЕДЕНИЕ

Флуоресцентные белки состоят из ароматического флуорофора и полипептида. Один из самых известных и используемых флуоресцентных белков – зеленый флуоресцентный белок (Green Fluorescent Protein, GFP) – был выделен в 1962 году из медузы *Aequorea victoria* профессором О. Шимомура [Shimomura, Johnson, Saiga, 1962]. В настоящее время известно достаточно много флуоресцентных белков, гомологичных GFP, характеризующихся различными флуоресцентными свойствами [Степаненко и др., 2007; Zimmer, 2002; Labas et al., 2002]; их флуорофоры сформированы за счет химического взаимодействия аминокислотных остатков. Эти белки широко используются в качестве генетически кодируемых маркеров для мечения отдельных молекул, внутриклеточных структур, живых клеток и целых организмов, с целью визуализации внутриклеточных процессов, например, взаимодействия белков, их локализации и транспорта. Кроме GFP-подобных, к группе флуоресцентных белков относятся целентерамид-содержащие белки, которые присутствуют в светящихся морских кишечнополостных (медузах *Aequorea* [Shimomura, Johnson, 1975] и *Phialidium (Clytia)* [Levine, Ward, 1982], гидроидном полипе *Obelia longissima* [Vysotski, Bondar, Letunov, 1989] и др.). Их флуорофором является молекула целентерамида (ЦЛМ), связанная нековалентно с белком внутри его гидрофобной полости.

Целентерамид-содержащие флуоресцентные белки являются продуктами биолюминесцентных реакций кишечнополостных. В ходе этих реакций фотопротеин (комплекс белка с 2-гидропероксицелентеразином) в присутствии ионов кальция «разряжается» с испусканием кванта света. Поэтому ЦЛМ-содержащие флуоресцентные белки принято называть «разряженными фотопротеинами». В отличие от GFP-подобных белков, разряженные фотопротеины не получили широкого распространения в биомедицинских

исследованиях, и их потенциал в качестве флуоресцентных биомаркеров в настоящее время недооценен.

Известно, что спектры биолюминесценции и фотолюминесценции фотопротеинов широкие, асимметричные и включают несколько компонент (эмиттеров), соответствующих различным формам ЦЛМ. Соотношение компонент может меняться под действием различных факторов. Такие изменения связываются с химией возбужденных состояний [Turro, 1991], а именно, с переносом протона от фенольной группы ЦЛМ к протонно-акцепторной группе аминокислотного окружения в белке.

В настоящее время особый интерес представляет фотопротеин обелин, выделенный из гидроидного полипа *Obelia longissima* [Vysotski, Bondar, Letunov, 1989]. Получены генетически модифицированные формы обелина с различными характеристиками биолюминесценции [Высоцкий, Маркова, Франк, 2006; Malikova et al., 2003]. Показано, что воздействие экзогенных ароматических химических соединений и варьирование концентрации ионов кальция изменяют интенсивность биолюминесценции обелина, но не ее спектральный состав [Belogurova et al., 2009; 2010]. Кроме того, продемонстрировано, что интенсивность и форма спектра фотолюминесценции продукта биолюминесцентной реакции (разряженного обелина) зависит от концентрации ионов кальция [Belogurova et al., 2010]. Однако возможность варьирования спектров фотолюминесценции разряженного обелина под действием различных физико-химических факторов, таких как экзогенные соединения и повышенная температура, энергия фотовозбуждения, до настоящего времени не изучена.

Цель исследования – выявить закономерности варьирования спектров флуоресценции разряженного фотопротеина обелина при изменении энергии фотовозбуждения и воздействии ряда деструктивных физико-химических факторов – экзогенных соединений, повышенной температуры, процесса лиофилизации.

В работе поставлены следующие **задачи**:

1. Продемонстрировать зависимость флуоресцентных характеристик разряженных фотопротеинов от энергии фотовозбуждения.
2. Провести экспериментальный и теоретический анализ флуоресцентных свойств флуорофора разряженных фотопротеинов – молекулы ЦЛМ при различных энергиях фотовозбуждения.
3. Выявить зависимости спектральных характеристик флуоресценции разряженного обелина (интенсивности и вклада спектральных компонент) от концентрации экзогенных соединений – этанола, этиленгликоля, глицерина, ДМСО.
4. Определить зависимости спектральных характеристик флуоресценции разряженного обелина (интенсивности и вклада спектральных компонент) от времени хронического воздействия повышенной температуры (40 °С).
5. Связать вариабельность спектров флуоресценции разряженного обелина под действием деструктивных физико-химических факторов (экзогенных соединений, температуры, процесса лиофилизации) с изменением эффективности переноса протона в возбужденном состоянии флуорофора (ЦЛМ).

Положения, выносимые на защиту:

1. Флуоресценция свободного ЦЛМ при фотовозбуждении в высшие электронно-возбужденные состояния включает дополнительное излучение в ближней ультрафиолетовой области, которое формируется с участием пиразинового, фенольного и бензольного фрагментов ЦЛМ. Это излучение может вносить вклад в ультрафиолетовую флуоресценцию разряженных фотопротеинов (обелина, акворина и клитина).
2. Изменение спектрального состава видимой флуоресценции разряженного обелина под действием деструктивных факторов (хронического воздействия повышенной температуры, экзогенных соединений, процесса лиофилизации) характеризуется увеличением вклада фиолетовой, уменьшением вклада сине-зеленой компонент и определяется эффективностью переноса протона в возбужденном состоянии ЦЛМ в белковом окружении.

Научная новизна.

Продемонстрировано, что спектры флуоресценции разряженных фотопротеинов (обелина, акворина, клитина) и свободного ЦЛМ зависят от энергии возбуждения: при фотовозбуждении в высшие электронно-возбужденные состояния возникает дополнительное излучение в ближней ультрафиолетовой области с максимумами 330-350 нм. Квантово-химические расчеты показали, что ультрафиолетовое излучение в спектрах флуоресценции молекулы ЦЛМ формируются с участием пиразинового, фенольного и бензольного фрагментов. Ультрафиолетовое излучение ЦЛМ может вносить вклад в ультрафиолетовую флуоресценцию разряженных фотопротеинов. Рассчитан квантовый выход флуоресценции ЦЛМ в метаноле, который оказался равным $0,028 \pm 0,005$ в интервале длин волн фотовозбуждения 270-340 нм.

Впервые показано, что такие физико-химические факторы, как повышенная температура, воздействие экзогенных соединений, процесс лиофилизации препарата изменяют характеристики фотолюминесценции разряженного обелина в видимой области спектра, а именно: (А) уменьшают интенсивность, (Б) изменяют спектральный состав, увеличивая вклад фиолетовой и уменьшая вклад сине-зеленой компонент флуоресценции. Вышеперечисленные факторы также изменяют интенсивность и вклад ультрафиолетовой компоненты. Эти изменения связаны с частичной денатурацией белка, приводящей к уменьшению эффективности переноса протона в возбужденном состоянии ЦЛМ в белке, а также изменению пространственного положения боковых групп аминокислотных остатков (прежде всего, триптофановых), способных вносить вклад в ультрафиолетовую флуоресценцию белка.

Практическая значимость.

Выявленная вариабельность спектров флуоресценции разряженного обелина является основой для разработки новых цветовых биомедицинских маркеров, а также понимания функционирования уже имеющихся. Интенсивность флуоресценции разряженного обелина и соотношение вкладов фиолетовой и сине-зеленой компонент флуоресценции предложено использовать в качестве

количественных оценок степени деструкции разряженного обелина. Этот подход может лечь в основу создания нового типа биотестов на токсическое действие экзогенных соединений – биотестов с цветовой дифференциацией. Т.к. биолюминесценция обелина уже применяется для определения содержания кальция и мониторинга кальций-зависимых процессов, использование продукта биолюминесцентной реакции (разряженного обелина) для флуоресцентного биотестирования токсичности способно придать препарату обелина многофункциональность и повысить эффективность его использования.

Поскольку оптимальная температура функционирования фотопротейна обелина, выделенного из гидроидного полипа *Obelia longissima* (обитателя северных морей), менее 20 °С, необходимо учитывать изменение интенсивности и цвета фотолюминесценции разряженного обелина при использовании его в качестве флуоресцентной метки в теплокровных организмах.

Апробация работы.

Основные результаты работы представлены на российских и международных конференциях: XVII-ом Международном симпозиуме по биолюминесценции и хемилюминесценции (Гуэльф, Канада, 2012), XV-ом Международном симпозиуме люминесцентной спектроскопии (Барселона, Испания, 2012), Международной конференции «Экспериментальная и теоретическая биофизика» (Пушино, Москва, 2013), XIII-ой конференции молодых ученых по радиофизике, электронике, фотонике и биофизике (Харьков, Украина, 2013), X-ой Всероссийской конференции с международным участием «Молодежь и наука» (Красноярск, 2014), XVI-ом Международном симпозиуме по люминесцентной спектроскопии (Родос, Греция, 2014), зимней научной школе «Современная биология и биотехнологии будущего» (Звенигород, Московская область, 2015), 12-ой международной конференции по импульсным лазерам и их применению (Томск, 2015), V-ом съезде биофизиков России (Ростов-на-Дону, 2015), биолюминесцентных семинарах Сибирского федерального университета, XIX конференции молодых ученых Институтов КНЦ СО РАН (Красноярск, 2016).

Работа выполнена при финансовой поддержке следующих грантов: ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 годы» (№ 02.740.11.0766); мегапроекта «Биолюминесцентные биотехнологии» (№ 11.G34.31.0058); госбюджетной темы №Б-14 от 01.03.2013; программы РАН «Молекулярная и клеточная биология»; конкурса ККФН научных проектов авторских коллективов студентов и аспирантов под руководством молодых ученых (2014). Работа была удостоена премии ОАО АКБ «Международный финансовый клуб» в 2014 году за вклад в развитие науки Сибири молодыми учёными Сибирского федерального университета.

Личный вклад соискателя состоял в постановке и проведении всех экспериментов, обработке и обсуждении экспериментальных и теоретических данных, подборе экзогенных соединений, анализе литературы, подготовке публикаций, представлении результатов работы на научных конференциях. Основная часть результатов была получена в сотрудничестве с Н. В. Белогуровой, А. С. Петровой, Ф. Н. Томилиным, А. А. Кузубовым, С. Г. Овчинниковым, Л. С. Тирранен, А. Г. Сизых. Вклад соавторов отражен в публикациях. Кроме того, автор выражает глубокую и искреннюю благодарность Е. В. Немцевой, М. А. Герасимовой, Л. П. Бураковой, В. Н. Петушкову за консультации в экспериментальной работе, Е. В. Еремеевой, Л. А. Франк за приготовление препаратов фотопротеинов (обелина и др.).

Степень достоверности результатов.

Достоверность полученных результатов обеспечивается применением широкого набора методов исследования, таких как флуориметрический, спектрофотометрический, биохимический и квантово-химический. Экспериментальные исследования выполнены на сертифицированном оборудовании. Для теоретических расчетов и обработки экспериментальных данных использованы современные модели и лицензионные программы. Полученные результаты и их интерпретация не противоречат современным научным представлениям о закономерностях физико-химических процессов в биологических макромолекулах.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 6 статей в журналах ВАК, 12 тезисов докладов на российских и международных конференциях, из них 3 тезисов в реферируемом журнале *Luminescence* по материалам XVII-ого и XVIII-ого Международных симпозиумов по биолюминесценции и хемиллюминесценции.

ГЛАВА 1. ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ БЕЛКИ: СТРУКТУРА, СВОЙСТВА И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

1.1 Представители флуоресцентных белков

В 1961 году группой исследователей во главе с профессором О. Шимомура [Shimomura, Johnson, Saiga, 1962] был выделен и описан зеленый флуоресцентный белок (Green Fluorescent Protein, GFP), который характеризуется флуоресценцией в «зелёном» диапазоне длин волн при освещении его «синим» светом. Этот белок был обнаружен в процессе изучения биолюминесценции медузы *Aequorea victoria* из класса *Hydrozoa*.

Многие годы GFP изучался очень небольшой группой исследователей как белок, являющийся частью биолюминесцентной системы. Лишь в 1992 году была установлена его аминокислотная последовательность [Prasher et al., 1992]. Решающий прорыв в практическом применении GFP произошел после того, как зеленый белок был клонирован [Prasher et al., 1992] и было показано, что экспрессия гена GFP в других организмах также приводит к появлению флуоресцентного белка [Chalfie et al., 1994; Inouye, Tsuji, 1994]. После этого открытия интерес к GFP чрезвычайно возрос, и в настоящее время GFP и его мутанты являются широко используемыми генетическими маркерами. На рисунке 1.1 представлена хронология основных достижений в области открытия и развития флуоресцентных белков. В 2008 году за открытие и исследование GFP Нобелевской премии по химии были удостоены американские ученые О. Шимомура, М. Чалфи и Р. Тсьен. Очередным импульсом к развитию этого направления биотехнологии послужило клонирование генов GFP-подобных белков, флуоресцирующих в желтой, оранжевой, красной и дальней красной областях спектра. На данный момент известны флуоресцентные белки всей цветовой гаммы (от голубого до дальнего красного) [Зубова, Булавина, Савицкий, 2003; Петкевич и др., 2010, Chudakov et al., 2010].

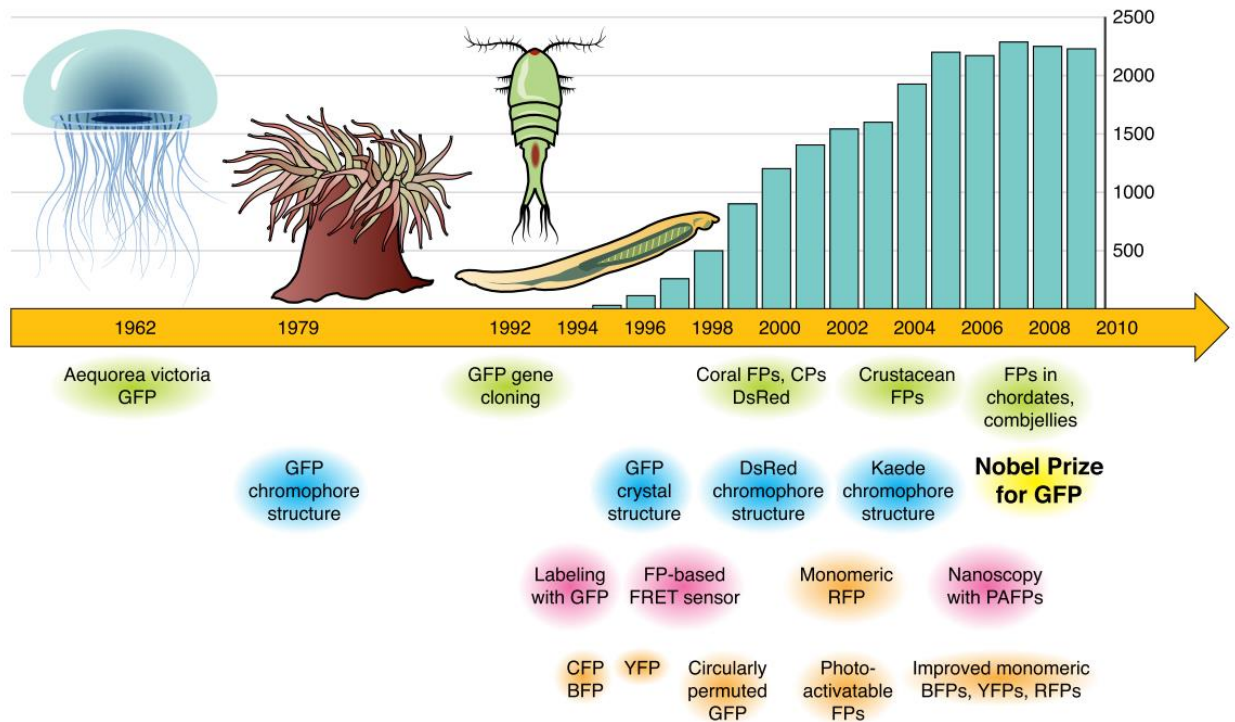


Рисунок 1.1. Хронология основных достижений в области исследований флуоресцентных белков [Chudakov et al., 2010]. Зеленым цветом помечены фундаментальные исследования природного разнообразия GFP. Представленные животные, имеющие флуоресцентные белки, приведены выше стрелки (слева направо: медуза, актиния, рачок и ланцетник). Колонки выше стрелки показывают ряд научных статей в соответствующем году, которые можно найти в поисках PubMed с термином GFP; этот поиск не является исчерпывающим, но отражает общую динамику публикаций по флуоресцентным белкам.

GFP-подобные белки значительно различаются по спектральным свойствам. По цвету флуоресценции GFP-подобные белки из класса *Anthozoa* можно разделить на три основные группы [Labas et al., 2002; Carter et al., 2004]: зеленые (около 485-520 нм, *Anthozoa* GFP), желтые (около 540 нм, *Anthozoa* YFP) и оранжево-красные (более 570 нм, *Anthozoa* RFP) [Степаненко и др., 2007].

Все известные GFP являются компактными глобулярными молекулами с массой мономера примерно 27 кДа. В растворах эти белки присутствуют в виде стабильных, недиссоциирующих димеров, превращающихся в мономер только при денатурации [Ward, Cormier, 1979]. Исключением является GFP из *Aequorea*

victoria, который существует в виде мономера в разбавленном водном растворе и димера в концентрированном [Prendergast, Mann, 1978].

Уникальной особенностью GFP из *Aequorea* является то, что входящий в состав белка флуорофор представляет собой не внешнюю простатическую группу (как, например, гемм в гемоглобине), а образуется из остатков цепи Ser65-Тур66-Gly67 путем реакции автокаталитической циклизации между остатками Ser и Gly [Cody et al., 1993; Ormö et al., 1996], входящими в состав внутренней α -спирали (рисунок 1.2). Подобная аминокислотная последовательность встречается и в других белках, но в них флуорофор не образуется, что свидетельствует о решающей роли пространственной структуры белка в образовании «зеленого» флуорофора. После процесса циклизации промежуточный продукт подвергается дегидрированию (отщепление атомов водорода происходит по C_{α} - C_{β} -связи Тур66) при помощи молекулярного кислорода, в результате чего и возникает зрелый флуорофор (4-(*p*-гидроксибензилиден)-имидазол-5-он). Флуорофор имеет плоское строение и состоит из двух ароматических колец и мостика между ними. Одним из ароматических колец является бензольное кольцо, а другим – пятичленный гетероцикл (рисунок 1.2). Таким образом, флуорофор представляет собой систему сопряженных связей, которая способна поглощать энергию в УФ и ближнем видимом диапазоне и излучать флуоресценцию в зеленой области спектра [Степаненко и др., 2007]. Жесткое микроокружение и высокая плотность упаковки ядра GFP, по-видимому, обеспечивают флуорофору высокий квантовый выход флуоресценции, который равен 0,7-0,8 [Morise et al., 1974; Shimomura, 2006]. Квантовый выход GFP превышает квантовые выходы биолюминесценции фотопротеинов акворина (0,15-0,16 [Shimomura, Johnson, 1970; Shimomura, 2006] и обелина (0,24 [Bondar et al., 1995]) и квантовые выходы фотолюминесценции разряженного акворина (0,12 [Morise et al., 1974; Chalfie, Kain, 2005]) и разряженного обелина (0,17 [Markova, Vysotski, Lee, 2001]).

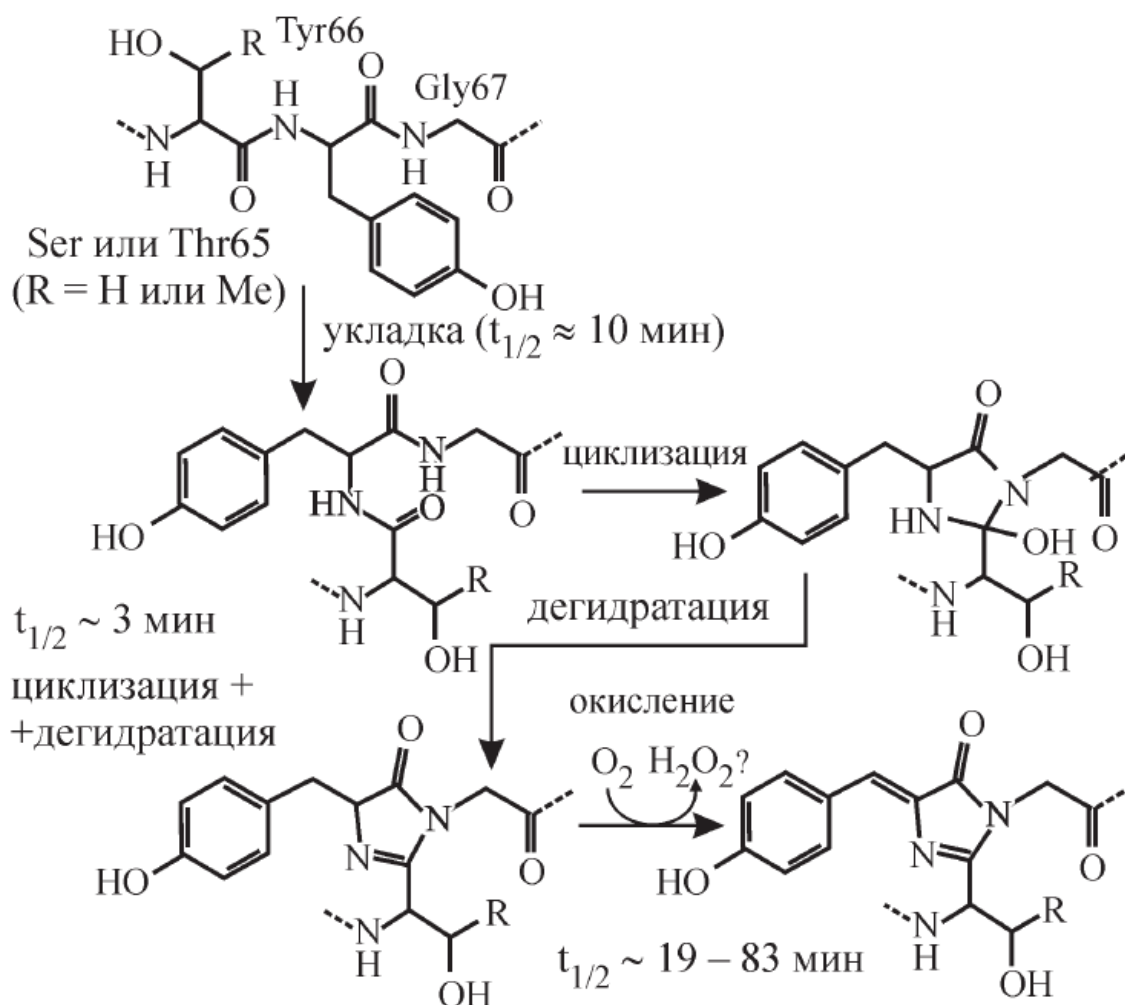


Рисунок 1.2. Схема образования флуорофора GFP [Heim et al., 1994; Степаненко и др., 2007].

Флуоресцентные белки широко применяются для анализа различных биологических систем. GFP используется как маркер для получения различных гибридных белков при изучении их внутриклеточной локализации и передвижения в клетке, а также для мечения живых клеток и целых организмов. Изначально GFP использовался в нативном виде. Получение мутантных форм флуоресцентных белков расширило палитру белков с флуоресценцией разных цветов и сделало возможным осуществление многоцветовой микроскопии [Петкевич и др., 2010].

Главными преимуществами GFP-подобных белков при использовании их в качестве флуоресцентных маркеров являются их высокая стабильность и способность образования флуорофора без необходимости добавления

вспомогательных кофакторов. Кроме того, N- и C-концы флуоресцентных белков доступны для создания гибридных белков, что позволяет осуществлять сшивку флуоресцентного белка с белком-мишенью. При этом флуоресцентный белок редко оказывает влияние на функциональные свойства последнего [Степаненко и др., 2007; Петкевич и др., 2010]. Гибридные белки на основе GFP используются для поиска новых лекарств [Kain, 1999; Taylor, Woo, Giuliano, 2001] и для детекции апоптоза [Shinbrot et al., 2000]. GFP-подобные белки в большинстве случаев оказываются нетоксичными для клеток.

Флуоресцентные свойства GFP дикого типа из *Aequorea* и многих его мутантов зависят от уровня pH. В нейтральных растворах (pH 7,0) максимум поглощения для GFP из *Aequorea* наблюдается при 398 нм, а максимум флуоресценции – при 508 нм. В щелочном растворе (pH 12,2) увеличивается интенсивность флуоресценции и наблюдается сдвиг спектра поглощения на 78 нм в длинноволновую область [Ward, Vokman, 1982]. Такой pH-зависимый сдвиг может быть результатом ионизации Tyr66 в флуорофоре и (или) депротонирования Arg96, который стабилизирует енольную форму имидазолидона флуорофора [Зубова, Булавина, Савицкий, 2003]. В кислом растворе (pH 4-6) наблюдается тушение флуоресценции (pK_a 4,5) [Степаненко и др., 2007]. Чувствительность GFP к pH может быть изменена введением точечных мутаций. Поскольку флуоресцентный ответ GFP на изменения кислотности среды происходит быстро и обратимо, было предложено использовать этот белок в качестве неинвазивного индикатора внутриклеточного pH, в тех случаях, когда традиционные синтетические pH-индикаторы не подходят [Зубова, Савицкий, 2005; Yuste et al., 2000]. Например, в работе [Sankaranarayanan et al., 2000] было предложено использовать pH-индикаторы (pH-луорины) на основе GFP для изучения пресинаптической активности в нервных тканях.

GFP находит многочисленные применения в промышленности, например, при контроле содержания мясных бродильных лактобацилл в колбасах [Gory, Montel, Zagorec, 2001] и распространения бактерий, которые усваивают дизельное топливо в почвах [Dandie, Thomas, McClure, 2001]. Несколько компаний начали

выращивание трансгенных флуоресцирующих домашних животных (мыши [Okabe et al., 1997], кролики, обезьяны [Chan et al., 2001]), а также растений (елки и цветы [Mercuri et al., 2001]).

Флуоресцентные белки могут служить репортерами генной активации [Moede et al., 2001; Yang, Hughes, 2001; Nakkila et al., 2002], маркерами для изучения последовательности клеточных делений в процессе развития и отслеживания роста клеточных клонов, включая патогенные бактерии и раковые опухоли [Terskikh et al., 2000; Verkhusha et al., 2001], локализации белков, органелл и вирусных частиц в живых клетках [Charpilienne et al., 2001; Engqvist-Goldstein et al., 2001; Nelson et al., 2002], для биоконтроля и одновременной визуализации нескольких различных бактериальных популяций на корнях растений [Bloemberg et al., 2000], для изучения взаимодействия микробных популяции и колоний, обитающих в кишечнике насекомых [Peloquin et al., 2002], для анализа фагоцитоза [Maselli et al., 2002] и т. п.

Преимуществом использования красных флуоресцентных белков в качестве флуоресцентных маркеров для внутриклеточных белков является низкий уровень автофлуоресценции биологических тканей в красной области спектра, при этом свет с меньшей частотой меньше рассеивается [Петкевич и др., 2010; Зубова и др., 2003].

1.2 Целентерамид-содержащие флуоресцентные белки (разряженные фотопротеины)

1.2.1 Разряженные фотопротеины как продукты биоломинесцентных реакций кишечнополостных; механизмы этих реакций

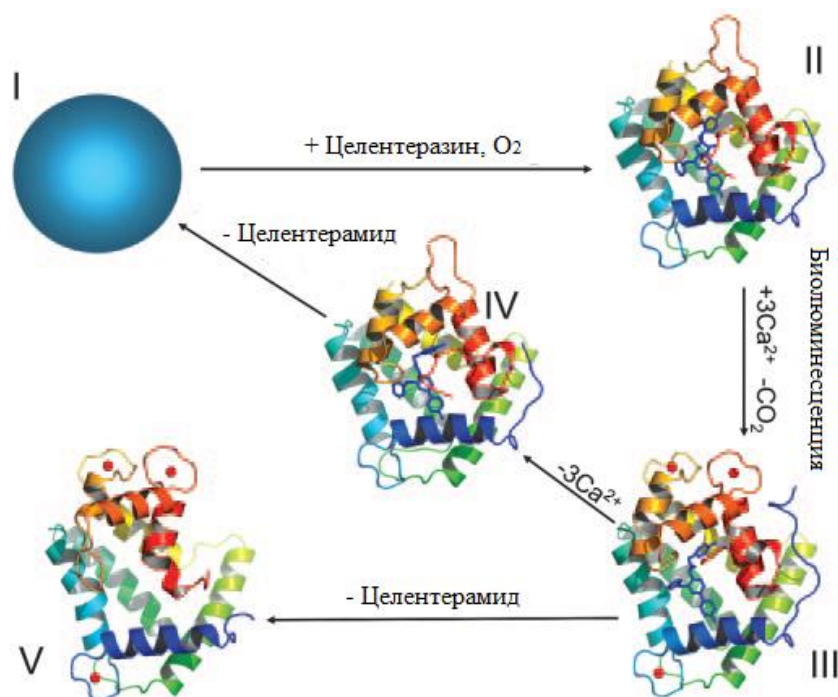
Кроме GFP-подобных, к группе флуоресцентных белков относятся целентерамид-содержащие белки, которые присутствуют в ряде светящихся морских кишечнополостных (медузах *Aequorea* [Shimomura et al., 1962] и *Phialidium (Clytia)* [Levine, Ward 1982], гидроидном полипе *Obelia longissima* [Высоцкий и др., 1989, Бондарь и др., 1990] и др.). Отличаются они от GFP-

подобных белков формированием хромофора: их флуорофором является молекула ЦЛМ (рисунок 1.3), которая нековалентно связана с белком внутри его гидрофобной полости, в то время как хромофор GFP-подобных белков сформирован, как было сказано выше в предыдущем разделе 1.1, из аминокислотных остатков (Ser65, Tyr66, Gly67).

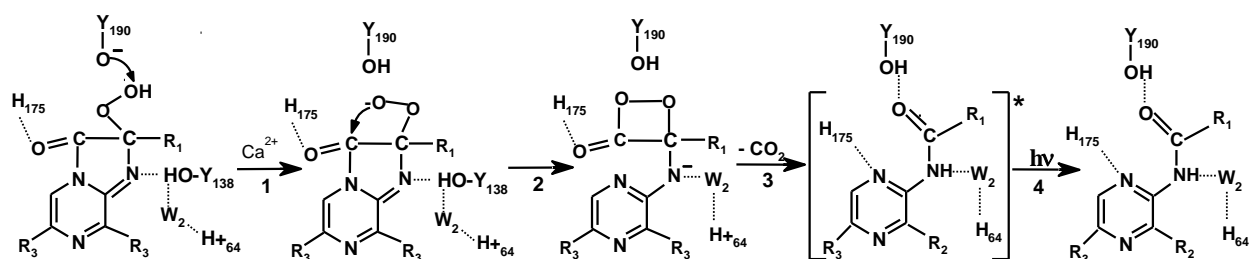
ЦЛМ-содержащие флуоресцентные белки являются продуктами билюминесцентных реакций кишечнополостных (рисунок 1.3), в которых фотопротеин (устойчивый фермент-субстратный комплекс, состоящий из одноцепочечного полипептида (22,2 кДа) и окисленного производного субстрата – 2-гидропероксицелентеразина) в присутствии ионов кальция «разряжается» с испусканием кванта света (рисунок 1.3). Поэтому ЦЛМ-содержащие флуоресцентные белки называют еще «разряженными фотопротеинами». Эти структуры представляют собой комплекс полипептида и окисленного субстрата билюминесцентной реакции – ЦЛМ. Известно, что в отсутствие Ca^{2+} для фотопротеинов характерен очень низкий уровень свечения – так называемая Ca^{2+} -независимая люминесценция [Allen et al., 1977], но при добавлении кальция интенсивность свечения возрастает в миллионы раз. Присоединение ионов кальция осуществляется за счет трех кальций-связывающих сайтов EF-hand типа (рисунок 1.4) [Deng et al., 2005]; существует также четвертая неактивная «EF-hand» последовательность, не способная связывать ионы кальция, так как она не содержит необходимых для выполнения этой функции аминокислотных остатков – аспарагиновую и глутаминовую кислоты [Strynadka, James, 1989].

Первый ЦЛМ-содержащий флуоресцентный белок (акворин) был выделен и изучен американским ученым О. Шимомура, одновременно с GFP. Он назвал его «голубым флуоресцентным белком» (Blue Fluorescent Protein, BFP) [Shimomura, Johnson, 1975]. В отличие от GFP-подобных, ЦЛМ-содержащие флуоресцентные белки не получили такого широкого распространения в биомедицинских исследованиях и их потенциал в качестве цветных биомаркеров в настоящее время недооценен.

a)



б)



2-гидропероксицелентеразин

целентерамид

Рисунок 1.3. Общая (а) и подробная (б) схемы биоломинесцентной реакции фотопroteина обелина [Liu et al., 2006]. (а) трехмерные структуры конформационных состояний обелина: I – полипептид (структура не определяется); II – фотопrotein с 2-гидропероксицелентеразином (PDB ID код 1EL4); III – разряженный фотопrotein с целентерамидом и Ca^{2+} ; IV – разряженный фотопrotein без ионов Ca^{2+} (PDB ID код 1S36); V – полипептид, связанный с ионами Ca^{2+} (PDB ID код 1SL7); (б) аминокислотные остатки в активном центре фермента: Y – тирозин, H – гистидин. W – молекула воды. Красные кружки в структуре разряженного фотопroteина – ионы кальция.

В настоящее время интенсивно изучается фотопротейин обелин, выделенный из гидроидного полипа *Obelia longissima* [Высоцкий, Бондарь, Летунов, 1989].

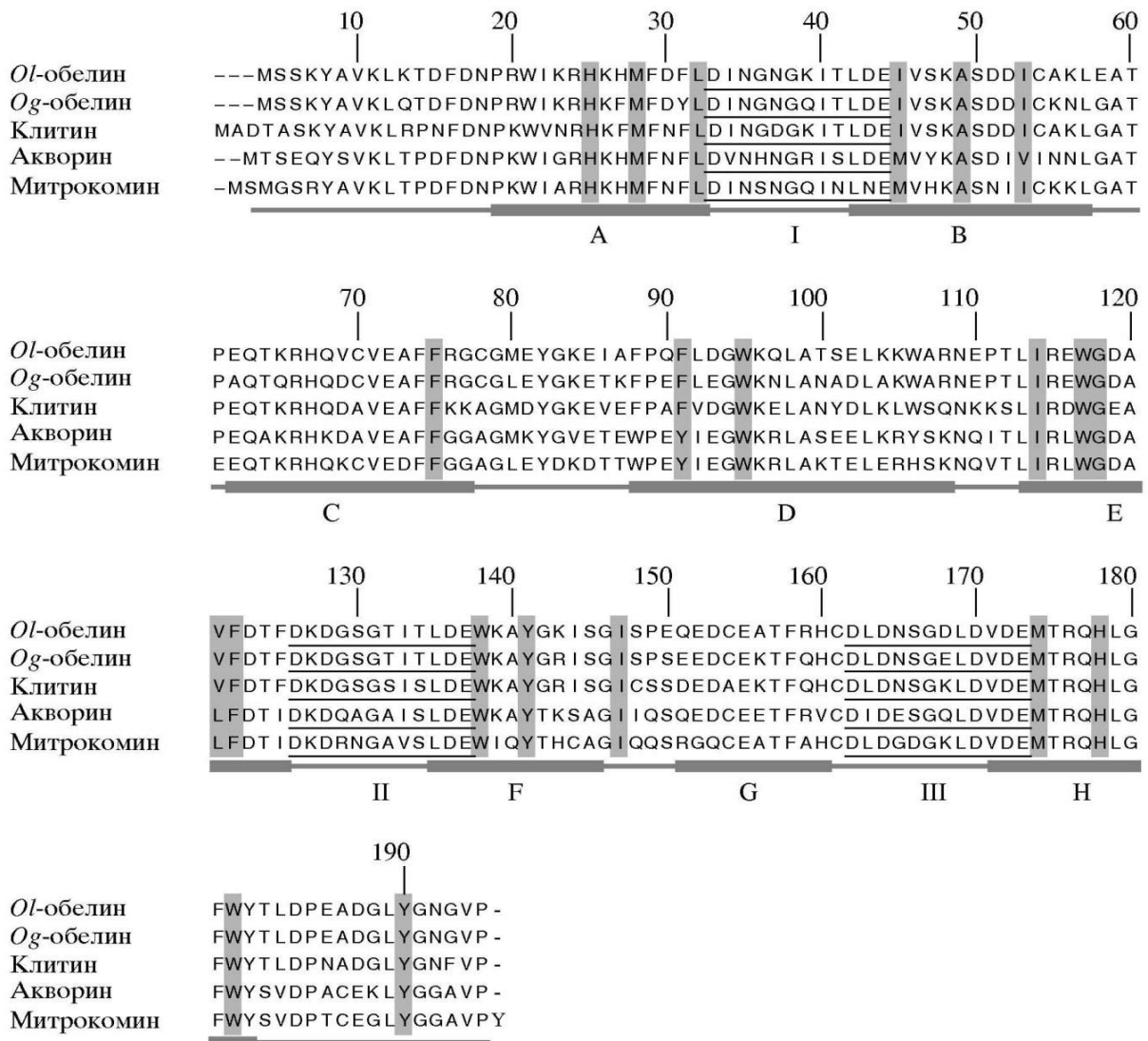


Рисунок 1.4. Аминокислотные последовательности фотопротейинов: акворина, клитина, митрокомины и обелинов из *O. longissima* (*Ol*-обелин) и *O. geniculata* (*Og*-обелин). Вторичная структура представлена в соответствии с кристаллической структурой обелина из *O. longissima*; α -спирали отмечены латинскими буквами (A-H). Аминокислоты, образующие внутреннюю субстрат-связывающую полость, показаны в виде столбцов серого цвета. Ca^{2+} -связывающие центры подчеркнуты и пронумерованы латинскими цифрами I, II и III [Высоцкий и др., 2006].

Спектры биолюминесценции акворина и фотолюминесценции разряженного акворина совпадают (465 нм) [Shimomura, 1985], в то время как спектры биолюминесценции обелина и фотолюминесценции разряженного обелина различны. Биолюминесценция обелина, в отличие от акворина, имеет более длинноволновый максимум 485 нм и коротковолновое плечо около 400 нм. Фотолюминесценция разряженного обелина сдвинута по сравнению с биолюминесценцией в длинноволновую область и характеризуется максимумом 510 нм [Высоцкий и др., 2006].

Процессы формирования возбуждения в биолюминесценции и фотолюминесценции ЦЛМ-содержащих белков (разряженных фотопротеинов) связаны со структурными особенностями их белков и флуорофоров.

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], а десятью годами позже также для клитина [Titushin et al., 2010]. После анализа полученных рентгеноструктурных данных было определено, что молекула фотопротеина имеет компактную лобулярную структуру с радиусом около 25 Å, состоящую из двух доменов. Каждый домен состоит из двух «EF-hand» мотивов и может быть представлен в форме «чашек», внутренняя полость которых «выстлана» боковыми цепями гидрофобных аминокислот. Эти «чашки», соединяясь краями друг с другом, формируют внутри защищенную от растворителя гидрофобную полость, в которой находится 2-гидропероксицелентеразин. По всей вероятности, именно защищенность субстрата от растворителя обеспечивает необходимое окружение для эффективного образования продукта в возбужденном состоянии с последующей его эффективной реализацией в виде кванта света [Еремеева, 2010].

Определение пространственных структур различных конформационных состояний фотопротеинов [Liu, et al., 2000; Head et al., 2000; Liu et al., 2003; Deng et al., 2004; Deng et al., 2005], а также структуры мутанта обелина W92F [Deng et al., 2001; Vysotski et al., 2003] и мутанта акворина W86F [Ohmiya et al., 1992] в совокупности с исследованиями хемилюминесценции и флуоресценции аналогов

целентеразина и целентерамида в растворителях различной полярности [McCarra et al., 1996; Shimomura, Teranishi, 2000; Imai et al., 2001] позволили сформулировать гипотезу ("proton relay mechanism") [Vysotski, Lee, 2004] о роли некоторых аминокислотных остатков внутренней полости фотопротеинов в реакции окислительного декарбоксилирования и образовании эмиттера (рисунок 1.5) [Vysotski, Lee, 2007].

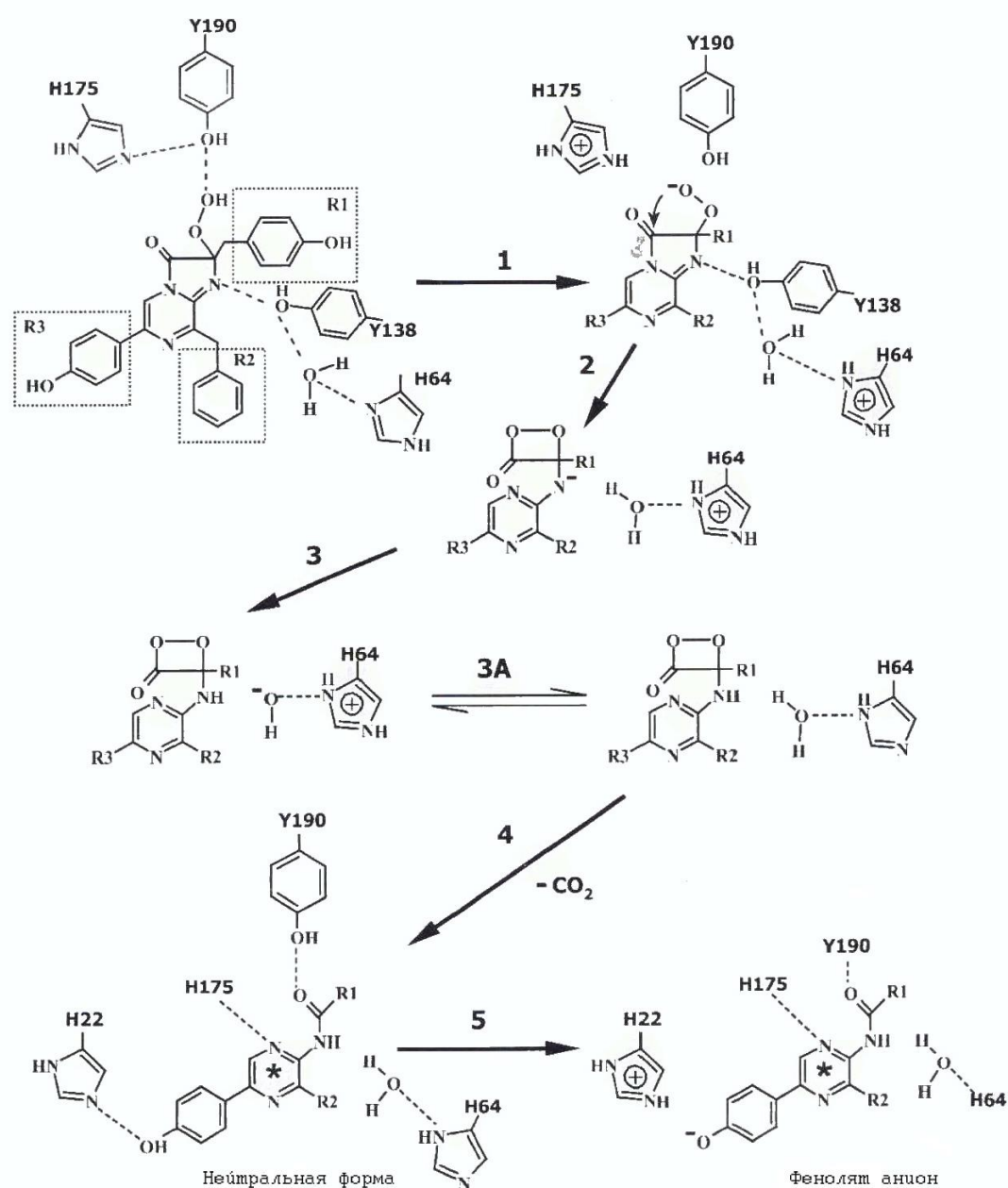


Рисунок 1.5. Механизм переноса протона и формирование продукта в возбужденном состоянии в билюминесцентной реакции фотопротеинов [Vysotski, Lee, 2007].

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 α -спирали (рисунок 1.4, рисунок 1.5), 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 (рисунок 1.5, шаг 1). Затем пероксианион «атакует» С3-положение целентеразина с образованием диоксиэтанового интермедиата [Vysotski, Lee, 2007] (рисунок 1.5, 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° [Liu et al., 2006]. Диоксиэтановый интермедиат – довольно нестабильное соединение и, согласно гипотезе МакКапра и Чанга, должен распадаться с образованием CO_2 и амид аниона ЦЛМ в возбужденном состоянии. Поскольку pK N-аниона в данном окружении выше, чем у соседней молекулы воды (W2), его протонирование за счет молекулы воды (рисунок 1.5, шаг 3) приводит к образованию диоксиэтанола в нейтральном состоянии. Протонированная форма гистидина энергетически более выгодна, и поэтому His64, в свою очередь, может отдавать протон на молекулу воды (W2) (рисунок 1.5, шаг 3А).

Таким образом, данная молекулы воды играет важную роль катализатора реакции декарбоксилирования 2-гидропероксицелентеразина, протонируя диоксиэтанон анион. Роль молекулы воды была также подтверждена в работе [Natashin et al., 2014] на основании пространственных структур двух конформационных состояний мутанта обелина Y138F (до и после биолюминесцентной реакции) и обелина дикого типа. Диоксиэтановый интермедиат нестабилен и распадается с образованием CO_2 и протонированного

ЦЛМ в возбужденном состоянии (рисунок 1.5, шаг 4), который является первичным эмиттером биолюминесценции фотопротеинов.

Молекула ЦЛМ характеризуется рядом спектрально-люминесцентных свойств, которые объединяют ее с эмиттерами других биолюминесцентных организмов. Известно, что, несмотря на то, что молекулы эмиттеров разных организмов принадлежат к различным классам химических соединений, их объединяет сходство в электронной структуре: они принадлежат к пятой спектрально-люминесцентной группе систематики молекул по спектрально-люминесцентным свойствам [Шигорин и др., 1993]. К этой группе относятся все ароматические гетероциклические соединения, характеризующиеся высокими выходами флуоресценции. Относительное положение уровней энергии электронно-возбужденных состояний молекул этой группы с учетом их орбитальной природы и мультиплетности приведено на рисунке 1.6.

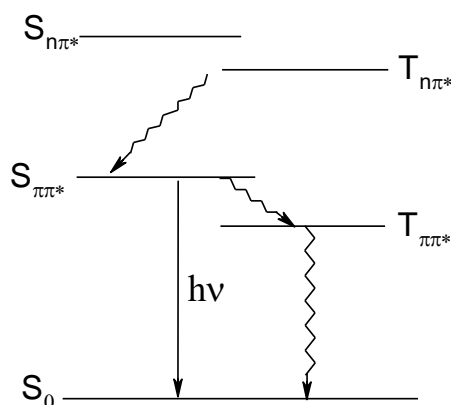


Рисунок 1.6. Относительное положение уровней энергии электронно-возбужденных состояний молекул V спектрально-люминесцентной группы с учетом их орбитальной природы и мультиплетности [Шигорин и др., 1993].

Такие молекулы характеризуются высшими возбужденными состояниями $\pi\pi^*$ -типа и эффективной конверсией возбуждения во флуоресцентное $S_{\pi\pi^*}$ -состояние из $T_{\pi\pi^*}$ - и $S_{\pi\pi^*}$ -состояний. Поэтому все молекулы эмиттеров биолюминесценции различных организмов (включая ЦЛМ, его протонированную и депротонированную формы) характеризуются высокими выходами $\pi\pi^*$ -

флуоресценции и высокой эффективностью внутримолекулярной деградации возбуждения из высших возбужденных состояний [Немцева, Кудряшева 2007; Belogurova et al., 2009; Белогурова, 2010].

Ранее в работах [Кудряшева и др., 1991; Kudryasheva et al., 2002; Немцева, Кудряшева, 2007] активность высших электронно-возбужденных состояний была доказана для бактериальной биолюминесценции; энергия этих состояний была локализована около 25000 см^{-1} . Было высказано предположение об универсальности гипотезы об активности высших возбужденных состояний эмиттера биолюминесценции, т.е. возможности распространения этой гипотезы и на биолюминесценцию других организмов. Действительно, в работах [Belogurova et al., 2009, Белогурова, 2010] на примере обелина дикого типа и его мутанта F88Y экспериментально подтверждено заселение высших электронно-возбужденных состояний в биолюминесцентной реакции кишечноплостных. Для доказательства заселенности высших электронно-возбужденных состояний эмиттера биолюминесценции в качестве акцепторов энергии использовали ряд экзогенных флуоресцентных соединений: пирен, нафталин, 2-метоксинафталин, энергия флуоресцентных состояний ($\pi\pi^*$ -типа) которых больше, чем энергия флуоресцентного состояния эмиттера биолюминесценции. Энергия высших электронно-возбужденных состояний была локализована около 31000 см^{-1} . Был предложен молекулярный механизм формирования первичного возбуждения, который включает стадию локализации возбуждения на кетоимидной группе ЦЛМ. На рисунке 1.7 изображен гетеролитический разрыв пероксидной связи (структура I). При этом образуется возбужденная карбонильная группа в синглетном $\pi\pi^*$ -состоянии. Это $\pi\pi^*$ -состояние характеризуется частичным смещением электронной плотности с несвязывающей n-орбитали атома кислорода на π^* -орбиталь ароматической молекулы ($n \rightarrow \pi^*$ переход [Шигорин и др., 1993]). Образованию и стабилизации этого состояния должно благоприятствовать электронно-донорное окружение карбонила кетоимидной группы в активном центре фотопротеина. Таким образом, образуется $\pi\pi^*$ -состояние, локализованное на карбонильной группе в положении 2, входящей в кетоимидную группу

(структура II, рисунок 1.7). Последующая внутримолекулярная деградация энергии распространяет возбуждение по всей молекуле (структура III, рисунок 1.7), формируя $\pi\pi^*$ -возбуждение. Процесс завершается испусканием кванта света ($\pi\pi^*$ -флуоресценция) [Белогурова, 2010].

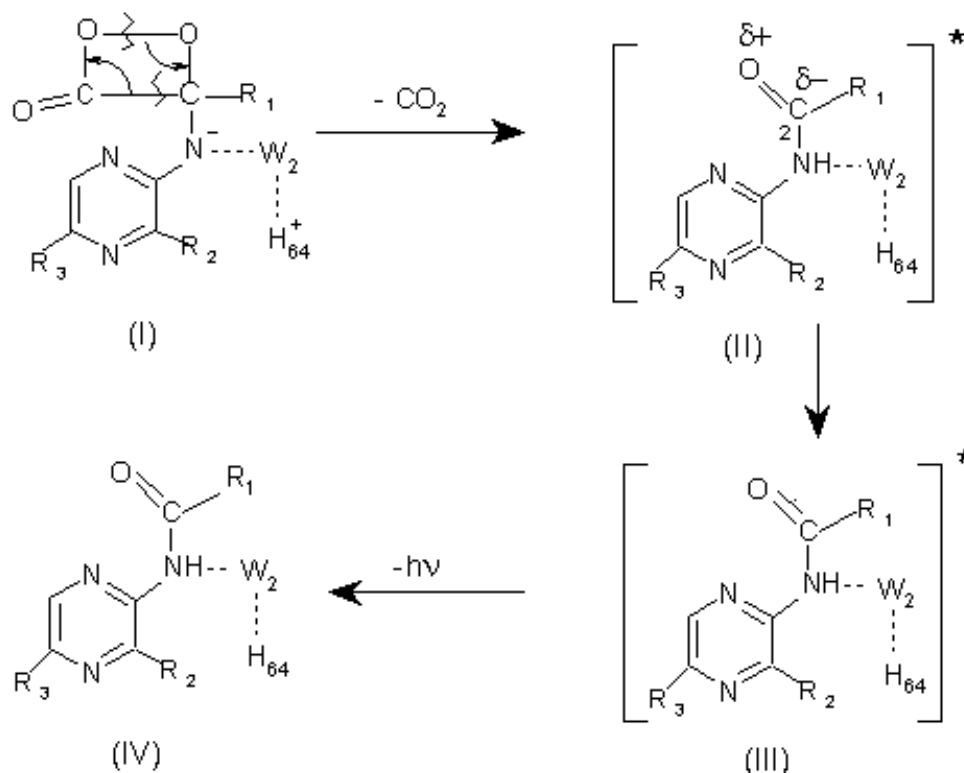


Рисунок 1.7. Стадии формирования возбуждения в Ca^{2+} -регулируемой билюминесцентной реакции обелина и образование высоковозбужденного состояния $\pi\pi^*$ -типа [Белогурова, 2010]. Структуры: (I) – 2-пероксицелентеразин, (II) – $\pi\pi^*$ -состояние целентерамида в качестве высоковозбужденного предшественника эмиттера, (III) – $\pi\pi^*$ -состояние целентерамида, (IV) – целентерамид в основном состоянии. H_{64} – аминокислота гистидин, W – молекула воды.

Аминокислотный состав фотопротеинов сильно различается, они содержат довольно много триптофановых остатков [Kretsinger, Nockolds, 1973]. Все фотопротеины, аминокислотные последовательности которых охарактеризованы

на данный момент, содержат шесть 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 α -спиралях, соответственно. Боковые цепи остатков Trp92 и Trp179 находятся по обе стороны от 6-(п-гидрокси)-фенильного кольца целентеразина, а боковые цепи Trp114 и Trp135 располагаются вблизи 2-(п-гидрокси)-бензильной группы целентеразина (рисунок 1.8а). Более того, атомы азота индольных колец Trp92 и Trp179 формируют водородные связи с атомами кислорода 6-(п-гидрокси)фенильной группы и С3-карбониллом целентеразина [Vysotski, Lee, 2004; Vysotski, Lee, 2007]. На рисунок 1.8б также представлена химическая структура ЦЛМ в разряженном обелине в присутствии Ca^{2+} в окружении аминокислот, формирующих водородные связи с атомами субстрата.

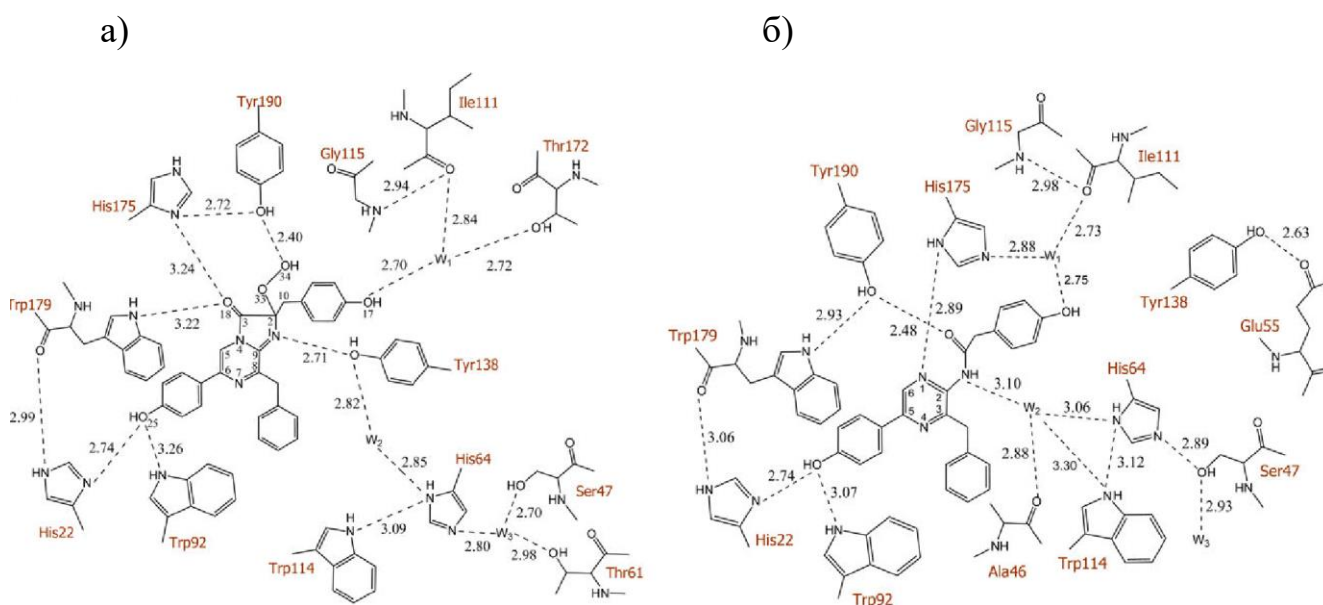


Рисунок 1.8. Химические структуры 2-гидропероксицелентеразина в обелине (а) и целентерамида в Ca^{2+} -разряженном обелине (б) в окружении аминокислот, формирующих водородные связи с атомами субстрата. Водородные связи показаны пунктиром, расстояние указано в ангстремах, W_1 и W_2 – молекулы воды [Liu et al., 2006].

Особенности микроокружения триптофанов в фотопротеине обелине и разряженном обелине определяют флуоресцентные свойства этих белков, а именно, эффективности излучательной и безызлучательной деградации энергии возбуждения, а также миграции возбуждения между различными боковыми группами аминокислотных остатков и ароматическими фрагментами ЦЛМ. Более подробно флуоресцентные характеристики аминокислот описаны в разделе 1.3.

Использование биолюминесценции фотопротеинов (обелина, акворина и др.) одно из важнейших направлений в биолюминесцентном анализе, который является в настоящее время широко используемым экспрессным методом биологического мониторинга окружающей среды [Girotti et al., 2008; Ugarova et al., 2005; Исмаилов, Алескерова, 2015; Ломакина и др., 2015; Kratasyuk, Esimbekova, 2015; Efremenko et al., 2016].

Расширение использования в биомедицинских исследованиях фотопротеина обелина связано с наличием бактериального штамма-суперпродуцента и разработкой эффективной технологии получения рекомбинантного обелина [Illarionov et al., 2000]. Благодаря способности люминесцировать в присутствии ионов кальция, фотопротеин обелин успешно используется для мониторинга внутриклеточного кальция [Campbell, Dormer, Hallet, 1985; Бондарь и др., 1990; Высоцкий и др., 2006]. Фотопротеины позволяют измерять концентрацию ионов кальция в диапазоне примерно от 0,5 до 100 мкМ в случае обелина и от 0,3 до 20 мкМ в случае акворина [Markova et al., 2002; Illarionov et al., 2000]. Поскольку в некоторых клеточных структурах, например, в митохондриях, концентрация Ca^{2+} значительно выше (~ 500 мкМ), то для мониторинга ионов кальция специально получены мутанты акворина с пониженной чувствительностью к кальцию [Kendall et al., 1992]. Достоинствами обелина как индикатора кальция являются простота регистрации люминесцентного сигнала, устойчивость к внутриклеточному окружению и отсутствие токсичности.

Обелин можно использовать не только в качестве биолюминесцентного [Markova et al., 2002], но и флуоресцентного (фотолюминесцентного) [Zhao et al.,

2005; Belogurova, Kudryasheva, 2010] индикаторов ионов кальция, однако, диапазон измеряемых концентраций кальция в этом случае ниже.

Помимо использования фотопротейна обелина в качестве индикатора внутриклеточного кальция, в целом ряде работ показана перспективность его применения в качестве меток в различных аналитических системах, прежде всего, в молекулярной диагностике – иммуноферментном и гибридизационном анализах [Высоцкий и др., 2006].

Разработан эффективный способ синтеза конъюгатов обелина с иммуноглобулинами и показана возможность использования полученных конъюгатов для иммуноанализа тиреотропного гормона, стимулирующего биосинтез тироидных гормонов щитовидной железой [Франк, Петунин, Высоцкий, 2004]. Показана возможность замены изотопной метки на безопасную биолюминесцентную обелиновую без потери качества анализа. Простота запуска реакции, высокая скорость фотопротейновой реакции и отсутствие инкубационного периода существенно укорачивают время анализа, что является преимуществом по сравнению с любыми ферментативными метками независимо от типа используемых субстратов, особенно при проведении большого массива измерений [Франк, Петунин, Высоцкий, 2004].

Конъюгат обелина с авидином или стрептавидином может успешно использоваться в качестве репортерного белка для выявления ДНК-фрагментов методом молекулярной гибридизации. При этом обелиновая биолюминесцентная метка обладает рядом преимуществ по сравнению с колориметрической [Борисова и др., 2008].

Фотопротейн обелин используется в качестве репортера в иммуноанализе [Frank, 2010]. Установлено, что репортерные молекулы на основе фотопротейна обелина могут быть получены генетическим слиянием с биоспецифическими полипептидами по его С-концу [Eremeeva et al., 2010].

В работе [Krasitskaya et al., 2012] показано, что использование биолюминесцентных меток на основе фотопротейна обелина и целентеразин-зависимой люцефифразы *Renilla muelleri* для детекции продуктов реакции

генотипирования методом ферментативного удлинения аллельспецифичного праймера представляет собой простой в исполнении, эффективный и относительно недорогой метод определения однонуклеотидного полиморфизма.

С помощью различных генно-инженерных манипуляций получают мутанты обелина для решения ряда аналитических задач, например, в работе [Malikova et al., 2003] получен мутант обелина (W95R), который имеет фиолетовую флуоресценцию (рисунок 1.9).

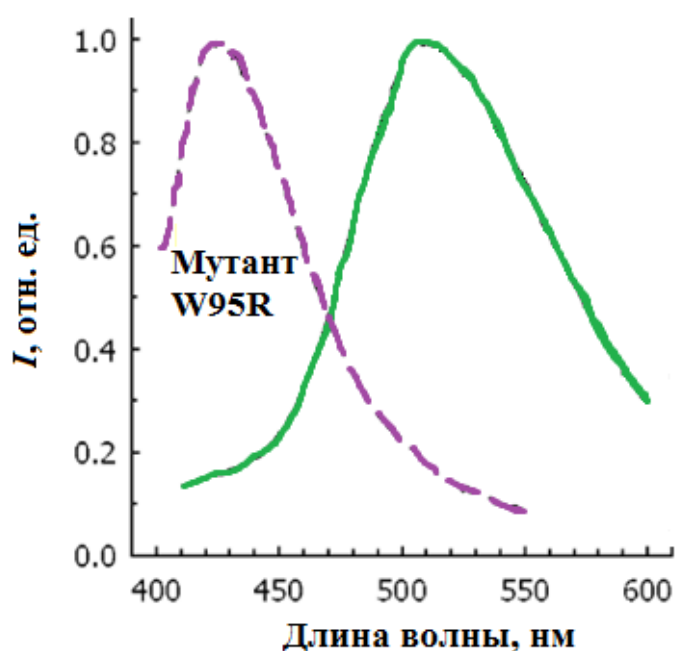


Рисунок 1.9. Спектры флуоресценции обелина и его мутанта W95R [Malikova et al., 2003].

Из вышесказанного видно, что область практического применения обелина постоянно расширяется. Однако, в перечисленных работах внимание уделено использованию билюминесценции обелина. Данных об использовании фотолюминесценции разряженного обелина в литературе представлено мало. В свою очередь, фотолюминесценция имеет преимущества перед билюминесценцией: отсутствие дополнительных биохимических процессов, возможность проводить повторные непрерывные измерения.

Известно, что спектры флуоресценции разряженного обелина являются суперпозицией нескольких излучателей, вклад которых определяет цвет люминесценции [Belogurova et al., 2008; Belogurova, Kudryasheva, 2010]. Возможность управлять цветом флуоресценции, изменяя физико-химические условия ферментативной среды и избегая трудоемкого и затратного генно-инженерного вмешательства, открывает перспективы использования ЦЛМ-содержащего обелина в качестве флуоресцентной метки.

1.2.2 Спектрально-люминесцентные и фотохимические свойства целентерамида – флуорофора разряженных фотопротеинов

В данном разделе описаны известные теоретические и экспериментальные исследования флуоресцентных свойств ЦЛМ, которые были проведены как для свободного ЦЛМ и его аналогов, так и для комплекса ЦЛМ с белком (биолюминесценция и фотолюминесценция фотопротеинов).

В водных растворах ЦЛМ флуоресцирует слабо (465 нм), но в органических растворителях – гораздо эффективнее; максимум его флуоресценции при переходе к органическому растворителю смещается в коротковолновую область до 380 нм [Saito et al., 1997], что логично приписать присутствию в неполярной среде неионизированной формы ЦЛМ.

Изучение свечения ЦЛМ и его аналогов в четырех различных растворителях (ДМСО, ацетонитриле, бензоле и н-бутаноле) показало, что ЦЛМ может образовывать четыре различные флуоресцентные формы, такие, как неионизированная форма (другие названия – протонированная или нейтральная), амид анион, комплекс с частичным переносом протона и резонансная структура фенолят-пирозин-N(4) анион (рисунок 1.10) [Shimomura, Teranishi, 2000; Imai et al., 2001].

Ионизированная форма ЦЛМ образуется из неионизированной в результате фотохимического процесса переноса протона во флуоресцентном состоянии. На рисунке 1.11 схематично показаны различные флуоресцентные состояния энергий

неионизированной (протонированной) и ионизированной (депротонированной или частично депротонированной) форм ЦЛМ [Alieva et al., 2016]. Флуоресцентные формы ЦЛМ различаются энергий флуоресцентных состояний, а, следовательно, и цветом люминесценции.

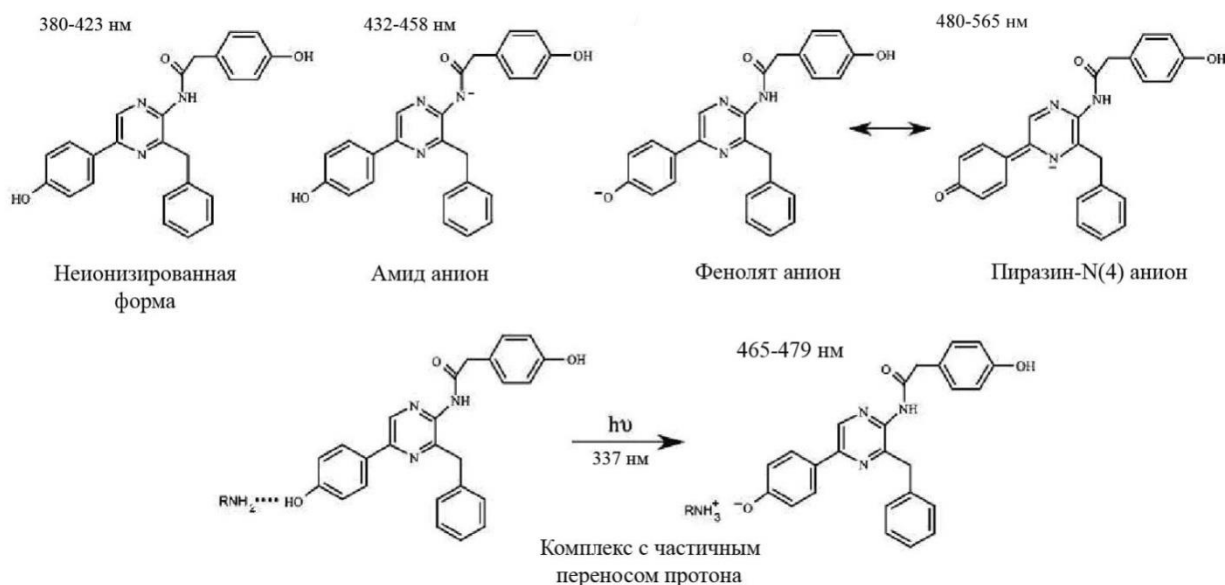


Рисунок 1.10. Флуоресцентные эмиттеры целентерамида [Shimomura, Teranishi, 2000].

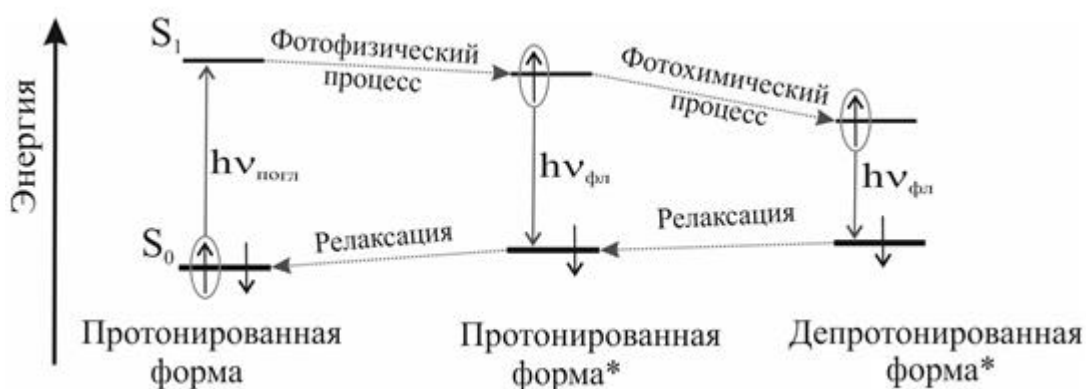


Рисунок 1.11. Схема фотофизических и фотохимических процессов, инициирующих образование флуоресцентных состояний целентерамида в разряженном обелине [Alieva et al., 2016].

В разряженных фотопротеинах ЦЛМ связан с полипептидом (апобелком), что усложняет понимание механизма образования эмиттеров биолюминесценции и фотолюминесценции фотопротеинов.

При изучении модельных хемилюминесцентных реакций в растворах амид анион был идентифицирован как первичное возбужденное состояние [McCarra, Chang, 1967]. Далее Хори с коллегами [Hori et al., 1973] провели исследования хемилюминесцентных свойств ряда аналогов целентеразина. На основании спектрального сходства флуоресценции амид аниона и биолюминесценции акворина сделан вывод о том, что амид анион является эмиттером биолюминесценции акворина. В работе профессора Шимомура [Shimomura, Teranishi, 2000] также предполагалось, что эмиттером флуоресценции акворина, помимо протонированной формы ЦЛМ, может быть амид анион, максимум флуоресценции которого наблюдается при 435-458 нм.

Однако следует отметить, что в случае биолюминесценции и фотолюминесценции фотопротеинов, в отличие от модельных экспериментов с ЦЛМ и его аналогами, флуорофор находится в окружении аминокислотных остатков и взаимодействует с ними через систему водородных связей. В этих условиях весьма вероятен перенос протона, который будет менять структуру молекулы излучателя. Известно, что биолюминесценция обелина, в отличие от акворина (465 нм [Shimomura, 1985]), имеет более длинноволновый максимум 485 нм и коротковолновое плечо около 400 нм [Markova et al., 2002], которое, вероятно, соответствует излучению протонированной формы ЦЛМ. Это согласуется с работами, в которых при замене аминокислоты Trp92 на Phe в обелине [Deng et al., 2001; Vysotski et al., 2003] и Trp86 в акворине [Ohmiya et al., 1992] было подтверждено, что часть возбужденных молекул ЦЛМ находится в протонированном состоянии.

В дальнейших работах в качестве эмиттеров люминесценции фотопротеинов были предложены протонированная форма ЦЛМ и фенолят анион. Хирано и его коллеги, изучая флуоресценцию аналогов целентерамида [Imai et al., 2001] предположили, что, эмиттером биолюминесценции акворина является

фенолят анион, а не амид анион, как считалось ранее. В других работах [Vysotski, Lee, 2004; Liu et al., 2006] также подтверждается, что амид анион не может претендовать на роль эмиттера люминесценции фотопротеинов.

В работе Томила [Tomilin et al., 2008] показано, что спектр биолюминесценции обелина определяется положением протона между атомом кислорода фенольного фрагмента ЦЛМ и атомом азота His22. Затем, в работе Антипиной [Антипина, Овчинников, 2010] с помощью квантово-химических методов показано, что спектр фотолюминесценции обелина зависит от положения протона между ЦЛМ и His22, в связи с этим на роль эмиттера предложено ион-парное состояние фенолят аниона ЦЛМ (комплекс с переносом протона). Моделирование проводили следующим образом. Протон помещали в различные положения между двумя крайними позициями, расстояние между которыми составляло 2,42 Å. В каждом положении отдельно рассчитывали параметры основного и возбужденного состояний. Оказалось, что расстояние 0,92 Å между кислородом и протоном соответствует равновесной геометрии основного состояния протонированной формы ЦЛМ, а расстояние около 1,65 Å соответствует экспериментальной флуоресценции с энергией около 2,5 эВ (~ 500 нм).

Квантово-химические расчеты, показывают, что в белке вероятность полного отрыва протона от фенольной группы ЦЛМ (переход протона к гистидину) очень мала [Tomilin et al., 2008; Антипина, Овчинников, 2010]. Это согласуется с тем, что фенольная группа характеризуется более выраженными кислотными свойствами в первом синглетном возбужденном состоянии, чем в основном состоянии [Turro, 1991]. В возбужденном состоянии значение pK^* фенольной группы ЦЛМ падает по сравнению с основным состоянием [Shimomura, Teranishi, 2000] и может быть даже ниже, чем pK гистидина (6,5) [Vysotski, Lee, 2004]. Поэтому быстрый перенос протона с образованием возбужденной фенольной ионной пары (комплекса с частичным переносом протона) вполне вероятен. Это подтверждается данными по влиянию pH и D₂O на бимодальный спектр W92F-мутанта обелина [Vysotski et al., 2003], а также

наблюдаемыми изменениями в спектрах биолюминесценции, происходящими в результате замен аминокислот в окружении 6-(*n*-гидрокси)-фенильной группы целентеразина [Malikova et al., 2003; Stepanyuk et al., 2005].

Также известно, что фенолят анион ЦЛМ может существовать в различных резонансных формах в зависимости от полярности растворителя. Максимумы флуоресценции различных ионных форм фенолят аниона в растворе варьируются в диапазоне от 452 до 615 нм (рисунок 1.12) [Mori et al., 2006], что включает в себя диапазон люминесценции (биолюминесценции и фотолюминесценции) различных фотопротеинов.

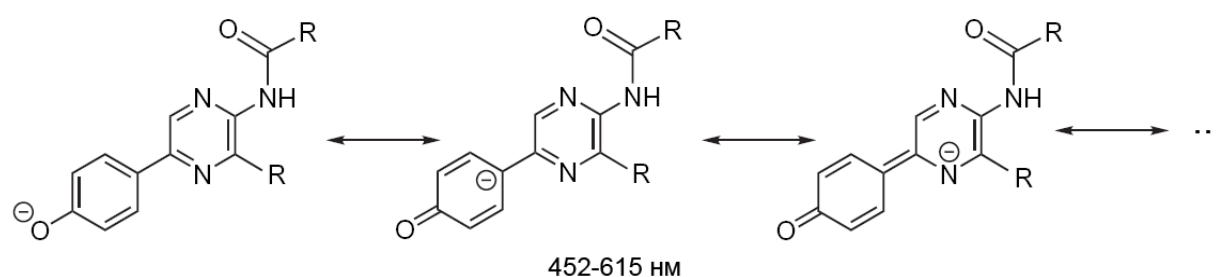


Рисунок 1.12. Резонансные формы фенолят аниона целентерамида [Mori et al., 2006].

Позднее были проведены эксперименты с использованием спектроскопии с временным разрешением по изучению флуоресцентных свойств спектральных компонент фотолюминесценции разряженных фотопротеинов обелина и акворина [Oort et al., 2009]. В этой работе показано, что при пикосекундном разрешении во флуоресценции разряженных фотопротеинов акворина и обелина наблюдаются две компоненты: одна с более высокой энергией ($\sim 25000 \text{ см}^{-1}$), соответствующая нейтральной форме ЦЛМ, и вторая с более низкой энергией – 19400 см^{-1} для обелина и 21300 см^{-1} для акворина. Время жизни ($t_{1/2}$) флуоресцентных форм для второй компоненты составляет 4 нс в обоих случаях, а для первой компоненты ~ 2 пс для разряженного обелина и 30 пс для разряженного акворина.

В работе [Chen et al., 2012] были изучены конформационные состояния протонированной формы ЦЛМ и фенолят аниона. Сделан вывод, что наиболее

вероятным первичным возбужденным состоянием продукта хемилюминесценции и биолюминесценции является нейтральная форма ЦЛМ.

В работе [Li et al., The dynamics ... , 2013] проведен квантово-химический расчет структур, участвующих в процессе протонирования ЦЛМ в белке. Для расчетов были использованы параметры кристаллической структуры 2F8P, соответствующей обелину, разряженному кальцием. Расчет показывает, что максимум поглощения протонированной формы ЦЛМ соответствует 334,2 нм; поглощение фенолят аниона сдвинуто в длинноволновую область – 382,8 нм. Максимум испускания для протонированной формы составляет 399,26 нм, для фенолят аниона – 492,21 нм. Таким образом, расчеты показывают, что перемещение протона от фенольной группы ЦЛМ к His22 сдвигает максимум спектра испускания в длинноволновую область. В работе продемонстрировано, что протонированная и депротонированная (фенолят анион) формы ЦЛМ формируются с участием ВЗМО и НВМО, ВЗМО+1, причем переход ВЗМО → НВМО для протонированной формы более эффективен (таблица 1.1). Разность энергий ВЗМО и НВМО для протонированной формы составляет 4,25 эВ, для фенолят аниона – 3,09 эВ.

Таблица 1.1. Квантово-химические расчеты форм целентерамида в гидрофобной среде с помощью TD DFT/V3LYP/6-31 + G (d). λ_{\max} – максимум поглощения, f – сила осциллятора [Li et al., The dynamics ... , 2013].

Формы целентерамида	λ_{\max} , нм	f	Электронные переходы
Протонированная	334,2	0,4269	ВЗМО → НВМО (80 %) ВЗМО-1 → НВМО (20 %)
Фенолят анион	382,8	0,66002	ВЗМО → НВМО (23 %) ВЗМО → НВМО + 1 (77 %)

В работе [Min et al., 2013] были изучены флуоресцентные свойства шести различных возможных излучателей ЦЛМ (нейтральной формы, фенолят аниона,

фенолят аниона с ионами щелочных металлов (фенолят⁻, Li⁺, Na⁺, K⁺), амида аниона, пиазин аниона и дианиона) в вакууме, в водном растворе, гидрофобной среде и бензоле. Расчётные максимумы испускания протонированной формы в воде (371,4 нм), в гидрофобной среде (357,8 нм) и бензоле (348,4 нм) различны. Разность энергий для нейтральной формы составляет 4,21 эВ, фенолят аниона – 3,42 эВ, амид аниона – 3,85 эВ, дианиона – 3,53 эВ (рисунок 1.13). В работе говорится, что фенолят анион образуется в процессе депротонирования нейтральной формы в возбужденном состоянии, причем, он образуется с меньшей затратой энергии, чем амид анион. Фенолят анион не может быть депротонирован с образованием дианиона, как считалось ранее в [Hori et al., 1973].

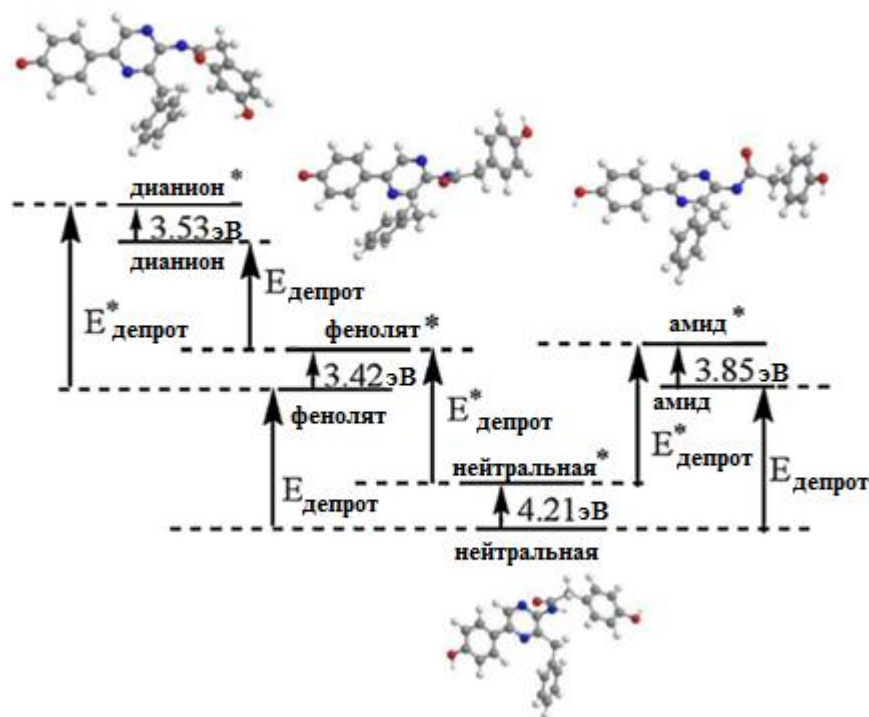


Рисунок 1.13. Энергии возбуждения S_0 - S_1 различных форм целентерамида (нейтральной, фенолят аниона, амид аниона и дианиона) предсказанные методом TD/ CAM-B3LYP/ 6-31 + G (d) в воде с учетом модели PCM [Min et al., 2013].

Таким образом, образование эмиттеров люминесценции (биолюминесценции и фотолюминесценции) фотопротеинов сопровождается переносом протона в возбужденном состоянии ЦЛМ и контролируется

аминокислотными остатками активного центра белка. Эмиттерами люминесценции являются протонированная и депротонированные формы ЦЛМ. Вклад этих форм в спектрах флуоресценции разряженных фотопротеинов зависит от эффективности фотохимического процесса (переноса протона) (рис. 1.11) и регулируется микроокружением.

1.3 Флуоресцентные свойства ароматических аминокислот в белках

Зависимость спектров фотолюминесценции разряженных фотопротеинов от энергии фотовозбуждения [Белогурова, 2010] предполагает анализ процессов внутрикомплексной миграции энергии возбуждения с участием ароматических фрагментов аминокислотных остатков.

Известно, что в состав белков входят три аминокислотных остатка – тирозин (Tyr), триптофан (Trp) и фенилаланин (Phe), ароматические фрагменты которых вносят вклад во флуоресценцию в ультрафиолетовой области спектра. Спектры поглощения и флуоресценции этих аминокислот в водных растворах показаны на рисунке 1.14 [Lakowicz, 2006].

Фенилаланин демонстрирует самое коротковолновое поглощение (255 нм) и флуоресценцию с максимумом около 282 нм (рисунок 1.14). Максимум флуоресценции тирозина в водных растворах составляет примерно 303 нм (рисунок 1.14) и является относительно нечувствительным к полярности растворителя. Максимум флуоресценции триптофана в воде – 350 нм (рисунок 1.14).

Собственная флуоресценция белков чаще всего возбуждается светом с длиной волны 280 нм или больше, что выходит за пределы области поглощения фенилаланина. Более того, квантовый выход излучения фенилаланина в белках очень мал – 0,04 [Векшин, 2014], таким образом, в большинстве экспериментов остатки фенилаланина не вносят вклада в общую флуоресценцию.

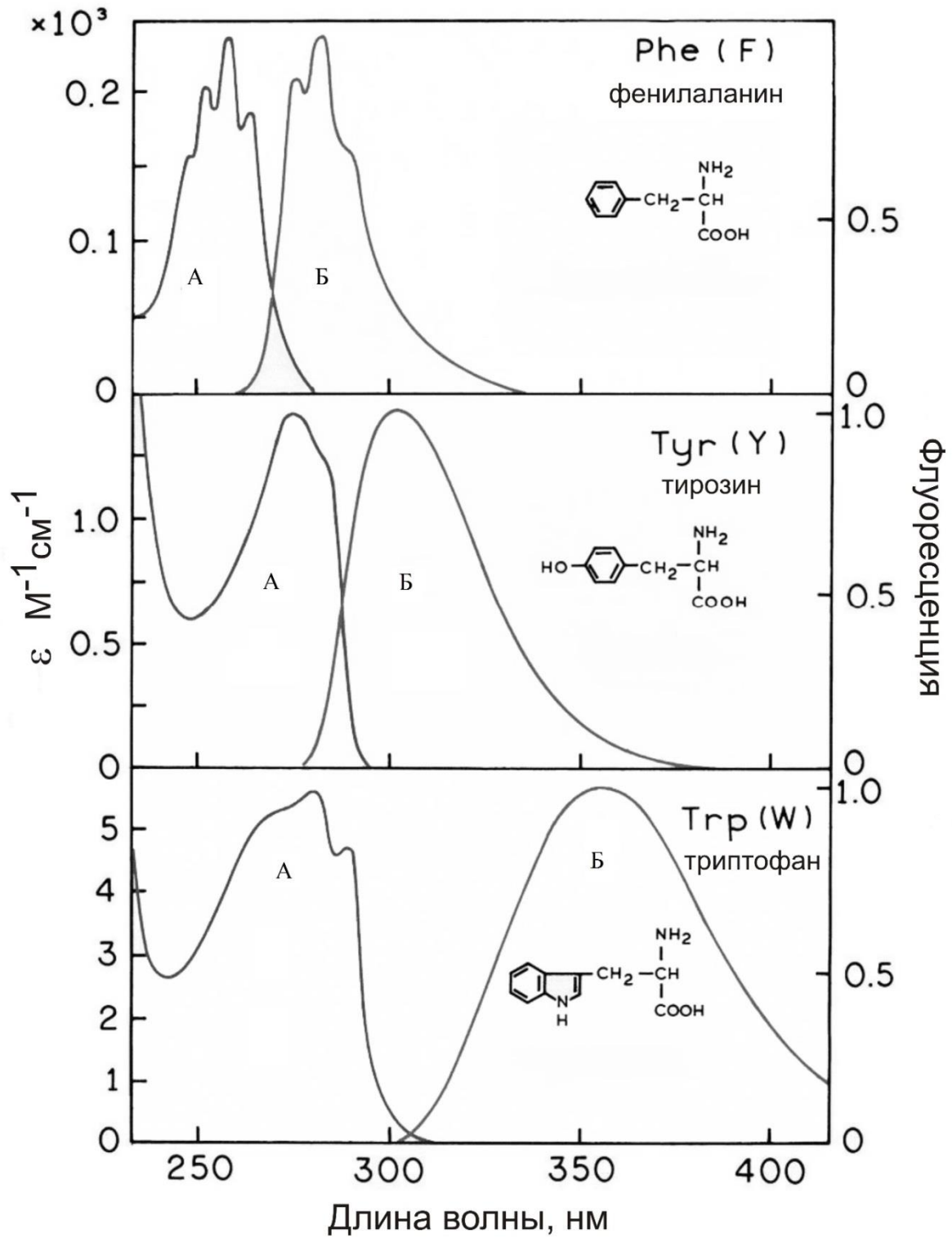


Рисунок 1.14. Спектры поглощения (А) и испускания (Б) ароматических аминокислот в водных растворах при рН 7 [Lakowicz, 2006].

Поглощение белков при 280 нм определяется остатками тирозина и триптофана. При комнатной температуре в нейтральных водных растворах

квантовый выход тирозина, триптофана равен 0,14 и 0,2 соответственно [Chen, 1967; Векшин, 2014]. При длинах волн больше 295 нм поглощение происходит преимущественно за счет триптофанов, таким образом, используя возбуждение при 295-305 нм, можно селективно выделить флуоресценцию триптофановых остатков [Лакович, 1986].

Тирозин представляет собой довольно простой флуорофор, но при ряде условий эта аминокислота может демонстрировать сложные спектральные свойства. Например, в возбужденном состоянии тирозин может переходить в ионизированное состояние, при котором происходит потеря протона ароматической гидроксильной группой. В основном состоянии pK этого гидроксила около 10, но в возбужденном состоянии pK уменьшается до ~ 4 . Гидроксильная группа может диссоциировать в течение времени жизни возбужденного состояния, что приводит к тушению флуоресценции тирозина. Тирозинат слабо флуоресцирует на 350 нм, поэтому его излучение можно принять за флуоресценцию триптофанов [Лакович, 1986]. Необходимо отметить, что описанное явление ионизации возбужденного состояния тирозина происходит достаточно редко.

Благодаря перекрытию спектров поглощения и испускания аминокислот, ответственных за собственную флуоресценцию белков (рисунок 1.14), может происходить резонансный перенос энергии – с фенилаланина на тирозин, а затем на триптофан. Перенос энергии часто наблюдается во многих белках и является основной причиной того, что вклад фенилаланинов и тирозинов в собственную флуоресценцию большинства белков минимален. Кроме того, перенос энергии возможен и с одних триптофанов на другие в случае, если эти остатки находятся в различном окружении и демонстрируют различные спектральные свойства [Лакович, 1986].

В отличие от фенилаланина и тирозина, максимум флуоресценции триптофана сильно зависит от полярности растворителя и микроокружения [Лакович, 1986; Eftink, 1990]. Одним из таких факторов, изменяющих спектральные свойства триптофанов, является полярность раствора (рисунок 1.15)

[Gryczynski et al., 1988]. Например, спектры флуоресценции триптофанов изменяются, если иминогруппы (NH) триптофанов формируют водородные связи с соседними молекулами. В неполярном растворителе (циклогексане), где водородные связи не образуются, флуоресценция индола структурирована и сдвинута в голубую область спектра. В присутствии этанола тонкая структура спектра теряется, и максимум излучения сдвигается в длинноволновую область (рисунок 1.15). Кроме того, флуоресценция триптофана может тушиться боковыми цепями аминокислотных остатков. Как следствие, спектр излучения каждого остатка триптофана в белке зависит от его микроокружения.

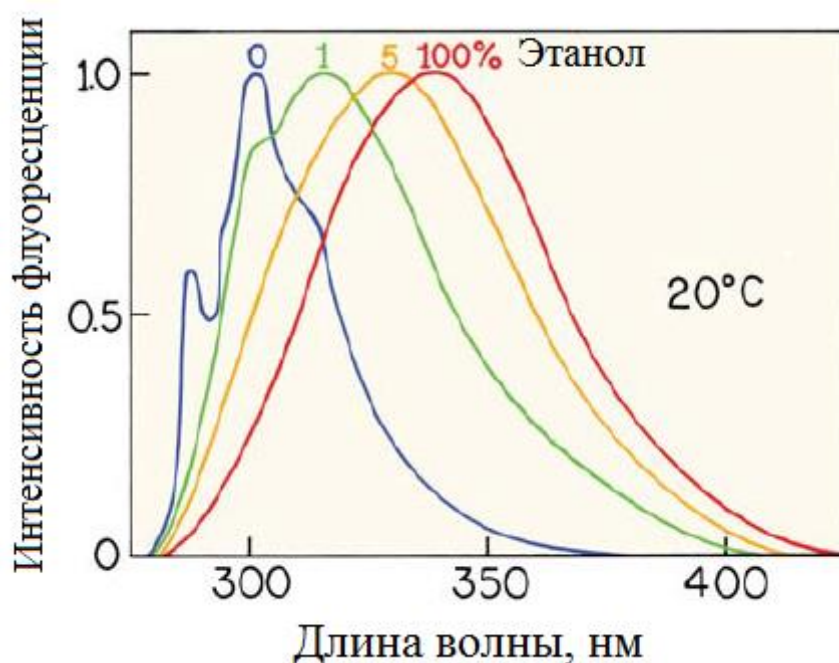


Рисунок 1.15. Спектры флуоресценции индола в циклогексане при различных концентрациях этанола, 20 °С [Gryczynski et al., 1988].

Детальный анализ флуоресценции белков затрудняется наличием в большинстве белков нескольких разных триптофановых остатков. Так как каждый остаток находится в разном окружении, то и спектральные свойства каждого остатка в общем случае различаются. Испускания всех остатков перекрываются во всем используемом диапазоне длин волн, и довольно сложно разделить спектральные вклады каждого из них в многотриптофановом белке. Кроме того,

спектры испускания и кинетика затухания интенсивности флуоресценции довольно сложны, как было найдено даже для свободного триптофана и для белков, содержащих единственный триптофановый остаток [Lakowicz, 2006].

В работах [Pattanaik, et al., 2003; Loewenthal, et al., 1991] для того чтобы определить вклад каждого триптофанового остатка в общую собственную флуоресценцию белка или исследовать взаимодействия между остатками триптофанов, используют мутанты с заменами отдельных остатков триптофанов на фенилаланин или другие аминокислотные остатки. Необходимо отметить, что чем больше остатков триптофанов в исследуемом белке, тем сложнее интерпретация спектральных данных.

В работе [Eremeeva et al., 2009] был определен вклад отдельных триптофановых остатков в собственную флуоресценцию апообелина путем замены отдельных остатков триптофанов на фенилаланин. Показано, что вклад отдельных остатков триптофанов в собственную флуоресценцию апообелина различен. Установлено, что Trp92, находящийся глубоко в целентеразин-связывающей полости, ответствен за 40 % общей собственной флуоресценции апообелина. Другие два остатка триптофанов, расположенные в целентеразин-связывающей полости, а именно Trp114 и Trp179, ответственны за 20 % общей собственной флуоресценции апообелина каждый, так же, как и Trp18, находящийся в первой α -спирали. Четвертый триптофан целентеразин-связывающей полости – Trp135 практически не влияет на общий уровень собственной флуоресценции, в то время как вклад Trp103 – единственного триптофанового остатка, расположенного на поверхности белка, составляет приблизительно 5 % в собственную флуоресценцию апообелина. Таким образом, в работе показано, что при фотовозбуждении 295 нм апообелин дает флуоресценцию с максимумом 336 нм, за которую ответственны несколько триптофанов, вклад в общую флуоресценцию которых различен.

В работе [Немцева и др., 2016] проведен анализ времени жизни триптофановой флуоресценции белков в нативном и денатурированном состояниях. Были исследованы белки с разным количеством триптофановых

остатков: сывороточный альбумин человека, бычий сывороточный альбумин и бактериальная люцифераза *Photobacterium leiognathi*, содержащих в составе один, два и семь триптофановых остатков соответственно. Анализ данных показал, что во всех случаях (независимо от длины волны регистрации, конформационного состояния белка, количества триптофановых остатков) затухание носит не моноэкспоненциальный характер и требует описания суммой не менее трех экспонент. Показано, что флуоресценция всех исследованных белков характеризуется тремя временами жизни: $\tau_1 = 6-7$ нс, $\tau_2 = 2,0-2,3$ нс и $\tau_3 \leq 0,1$ нс (нативное состояние) и $\tau_1 = 4,4-4,6$ нс, $\tau_2 = 1,7-1,8$ нс и $\tau_3 \leq 0,1$ нс (денатурированной состояние). Установлено, что спектральные контуры компонент с индивидуальным временем жизни флуоресценции белков близки по положению максимума и полуширине спектра как в случае нативной конформации ($\lambda_{\tau_1} = 342$ нм, $\lambda_{\tau_2} = 328$ нм и $\lambda_{\tau_3} = 315$ нм), так и в случае денатурированной конформации ($\lambda_{\tau_1} = 350$ нм, $\lambda_{\tau_2} = 343$ нм и $\lambda_{\tau_3} = 317$ нм). При этом различия в стационарных спектрах белков обусловлены индивидуальным соотношением вкладов как минимум двух временных компонент: с длинным временем жизни (6-7 нс) и средним (около 2 нс). Первая компонента характеризуется батохромным сдвигом, что может свидетельствовать о высокой полярности и подвижности микроокружения триптофанов. Денатурированные белки, вне зависимости от исходной структуры имеют спектральные компоненты с близкими временами жизни, энергетическими характеристиками и соотношением вкладов [Немцева и др., 2016].

1.4 Влияние физико-химических факторов на свойства флуоресцентных белков

Как следует из предыдущих разделов, существует возможность варьирования спектральных характеристик ЦЛМ-содержащих белков. В качестве варьирующих факторов могут служить (1) энергия фотовозбуждения, определяющая особенности внутрикомплексной деградации возбуждения и (2)

деструктивные воздействия на комплекс белок-флуорофор, изменяющие микроокружение флуорофора (ЦЛМ) и влияющие на степень его депротонирования в возбужденном состоянии.

1.4.1 Зависимость спектров флуоресценции флуоресцентных белков от энергии фотовозбуждения

Имеются данные о возможности варьирования спектров флуоресценции GFP и GFP-подобных белков. Известно, что GFP дикого типа из *Aequorea* имеет сложные спектры поглощения и флуоресценции (рисунок 1.16) [Tsien, 1998].

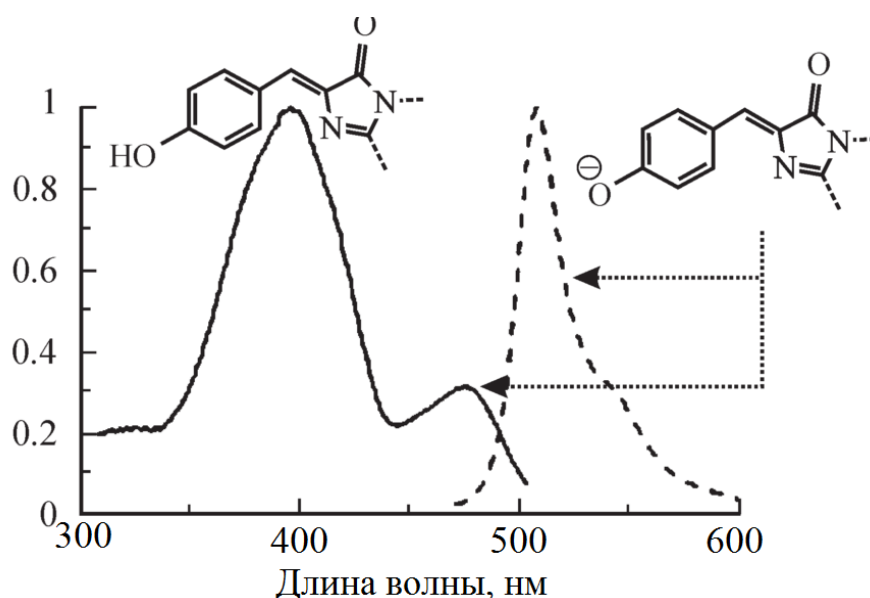


Рисунок 1.16. Спектры поглощения и флуоресценции (сплошная и штриховая линии соответственно) GFP дикого типа из *Aequorea* и структуры флуорофора [Tsien, 1998].

Спектр поглощения GFP имеет два максимума: 395 нм и 475 нм (рисунок 1.16). Возбуждение в области полосы с максимумом 395 нм приводит к возникновению спектра флуоресценции с максимумом 508 нм, тогда как возбуждение более длинноволновым светом (475 нм) приводит к возникновению спектра флуоресценции с максимумом 503 нм [Heim et al., 1994]. Таким образом,

спектр флуоресценции GFP дикого типа зависит от длины волны возбуждения. Это свидетельствует о том, что существуют, по меньшей мере, две химически различные формы флуорофора, равновесие между которыми не успевает установиться за время жизни в возбужденном состоянии. Было предложено, что полоса поглощения с максимумом 475 нм появляется за счет молекул GFP, содержащих депротонированный (анионный) флуорофор, тогда как полоса с максимумом 395 нм связана с поглощением GFP, содержащим протонированный (нейтральный) флуорофор [Cubitt et al., 1995] (рисунок 1.16).

Отдельную спектральную группу составляют так называемые фотоактивируемые флуоресцентные белки (photoactivatable fluorescent proteins, PAFPs), которые способны к существенному изменению флуоресцентных свойств при облучении достаточно интенсивным светом определенной длины волны. Некоторые PAFPs переходят из нефлуоресцентной структуры во флуоресцентную в результате действия облучения (фотоактивации), в то время как другие изменяют цвет флуоресценции при облучении светом (фотопереключение). Например, белок PA-GFP (Photoactivatable Green Fluorescent Protein) [Patterson, Lippincott-Schwartz, 2002] создан на основе GFP из *Aequorea* путем введения единичной замены остатка Thr203 на His, поэтому флуорофор PA-GFP находится преимущественно в протонированном состоянии. PA-GFP имеет максимумы поглощения и флуоресценции при 400 и 515 нм соответственно. При возбуждении в полосе поглощения анионной формы хромофора (480-510 нм) интенсивность флуоресценции PA-GFP чрезвычайно низка. Облучение 400 нм вызывает необратимый переход флуорофора из нейтральной в анионную форму, которая имеет максимумы поглощения и флуоресценции при 504 и 517 нм соответственно. В результате фотоактивации интенсивность зеленой флуоресценции анионной формы PA-GFP увеличивается в 100 раз. В противоположность PA-GFP, фотопереключаемый белок PS-CFP (Photoswitchable Green Fluorescent Protein) [Chudakov et al., 2004] флуоресцирует в синей области спектра (468 нм), а облучение белка ультрафиолетовым светом высокой интенсивности приводит к увеличению зеленой флуоресценции при 511 нм в 300

раз и уменьшению синей флуоресценции в 5 раз. Данный переход необратим [Степаненко и др., 2007].

Фотоактивируемые и фотопереключаемые белки стали очень популярными инструментами для отслеживания перемещения клеток, клеточных органелл и белков в системах *in vivo*.

Таким образом, флуоресценция GFP и GFP-подобных белков зависит от энергии фотовозбуждения, что объясняется наличием протонированной и депротонированной форм флуорофоров, каждая из которых характеризуется собственным спектрами поглощения и флуоресценции.

В случае разряженного обелина в работе [Белогурова, 2010] были предприняты попытки выявить зависимость спектров фотолюминесценции от длины волны возбуждения в видимой области, однако, четких доказательств существования таких зависимостей не было представлено.

1.4.2 Физико-химические механизмы воздействия экзогенных соединений на биологическую люминесценцию

Физико-химические механизмы воздействия экзогенных соединений на биологическую люминесценцию изучались в основном на примере бактериальной биолюминесценции. Это связано с тем, что именно бактериальная биолюминесценция наиболее чувствительна к токсикантам и поэтому уже несколько десятилетий используется для мониторинга химической токсичности водных сред. Для выявления физико-химических механизмов воздействий удобно использовать систему сопряженных ферментативных реакций с участием ферментов, выделенных из бактерий [Kratasyuk, Esimbekova, 2015]. В работе [Kudryasheva, 2006] механизмы воздействия экзогенных соединений на эту систему связаны с влиянием на ферменты, низкомолекулярные компоненты и скорости их взаимодействия, а также с процессами межмолекулярного и внутримолекулярного переноса энергии. В этой работе предложена классификация механизмов воздействия экзогенных соединений на

биоломинесценцию системы ферментативных реакций. Было выделено пять возможных механизмов (рисунок 1.17): (1) процессы переноса энергии с участием возбужденных состояний экзогенных молекул, (2) увеличение вероятности $S \sim T$ конверсии в эмиттере биоломинесценции в присутствии тяжелого атома галоида, (3) изменение скоростей сопряженных ферментативных реакций, (4) взаимодействие с ферментами и изменение их активности, (5) неспецифическое влияние доноров и акцепторов электронов на распределение электронной плотности в биоломинесцентной системе. Механизмы (1-2 и 4-5) могут быть актуальны и для фотолюминесценции разряженных фотопротеинов.

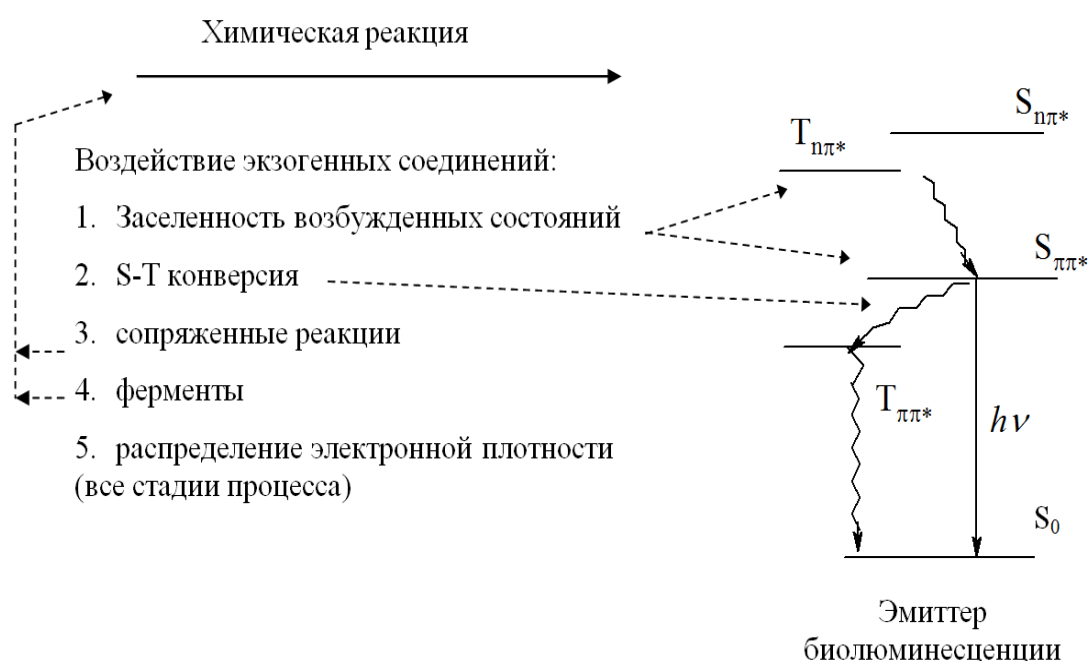


Рисунок 1.17. Влияние экзогенных соединений на различных стадиях биоломинесцентного процесса [Kudryasheva, 2006].

Вместе с тем, закономерности воздействия экзогенных соединений на фотолюминесценцию разряженных фотопротеинов в настоящее время не исследованы.

Представляется важным изучение влияния на люминесцентные свойства разряженного обелина сопутствующих веществ, применяемых в биомедицинских исследованиях. В частности, представляет интерес влияние на флуоресценцию

разряженного обелина таких соединений, как этиленгликоль, глицерин и диметилсульфоксид (ДМСО), которые используются в криобиологии в качестве криопротекторов (веществ, защищающих живые объекты от повреждающего действия замораживания). Такие вещества стабилизируют гидратную структуру белков, снижают поверхностное натяжение и силу водородных связей, в результате чего большее число конформационных переходов белковой молекулы становятся обратимыми. Криопротекторы препятствуют формированию кристаллов льда за счёт образования водородных связей с молекулами воды.

Ранее, в работе [Белогурова, 2010] продемонстрировано влияние этанола на биолюминесценцию акворина и обелина. Было обнаружено, что увеличение концентрации этилового спирта (0-4,67 об%) вызывает смещение спектров биолюминесценции акворина, мутантов обелина I144N и Y138F в коротковолновую область, в то время как спектры биолюминесценции обелина дикого типа и его мутанта F88Y остаются стабильными. Таким образом, добавление этилового спирта в реакционную смесь, снижающее полярность раствора фотопотеина, может вызвать смещение спектра биолюминесценции.

1.4.3 Влияние условий получения разряженного обелина на его флуоресцентные характеристики

Флуоресцентные характеристики разряженного обелина могут изменяться при варьировании концентрации ионов кальция. В работах [Белогурова, 2010; Belogurova, Kudryasheva, 2010] впервые продемонстрировано, что форма спектра биолюминесценции обелина не зависит от концентрации Ca^{2+} в системе, в то время как форма спектра фотолюминесценции разряженного обелина (испускания и возбуждения) зависят. По сравнению с разряженным обелином, полученным при повышенной температуре без добавления ионов кальция, присутствие Ca^{2+} вызывает сдвиг максимума спектра возбуждения в коротковолновую (на 4 нм), а максимума спектра испускания в длинноволновую (на 10 нм) область. При этом наблюдается уменьшение интенсивности коротковолнового плеча в спектре

испускания. Обнаружен линейный участок зависимости интенсивности фотолюминесценции разряженного обелина от концентрации ионов кальция в двойных логарифмических координатах в интервале концентраций $2 \cdot 10^{-7}$ - $1,5 \cdot 10^{-6}$ М, что дает возможность использовать флуоресценцию разряженного обелина для определения ионов кальция в различных системах [Белогурова, 2010; Belogurova, Kudryasheva, 2010].

Таким образом, спектры флуоресценции разряженного обелина зависят от концентрации ионов кальция, что вероятно связано с изменением структуры белка, и, следовательно, микроокружением флуорофора (ЦЛМ). В настоящей работе концентрация ионов кальция в ферментативной системе подобрана так, чтобы вероятность заселения всех трех кальций-связывающих сайтов была максимальной для всех образцов.

Также известно, что флуоресцентные характеристики разряженного обелина чувствительны к температурному воздействию в отсутствие ионов кальция. В фотопротеине обелине может протекать реакция окисления флуорофора (целентеразина) не только в присутствии Ca^{2+} , но и при его отсутствии [Франк, 1997], причем, скорость этой реакции зависит от температуры. Зависимость интенсивности биолюминесценции обелина от времени инкубации приведена на рисунке 1.18, из которого видно, что при температуре 20 °С интенсивность свечения обелина не меняется в течение часа.

При комнатной температуре (18-20 °С) биолюминесцентная активность белка сохраняется в течение суток, а при хранении в камере бытового холодильника (около 4 °С) – в течение 1,5 месяцев. При инкубации в течение часа при 30 °С активность теряется на 15-18 %. Повышение температуры до 40 °С приводит к резкому снижению биолюминесцентной активности белка за это же время (на 95 %), а при 50 °С уже через 30 минут остается только 3 % от первоначальной активности. Падение биолюминесцентной активности обелина хорошо аппроксимируется экспонентой, т.е. процесс инактивации подчиняется кинетике мономолекулярной реакции [Франк, 1997].

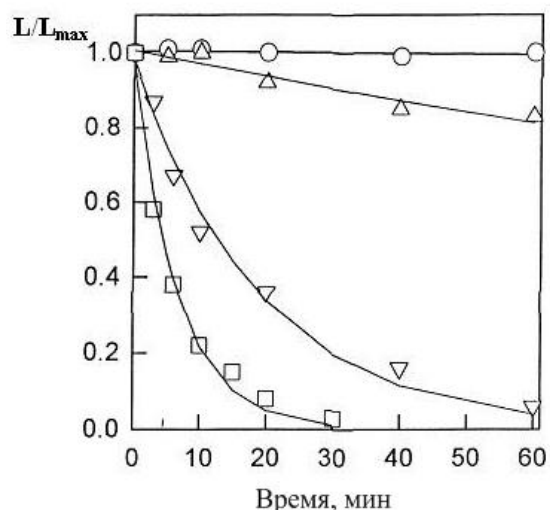


Рисунок 1.18. Инактивация обелина в зависимости от температуры и времени инкубации [Франк, 1997]. ○ – 20 °C; △ – 30 °C; ▽ – 40 °C; □ – 50 °C; L – интенси́вность люминесценции, L_{\max} – интенси́вность люминесценции в начальный момент времени.

Разряженный обелин может использоваться в качестве флуоресцентного биомаркера с заданными цветовыми характеристиками в различных биомедицинских исследованиях. Так как оптимальная температура функционирования фотопротейна обелина, выделенного из гидроидного полипа *Obelia longissima* (обитателя северных морей), менее 20 °C, важно выяснить, как меняются спектральные характеристики флуоресценции разряженного обелина при использовании его в качестве флуоресцентной метки при температуре, близкой к температуре человеческого тела. Кроме того, известно, что температура в разных точках тела человека различна и может увеличиваться в зависимости от состояния организма. Поэтому мы выбрали удобную для измерения температуру 40 °C для анализа зависимости спектральных свойств разряженного обелина от времени хронического воздействия повышенной температуры.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Реактивы

Для приготовления рабочих растворов использовали следующие реактивы и препараты: рекомбинантные фотопротейны (обелин, акворин и клитин), полученные генно-инженерным методом в лаборатории фотобиологии Института биофизики СО РАН (г. Красноярск), трис (трис[гидроксиметил]аминометан) (ч.д.а., Sigma-Aldrich), ЭДТА (ч.д.а., Sigma-Aldrich), целентерамид (NanoLight, USA), метанол (Sigma-Aldrich), этанол (Fluka), этиленгликоль (Sigma-Aldrich), глицерин (Sigma), хлорид кальция (Fluka), ДМСО (диметилсульфоксид) (ч.д.а., Sigma, Germany), РОРОР (1,4-бис (5-фенилоксазол-2-ил) бензол) (ч.д.а., Eastman).

Готовили трис-НСl буфер (рН 7): [трис] = 0,02 М и [ЭДТА] = 0,005 М.

В работе использовали свежеприготовленный обелин и обелин, приготовленный из лиофилизированного препарата.

Для приготовления всех растворов использовалась деионизованная вода (18,2 МОм).

2.2 Приборы и установки

Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметрах *LS55* Perkin Elmer (Shelton, Connecticut, США) и *Fluorolog 3* (HORIBA Jobin Yvon, США). В качестве источника возбуждения использована широкополосная ксеноновая дуговая лампа (450 Вт) со свечением в диапазоне 180-1100 нм. Для регистрации люминесценции использовали кварцевую кювету сечением 5x5 мм с двумя зеркальными стенками, изготовленную в Институте биофизики клетки РАН (г. Пущино, Россия).

Для записи спектров поглощения использовали двулучевой регистрирующий спектрофотометр *UVIKON 943* (KONTRON Instruments, Италия). Для регистрации спектров применяли кварцевую кювету с квадратным

сечением (10x10 мм). Рабочий диапазон сканирования длин волн: 190÷900 нм. Источник света: вольфрамо-галогеновая лампа в диапазоне 290÷900 нм и дейтериевая лампа в диапазоне 190÷370 нм. Спектры поглощения корректировали с учетом рассеивающей компоненты (Рэлеевское рассеяние) путем вычитания дисперсионной составляющей с интенсивностью, пропорциональной $1 / \lambda^4$ [Lakowicz, 2006].

2.3 Методика эксперимента

2.3.1 Условия экспериментов

2.3.1.1 Воздействие экзогенных веществ на флуоресценцию разряженного обелина

Разряженный обелин получали путем добавления 15 мкл 0,1 М раствора хлорида кальция к 300 мкл раствора фотопротейна обелина. Концентрация фотопротейна обелина в кювете составляла 10^{-5} М, а хлорида кальция – $4,81 \cdot 10^{-3}$ М. Концентрацию свободных ионов кальция ($1,17 \cdot 10^{-6}$ М) в растворе рассчитывали, используя программу MaxChelator.

Экзогенные соединения (этанол, этиленгликоль, глицерин, ДМСО) добавляли в раствор после проведения биолюминесцентной реакции. В контрольном эксперименте добавляли аналогичные объемы буферного раствора; на основании полученных данных проводилась корректировка интенсивности флуоресценции на разбавление.

Концентрацию этанола, этиленгликоля, глицерина и ДМСО варьировали в пределах 0 ÷ 0,15 М, 0 ÷ 0,74 М, 0 ÷ 0,11 М и 0 ÷ 2,65 М, соответственно.

Спектры испускания регистрировали при низкоэнергетическом (350 нм) и высокоэнергетическом (280 нм) фотовозбуждении, соответствующем максимумам первой и второй полос поглощения разряженного обелина. Скорость сканирования составляла 7 нм/с, размер щели 4 нм, напряжение ФЭУ – 790 В.

2.3.1.2 Воздействие температуры на флуоресценцию разряженного обелина

Для изучения хронического воздействия температуры использовали разряженный обелин, полученный двумя способами – в отсутствие и присутствии Ca^{2+} .

В первом случае разряженный обелин получали путем нагревания раствора обелина в термостате при температуре 40 °С [Франк, 1997] в течение 1-2 часов в отсутствие Ca^{2+} до максимальной интенсивности флуоресценции в видимой области спектра. Концентрация обелина в кювете составляла $2,3 \cdot 10^{-5}$ М. Далее, раствор разряженного обелина выдерживали при 40 °С в течение 12,5 ч, при этом проводили измерения его флуоресценции через определённые промежутки времени (3 ч, 6 ч, 7 ч, 8 ч, 9 ч, 11 ч, 12,5 ч) при 20 °С.

Во втором случае разряженный обелин получали, как написано выше в разделе 2.3.1.1. Далее раствор разряженного обелина выдерживали при 40 °С в течение 3 ч, при этом измеряли его флуоресценцию через каждый час при 20 °С.

Спектры испускания регистрировали при варьировании длины волны возбуждения от 260 до 390 нм с шагом 10 нм, а спектры возбуждения – при варьировании длины волны регистрации от 390 до 700 нм с шагом 10 нм. Скорость сканирования составляла 7 нм/с, размер щели – 4 нм, напряжение – 790 В.

2.3.2 Изучение флуоресцентных характеристик свободного целентерамида

2.3.2.1 Регистрация спектров

Спектры поглощения целентерамида в метаноле ($2,2 \cdot 10^{-6}$ М) регистрировали в интервале длин волн 250-400 нм, испускания – в интервале длин волн 290-600 нм при фотовозбуждении 260-400 нм. Скорость сканирования составляла 7 нм/с, размер щели – 4 нм, напряжение – 790 В.

2.3.2.2 Квантово-химические расчеты

Квантово-химические расчеты проводились с помощью метода функционала плотности B3LYP [Becke, 1993; Lee et al., 1988] в базисе cc-pVDZ [Schuchardt et al., 2007]. Для учета свойств метанола были использованы модели PCM (Polarized Continuum Model) [Tomasi et al., 2005] и SMD (Solvation Model based on Density) [Marenich et al., 2009], которые дают небольшую разницу в расчетах и могут быть использованы равноправно (Приложение А, таблица А.1). Расчёты проводились с помощью программы GAMESS [Schmidt et al., 1993] (версия декабрь 2014).

Метод TD (Time-dependent) [Runge, Gross, 1984] использовали для расчёта спектров поглощения и поиска возбуждённого состояния. На спектр поглощения и излучения молекулы ЦЛМ влияет выбор способа возбуждений [Cossi, Barone, 2001], поэтому расчёт проводился как для вертикальных (PCM, SMD), так и для адиабатических (PCM*, SMD*) возбуждений. Результаты расчетов с использованием модели SMD*, представленные в этой работе, в большей степени соответствуют экспериментальным данным.

В качестве стартовой равновесной геометрии для расчётов была выбрана структура ЦЛМ из фотопротейна обелина (PDB код 1S36). Описание общей схемы квантово-химических расчетов молекулы ЦЛМ методом B3LYP/cc-pVDZ представлена на рисунке 2.1 [Alieva et al., 2016]. Сначала определяли равновесную геометрию молекулы ЦЛМ в основном состоянии для газовой фазы и с учётом метанола (PCM, SMD), на её основе был рассчитан спектр поглощения с помощью метода TD [Runge, Gross, 1984]. Затем оптимизировали характеристики возбуждённого состояния молекулы ЦЛМ и с помощью полученных геометрий определяли электронные переходы в спектрах испускания (рисунок 2.1). Геометрии для основного и возбуждённого состояний различались незначительно.

Учитывая возможность переноса заряда в данной системе, геометрия основного и возбужденных состояний была оптимизирована также с использованием метода, предназначенного для учёта таких процессов САМ-

V3LYP [Yanai et al., 2004] в базисе cc-pVDZ для SMD*, однако, данный подход показал худшие результаты, по сравнению с V3LYP [Becke, 1993; Lee et al., 1988], что указывает на малый вклад процессов переноса заряда (Приложение А, таблица А.1, рисунок А.1 [Alieva et al., 2016]). Подобная ситуация наблюдалась и в работах [Min et al., 2013; Li et al., The dynamics ... , 2013], где также были использованы V3LYP и CAM-V3LYP. Кроме того, критерием определения переноса заряда является «лямбда диагностика» (lambda diagnostic) [Peach et al., 2008], согласно которой, значения, лежащие в пределах $0,45 < \lambda < 0,89$ указывают на малую степень перераспределения заряда между орбиталями. В нашем случае, лямбда диагностика показала значения в пределах $0,65 < \lambda < 0,75$ для всех расчетов [Alieva et al., 2016]. Это подтверждает, что перенос заряда не играет существенной роли для молекулы ЦЛМ в процессах поглощения и испускания.

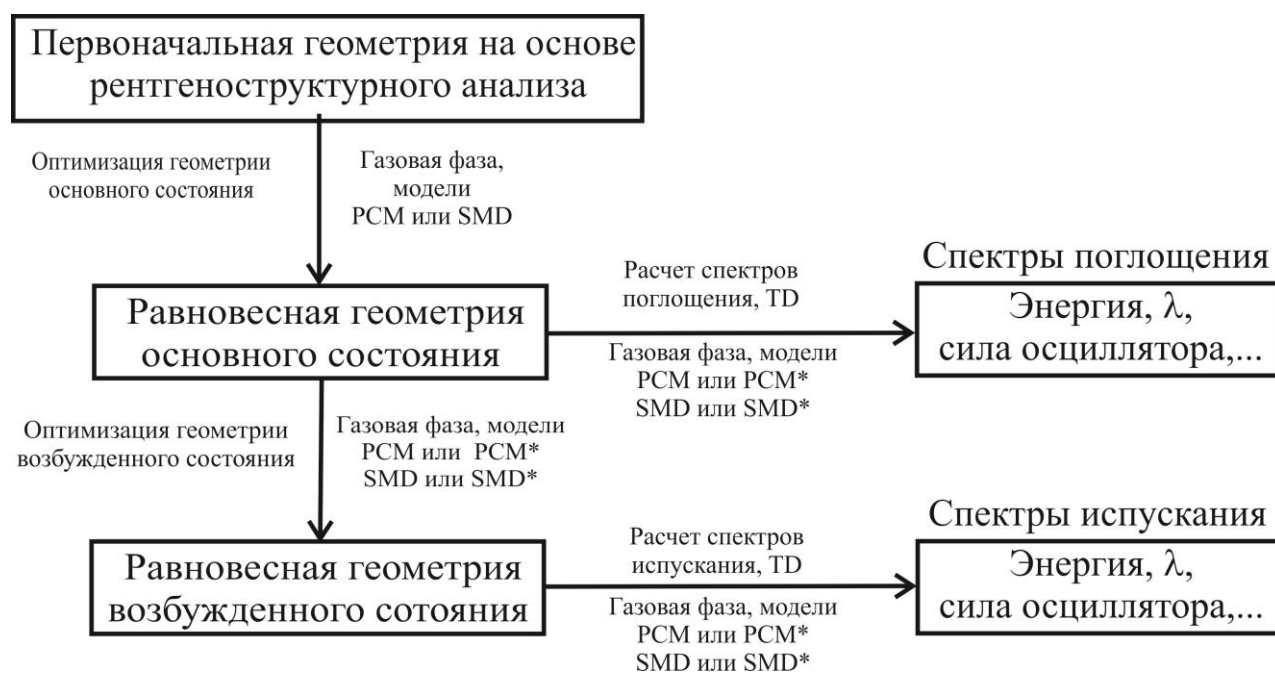


Рисунок 2.1. Схема квантово-химических расчетов молекулы целентерамида методом V3LYP/cc-pVDZ. Расчёт для вертикальных (PCM, SMD) и адиабатических (PCM*, SMD*) возбуждений [Alieva et al., 2016].

2.3.2.3 Расчет квантового выхода флуоресценции

Для определения квантового выхода флуоресценции ЦЛМ провели подбор подходящего флуоресцентного стандарта. Из рисунка 2.2 видно, что спектральные области поглощения и флуоресценции ЦЛМ и РОРОР (1,4-бис (5-фенилоксазол-2-ил) бензол) в метаноле близки, следовательно, молекула РОРОР может быть использована в качестве стандарта для расчета квантового выхода флуоресценции ЦЛМ.

Экспериментальный спектр поглощения ЦЛМ в метаноле, приведенный на рисунке 2.2, соответствует спектру поглощения этого соединения, описанному в работе [Shimomura, 2006].

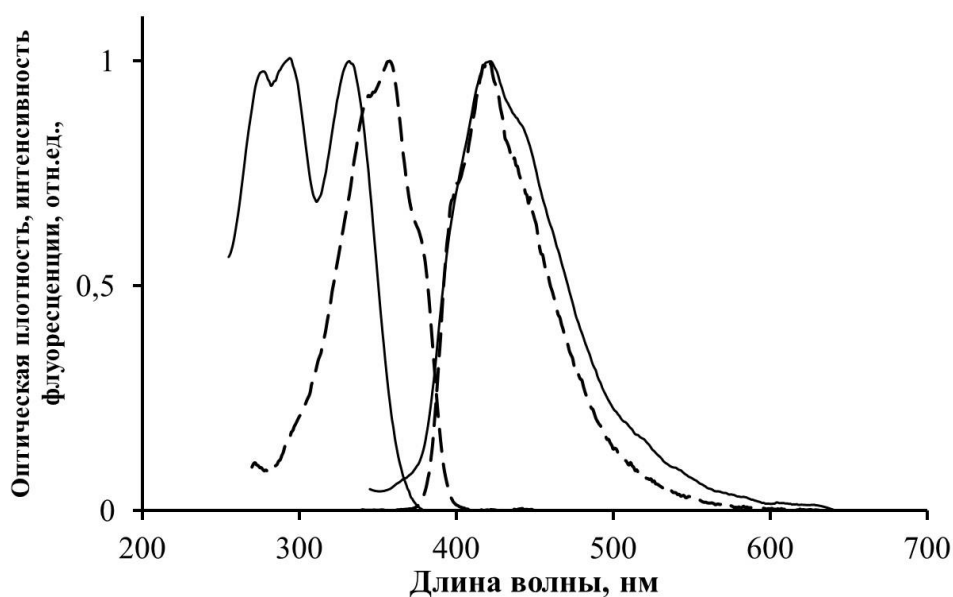


Рисунок 2.2. Спектры поглощения и флуоресценции целентерамида (сплошная линия, $2,2 \cdot 10^{-6}$ М) и РОРОР (штриховая линия, $5 \cdot 10^{-6}$ М) в метаноле.

Фотовозбуждение – 330 нм.

Квантовый выход флуоресценции целентерамида в метаноле ($\phi_{\text{ЦЛМ}}$) рассчитывали по формуле 2.1:

$$\phi_{\text{ЦЛМ}} = \phi_{\text{см}} \cdot \frac{I_{\text{ЦЛМ}}}{I_{\text{см}}} \cdot \frac{A_{\text{см}}}{A_{\text{ЦЛМ}}}, \quad (2.1)$$

где ϕ_{cm} – квантовый выход стандарта, $I_{ЦЛМ}$ и I_{cm} – интегральные интенсивности флуоресценции, $A_{ЦЛМ}$ и A_{cm} – оптические плотности при используемой длине волны возбуждения. В качестве стандарта (cm) использовали раствор РОРОР (1,4-бис (5-фенилоксазол-2-ил) бензола) с известным квантовым выходом (0,75) [Ei-Daly et al., 2012] в том же растворителе.

2.4. Математическая обработка спектров флуоресценции

Спектры флуоресценции разряженного обелина являются сложными, состоящими из нескольких компонент, соответствующих различным излучателям. Эти спектры разлагали на компоненты, описываемые распределением Гаусса:

$$\ln I = \ln I_0 - \frac{2(\nu - \nu_0)^2}{\nu_{1/2}^2}, \quad (2.2)$$

где ν – волновое число, см^{-1} ; ν_0 – положение максимума полосы, $\nu_{1/2}$ – ширина на полувысоте, I – интенсивность флуоресценции; I_0 – интенсивность при ν_0 ; Линейная зависимость $\ln I = f((\nu - \nu_0)^2)$ в координатах $\ln I$ от $(\nu - \nu_0)^2$ подтверждает обоснованность описания компонент флуоресценции Гауссовым распределением. Ранее такое разложение для флуоресценции фотопротеинов было использовано в работе [Belogurova et al., 2008].

Математическую обработку зарегистрированных спектров проводили с помощью пакета Origin 8.5.1. Для нахождения количества спектральных компонент и положения их максимумов использовали метод второй производной [Левшин, 1976]. Разложение на компоненты проводили в программе Origin 8.5.1, достоверность аппроксимации оценивали коэффициентом детерминации (0,98-0,99).

В коротковолновой области (< 280-320 нм для длин волн возбуждения 260-300 нм) спектры флуоресценции разряженного обелина моделировали с помощью распределения Гаусса.

Отклонение площади расчетного суммарного спектра от экспериментального оценивали величиной d :

$$d = \frac{|S_{\text{экс}} - S_{\text{расч}}|}{S_{\text{экс}}} \cdot 100\%, \quad (2.3)$$

где $S_{\text{экс}}$ – площадь экспериментального спектра; $S_{\text{расч}}$ – площадь расчетного спектра, т.е. сумма площадей, выделенных компонент. Величина d для всех случаев не превышала 0,5 %.

Вклады (W) компонент в спектры флуоресценции рассчитывали по уравнению (2.4):

$$W = (S_{\text{комп}} / S_{\text{общ}}) \cdot 100\%, \quad (2.4)$$

где $S_{\text{комп}}$ – площадь выделенной компоненты; $S_{\text{общ}}$ – суммарная площадь выделенных компонент.

Влияние экзогенных соединений на интенсивность флуоресценции разряженного обелина оценивали с помощью эмпирического коэффициента тушения флуоресценции K :

$$I / I_0 = e^{-Kc}, \quad (2.5)$$

где I и I_0 – интенсивности флуоресценции в присутствии и в отсутствии экзогенного соединения, C – концентрация, М.

Хроническое влияние повышенной температуры (40 °С) на интенсивность флуоресценции разряженного обелина оценивали с помощью коэффициента спада флуоресценции K' :

$$I / I_0 = e^{-K' t}, \quad (2.6)$$

где I_0 и I – интенсивности флуоресценции до и после температурного воздействия в течение времени t , ч.

Положительные значения величин K и K' соответствуют снижению интенсивности флуоресценции, а отрицательные – ее росту.

Для статистической обработки использовали пакет Microsoft Office Excel (2007).

ГЛАВА 3. ЗАВИСИМОСТЬ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ РАЗРЯЖЕННОГО ФОТОПРОТЕИНА ОБЕЛИНА ОТ ЭНЕРГИИ ФОТОВОЗБУЖДЕНИЯ

3.1. Спектры флуоресценции разряженных фотопротеинов при различных длинах волн возбуждения

В настоящей работе проанализированы спектры флуоресценции разряженного обелина при варьировании длин волн фотовозбуждения от 260 до 380 нм. На рисунке 3.1 в качестве примера приведены 3D спектры флуоресценции обелина, разряженного в присутствии ионов кальция.

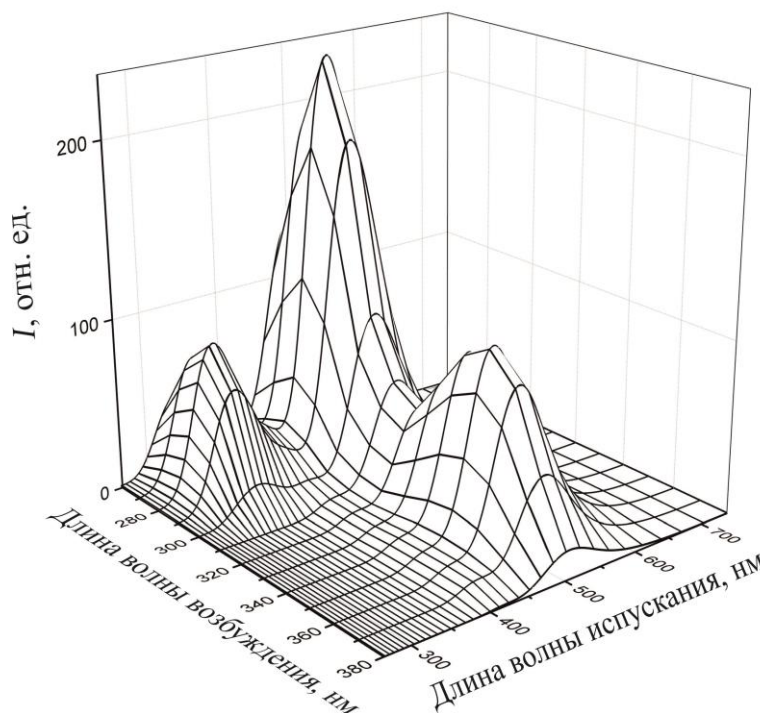


Рисунок 3.1. 3D-спектры флуоресценции обелина (10^{-5} М), разряженного в присутствии ионов кальция.

Как видно из рисунка 3.1, фотовозбуждение в интервале длин волн 310-380 нм инициирует излучение в сине-зеленой области с максимумом при 507 нм и плечом в фиолетовой области спектра. Видимая флуоресценция с максимумом при 507 нм фиксируется на всем интервале длин волн фотовозбуждения. Кроме

того, в диапазоне длин волн фотовозбуждения 260-300 нм зарегистрирован ультрафиолетовый пик флуоресценции разряженного обелина с максимумом 345 нм.

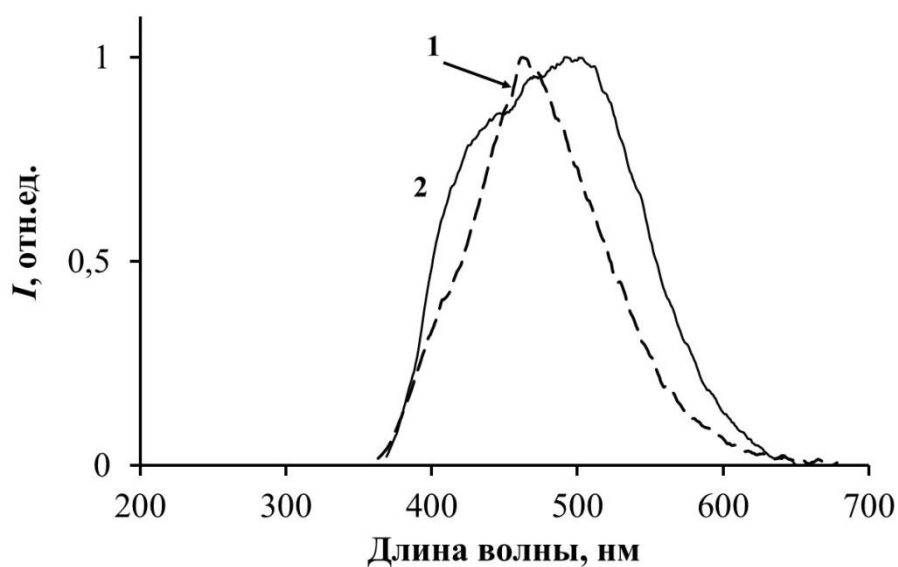
Продемонстрировано наличие аналогичной ультрафиолетовой флуоресценции у других разряженных фотопротеинов акворина и клитина, выделенных из медуз *Aequorea* и *Phialidium (Clytia)*. Для этого зарегистрированы спектры флуоресценции разряженных акворина и клитина при низкоэнергетическом (350 нм, рисунок 3.2а) и высокоэнергетическом (280 нм, рисунок 3.2б) фотовозбуждении.

Таким образом, продемонстрировано, что флуоресценция разряженных фотопротеинов (обелина, акворина и клитина) при фотовозбуждении в высшие электронно-возбужденные состояния (280 нм) включает излучение в ультрафиолетовой области спектра (соответственно 345 нм, 332 нм, 339 нм).

Неизученной в настоящее время является природа этого ультрафиолетового излучения. Ультрафиолетовую флуоресценцию белков и белковых комплексов принято связывать с ароматическими фрагментами боковых групп аминокислотных остатков (триптофана, тирозина, фенилаланина) [Lakowicz, 2006]. Не исключено также участие частично изолированных сопряженных электронных подсистем низкомолекулярных ароматических соединений, в частности, ЦЛМ – флуорофора разряженных фотопротеинов.

Для понимания природы ультрафиолетового излучения разряженных фотопротеинов были проведены дополнительные эксперименты по изучению спектрально-люминесцентных свойств молекулы ЦЛМ [Alieva et al., 2016] при различных энергиях фотовозбуждения, а также квантово-химические расчеты. Результаты этих исследований представлены в разделе 3.2.

а)



б)

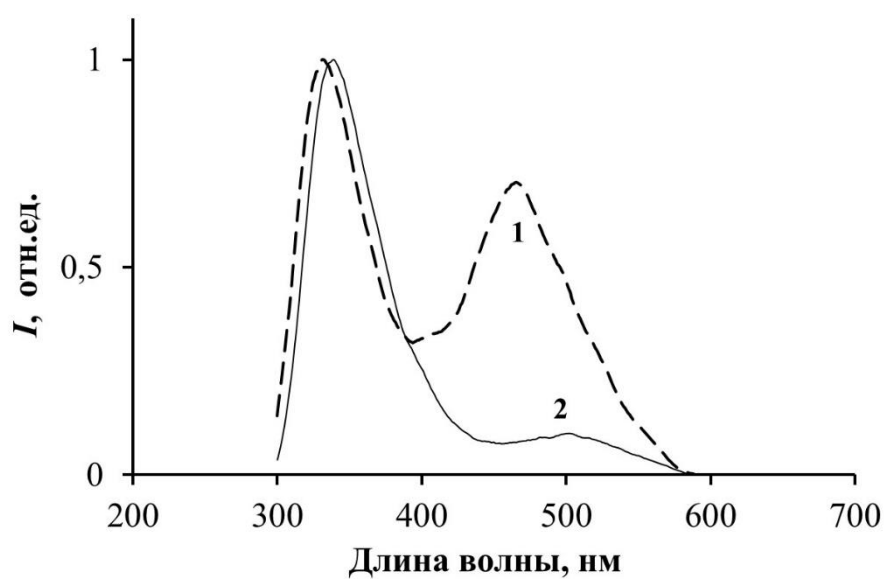


Рисунок 3.2. Спектры флуоресценции фотопротеинов, разряженных в присутствии Ca^{2+} , при фотовозбуждении 350 нм (а) и 280 нм (б): 1 – акворин ($2 \cdot 10^{-6}$ М), 2 – клитин ($8 \cdot 10^{-5}$ М) [Alieva et al., 2016].

3.2 Спектрально-люминесцентные свойства целентерамида – флуорофора разряженных фотопротеинов

Структурная формула ЦЛМ приведена на рис. 3.3. Ароматические фрагменты ЦЛМ – пиразиновый (*P*, рисунок 3.3), фенольный (*F*, рисунок 3.3) и

бензольный (*B*, рисунок 3.3) – способны участвовать в формировании спектров люминесценции. Кроме того, в структуре ЦЛМ присутствуют атомы азота и кислорода с неподеленными электронными парами, образующими несвязывающие заполненные электронные орбитали, которые также способны вносить вклад в формирование электронных подсистем основного и возбужденного состояний ЦЛМ.

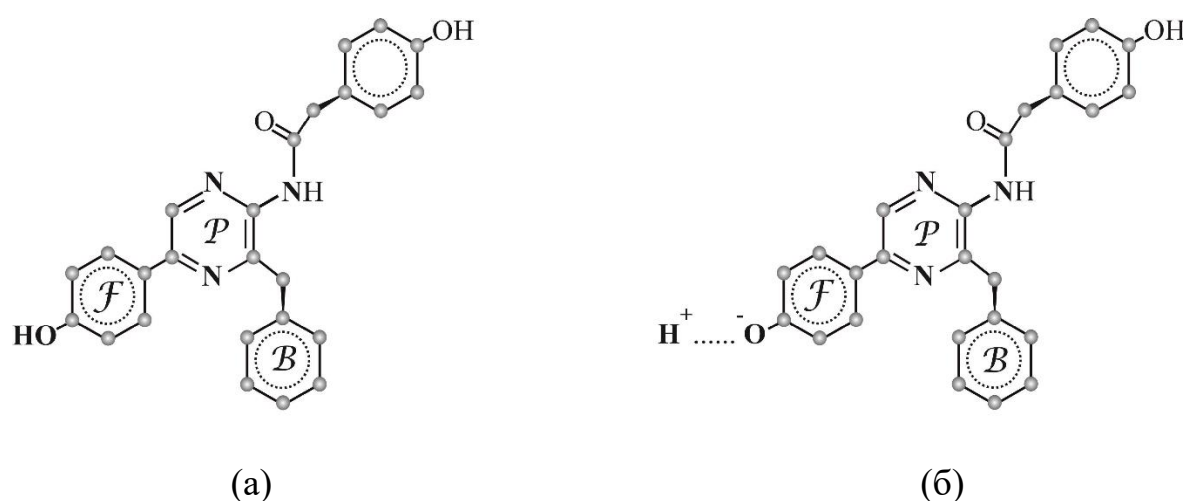


Рисунок 3.3. Химическая структура молекулы целентерамида: (а) протонированная, (б) депротонированная формы [Alieva et al., 2016]. Фрагменты молекулы: *P* – пиразиновый, *F* – фенольный, *B* – бензольный.

Зарегистрированы спектры испускания ЦЛМ в растворе метанола ($2,2 \cdot 10^{-6}$ М) в интервале длин волн 290-600 нм при варьировании длины волны фотовозбуждения в интервале 260-400 нм (рисунок 3.4). Малая константа диссоциации по кислотному типу фенольной группы в метаноле ($pK_a = 14$ [Roуa, 2009]) указывает на то, что молекула ЦЛМ в этом растворителе практически полностью находится в недиссоциированной форме (рисунок 3а).

Из рисунка 3.4 видно, что спектры флуоресценции свободного ЦЛМ в растворе метанола зависят от длины волны возбуждения: при фотовозбуждении в высшие электронно-возбужденные состояния в интервале 260-300 нм возникает дополнительное излучение в ультрафиолетовой области с максимумом 330 нм.

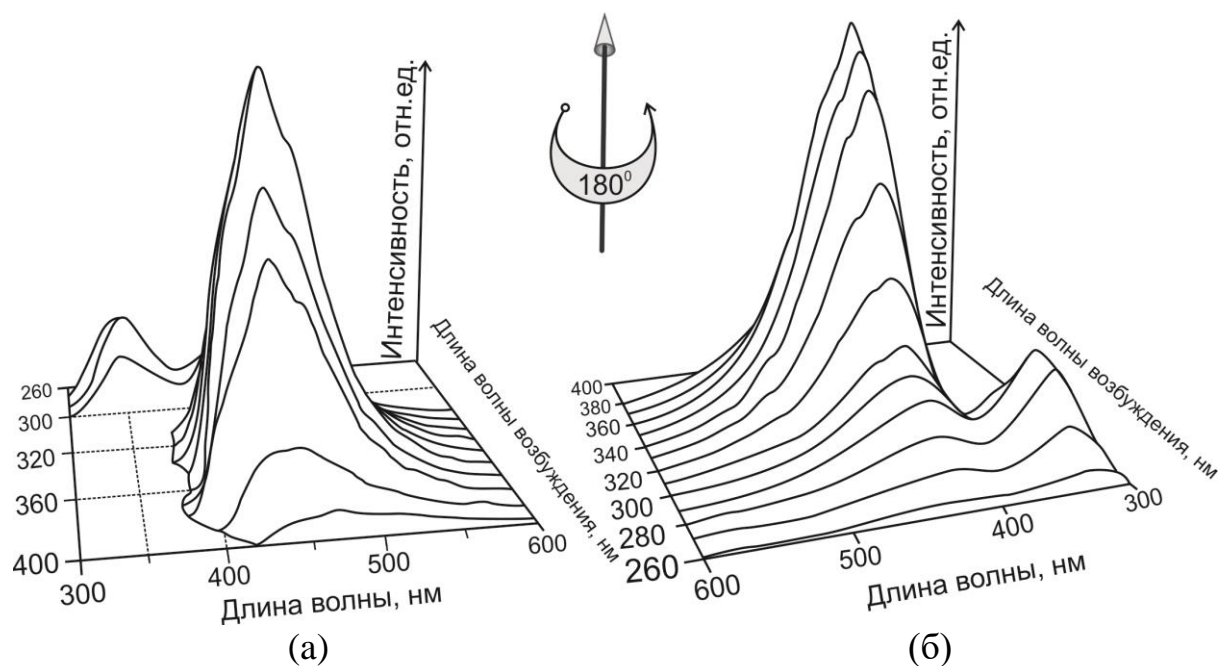


Рисунок 3.4. 3D спектры флуоресценции целентерамида в метаноле ($2,2 \cdot 10^{-6}$ М).
(а) и (б) различаются поворотом на 180° [Alieva et al., 2016].

Определен квантовый выход флуоресценции ЦЛМ в метаноле. Для этого использовали предварительно подобранный флуоресцентный стандарт (см. главу 2, раздел 2.3.2). В соответствии с уравнением 2.1 рассчитан квантовый выход ЦЛМ в растворе метанола при фотовозбуждении 270-340 нм, который оказался равным $0,028 \pm 0,005$. Расчеты подтверждаются данными работы [Saito et al., 1997], в которой квантовый выход ЦЛМ в метаноле был определен при фотовозбуждении 355 нм; он оказался равным 0,02. Значение квантового выхода флуоресценции разряженного обелина приведено в работе [Markova, Vysotski, Lee, 2001]; его величина (0,17) оказалась выше квантового выхода фотолюминесценции ЦЛМ в метаноле.

Экспериментальные спектры поглощения и испускания ($\lambda_{\text{возб}} = 280$ нм) ЦЛМ приведены на рисунке 3.5а, б. Из рисунка 3.5б видно, что при высокоэнергетическом фотовозбуждении (280 нм) в ультрафиолетовой области спектра флуоресценции ЦЛМ наблюдается полоса с максимумом 330 нм, аналогично спектрам флуоресценции фотопротеинов (рисунок 3.2б). Максимум

спектра испускания в видимой области (420 нм) соответствует протонированной форме ЦЛМ в белке.

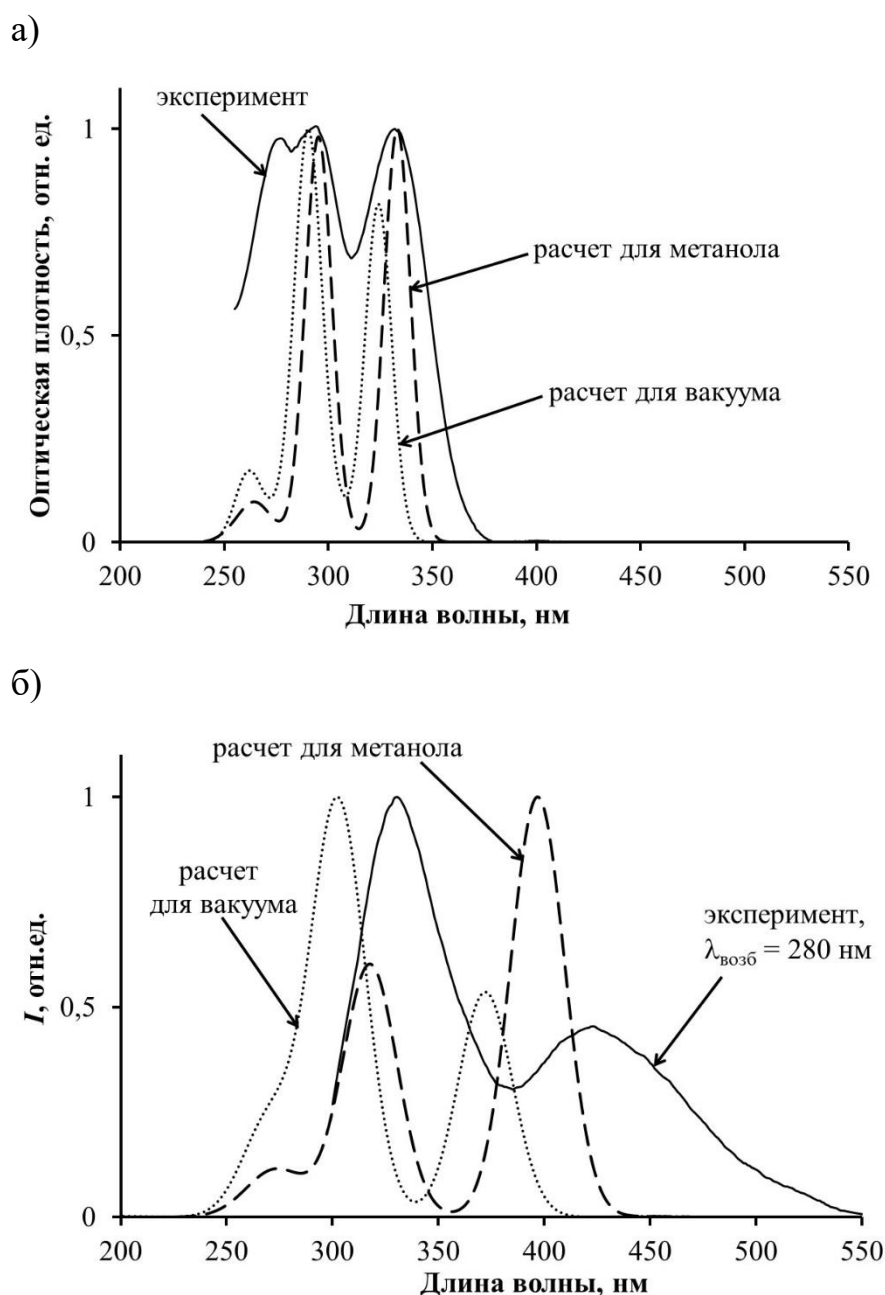


Рисунок 3.5. Расчетные и экспериментальные спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) целентерамида [Alieva et al., 2016]. Расчеты проведены для вакуума и метанола с помощью SMD*/TD/B3LYP/cc-pVDZ. $C_{\text{ЦЛМ}} = 2,2 \cdot 10^{-6}$ М, метанол. Теоретические спектры были смоделированы размытием по Гауссу на полувысоте с полушириной для спектров поглощения – 15 нм, для испускания – 30 нм.

Рассчитаны спектры поглощения и испускания ЦЛМ в вакууме и метаноле, проведено сравнение с экспериментальными спектрами (рисунок 3.5). Результаты квантово-химических расчетов показывают, что теоретический спектр поглощения ЦЛМ в метаноле близок экспериментальному: максимумы экспериментального спектра поглощения ЦЛМ 277 нм, 294 нм и 332 нм соответствуют максимумам расчетного спектра 264 нм, 295 нм и 332 нм (рисунок 3.5а). Максимумы поглощения ЦЛМ в метаноле совпадают с ранее опубликованными экспериментальными данными [Saito et al., 1997]. Расхождение максимумов экспериментального (330 нм, 420 нм) и расчетного (318 нм, 397 нм) спектров флуоресценции ЦЛМ (рисунок 3.5б) связано с несовершенством расчётной модели.

На рисунке 3.6 схематически представлены молекулярные орбитали ЦЛМ, участвующие в образовании спектров его флуоресценции, и соответствующие электронные переходы.

Как видно из рисунка 3.6, электронный переход для длинноволновой полосы с максимумом 397 нм формируется с участием НВМО и ВЗМО. При формировании коротковолновой полосы флуоресценции с максимумом 318 нм имеют место электронные переходы с участием НВМО+1 и ВЗМО, а также занятых орбиталей более низких энергий ВЗМО-3, ВЗМО-2 (рисунок 3.6). Коротковолновая полоса флуоресценции ЦЛМ (318 нм в расчетном спектре, 330 нм – в экспериментальном) и ее электронные переходы описаны нами впервые. Ранее, в теоретической работе [Li et al., The dynamics ... , 2013], как и в работе [Min et al., 2013], рассматривалась только длинноволновая полоса флуоресценции ЦЛМ (протонированная форма, 399,26 нм), которая, в соответствии с их данными, формируется с участием НВМО → ВЗМО и в меньшей степени НВМО → ВЗМО-1. В этой же работе рассмотрена депротонированная форма (испускание при 492,21 нм), которая формируется с участием НВМО → ВЗМО, НВМО + 1 → ВЗМО. Возможно, депонированная форма (рисунок 3б) может вносить вклад и в коротковолновую полосу флуоресценции разряженного обелина при высокоэнергетическом фотовозбуждении.

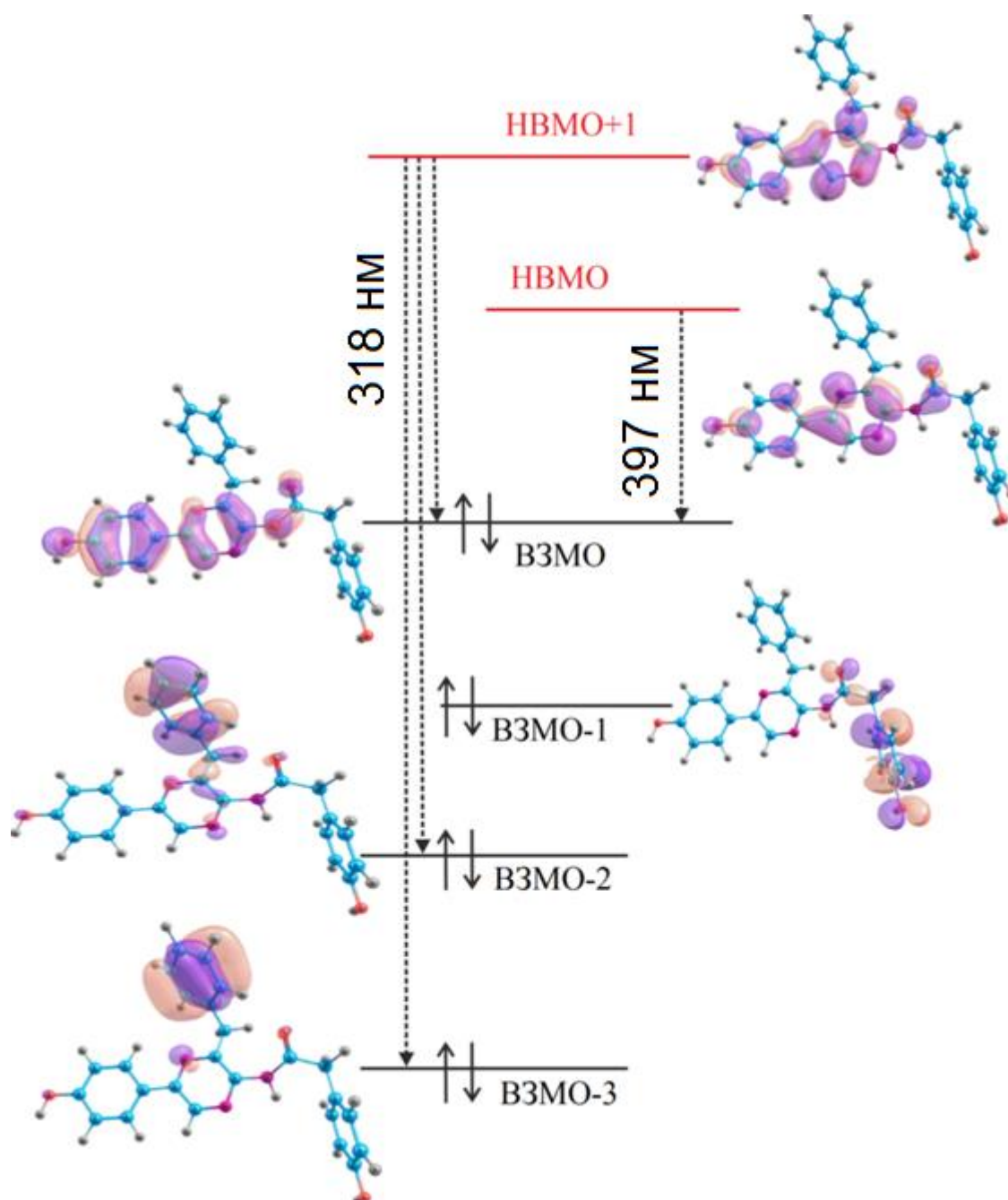


Рисунок 3.6. Схема электронных переходов в спектрах флуоресценции молекулы целентерамида, рассчитанных SMD*/TD/B3LYP/cc-pVDZ [Alieva et al., 2016].

Из проведенных нами расчетов следует, что низкоэнергетичный электронный переход с максимумом 397 нм формируется за счет участия двух сопряженных фрагментов ЦЛМ – пиразинового (*P*, рисунок 3.3а) и фенольного (*F*, рисунок 3.3а). Это совпадает с данными более ранней публикации [Min et al., 2013], в которой также было продемонстрировано участие сопряженных пиразинового и фенольного фрагментов ЦЛМ в формировании

низкоэнергетического электронного перехода, причем, эти фрагменты указывались как для протонированной, так и депротонированной форм ЦЛМ (расчёт проводился с помощью TD/CAM-B3LYP/6-31+G только для вертикальных возбуждений). Кроме этого, из рис. 3.6 видно, что в формировании высокоэнергетичного электронного перехода ЦЛМ (максимум 318 нм) дополнительно в значительной степени участвует бензольный фрагмент ЦЛМ (В, рисунок 3.3а).

Вероятно, аналогичная природа переходов характерна и для ультрафиолетовой полосы флуоресценции фотопротеинов, регистрируемой при высокоэнергетическом фотовозбуждении.

Все результаты и выводы раздела 3.2 опубликованы в работе [Alieva et al., 2016].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ 3

В главе 3 продемонстрировано, что спектры флуоресценции разряженных фотопротеинов (обелина, акворина, клитина) и их флуорофора (целентерамида) зависят от энергии возбуждения: при фотовозбуждении в высшие электронно-возбужденные состояния (260-300 нм) возникает дополнительное излучение в ближней ультрафиолетовой области с максимумами от 330 нм до 350 нм. Квантово-химические расчеты показали, что ультрафиолетовое излучение в спектрах флуоресценции молекулы ЦЛМ формируются с участием пиразинового, фенольного и бензольного фрагментов ЦЛМ. В процесс формирования ультрафиолетовой флуоресценции ЦЛМ вовлечены электронные переходы с участием вакантных и занятых молекулярных орбиталей разных энергий – НВМО+1, ВЗМО, ВЗМО-2, ВЗМО-3. Эти переходы могут вносить вклад в ультрафиолетовую флуоресценцию разряженных фотопротеинов.

Полученные результаты могут послужить основой для дальнейших исследований взаимодействий белок-целентерамид в ЦЛМ-содержащих флуоресцентных белках. В целом, это исследование связано с выявлением закономерностей миграции энергии возбуждения в биологических структурах – комплексах белков с низкомолекулярными ароматическими соединениями. Миграция энергии с участием высших электронно-возбужденных состояний в биологических процессах представляет особый интерес. Ранее было экспериментально подтверждено участие высших электронно-возбужденных состояний флуорофоров в биолюминесцентных реакциях кишечнополостных [Belogurova et al., 2009] и бактерий [Кудряшева и др., 1991; Kudryasheva et al., 2002; Немцева, Кудряшева, 2007]. Настоящее исследование связывает люминесцентную активность высших электронно-возбужденных состояний со структурными особенностями низкомолекулярных молекул, свободных и связанных с белком.

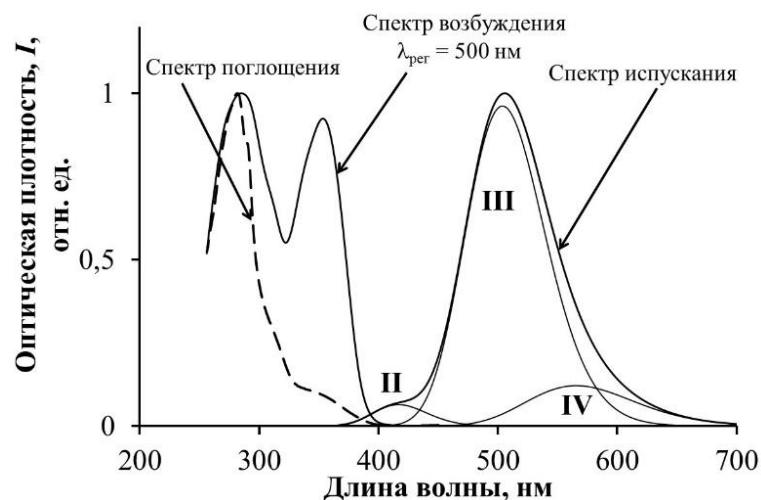
ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ ДЕСТРУКТИВНЫХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ФЛУОРЕСЦЕНЦИЮ РАЗРЯЖЕННОГО ФОТОПРОТЕИНА ОБЕЛИНА

Изучены спектры флуоресценции разряженного обелина при различных концентрациях экзогенных соединений [Alieva et al., 2014; Alieva et al., Luminescence, 2014], а также при различных временах выдерживания при 40 °С [Alieva et al., 2012, 2013]. Для анализа воздействия этих факторов все спектры флуоресценции были разделены на гауссовы компоненты (см. главу 2, раздел 2.4). В качестве примера на рисунке 4.1, представлены спектры флуоресценции разряженного обелина и его компоненты I-IV при низкоэнергетическом (350 нм, рисунок 4.1а) и высокоэнергетическом (280 нм, рисунок 4.1б) фотовозбуждении.

Спектр флуоресценции разряженного обелина при фотовозбуждении 350 нм (рисунок 4.1а) является суперпозицией компонент II, III и IV в видимом диапазоне с максимумами соответственно при 417 ± 1 , 505 ± 1 и 566 ± 1 нм. При фотовозбуждении 280 нм имеется дополнительная ультрафиолетовая компонента I (345 ± 1 нм, рисунок 4.1б). Испускание в этой области связано с участием ароматических структур с низкой степенью сопряжения. За него могут быть ответственны как боковые группы аминокислотных остатков, так и фрагменты молекулы флуорофора (как обсуждается в главе 3, раздел 3.2 [Alieva et al., 2016]).

На основании литературных данных (глава 1, раздел 1.2.2) было проведено соотнесение выделенных компонент различным флуоресцентным формам ЦЛМ. Известно, что ЦЛМ способен существовать в нескольких флуоресцентных формах [Shimomura, Teranishi, 2000] в зависимости от степени протонирования в возбужденном состоянии (глава 1, рисунок 1.10). Компонента II была приписана протонированной форме ЦЛМ (380÷423 нм), что подтверждается данными различных групп ученых [Imai et al., 2001, Liu et al., 2006, Mori et al., 2006; Vysotski, Lee, 2007; Chen et al., 2012].

а)



б)

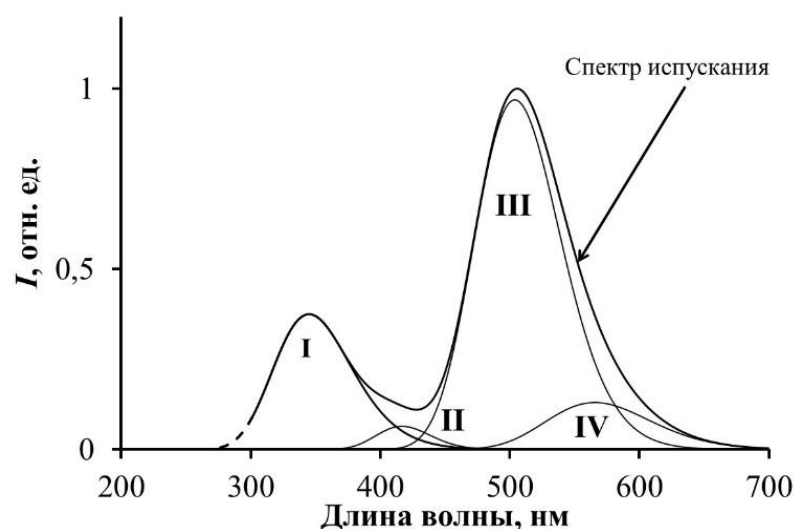


Рисунок 4.1. Спектры поглощения и флуоресценции разряженного обелина и их компоненты I-IV при фотовозбуждении 350 нм (а) и 280 нм (б), $C_{\text{обелина}} = 10^{-5}$ М.

Компоненты III и IV принадлежат области излучения фенолят аниона (465÷565 нм), однако, как показывают квантово-химические расчеты, проведенные для Ca^{2+} -разряженного обелина, вероятность полного отрыва протона от фенольной группы ЦЛМ и переход его к His22 очень мала [Tomilin et al., 2008]. В свою очередь, известно, что гидроксильная группа фенола в возбужденном состоянии является более сильной кислотой, чем в основном состоянии [Shimomura, Teranishi, 2000], поэтому возможен быстрый перенос

протона в возбужденном состоянии ЦЛМ с образованием возбужденной фенольной ионной пары (комплекса с частичным переносом протона).

Таким образом, компоненты III и IV приписаны излучению депротонированных форм ЦЛМ. Образование депротонированных форм связано с фотохимическим процессом, а именно, с переносом протона в электронно-возбужденном состоянии ЦЛМ в разряженном обелине (глава 1, рисунок 1.11). Из рисунка 1.11 видны различия энергий флуоресцентных состояний протонированной и депротонированной форм ЦЛМ. Депротонированные флуоресцентные эмиттеры III и IV различаются эффективным положением протона между фенольной группой ЦЛМ и акцептором протона (His22).

С использованием выделенных спектральных компонент (I-IV) было проанализировано влияние экзогенных соединений (раздел 4.1) и температурного воздействия (раздел 4.2) на интенсивность и спектральный состав флуоресценции разряженного обелина.

4.1 Воздействие экзогенных соединений на флуоресценцию разряженного фотопротеина обелина

4.1.1 Влияние на интенсивность флуоресценции

Ранее показано, что воздействие экзогенных ароматических соединений изменяют интенсивность биолюминесценции обелина, но не влияют на форму спектра биолюминесценции [Belogurova et al., 2009]. Однако воздействие химических соединений на фотолуминесценцию продукта биолюминесцентной реакции (разряженного обелина) требует исследования. Результаты представлены в данном разделе.

Исследовано влияние ряда спиртов (этанола [Alieva et al., 2014], этиленгликоля, глицерина [Alieva et al., 2014]) и ДМСО [Petrova et al., 2014; Петрова и др., 2016] на флуоресценцию разряженного обелина при низкоэнергетическом (350 нм) и высокоэнергетическом (280 нм) фотовозбуждении, соответствующем первой и второй полосам поглощения

обелина (рисунок 4.1а). В качестве примера на рисунке 4.2 представлены спектры флуоресценции разряженного обелина в присутствии глицерина.

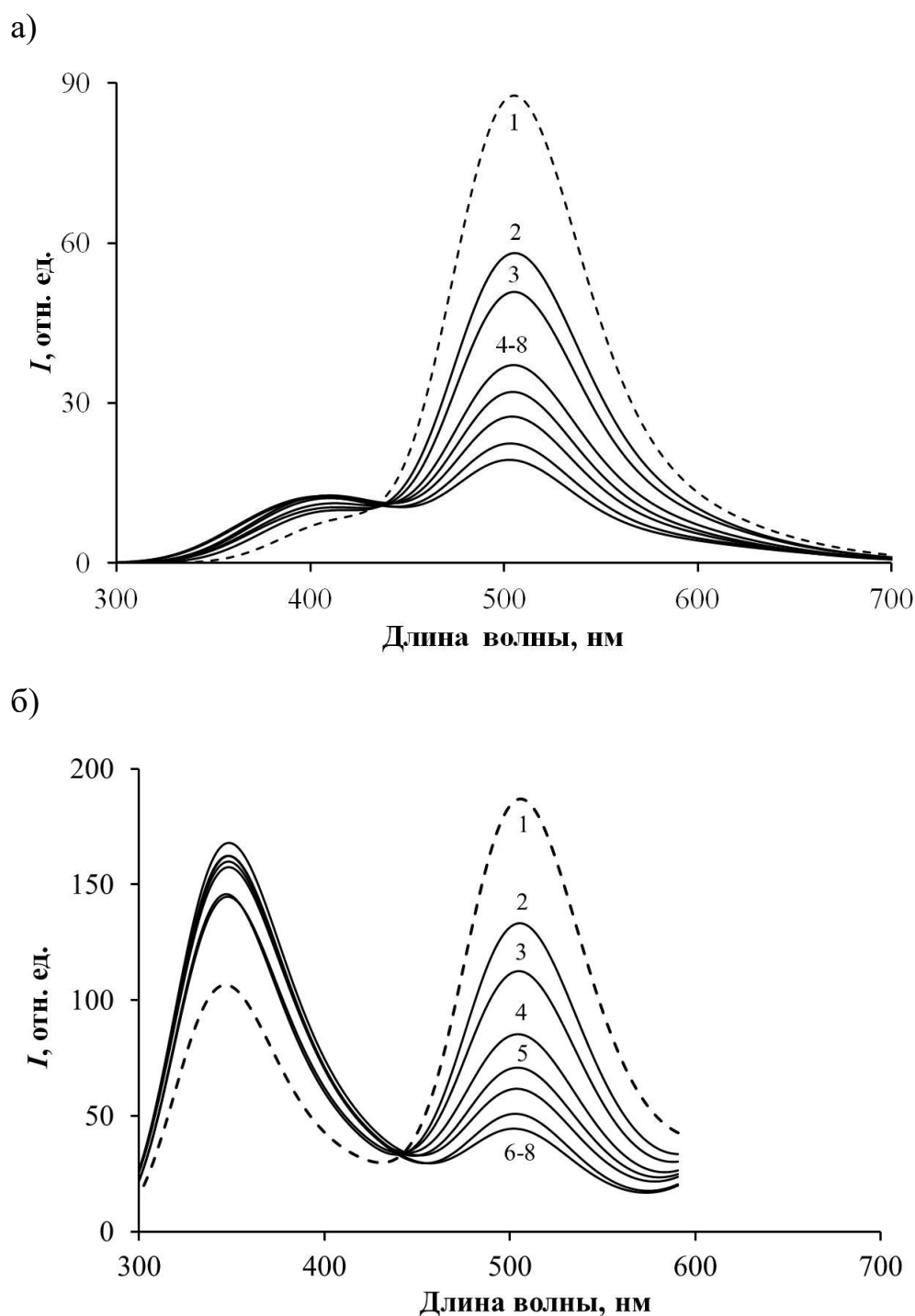


Рисунок 4.2. Спектры флуоресценции разряженного обелина при различных концентрациях глицерина: (1) – 0, (2) – 0,06 М, (3) – 0,11 М, (4) – 0,16 М, (5) – 0,21 М, (6) – 0,26 М, (7) – 0,31 М, (8) – 0,36 М. Фотовозбуждение 350 нм (а) и 280 нм (б) [Alieva et al., 2014].

Спектры флуоресценции для других экзогенных соединений, перечисленных выше, приведены в приложении Б (этанол – рисунок Б.1, этиленгликоль – рисунок Б.2, ДМСО – рисунок Б.3). Из всех рисунков видно, что действие экзогенных соединений на разряженный обелин приводит к общему спаду интенсивности видимой флуоресценции. При этом, интенсивность ультрафиолетового излучения возрастает при малых концентрациях соединений и затем уменьшается с ростом их концентрации.

Эффективность тушения флуоресценции разряженного обелина, полученного из лиофилизированного препарата обелина, оказалась даже выше, чем свежеприготовленного. В качестве примера на рисунке 4.3 представлены спектры разряженного обелина в присутствии глицерина различных концентраций при фотовозбуждении 350 нм.

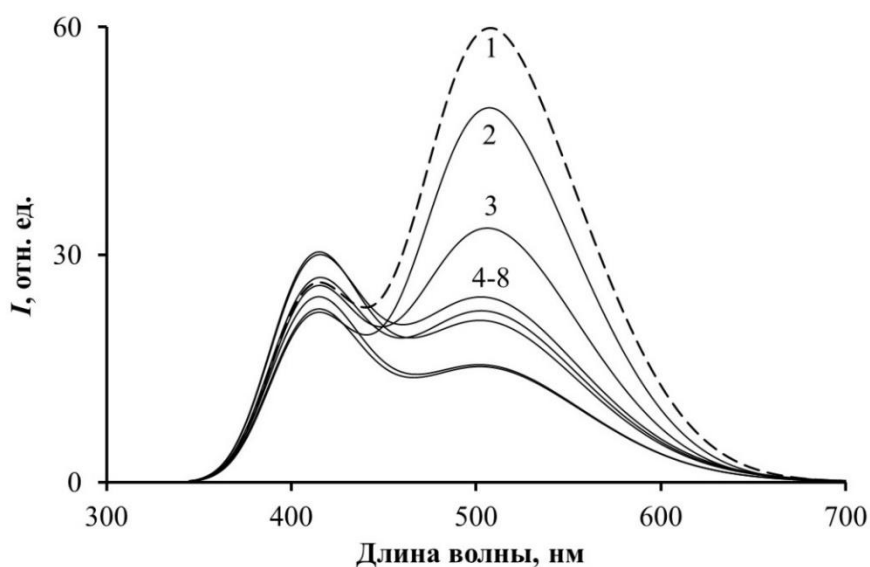


Рисунок 4.3. Спектры флуоресценции разряженного обелина, полученного из лиофилизированного препарата, при различных концентрациях глицерина: (1) – 0, (2) – 0,02 М, (3) – 0,03 М, (4) – 0,04 М, (5) – 0,06 М, (6) – 0,07 М, (7) – 0,10 М, (8) – 0,11 М. Фотовозбуждение – 350 нм.

При сопоставлении рисунков 4.3 и 4.2а видно, что при 0,06 М глицерина интенсивность спектров разряженного обелина падает на 62 % (для обелина из лиофилизированного препарата) и на 30 % (для обелина из свежеприготовленного

препарата) относительно исходных спектров. Также видно, что интенсивность коротковолнового (фиолетового) плеча обелина, разряженного из лиофилизированного препарата, исходно выше, причем, увеличение концентрации глицерина приводит к дополнительному возрастанию интенсивности этого плеча и к уменьшению интенсивности основного (сине-зеленого) максимума флуоресценции. При концентрации глицерина 0,07 М интенсивность фиолетового пика становится больше, чем сине-зеленого. Такая же тенденция наблюдалась в присутствии этанола (Приложение В, рисунок В1), этиленгликоля (Приложение В, рисунок В2) и глицерина (рисунок 4.3 и Приложение В, рисунок В3) для разряженного обелина, полученного из лиофилизированного препарата.

Все спектры были разложены на гауссовы компоненты. В соответствии с уравнением 2.5 рассчитаны коэффициенты тушения флуоресценции разряженного обелина (K) экзогенными соединениями. В качестве примера, на рисунке 4.4 представлена зависимость интенсивности флуоресценции компонент I, II, III от концентрации глицерина при фотовозбуждении 350 нм [Alieva et al., 2014].

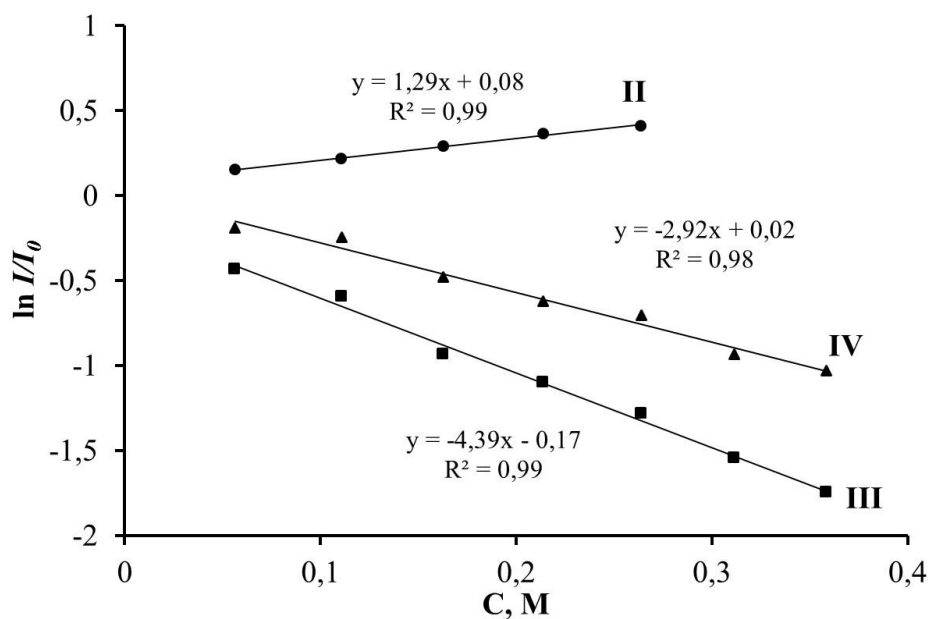


Рисунок 4.4. Зависимость интенсивности флуоресценции $\ln(I/I_0)$ компонент II, III, IV разряженного обелина от концентрации глицерина при фотовозбуждении 350 нм [Alieva et al., 2014]. R – коэффициент аппроксимации.

Значения коэффициентов K для спектральных компонент в присутствии экзогенных соединений (этанола, этиленгликоля, глицерина и ДМСО) при фотовозбуждении 350 нм и 280 нм представлены в таблице 4.1.

Таблица 4.1. Коэффициенты тушения K экзогенными соединениями флуоресценции разряженного обелина. Достоверность аппроксимации $R^2 = 0,95-0,99$.

Экзогенные соединения	Диапазон концентраций, М	K, M^{-1}						
		$\lambda_{\text{возб}} = 280 \text{ нм}$				$\lambda_{\text{возб}} = 350 \text{ нм}$		
		Спектральные компоненты						
		I	II	III	IV	II	III	IV
этанол	0,02-0,11	-1,2	-1,7	2,9	7,6	0,7	3,6	2,7
этиленгликоль	0,09-0,51	-0,1	0,4	0,4	0,2	-0,5	0,4	0,4
глицерин	0,06-0,36	-0,7	-0,7	4,6	2,4	-1,3	4,4	2,9
ДМСО	0,01-2,65	-0,1	0,2	0,3	0,1	0,1	0,3	0,3

Из таблицы 4.1, видно, что с ростом концентрации всех экзогенных соединений интенсивность компоненты I увеличивается ($K < 1$), а интенсивности компонент III и IV уменьшаются ($K > 1$). При фотовозбуждении 350 нм величина K_{II} для всех соединений меньше, чем K_{III} и K_{IV} . Однако при фотовозбуждении 280 нм такая закономерность наблюдается только для этанола и глицерина, что вероятно связано с более сложными процессами деградации энергии при фотовозбуждении в высшие электронно-возбужденные состояния.

Аналогичные закономерности наблюдали и для разряженного обелина, полученного из лиофилизированного препарата. Результаты приведены в приложении В (таблица В.1).

4.1.2 Влияние на спектральный состав

Рассчитаны вклады спектральных компонент в спектры испускания разряженного обелина в присутствии спиртов (этанола [Alieva et al., 2014], этиленгликоля, глицерина [Alieva et al., 2014]) и ДМСО [Петрова и др., 2016]. В качестве примера на рисунке 4.5 представлены вклады компонент разряженного обелина в присутствии глицерина при фотовозбуждении 350 нм (рисунок 4.5а) и 280 нм (рисунок 4.5б). Из этих рисунков видно, что с увеличением концентрации глицерина вклад фиолетовой компоненты II (протонированной формы ЦЛМ) возрастает, а вклад сине-зеленой компоненты III (депротонированной формы ЦЛМ) уменьшается. Из сопоставления этих рисунков видно, что тенденции изменения вкладов компонент II-IV при фотовозбуждении 280 нм и 350 нм схожи (рисунок 4.5).

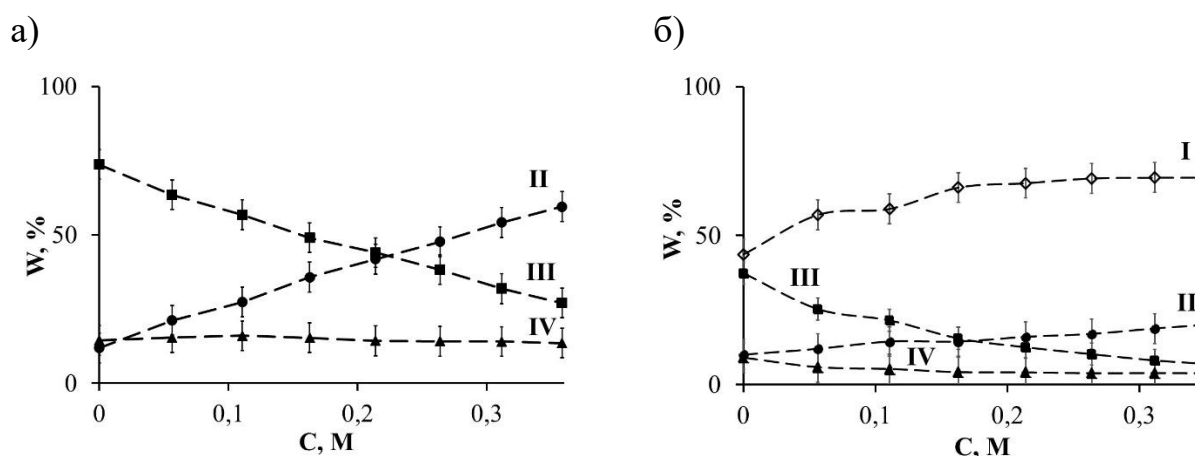


Рисунок 4.5. Вклады, W , компонент I-IV в спектрах испускания разряженного обелина при различных концентрациях (C , M) глицерина при фотовозбуждении 350 нм (а) [Alieva et al., 2014] и 280 нм (б).

На рисунке 4.6 приведен суммарный вклад компонент видимой области спектра ($II + III + IV$) и вклад ультрафиолетовой компоненты I при фотовозбуждении 280 нм. Из данного рисунка видно, что суммарный вклад компонент видимой области спектра уменьшается, а вклад ультрафиолетовой компоненты I – увеличивается с ростом концентрации глицерина. Аналогичные тенденции наблюдаются и в присутствии других экзогенных веществ

(Приложение Г, этанол – рисунок Г1, этиленгликоль – рисунок Г2, ДМСО – рисунок Г3).

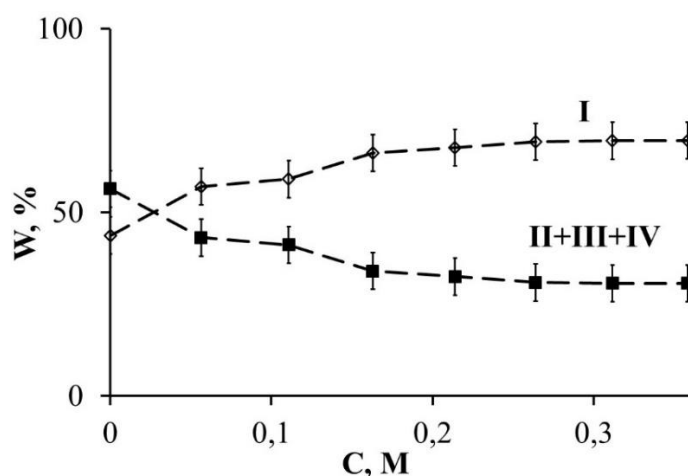


Рисунок 4.6. Вклады, W, компонент I-IV в спектрах испускания разряженного обелина при различных концентрациях (C, М) глицирина при фотовозбуждении 280 нм.

Рассчитаны вклады спектральных компонент в спектры испускания разряженного обелина, полученного из лиофилизированного препарата обелина, при различных концентрациях (C, М) спиртов (этанола, этиленгликоля и глицирина). В качестве примера, на рисунке 4.7 представлены вклады компонент разряженного обелина в присутствии глицирина при фотовозбуждении 350 нм (рисунке 4.7а) и 280 нм (рисунке 4.7б). Из рисунка 4.7а видно, что с увеличением концентрации глицирина вклад фиолетовой компоненты II (протонированной формы ЦЛМ) возрастает, а вклад сине-зеленой компоненты III (депротонированной формы ЦЛМ) уменьшается. Таким образом, тенденции изменения вкладов спектральных компонент для обелина, разряженного из лиофилизированного препарата аналогично обелину из свежеприготовленного препарата (рисунке 4.5). Аналогичные тенденции наблюдали и в присутствии других экзогенных веществ (Приложение Д, этанол – рисунок Д1, этиленгликоль – рисунок Д2).

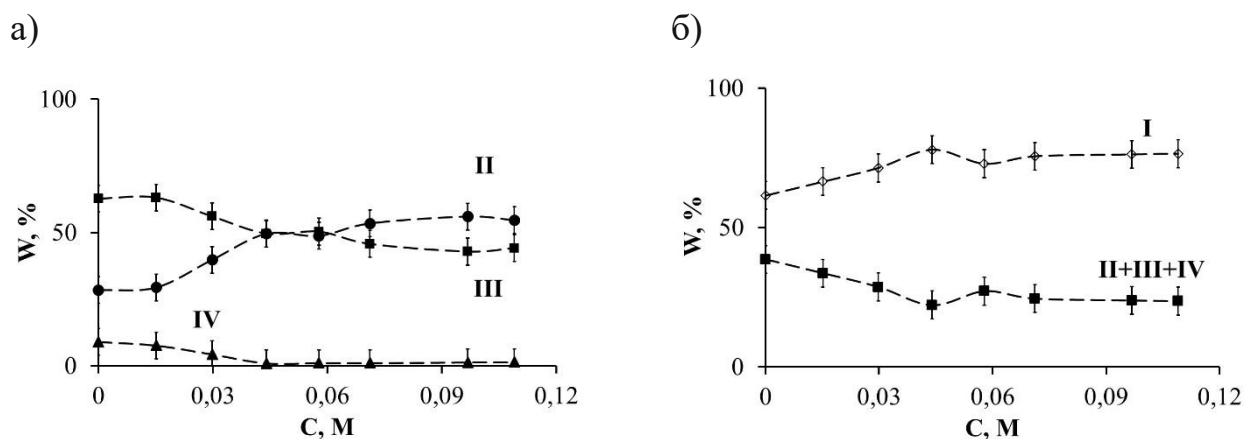


Рисунок 4.7. Вклады, W , компонент I-IV в спектрах испускания разряженного обелина, полученного из лиофилизированного препарата, при различных концентрациях (C, M) глицерина при фотовозбуждении 350 нм (а) и 280 нм (б).

Таким образом, действие экзогенных соединений уменьшает интенсивность флуоресценции разряженного обелина в видимой области и изменяет соотношение протонированной (фиолетовой компоненты II) и депротонированной (сине-зеленой компоненты III) форм ЦЛМ в пользу протонированной формы. Следует отметить, что лиофилизация препарата обелина увеличивает чувствительность разряженного обелина к экзогенным соединениям. Вероятно, эти эффекты вызваны деструктивными воздействиями экзогенных соединений и процесса лиофилизации, которые изменяют межатомные расстояния в аминокислотном окружении флуорофора, уменьшают эффективность переноса протона в возбужденном состоянии ЦЛМ, увеличивая при этом вклад протонированной формы ЦЛМ. Кроме того, воздействие экзогенных веществ увеличивает вклад ультрафиолетовой компоненты I, что может быть связано с ростом вклада флуоресценции боковых групп аминокислотных остатков, прежде всего, триптофанов.

Изменение вкладов спектральных компонент при воздействии экзогенных соединений может служить основой для использования разряженного обелина в качестве биотеста для мониторинга внутриклеточной токсичности. Соотношение вкладов фиолетовой и сине-зеленой компонент предложено использовать в качестве количественной оценки степени деструкции белкового комплекса –

разряженного обелина. Мониторинг токсичности в данном случае осуществляется на уровне элементарных физико-химических процессов; он связан с оценкой изменения эффективности элементарного фотохимического процесса – переноса протона в возбужденном состоянии флуорофора разряженного обелина, ЦЛМ.

4.2 Хроническое воздействие повышенной температуры на флуоресценцию разряженного обелина

4.2.1 Влияние на интенсивность флуоресценции

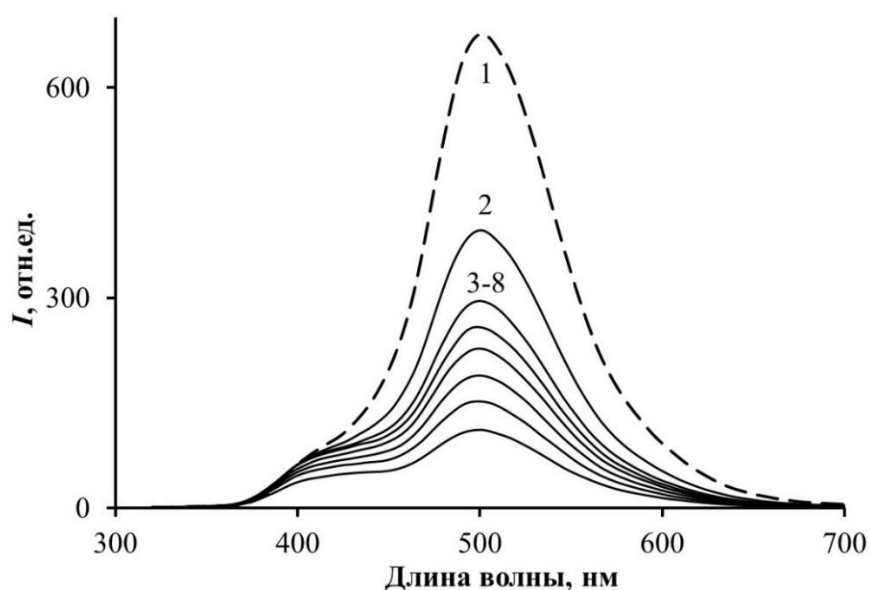
Поскольку оптимальная температура функционирования фотопротейна обелина, выделенного из гидроидного полипа *Obelia longissima* (обитателя северных морей), менее 20 °С, необходимо учитывать изменение интенсивности и цвета флуоресценции разряженного обелина при использовании его в качестве флуоресцентной метки в теплокровных организмах. Кроме того, известно, что температура в разных точках организма может быть различна.

Для экспериментов была выбрана температура 40 °С. В данной главе изучено хроническое влияние этой температуры на флуоресценцию разряженного обелина при различных энергиях фотовозбуждения. Результаты и выводы раздела 4.2 опубликованы в работах [Alieva et al., 2012, 2013].

Выявлены изменения интенсивности спектров флуоресценции разряженного обелина при различных временах высокотемпературного воздействия (40 °С). На рисунке 4.8 представлены спектры флуоресценции обелина, разряженного в отсутствие ионов кальция, при фотовозбуждении 350 нм (рисунок 4.8а) [Alieva et al., 2013] и 280 нм (рисунок 4.8б). Изменение спектров флуоресценции наблюдали в течение 12,5 часов. Из рисунков видно, что увеличение времени воздействия приводит к общему падению интенсивности флуоресценции в видимой области спектра. При этом, интенсивность ультрафиолетового излучения (рисунок 4.8б) сначала возрастает, а затем уменьшается, что может быть связано с протеканием двух (или более) последовательных процессов изменения пространственной структуры белка,

определяющих эффективность переносов энергии (излучательных и безызлучательных, внутри- и межмолекулярных) с участием боковых групп аминокислотных остатков (в первую очередь, триптофановых), а, следовательно, и выход квантов ультрафиолетовой флуоресценции.

а)



б)

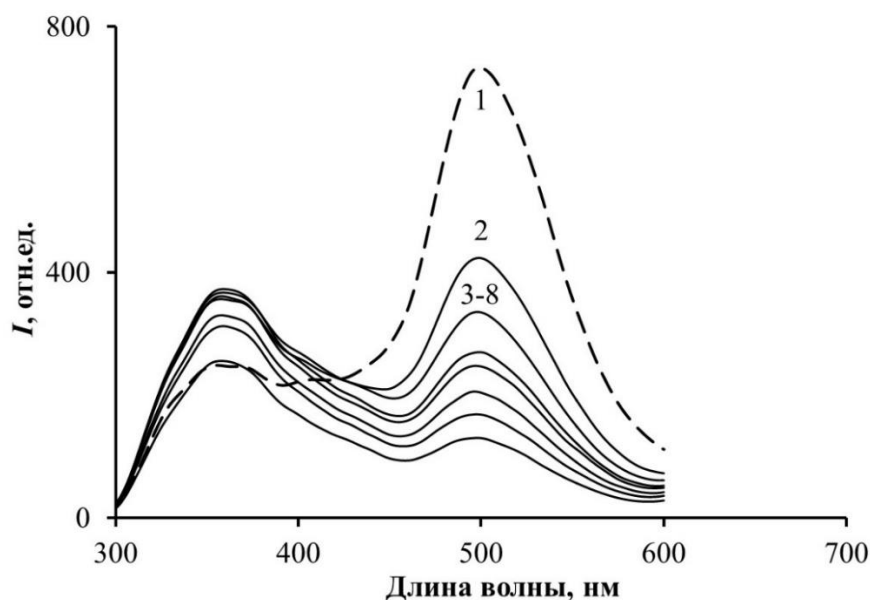


Рисунок 4.8. Спектры флуоресценции разряженного обелина при различных временах температурного воздействия (40 °С): 1 – 0 ч, 2 – 3 ч, 3 – 6 ч, 4 – 7 ч, 5 – 8 ч, 6 – 9 ч, 7 – 11 ч, 8 – 12,5 ч. Фотовозбуждение 350 нм (а) [Alieva et al., 2013] и 280 нм (б).

Аналогичную тенденцию изменения спектров флуоресценции наблюдали и для обелина, разряженного в присутствии ионов кальция (Приложение Е, рисунок Е1). Однако, падение интенсивности флуоресценции при этом происходило всего за 3 ч.

На рисунке 4.9 приведены 3D спектры флуоресценции разряженного обелина при варьировании длин волн возбуждения от 260 до 390 нм, зарегистрированные после 12,5 ч нагревания [Alieva et al., 2013]. Для сравнения, 3D-спектры флуоресценции разряженного обелина без температурного воздействия представлены ранее в главе 3, рисунок 3.1. Как видно из сопоставления этих рисунков, температурное воздействие изменяет форму спектра флуоресценции разряженного обелина: увеличивает интенсивность ультрафиолетового излучения и фиолетового плеча, а также уменьшает интенсивность сине-зеленого пика.

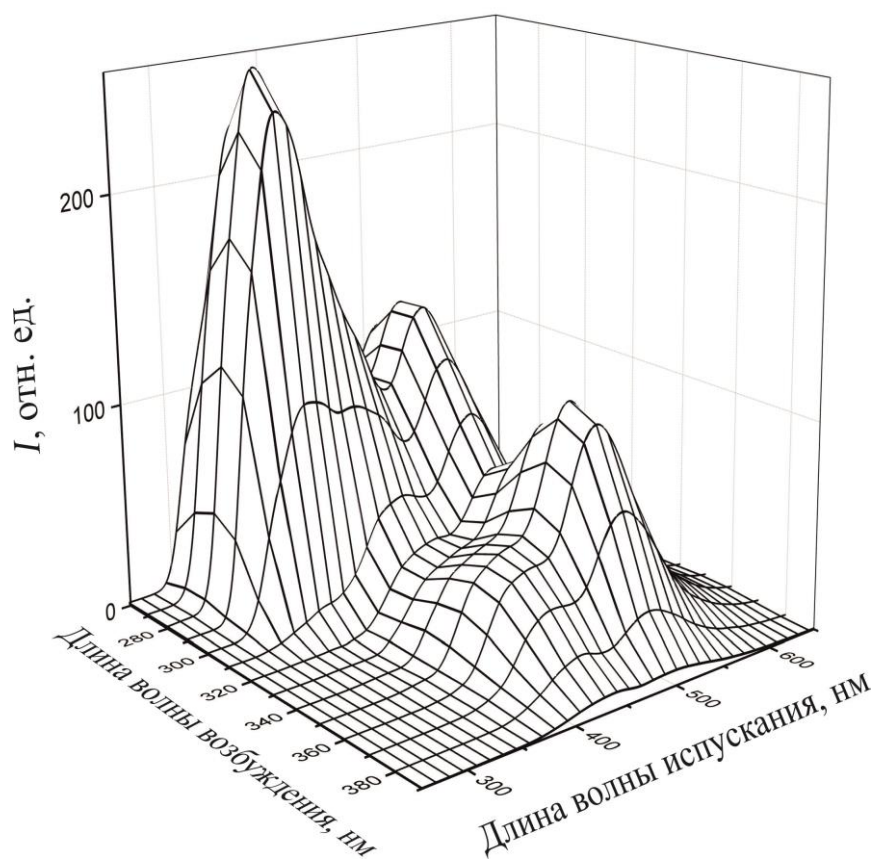


Рисунок 4.9. 3D-спектры флуоресценции разряженного обелина (10^{-5} М), подвергнутого температурному воздействию 12,5 ч при 40 °С [Alieva et al., 2013].

Спектры флуоресценции разряженного обелина, подвергнутого хроническому температурному воздействию (40 °С), были разложены на компоненты. Обнаружены три компонента (I, II и III) при фотовозбуждении 280 нм и две (II и III) – при фотовозбуждении 350 нм. Максимумы компонент I, II и III оказались равны соответственно 350 ± 1 , 420 ± 1 и 502 ± 1 нм. Показано, что положения максимумов выделенных компонент не зависят во времени температурного воздействия (0-12,5 ч) и длины волны возбуждения (260-390 нм).

В соответствии с уравнением 4 были рассчитаны коэффициенты спада флуоресценции разряженного обелина (K') под действием температуры при низкоэнергетическом (350 нм) и высокоэнергетическом (280 нм) фотовозбуждении (таблица 4.2). Из этой таблицы видно, что коэффициенты K' соответствующих спектральных компонент (II и III) близки для двух длин волн фотовозбуждения. Максимальные коэффициенты спада соответствуют компоненте III.

Таблица 4.2. Коэффициенты спада K' флуоресценции обелина, разряженного в отсутствие Ca^{2+} , при хроническом температурном воздействии 40 °С. Достоверность аппроксимации $R^2 = 0,95-0,99$.

$K', \text{ч}^{-1}$				
$\lambda_{\text{возб}} = 280 \text{ нм}$			$\lambda_{\text{возб}} = 350 \text{ нм}$	
Спектральные компоненты				
I	II	III	II	III
0,05	0,06	0,13	0,07	0,13

Таким образом, действие повышенной температуры на разряженный обелин приводит к спаду интенсивности флуоресценции в видимой и ультрафиолетовой области спектра.

4.2.2 Влияние на спектральный состав флуоресценции

Хроническое воздействие повышенной температуры на разряженный обелин влияет не только на интенсивность флуоресценции, то и на форму ее спектра.

На рисунке 4.10 представлены нормированные спектры люминесценции (возбуждения и испускания) разряженного обелина [Alieva et al., 2013]. Из этого рисунка видно, что с увеличением времени нагревания форма спектра возбуждения не изменяется, в то время как в нормированном спектре испускания наблюдается рост интенсивности коротковолнового плеча. Отсутствие изменения спектра возбуждения (рисунок 4.10) может быть связано с тем, что этот спектр формируется за счет протонированной формы ЦЛМ в течение времени, меньшего времени переноса протона, и аналогичен спектрам поглощения разряженного обелина.

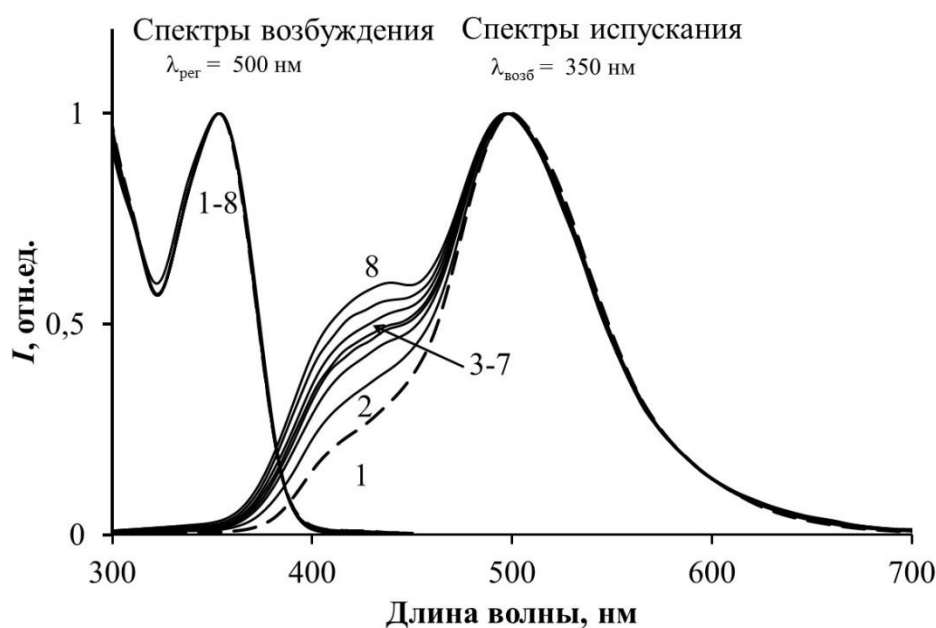


Рисунок 4.10. Нормированные спектры люминесценции разряженного обелина при варьировании времени выдерживания при температуре 40 °С: (1) – 0, (2) – 3, (3) – 6, (4) – 7, (5) – 8, (6) – 9, (7) – 11, (8) – 12,5 ч [Alieva et al., 2013].

Спектры испускания разряженного обелина, подвергнутого хроническому высокотемпературному воздействию (40 °С), были разложены на компоненты. Установлено, что вклады компонент изменяются с ростом времени воздействия.

На рисунке 4.11 представлены вклады компонент при различных временах температурного воздействия (40 °С) при фотовозбуждении 350 нм (рисунок 4.11а) [Alieva et al., 2013] и 280 нм (рисунок 4.11б). Из рисунка видно, что с увеличением времени нагревания вклад депротонированной формы ЦЛМ (компонента III) падает, а вклад протонированной формы (компонента II) растет (рисунок 4.11а), либо практически не изменяется (рисунок 4.11б).

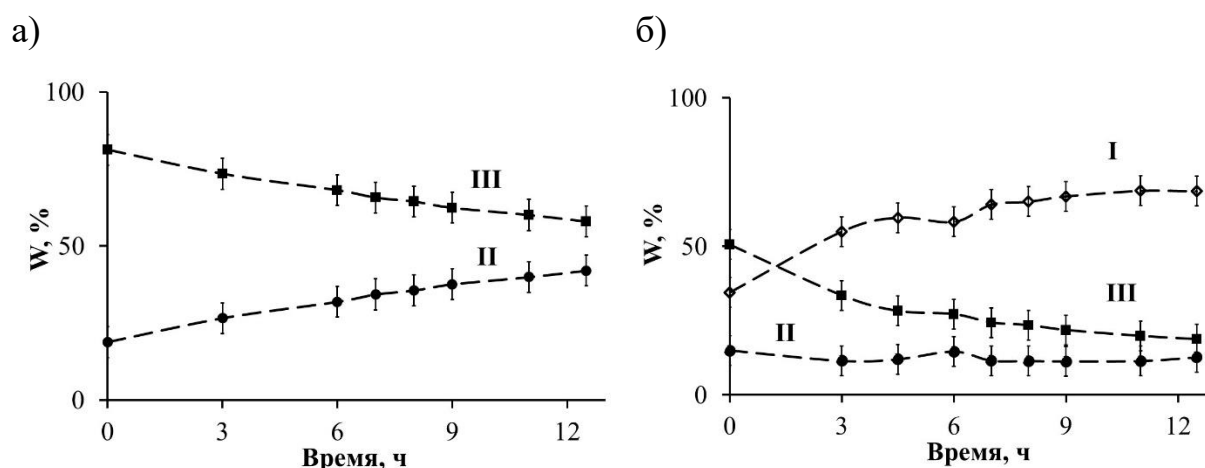


Рисунок 4.11. Вклады, W, компонент I-III спектра испускания разряженного обелина при различных временах высокотемпературного воздействия (40 °С) при фотовозбуждении 350 нм (а) [Alieva et al., 2013] и 280 нм (б).

На рисунке 4.12 приведен суммарный вклад компонент видимой области спектра (II + III) и вклад ультрафиолетовой компоненты I при фотовозбуждении 280 нм. Из этого рисунка видно, что суммарный вклад компонент видимой области спектра уменьшается, а вклад ультрафиолетовой компоненты I увеличивается с ростом времени нагревания. Аналогичные тенденции наблюдали и в присутствии экзогенных веществ (раздел 4.1.2).

Таким образом, деструктивное влияние повышенной температуры аналогично действию экзогенных соединений: рост времени высокотемпературного воздействия уменьшает общий выход флуоресценции разряженного обелина, изменяет соотношение между фиолетовой и сине-зеленой

компонентами в пользу фиолетовой, а также увеличивает вклад ультрафиолетовой компоненты.

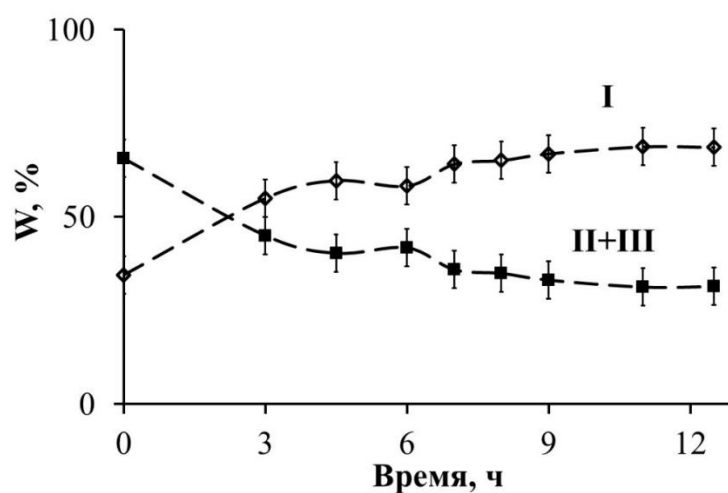


Рисунок 4.12. Вклады, W , компонент I-III спектра испускания разряженного обелина при различных временах высокотемпературного воздействия ($40\text{ }^{\circ}\text{C}$) при фотовозбуждении 280 нм .

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ 4

В главе 4 проведено исследование воздействий на флуоресценцию разряженного обелина ряда физико-химических факторов – экзогенных веществ (этанола, этиленгликоля, глицерина и ДМСО) и повышенной температуры. Исследовано воздействие на разряженный обелин, полученный из свежеприготовленного и лиофилизированного препаратов фотопротеина, поэтому процесс лиофилизации может быть рассмотрен как дополнительный физико-химический фактор. Показано, что перечисленные факторы изменяют спектральные характеристики разряженного обелина в видимой области спектра, а именно: (1) уменьшают интенсивность, (2) изменяют спектральный состав, увеличивая вклад фиолетовой и уменьшая вклад сине-зеленой компонент. Вышеперечисленные факторы также изменяют интенсивность и вклад ультрафиолетовой компоненты. Все изменения связаны с частичной денатурацией белка, приводящей к уменьшению эффективности фотохимического процесса (т.е. переноса протона в возбужденном состоянии флуорофора, ЦЛМ), а также изменению пространственного положения боковых групп аминокислотных остатков (прежде всего, триптофановых) и фрагментов ЦЛМ, способных вносить вклад в ультрафиолетовую флуоресценцию разряженного обелина.

Проведено сравнение действия экзогенных соединений на флуоресценцию обелина, разряженного в присутствии Ca^{2+} из свежеприготовленного и лиофилизированного препаратов обелина. Показано, что лиофилизация препарата обелина увеличивает чувствительность его флуоресценции к экзогенным веществам (этанола, этиленгликолю и глицерину).

На рисунке 4.13а-г приведены наиболее выраженные изменения спектров испускания флуоресценции разряженного обелина (видимая область) при воздействии перечисленных факторов. Из рисунка видно, что во всех случаях увеличиваются вклады коротковолнового (фиолетового) плеча

флуоресценции. При действии этанола на разряженный обелин, полученный из лиофилизированного препарата, наблюдается полное перераспределение интенсивности в максимумах спектров флуоресценции (рисунок 4.13г).

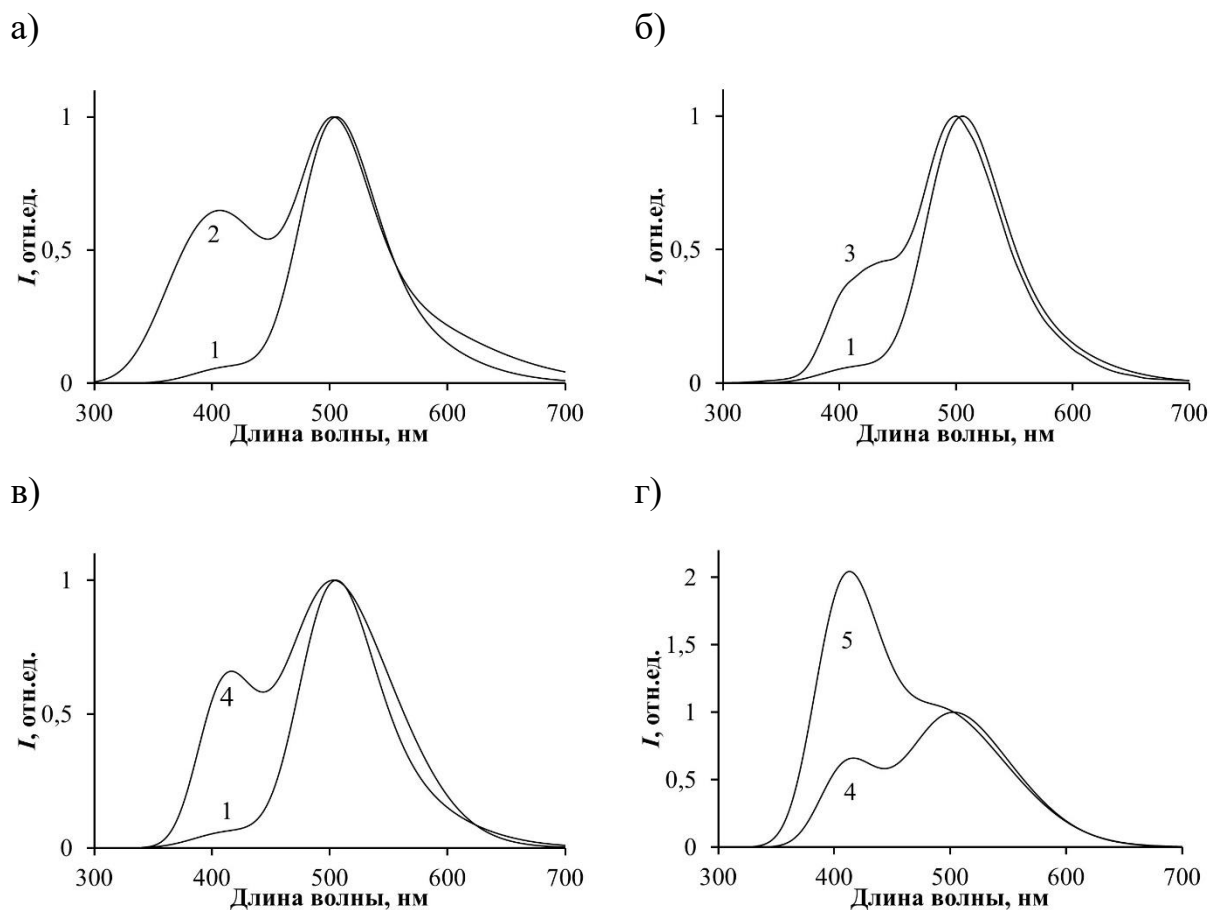


Рисунок 4.13. Варьирование спектров испускания флуоресценции разряженного обелина различными физико-химическими факторами: (а, г) – влияние спиртов, (б) – термическое воздействие 40 °С, (в, г) лиофилизация. Спектры испускания разряженного обелина: 1 – контрольный образец, 2 – в присутствии глицерина (0,35 М), 3 – после 12,5 ч выдерживания при 40 °С, 4 – образец, полученный из лиофилизированного препарата, 5 – в присутствии этанола (0,09 М).

Фотовозбуждение – 350 нм.

Данное исследование вносит вклад в понимание механизмов воздействия внешних факторов (включая факторы химической токсичности и температурное воздействие) на белковые комплексы и может быть использовано при разработке

основ использования флуоресцентных белков в качестве биосенсоров для оценки степени токсического воздействия. Разряженные фотопротеины являются удобными биотестовыми системами для изучения токсических эффектов с физико-химических позиций, а именно с точки зрения влияния внешних факторов на эффективность элементарных фотохимических процессов. Воздействие внешних факторов приводит к изменению соотношения флуоресцентных форм ЦЛМ, и соответственно к изменению цвета флуоресценции разряженного обелина. Это делает возможным количественную оценку результатов внешнего воздействия (химического, температурного и др.) и может являться основой создания нового типа биотестов на токсическое действие – биотестов с цветовой дифференциацией на основе ЦЛМ-содержащих флуоресцентных белков. Возможность регистрации фотолюминесценции в качестве физиологической функции придает биотестовой системе максимальное удобство при практическом использовании. Изменение интенсивности и цвета флуоресценции разряженного обелина в присутствии экзогенных соединений и при температурах теплокровных организмов необходимо учитывать при использовании разряженного обелина в качестве флуоресцентной метки *in vivo*.

Таким образом, описанные результаты исследований могут расширить многофункциональность препарата обелина и повысить эффективность его использования в различных биомедицинских анализах.

ВЫВОДЫ

1. Флуоресценция свободного целентерамида при фотовозбуждении в высшие электронно-возбужденные состояния (260-300 нм) включает дополнительное излучение в ближней ультрафиолетовой области (330 нм, метанол), которое формируется с участием пиразинового, фенольного и бензольного фрагментов молекулы целентерамида. В этот процесс вовлечены электронные переходы с участием вакантных и занятых молекулярных орбиталей разных энергий (НВМО+1, ВЗМО, ВЗМО-2, ВЗМО-3). Так как целентерамид является флуорофором разряженных фотопротеинов (обелина, акворина, клитина), он может вносить вклад в их ультрафиолетовую флуоресценцию (с максимумами 330-350 нм) при фотовозбуждении в высшие электронно-возбужденные состояния (260-300 нм).

2. Действие ряда деструктивных физико-химических факторов (хронического воздействия повышенной температуры и экзогенных соединений, процесса лиофилизации) увеличивает вклад фиолетовой, но уменьшает вклад сине-зеленой спектральных компонент в видимой области спектра, что связано с эффективностью фотохимических процессов – переноса протона в возбужденном состоянии целентерамида в белковом окружении. Данное изменение спектрального состава флуоресценции происходит на фоне общего падения ее интенсивности.

3. Соотношение вкладов фиолетовой и сине-зеленой компонент предложено использовать в качестве биотеста с цветовой дифференциацией для определения степени деструкции разряженного обелина. Предлагаемый подход основан на мониторинге эффективности элементарного фотохимического процесса – переноса протона в возбужденном состоянии флуорофора, целентерамида.

4. Вклад ультрафиолетовой компоненты во флуоресценцию разряженного обелина растёт под влиянием деструктивных физико-химических факторов – хронического воздействия повышенной температуры и экзогенных соединений, процесса лиофилизации, что может быть связано с увеличением вклада флуоресценции боковых групп аминокислотных остатков.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

GFP – зеленый флуоресцентный белок,

POPOP – (1,4-бис (5-фенилоксазол-2-ил) бензол),

ВЗМО – высшая занятая молекулярная орбиталь,

ДМСО – диметилсульфоксид,

НВМО – низшая вакантная молекулярная орбиталь.

ЦЛМ – целентерамид.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антипина, Л. Ю. Теоретическое моделирование процесса флуоресценции и формирование излучающего субстрата белка обелина / Л. Ю. Антипина, С. Г. Овчинников // В мире научных открытий, физико-математические науки. – 2010. – № 5 (11). – С. 35-37.
2. Белогурова, Н. В. Спектрально-люминесцентный анализ Ca^{2+} -регулируемых биолюминесцентных реакций фотопротеинов: дис. ... канд. физ.-мат. наук: 03.01.02 / Н. В. Белогурова. – Красноярск, 2010. – 123 с.
3. Бондарь, В. С. Получение, свойства и применение кальций-чувствительного фотопротеина из гидроида *Obelia longissima* / В. С. Бондарь, Е. С. Высоцкий, И. А. Гамалей, А. Б. Каулин // Цитология. – 1990. – Т. 33. – С. 57-66.
4. Борисова, В. В. Высокочувствительный и быстрый метод выявления ДНК-фрагментов с использованием фотопротеина обелина как репортера / В. В. Борисова, И. А. Пышная, Д. В. Пышный, Л. А. Франк // Биоорганическая химия. – 2008. – Т. 34, № 6. – С. 792-798.
5. Векшин, Н. Л. Флуоресцентная спектроскопия биополимеров / Н. Л. Векшин. – Пушкино: ООО Фотон век, 2014. – 188 с.
6. Высоцкий, Е. С. Выделение и очистка Ca^{2+} -зависимого фотопротеина – обелина из гидроидных полипов *Obelia longissima* / Е. С. Высоцкий, В. С. Бондарь, В. Н. Летунов // Биохимия. – 1989. – Т. 54. – С. 965-973.
7. Высоцкий, Е. С. Кальций-регулируемые фотопротеины морских кишечноротовых / Е. С. Высоцкий, С. В. Маркова, Л. А. Франк // Молекулярная биология. – 2006. – Т. 40, № 3. – С. 404-417.
8. Еремеева, Е. В. Формирование активного фотопротеинового комплекса на примере обелина и акворина и их мутантных форм: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.02 / Е. В. Еремеева. – Красноярск, 2010. – 122 с.

9. Зубова, Н. Н. Молекулярные клеточные сенсоры, созданные на основе цветных флуоресцирующих белков / Н. Н. Зубова, А. П. Савицкий // Успехи биологической химии. – 2005. – Т. 45. – С. 391-454.
10. Зубова, Н. Н. Спектральные и физико-химические свойства зеленого (GFP) и красного (drFP583) флуоресцирующих белков / Н. Н. Зубова, А. Ю. Булавина, А. П. Савицкий // Успехи биологической химии. – 2003. – Т. 43. – С. 163-224.
11. Исмаилов, А. Д. Фотобиосенсоры на основе светящихся бактерий / А. Д. Исмаилов, Л. Э. Алескерова // Биохимия. – 2015. – Т. 80, № 6. – С. 867-881.
12. Красицкая, В. В. Выявление аллельных вариантов гена с помощью биолюминесцентных репортеров / В. В. Красицкая, Л. П. Буракова, И. А. Пышная, Л. А. Франк // Биоорганическая химия. – 2012. – Т. 38, № 3. – С. 342-350.
13. Кудряшева, Н. С. Электронновозбужденные состояния при биолюминесценции / Н. С. Кудряшева, П. И. Белобров, В. А. Кратасюк, Д. Н. Шигорин // Доклады АН СССР. – 1991. – Т. 321, № 4. – С. 837-841.
14. Лакович, Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии / Дж. Лакович; пер. с англ. под редакцией М. Г. Кузьмина. – Москва: Мир, 1986. – 496 с.
15. Левшин, Л. В. Практикум по спектроскопии / Л. В. Левшин. – Москва: издательство Московского университета, 1976. – 320 с.
16. Ломакина, Г. Ю. Биолюминесцентная детекция жизнеспособности клеток / Г. Ю. Ломакина, Ю. А. Модестова, Н. Н. Угарова // Биохимия. – 2015. – Т. 80, № 6. – С. 829-844.
17. Немцева, Е. В. Механизм электронного возбуждения в биолюминесцентной реакции бактерий / Е. В. Немцева, Н. С. Кудряшева // Успехи химии. – 2007. – Т. 76. – С. 101-112.
18. Немцева, Е. В. Сходство спектральных компонент с индивидуальным временем жизни для триптофановой флуоресценции белков разной сложности / Е. В. Немцева, О. О. Лащук, М. А. Герасимова // Биофизика. – 2016. – Т. 61, вып. 2. – С. 231-238.

19. Петкевич, К. Д. Красные флуоресцентные белки и их свойства / К. Д. Петкевич, Е. Н. Ефременко, В. В. Верхуша, С. Д. Варфоломеев // Успехи химии. – 2010. – Т. 79, № 3. – С. 274-290.
20. Петрова, А. С. Варьирование спектральных характеристик целентерамид-содержащего флуоресцентного белка из *Obelia longissima* под воздействием диметилсульфоксида / А. С. Петрова, Р. Р. Алиева, Н. В. Белогурова, Л. С. Тирранен, Н. С. Кудряшева // Известия Высших учебных заведений. Физика. – 2016. – Т. 59, № 4. – С. 87-92.
21. Степаненко, О. В. Флуоресцентные белки: физико-химические свойства и использование в клеточной биологии / О. В. Степаненко, В. В. Верхуша, И. М. Кузнецова, К. К. Туроверов // Цитология. – 2007. – Т. 49, № 5. – С. 395-420.
22. Франк, Л. А. Рекомбинатный фотопротейн обелин гидроидного полипа *Obelia longissima*: выделение и использование в иммуноферментном анализе: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.02 / Л. А. Франк. – Красноярск, 1997. – 23 с.
23. Франк, Л. А. Синтез конъюгантов Ca^{2+} -регулируемого фотопротейна обелина с иммуноглобулинами и их использование в качестве меток в иммуноанализе / Л. А. Франк, А. И. Петунин, Е. С. Высоцкий // Биоорганическая химия. – 2004. – Т. 30, № 4. – С. 364-368.
24. Шигорин, Д. Н. Электронно-возбужденные состояния многоатомных молекул / Д. Н. Шигорин, Г. А. Валькова, Е. А. Гаспилович. – М.: Наука, 1993. – 495с.
25. Alieva, R. R. Thermoinactivated photoprotein obelin: fluorescence peculiarities / R. R. Alieva, N. V. Belogurova, A. S. Petrova, N. S. Kudryasheva // Luminescence. – 2012. – V. 27, № 2. – P. 96.
26. Alieva, R. R. Fluorescence properties of Ca^{2+} -independent discharged obelin and its application prospect / R. R. Alieva, N. V. Belogurova, A. S. Petrova, N. S. Kudryasheva // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2013. – V. 405, № 10. – P. 3351-3358.
27. Alieva, R. R. Effects of alcohols on the fluorescence of Ca^{2+} -discharged photoprotein obelin / R. R. Alieva, N. V. Belogurova, A. S. Petrova, N. S. Kudryasheva // Luminescence. – 2014. – V. 29, № 1. – P. 57-58.

28. Alieva, R. R. Effects of alcohols on fluorescence intensity and color of a discharged-obelin-based biomarker / R. R. Alieva, N.V. Belogurova, A. S. Petrova, N. S. Kudryasheva // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2014. – V. 406, № 12. – P. 2965-2974.
29. Alieva, R. R. Ultraviolet fluorescence of coelenteramide and coelenteramide-containing fluorescent proteins. Experimental and theoretical study / R. R. Alieva, F. N. Tomilin, A. A. Kuzubov, S. G. Ovchinnikov, N. S. Kudryasheva // *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*. – 2016. – V. 162. – P. 318-323.
30. 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.
31. Becke, A. D. Density-functional thermochemistry. The role of exact exchange / A. D. Becke // *J. Chem. Phys.* – 1993. – V. 98. – P. 5648-5652.
32. Belogurova, N. V. Spectral components of bioluminescence of aequorin and obelin / N. V. Belogurova, N. S. Kudryasheva, R. R. Alieva, A. G. Sizykh // *J. of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2008. – V. 92. – P. 117-122.
33. Belogurova, N. V. Activity of upper electron-excited states in bioluminescence of coelenterates / N. V. Belogurova, N. S. Kudryasheva, R. R. Alieva // *Journal of Molecular Structure*. – 2009. – V. 924-926. – P. 148-152.
34. Belogurova, N. V. Discharged photoprotein obelin: fluorescence peculiarities / N. V. Belogurova, N. S. Kudryasheva // *Journal of photochemistry and photobiology. B*. – 2010. – V. 101. – P. 103-108.
35. Bondar, V. S. Cadmium-induced luminescence of recombinant photoprotein obelin / V. S. Bondar, A.G. Sergeev, B. A. Illarionov, J. Vervoort, W. R. Hagen // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1995. – V.1231. – P. 29-32.
36. Bloemberg, G.V. Simultaneous imaging of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 populations expressing three different autofluorescent proteins in the rhizosphere: new perspectives for studying microbial communities / G. V. Bloemberg, A. H. Wijnjes, G. E. Lamers, N. Stuurman, B. J. Lugtenberg // *Molecular Plant-Microbe Interactions* – 2000. – V. 13. – P. 1170-1176.

37. Campbell, A. K. Coelenterate photoproteins as indicators of cytoplasmic free Ca^{2+} in small cells / A. K. Campbell, R. L. Dormer, M. B. Hallet // *Cell Calcium*. – 1985. – V. 6. – P. 69-82.
38. Carter, R. W. Cloning of anthozoan fluorescent protein genes / R. W. Carter, M. C. Schmale, P. D. Gibbs // *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* – 2004. – V. 138. – P. 259-270.
39. Chalfie, M. Green fluorescent protein as a marker for gene expression / M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, D. C. Prasher // *Science*. – 1994. V. 263. – P. 802-805.
40. Chalfie, M. Green Fluorescent Protein: properties, applications and protocols / M. Chalfie, S. R. Kain. – 2 ed. – V. 47. – New Jersey: John Wiley and Sons, Inc., 2005. – 488 p. DOI: 10.1002/0471739499
41. Chan, A.W. Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes / A. W. Chan, K. Y. Chong, C. Martinovich, C. Simerly, G. Schatten // *Science*. – 2001. – V. 291 (5502). – P. 309-312.
42. Charpilienne, A. Individual rotavirus-like particles containing 120 molecules of fluorescent protein are visible in living cells / A. Charpilienne, M. Nejmeddine, M. Berois, N. Perez, E. Neumann, E. Hewat, G. Trugnan, J. Cohen // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. – P. 29361-29367.
43. Chen, R. F. Fluorescence quantum yield of tryptophan and tyrosine / R. F. Chen // *Analytical Letters*. – 1967. – V.1 – P. 35-42.
44. Chen, S.-F. Chemiluminescence of coelenterazine and fluorescence of coelenteramide: a systematic theoretical study / S.-F. Chen, I. Navizet, D. Roca-Sanjua, R. Lindh, Y.-J. Liu, N. Ferre // *J. Chem. Theory Comput.* – 2012. – V. 8. – P. 2796-2807.
45. Chen, S.-F. QM/MM Study on the light emitters of aequorin chemiluminescence, bioluminescence, and fluorescence: a general understanding of the bioluminescence of several marine organisms / S.-F. Chen, N. Ferre, Y. J. Liu // *Chem.-Eur. J.* – 2013. – V. 19. – P. 8466-8472.

46. Chudakov, D. M. Photoswitchable cyan fluorescent protein for protein tracking / D. M. Chudakov, V. V. Verkhusha, D. B. Staroverov, E. A. Souslova, S. Lukyanov, K. A. Lukyanov // *Nat. Biotechnol.* – 2004. – V. 22. – P. 1435-1439.
47. Chudakov, D. M. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues / D. M. Chudakov, M. V. Matz, S. Lukyanov, K. A. Lukyanov // *Physiol. Rev.* – 2010. – V. 90. – P. 1103-1163.
48. Cody, C.W. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein / C. W. Cody, D. C. Prasher, W. W. Wester, F. G. Prendergast, W. W. Ward // *Biochemistry.* – 1993. – V. 32. – P. 1212-1218.
49. Cossi, M. Time-dependent density functional theory for molecules in liquid solutions / M. Cossi, V. Barone // *J. Chem. Phys.* – 2001. – V. 115. – P. 4708-4717.
50. Cubitt, A. B. Understanding, improving and using green fluorescent proteins / A. B. Cubitt, R. Heim, S. R. Adams, A. E. Boyd, L. A. Gross, R. Y. Tsien // *Trends Biochem. Science.* – 1995. – V. 20. – P. 448-455.
51. Dandie, C.E. Comparison of a range of green fluorescent protein-tagging vectors for monitoring a microbial inoculant in soil / C. E. Dandie, S. M. Thomas, N. C. McClure // *Lett. Appl. Microbiol.* – 2001. – V. 32 (1). – P. 26-30.
52. 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 // *J. FEBS Letters.* – 2001. – V. 506. – P. 281-285.
53. Deng, L. Crystal structure of a Ca²⁺-discharged photoprotein: Implications for the mechanisms of the calcium trigger and the 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.
54. Deng, L. All three Ca²⁺-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 // *J. Protein Science.* – 2005. – V. 14. – P. 663-675.

55. Efremenko, E. N. Biosensitive element in the form of immobilized luminescent photobacteria for detecting ecotoxicants in aqueous flow-through systems / E. N. Efremenko, O. V. Maslova, A. V. Kholstov, O. V. Senko, A. D. Ismailov // *Luminescence: the journal of biological and chemical luminescence*. – 2016. – V. 31, № 6. – P. 1283-1289.
56. Eftink, M.R. Fluorescence techniques for studying protein structure / M. R. Eftink // *Methods Biochem. Anal.* – 1990. – V.35. – P. 117-129.
57. El-Daly, S. A. Photophysical parameters, excitation energy transfer, and photoreactivity of 1,4-Bis(5-phenyl-2-oxazolyl)benzene (POPOP) laser dye / S. A. El-Daly, S. A. El-Azim, F. M. Elmekawey, B. Y. Elbaradei, S. A. Shama, A. M. Asiri // *International Journal of Photoenergy*. – 2012. – 10 p. doi:10.1155/2012/458126
58. Engqvist-Goldstein, A. E. The actin-binding protein Hip1R associates with clathrin during early stages of endocytosis and promotes clathrin assembly in vitro / A. E. Engqvist-Goldstein, R. A. Warren, M. M. Kessels, J. H. Keen, J. Heuser, D. G. Drubin // *J. Cell Biol.* – 2001. – V. 154. – P. 1209-1223.
59. 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. W. G. Visser, W. J. H. van Berkel, E. S. Vysotski // *FEBS Letters*. – 2009. – V. 583. – P. 1939-1944.
60. Ereemeeva, E. V. Ca²⁺-regulated photoprotein obelin as N-terminal partner in the fusion proteins / E. V. Ereemeeva, L. A. Frank, S. V. Markova, E. Vysotski // *Journal of Siberian Federal University. Biology*. – 2010. – V. 4. – P. 372-383.
61. Frank, L. A. Ca²⁺-Regulated Photoproteins: Effective Immunoassay Reporters / L. A. Frank // *Sensors*. – 2010. – V. 10. – P. 11287-1130.
62. Girotti, S. Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria / S. Girotti, E. N. Ferri, M. G. Fumo, E. Maiolini // *Analytica Chimica Acta*. – 2008. – V. 608 (1). – P. 2-29. doi: 10.1016/j.aca.2007.12.008.

63. Gory, L. Use of green fluorescent protein to monitor *Lactobacillus sakei* in fermented meat products / L. Gory, M. C. Montel, M. Zagorec // FEMS Microbiol. Lett. – 2001. – V. 194 (2). – P. 127-133.
64. Gryczynski, I. Lifetime distributions and anisotropy decays of indole fluorescence in cyclohexane / ethanol mixtures by frequency-domain fluorometry / I. Gryczynski, W. Wiczek, M. L. Johnson, J. R. Lakowicz // Biophys. Chem. – 1988. – V. 32. – P. 173-185.
65. Hakkila, K. Reporter genes lucFF, luxCDABE, GFP, and DSRED have different characteristics in whole-cell bacterial sensors / K. Hakkila, M. Matsumov, M. Karp, M. Virta // Anal. Biochem. – 2002. – V. 301. – P. 235-242.
66. 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.
67. Heim, R. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein / R. Heim, D. C. Prasher, R. Y. Tsien // PNAS USA. – 1994. – V. 91. – P. 12501-12504.
68. Hori, K. Chemiluminescence of *Renilla* (sea pansy) luciferin and its analogues / K. Hori, J. E. Wampler, M. J. Cormier // J. Chem. Commun. – 1973. – P. 492-494.
69. 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.
70. 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.
71. Inouye, S. Evidence for redox forms of the *Aequorea* green fluorescent protein / S. Inouye, F. I. Tsuji // FEBS Lett. – 1994. – V. 351. – P. 211-214.
72. Kain, S. R. Green fluorescent protein (GFP): applications in cell-based assays for drug discovery / S. R. Kain // Drug Discov. Today. – 1999. – P. 4 (7). – P. 304-312.

73. Kendall, J. M. Engineering the Ca²⁺-activated photoprotein aequorin with reduced affinity for calcium / J. M. Kendall, G. Sala-Newby, V. Ghalaut, R. L. Dormer, A. K. Campbell // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1992. – V. 187. – P. 1091-1097.
74. Kratasyuk, V. A. Applications of luminous bacteria enzymes in toxicology / V. A. Kratasyuk, E. N. Esimbekova // *Combinatorial chemistry & high throughput screening.* – 2015. – V. 18 (10). – P. 952-959.
75. 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.
76. Kudryasheva, N. S. Estimation of energy of the upper electron-excited states of the bacterial bioluminescent emitter / N. S. Kudryasheva, E. V. Nemtseva, A. G. Sizykh, V. A. Kratasyuk, A. J. W. G. Visser // *J. Photochemistry and Photobiology B: Biology.* – 2002. – V. 68. – P. 88-92.
77. Kudryasheva, N. S. Bioluminescence and exogenous compounds: physico-chemical basis for bioluminescent assay / N. S. Kudryasheva // *J. Photochemistry and Photobiology B: Biology.* – 2006. – V. 83. – P. 77-86.
78. Labas, Y. A. Diversity and evolution of the green fluorescent protein family / Y. A. Labas, N. G. Gurskaya, Y. G. Yanushevich, A. F. Fradkov, K. A. Lukyanov, S. A. Lukyanov, M. V. Matz // *PNAS USA.* – 2002. – V. 99. – P. 4256-4261.
79. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy* / J. R. Lakowicz. – New York, USA: Springer Science & Business Media, 2006. – 980 p.
80. Lee, C. Development of the colle-salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density / C. Lee, W. Yang, R. G. Parr // *Phys. Rev.* – 1988. – V. 37. – P. 785-789.
81. Levine, L. D. Isolation and characterization of a photoprotein “phialidin” and a spectrally unique green-fluorescent protein from the bioluminescent jellyfish *Phialidium gregarium* / L. D. Levine, W. W. Ward // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1982. – V. 72. – P. 77-85.

- 82.Li, Z.-S. The dynamics simulation and quantum calculation investigation about luminescence mechanism of coelenteramide / Z.-S. Li, X. Zhao, L.-Y. Zou, A.-M. Ren // *Photochemistry and photobiology*. – 2013. – V. 89. – P. 849-855.
- 83.Li, Z.-S. The effect of micro-environment on luminescence of aequorin: the role of amino acids and explicit water molecules on spectroscopic properties of coelenteramide / Z.-S. Li, L.-Y. Zou, Ch.-G. Min, A.-M. Ren // *J. of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2013. – V. 127. – P. 94-99.
- 84.Liu, Z. J. Structure of the Ca²⁺-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.
- 85.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.
- 86.Liu, Z. J. Crystal structure of obelin after Ca²⁺-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.
87. Loewenthal, R. Fluorescence spectrum of barnase: contributions of three tryptophan residues and a histidine-related pH dependence / R. Loewenthal, J. Sancho, A.R. Fersht // *Biochemistry*. – 1991. – V.30. – P. 6775-6779.
- 88.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 Letters*. – 2003. – № 554. – P. 184-188.
89. Marenich, A. V. Universal solution model based on solute electron density and on a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions / A. V. Marenich, C. J. Cramer, D. G. Truhlar // *J. Phys. Chem. B*. – 2009. – V. 113. – P. 6378-6396.
- 90.Markova, S. V. Obelin hyperexpression in *E. coli*, purification and characterization // S.V. Markova, E.S. Vysotski, J. Lee // *In bioluminescence and chemiluminescence*

- (eds. J.F. Case et al.). World Scientific Publishing Company, Singapore. – 2001. – P. 115-119.
91. Markova, S. V. Obelin from the bioluminescent marine hydroid *Obelia geniculata*: cloning, expression, and comparison of some properties with those of other Ca²⁺-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.
92. Maselli, A. Kinetics of binding, uptake and degradation of live fluorescent (DsRed) bacteria by *Dictyostelium discoideum* / A. Maselli, G. Laevsky, D. A. Knecht // *Microbiology*. – 2002. – V. 148. – P. 413-420.
93. McCapra, F. The chemiluminescence of Cypridina analogue / F. McCapra, Y. C. Chang // *Chem. Commun.* – 1967. – P. 1011-1012.
94. McCapra, F. Mechanism in chemiluminescence and bioluminescence - unfinished business / F. McCapra // In *bioluminescence and chemiluminescence: molecular reporting with photons* (ed. J. W. Hastings, L. J. Kricka, P. E. Stanley). Chichester: John Wiley & Sons. – 1996. – P. 7-15.
95. Mercuri, A. Green fluorescent flowers / A. Mercuri, A. Sacchetti, L. De Benedetti, T. Schiva, S. Alberti // *Plant Science*. – 2001. – V. 161 (5). – P. 961-968.
96. Min, C. The fluorescent properties of coelenteramide, a substrate of aequorin and obelin/ C. Min, Z. Li, A. Ren, L. Zou, J. Guo, J.D. Goddard // *Journal of photochemistry and photobiology. A-Chemistry*. – 2013. – V. 251. – P. 182-188.
97. Moede, T. Online monitoring of stimulus-induced gene expression in pancreatic beta-cells / T. Moede, B. Leibiger, P. O. Berggren, I. B. Leibiger // *Diabetes*. – 2001. – V. 50. – P. 15-19.
98. 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.
99. Morise, H. Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea* / H. Morise, O. Shimomura, F.H. Johnson, J. Winant // *Biochemistry*. – 1974. – V. 13. – P. 2656-2662.

100. Natashin, P.V. Structures of the Ca^{2+} -regulated photoprotein obelin Y138F mutant before and after bioluminescence support the catalytic function of a water molecule in the reaction / P. V. Natashin, W. Ding, E. V. Ereemeeva, S. V. Markova, J. Lee, E. S. Vysotski, Z.-J. Liu // *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* – 2014. – V. 70. – P. 720-732.
101. Nelson, G. Multi-parameter analysis of the kinetics of NF-kappa B signalling and transcription in single living cells / G. Nelson, L. Paraoan, D. G. Spiller, G. J. Wilde, M. A. Browne, P. K. Djali, J. F. Unitt, E. Sullivan, E. Floettmann, M. R. White // *J. Cell Sci.* – 2002. – V. 115. – P. 1137-1148.
102. 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.
103. Okabe, M. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells / M. Okabe, M. Ikawa, K. Kominami, T. Nakanishi, Y. Nishimune // *FEBS Lett.* – 1997. – V. 407 (3). – P. 313-319.
104. Ormö, M. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein / M. Ormö, A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien, S. J. Remington // *Science.* – 1996. – V. 273. – P. 1392-1395.
105. Pattanaik, P. Unusual fluorescence of W168 in *plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase, probed by single-tryptophan mutants / P. Pattanaik, G. Ravindra, C. Sengupta, K. Maithal, P. Balaram, H. Balaram // *Eur. J. Biochem.* – 2003. – V. 270. – P.745-756.
106. Patterson, G. H. Photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells / G. H. Patterson, J. Lippincott-Schwartz // *Science.* – 2002. – V. 13. – P. 1873-1877.
107. Peloquin, J. J. Transformed bacterial symbionts reintroduced to and detected in host gut / J. J. Peloquin, C. R. Lauzon, S. Potter, T. A. Miller // *Curr. Microbiol.* – 2002. – V. 45. – P. 41-45.

108. Petrova, A. N. Effect of DMSO on fluorescence properties of Ca²⁺-discharged photoprotein obelin / A. S. Petrova, N. V. Belogurova, R. R. Alieva, N. S. Kudryasheva // *Luminescence*. – 2014. – V. 29, № 1. – P. 40.
109. Prasher, D. C. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein / D. C. Prasher, V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast, M. J. Cormier // *Gene*. – 1992. – V. 111. – P. 229-233.
110. Prendergast, F. G. Chemical and physical properties of aequorin and the green fluorescent protein isolated from *Aequorea forskalea* / F. G. Prendergast, K. G. Mann // *Biochemistry*. – 1978. – V. 17. – P. 3448-3453.
111. Roy, K. Predictive QSPR modeling of the acidic dissociation constant (pKa) of phenols in different solvents/ K. Roy, P. L. A. Popelier // *Journal of Physical Organic Chemistry*. – 2009. – V. 22. – P. 186-196.
112. Runge, E. Density-functional theory for time-dependent systems / E. Runge, E. K. U. Gross // *Phys. Rev. Lett.* – 1984. – V. 52. – P. 997-1000.
113. Saito, R. Solvent and substituent effects on the fluorescent properties of coelenteramide analogues / R. Saito, T. Hirano, H. Niwa, M. Ohashi // *Journal of the chemical society, Perkin transactions 2*. – 1997. – P. 1711-1716.
114. Sankaranarayanan, S. The use of pHluorins for optical measurements of presynaptic activity / S. Sankaranarayanan, D. De Angelis, J. E. Rothman, T. A. Ryan // *Biophys J*. – 2000. – V. 79. – P. 2199-2208.
115. Schmidt, M. W. General atomic and molecular electronic structure system / M. W. Schmidt, K. K. Baldrige, J. A. Boatz, S. T. Elbert, M. S. Gordon, J. H. Jensen, S. Koseki, N. Matsunaga, K. A. Nguyen, S. J. Su, T. L. Windus, M. Dupuis, J. A. Montgomery // *J. Comput. Chem.* – 1993. – V. 14. – P. 1347-1363.
116. Schuchardt, K. L. Basis set exchange: a community database for computational sciences / K. L. Schuchardt, B. T. Didier, T. Elsethagen, L. Sun, V. Gurumoorthi, J. Chase, J. Li, T. L. Windus // *J. Chem. Inf. Model.* – 2007. – V. 47 (3). – P. 1045-1052.
117. 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.
118. Shimomura, O. Bioluminescence in the sea: photoprotein systems / O. Shimomura // *J. Symp. Soc. Exp. Biol.* – 1985. – V. 39. – P. 351-422.
119. Shimomura, O. Calcium binding, quantum yield, and emitting molecule in aequorin bioluminescence / O. Shimomura, F. H. Johnson // *Nature.* – 1970. – V. 227. – P. 1356-1357.
120. Shimomura, O. Chemical nature of bioluminescence systems in coelenterates / O. Shimomura, F. H. Johnson // *PNAS USA.* – 1975. – V. 72 (4). – P. 1546-1549.
121. Shimomura, O. Light-emitters involved in the luminescence of coelenterazine / O. Shimomura, K. Teranishi // *Luminescence.* – 2000. – V. 15. – P. 51-58.
122. Shimomura, O. Bioluminescence: chemical principles and methods / O. Shimomura. – World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore, 2006. – 470 p.
123. Shinbrot, E. Use of fusions to green fluorescent protein in the detection of apoptosis / E. Shinbrot, C. Spencer, V. Natale, S. R. Kain // *Methods Enzymol.* – 2000. – V. 327. – P. 513-522.
124. 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. – P. 1008-1014.
125. 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.
126. Taylor, D. L. Real-time molecular and cellular analysis: the new frontier of drug discovery / D. L. Taylor, E. S. Woo, K. A. Giuliano // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2001. – V. 12 (1). – P. 75-81.
127. Terskikh, A. Fluorescent timer: protein that changes color with time / A. Terskikh, A. Fradkov, G. Ermakova, A. Zaraisky, P. Tan, A. V. Kajava, X. Zhao, S. Lukyanov, M. Matz, S. Kim, I. Weissman, P. Siebert // *Science.* – 2000. – V. 290. – P. 1585-1588.

128. 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.
129. Tomasi J. Quantum mechanical continuum solvation models / J. Tomasi, B. Mennucci, R. Cammi // *Chem. Rev.* – 2005. – V. 105. – P. 2999-3094.
130. Tomilin, F. N. Fluorescence of calcium-discharged obelin: The structure and molecular mechanism of emitter formation / F. N. Tomilin, L. U. Antipina, E. S. Vysotski, S. G. Ovchinnikov, I. I. Gitelzon // *Dokl. Biochem. Biophys.* – 2008. – V. 422. – P. 279-284.
131. Tsien, R. Y. The green fluorescent protein / R. Y. Tsien // *Annu. Rev. Biochem.* – 1998. – V. 67. – P. 509-544.
132. Turro, N. J. Modern molecular photochemistry / N. J. Turro. – California: University science book, 1991. – 620 p.
133. Ugarova, N. N. Bioluminescence spectra of native and mutant firefly luciferases as a function of pH / N. N. Ugarova, L. G. Maloshenok, I. V. Uporov, M. I. Koksharov // *Biochemistry (Moscow)*. – 2005. – V. 70. – I. 11. – P. 1262-1267.
134. Verkhusha, V. V. Kinetic analysis of maturation and denaturation of DsRed, a coral-derived red fluorescent protein / V. V. Verkhusha, N. A. Akovbian, E. N. Efremenko, S. D. Varfolomeyev, P. V. Vrzherch // *Biochemistry*. – 2001. – V. 66. – P. 1342-1351.
135. 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.
136. Vysotski, E. S. Ca²⁺-regulated photoproteins: structural insight into the bioluminescence mechanism / E. S. Vysotski, J. Lee // *Acc. Chem. Res.* – 2004. – V. 37. – P. 405-415.

137. Vysotski, E. S. Bioluminescent mechanism of Ca^{2+} -regulated photoproteins from three-dimensional structures / E. S. Vysotski, J. Lee // In luciferases and fluorescent proteins: principles and advances in biotechnology and bioimaging (eds V. R. Viviani, Y. Ohmiya). Transworld Research Network, Kerala, India. – 2007. – P. 19-41.
138. Ward, W. W. An energy transfer protein in coelenterate bioluminescence. Characterization of the *Renilla* green-fluorescent protein / W. W. Ward, M. J. Cormier // J. Biol. Chem. – 1979. – V. 254. – P. 781-788.
139. Ward, W. W. Reversible denaturation of *Aequorea* green-fluorescent protein: physical separation and characterization of the renatured protein / W.W. Ward, S.H. Bokman // Biochemistry. – 1982. – V. 21 (19). – P. 4535-4540.
140. Yanai, T. A new hybrid exchange-correlation functional using the Coulomb-attenuating method (CAM-B3LYP) / T. Yanai, D. P. Tew, N. C. Handy // Chem. Phys. Lett. – 2004. – V. 393. – P. 51-57.
141. Yang, Y. S. Cre stoplight: a red/green fluorescent reporter of Cre recombinase expression in living cells / Y. S. Yang, T. E. Hughes // Biotechniques. – 2001. – V. 31. – P. 1036-1041.
142. Yuste, R. Synapto-pHluorins: chimeras between pH-sensitive mutants of green fluorescent protein and synaptic vesicle membrane proteins as reporters of neurotransmitter release / R. Yuste, R. B. Miller, K. Holthoff, S. Zhang, G. Miesenbock // Methods Enzymol. – 2000. – V. 327. – P. 522-546.
143. Zhao, Y. CcbP, a calcium-binding protein from *Anabaena* sp. PCC 7120, provides evidence that calcium ions regulate heterocyst differentiation / Y. Zhao, Y. Shi, W. Zhao, X. Huang, D. Wang, N. Brown, J. Brand, J. Zhao // PNAS USA. – 2005. – V. 102. – P. 5744-5748.
144. Zimmer, M. Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior / M. Zimmer // Chem. Rev. – 2002. – V.102. – P. 759-781.

Приложение А
(рекомендуемое)

Сравнение методов квантово-химических расчетов для молекулы целентерамида
(глава 2 раздел 2.3.2.2 диссертации)

Таблица А.1 – Характеристики молекулы целентерамида, рассчитанные разными методами ВЗЛР и САМ-ВЗЛР в базисе *сс-pVDZ* с учетом моделей для растворителя (метанола) [Alieva et al., 2016].

Метод	Тип модели	Поглощение, состояние S_1			Испускание		
		Энергия, эВ	λ , нм	СО, отн. ед.	Энергия, эВ	λ , нм	СО, отн. ед.
ВЗЛР	вакуум	3,821	324	0,324	3,333	372	0,268
ВЗЛР	PCM	3,719	333	0,452	3,247	382	0,497
	PCM*	3,642	340	0,668	3,151	393	0,695
	SMD	3,739	332	0,458	3,245	382	0,549
	SMD*	3,652	339	0,692	3,123	397	0,776
САМ-ВЗЛР	SMD	4,267	290	0,465	3,470	357	0,814
	SMD*	4,183	296	0,736	3,323	373	1,023

* – адиабатическое возбуждение, λ – длина волны, СО – сила осциллятора.

Продолжение Приложения А

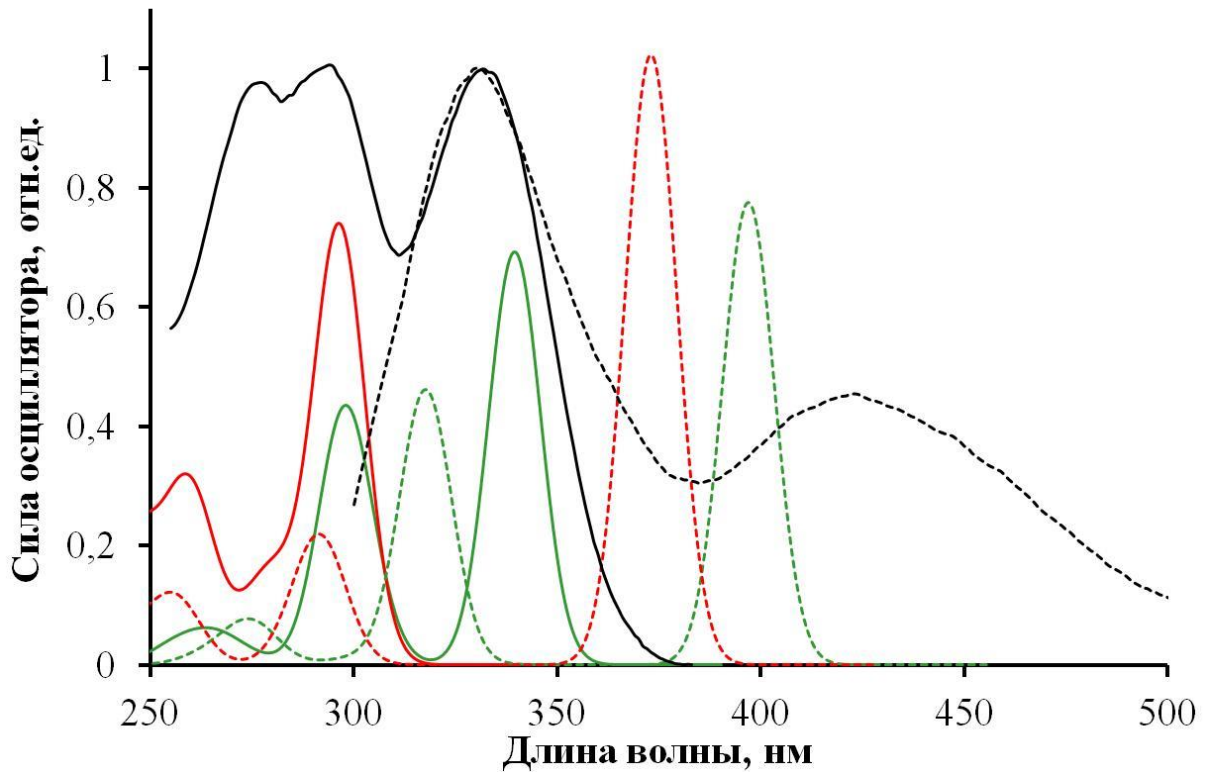


Рисунок А.1. Сравнение методов SAM-B3LYP и B3LYP в базисе cc-pVDZ для SMD* [Alieva et al., 2016]. Спектры поглощения (сплошная линия) и флуоресценции (пунктирная линия) были смоделированы размытием по Гауссу на полувысоте с полушириной – 15 нм. Красный цвет – SAM-B3LYP, зеленый цвет – B3LYP, черный цвет – эксперимент

Приложение Б

(рекомендуемое)

Влияние экзогенных веществ на интенсивность флуоресценции разряженного обелина

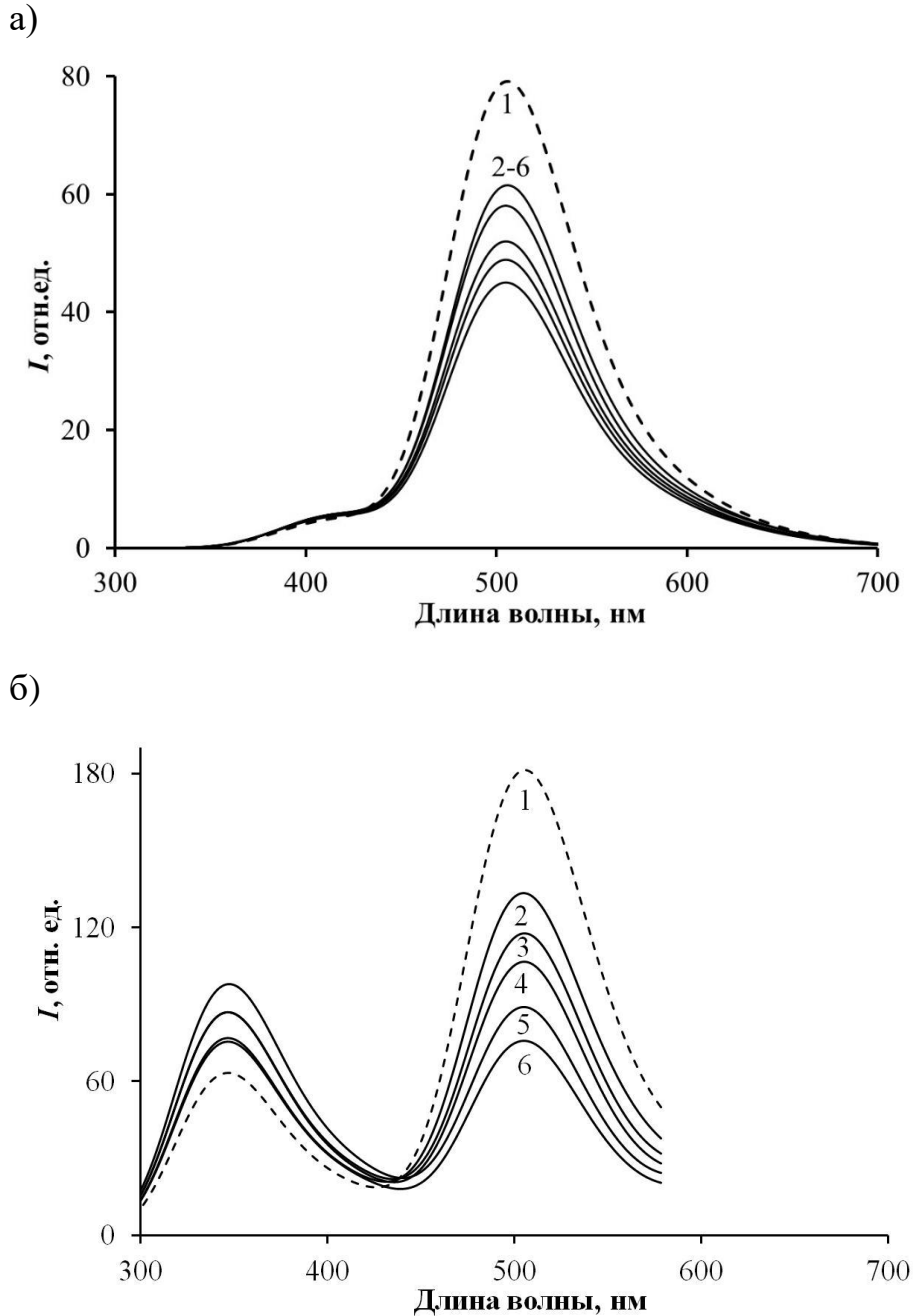


Рисунок Б.1. Спектры флуоресценции разряженного обелина при различных концентрациях этанола: (1) – 0, (2) – 0,02 М, (3) – 0,04 М, (4) – 0,06 М, (5) – 0,09 М, (6) – 0,11 М. Фотовозбуждение (а) 350 нм, (б) 280 нм [Alieva et al., 2014].

Продолжение Приложения Б

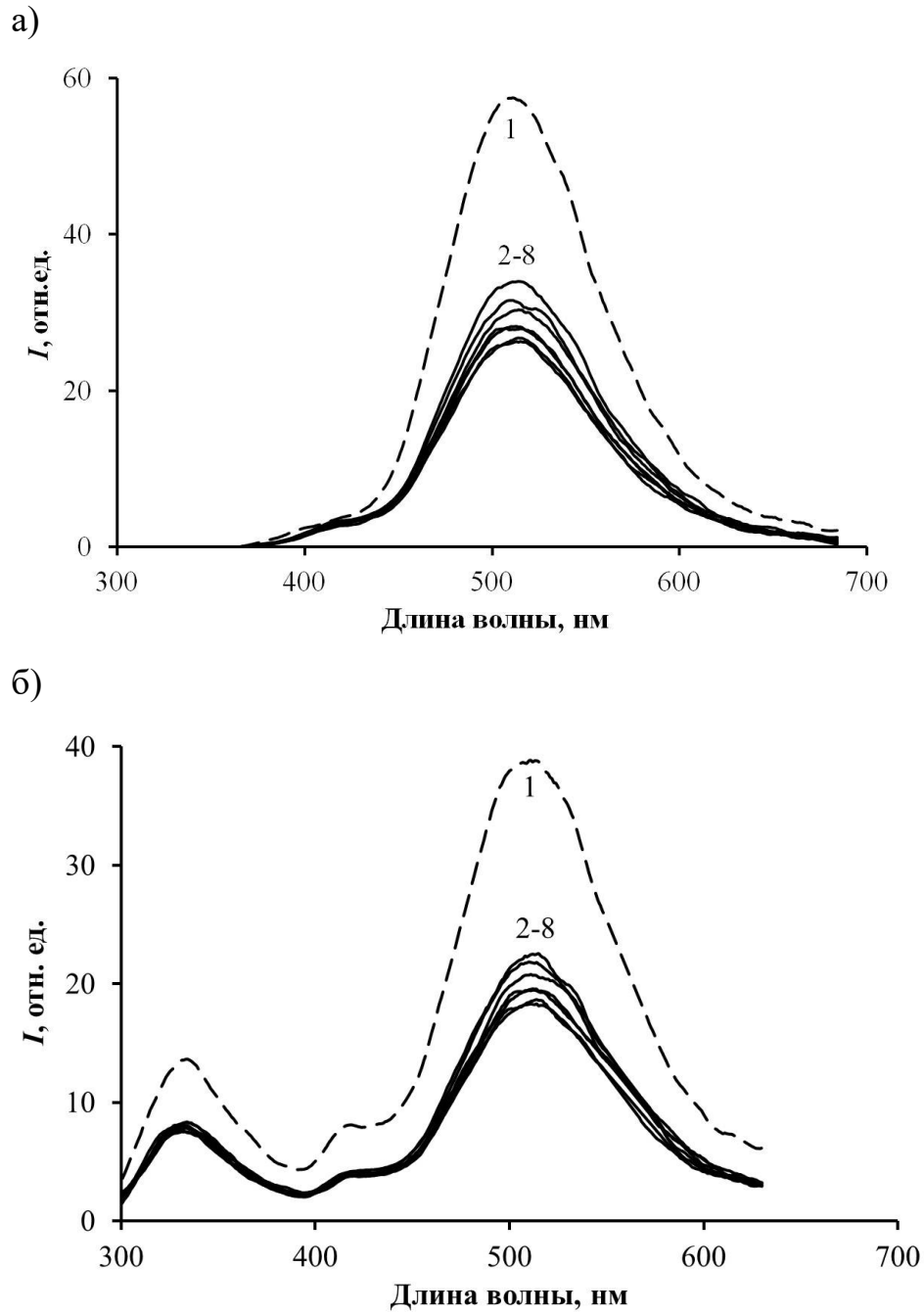
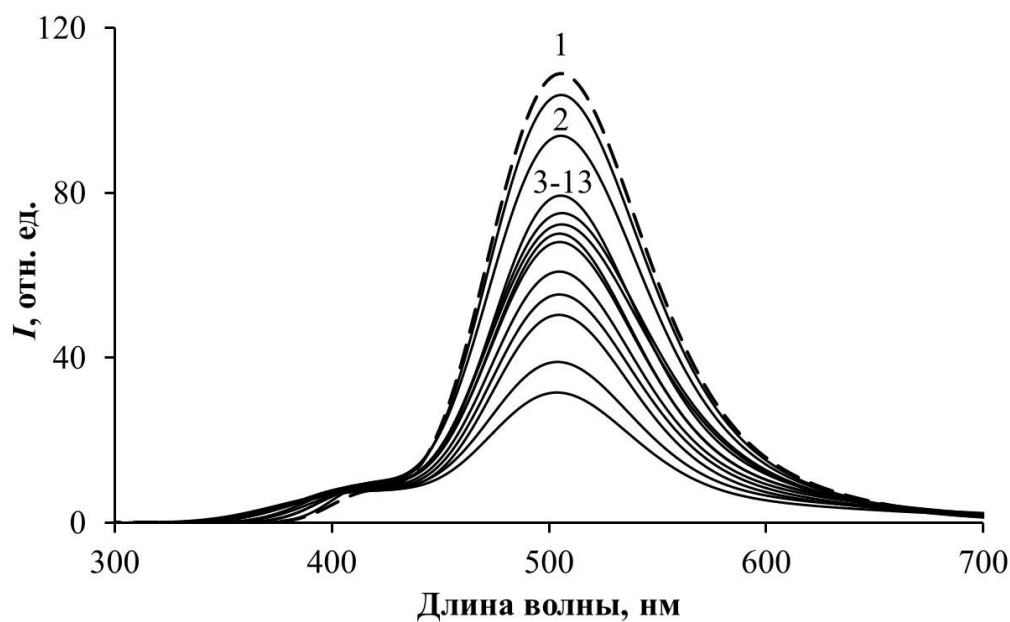


Рисунок Б.2. Спектры флуоресценции разряженного обелина при различных концентрациях этиленгликоля: (1) – 0, (2) – 0,09 М, (3) – 0,18 М, (4) – 0,27 М, (5) – 0,44 М, (6) – 0,59, (7) – 0,67 М, (8) – 0,74 М. Фотовозбуждение (а) 350 нм и (б) 280 нм.

Продолжение Приложения Б

а)



б)

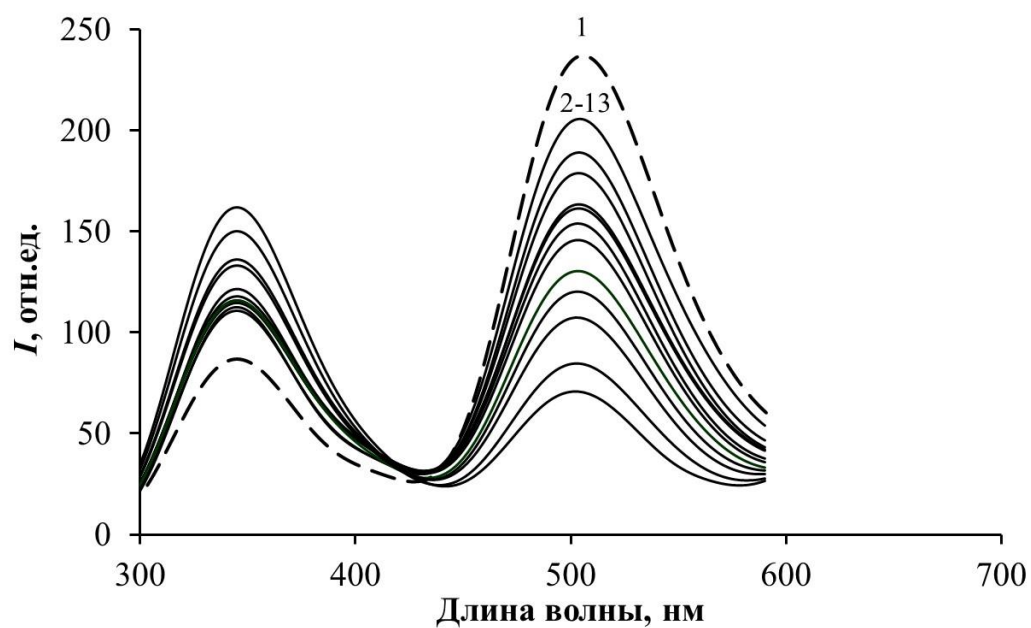


Рисунок Б.3. Спектры флуоресценции разряженного обелина при различных концентрациях ДМСО: (1) – 0, (2) – 0,02 М, (3) – 0,04 М, (4) – 0,06 М, (5) – 0,08 М, (6) – 0,1 М, (7) – 0,21 М, (8) – 0,4 М, (9) – 0,78 М, (10) – 1,12 М, (11) – 1,5 М, (12) – 2 М, (13) – 2,65 М. Фотовозбуждение (а) 350 нм и (б) 280 нм.

Приложение В

(рекомендуемое)

Влияние экзогенных веществ на интенсивность флуоресценции разряженного обелина, полученного из лиофилизированного препарата

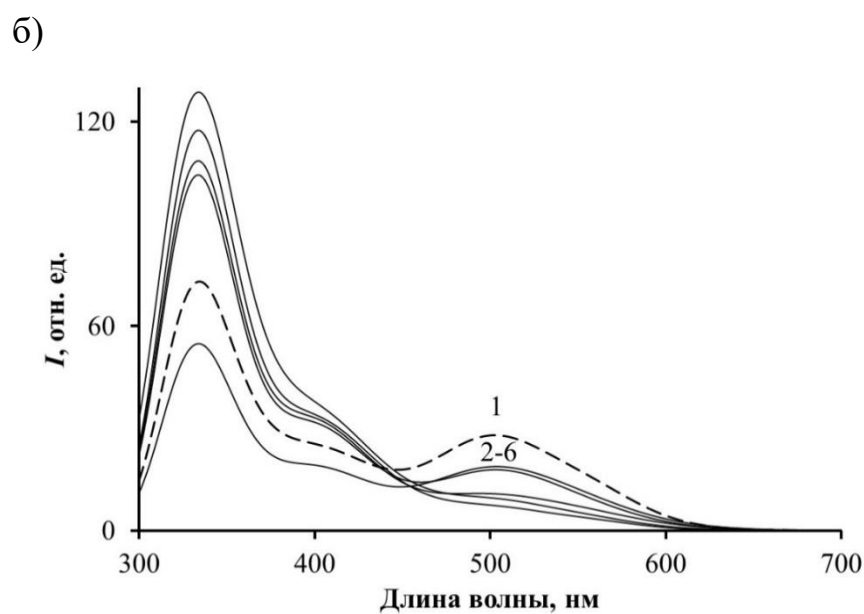
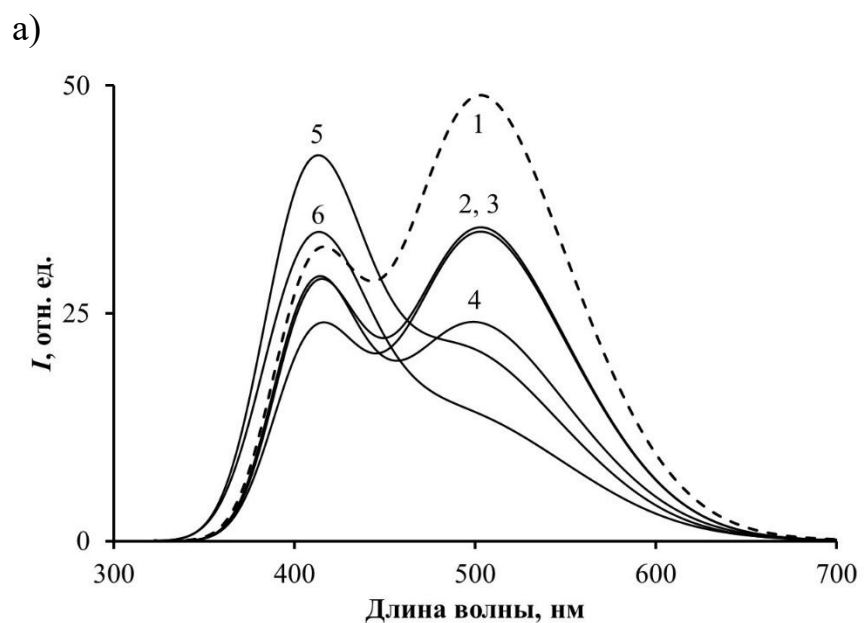
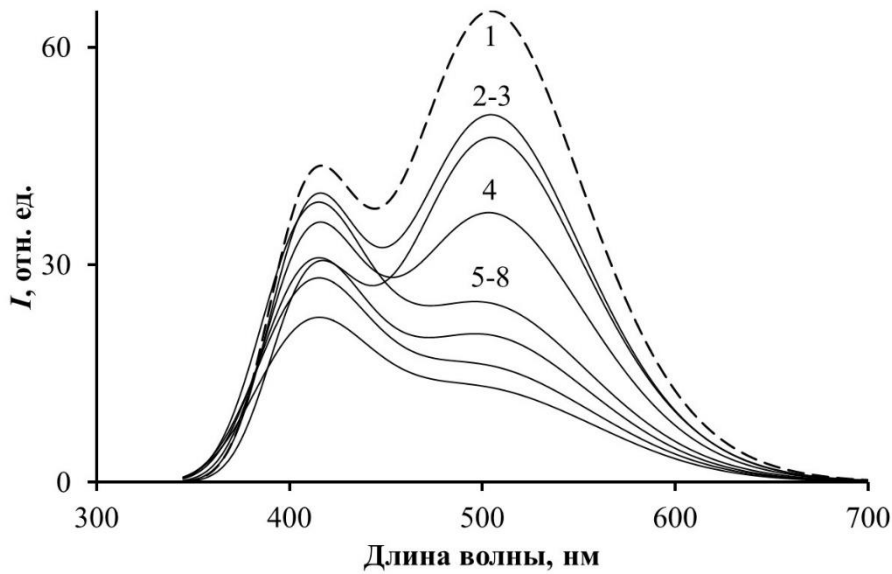


Рисунок В.1. Спектры флуоресценции разряженного обелина, полученного из лиофилизированного препарата, при различных концентрациях этанола: (1) – 0, (2) – 0,02 М, (3) – 0,04 М, (4) – 0,06 М, (5) – 0,09 М, (6) – 0,11 М.

Фотовозбуждение (а) 350 нм и (б) 280 нм.

Продолжение Приложения В

а)



б)

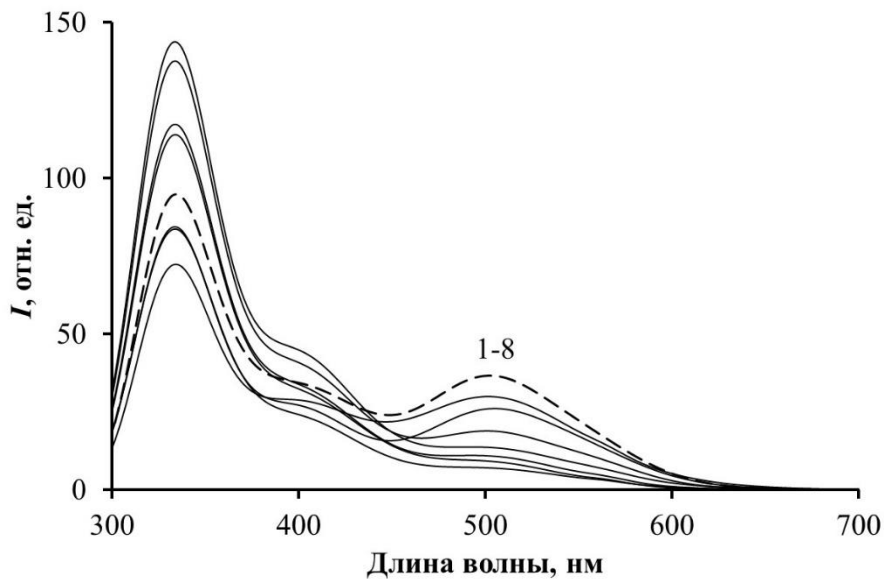


Рисунок В.2. Спектры флуоресценции разряженного обелина, полученного из лиофилизированного препарата, при различных концентрациях этиленгликоля: (1) – 0, (2) – 0,02 М, (3) – 0,04 М, (4) – 0,06 М, (5) – 0,08 М, (6) – 0,9 М, (7) – 0,11 М, (8) – 0,13 М. Фотовозбуждение (а) 350 нм, (б) 280 нм.

Продолжение Приложения В

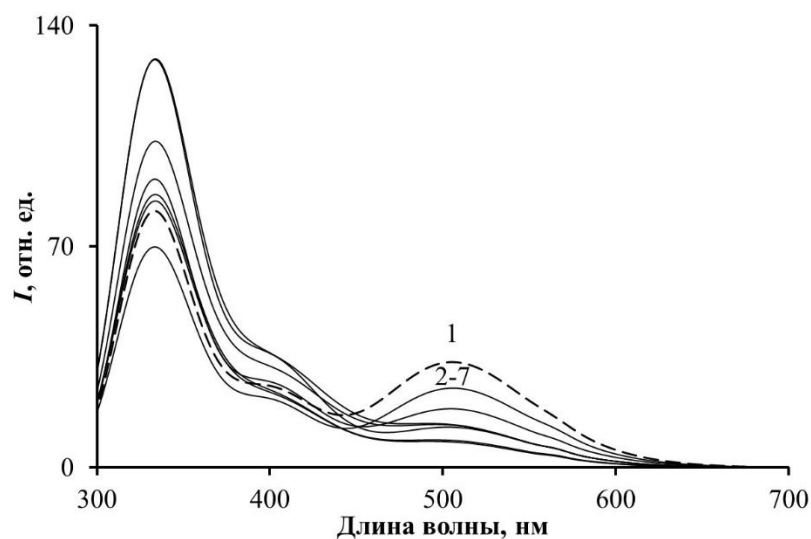


Рисунок В.3. Спектры флуоресценции разряженного обелина, полученного из лиофилизированного препарата, при различных концентрациях глицерина: (1) – 0, (2) – 0,02 М, (3) – 0,03 М, (4) – 0,04 М, (5) – 0,06 М, (6) – 0,7 М, (7) – 0,10 М, (8) – 0,11 М. Фотовозбуждение 280 нм.

Таблица В.1. Коэффициенты тушения K экзогенными соединениями флуоресценции разряженного обелина, полученного из лиофилизированного препарата. Достоверность аппроксимации $R^2 = 0,95-0,99$.

Экзогенные соединения	Диапазон концентраций, М	K, M^{-1}						
		$\lambda_{\text{возб}} = 280 \text{ нм}$				$\lambda_{\text{возб}} = 350 \text{ нм}$		
		Спектральные компоненты						
		I	II	III	IV	II	III	IV
этанол	0,02-0,07	-19,4	-16,3			-4,3		
	0,04-0,12	7,6	8,0	10,8	12,3	7,2	11,5	12,6
этиленгликоль	0,04-0,08	-17,0	-13,7			-6,6		
	0,02-0,13	9,7	11,3	14,2	16,4	9,2	13,7	12,7
глицерин	0,02-0,04	-21,3	-17,3			-10,1		
	0,02-0,11	12,0	11,8	11,1	12,0	7,6	11,6	10,8

Приложение Г

(рекомендуемое)

Влияние экзогенных веществ на спектральный состав флуоресценции разряженного обелина

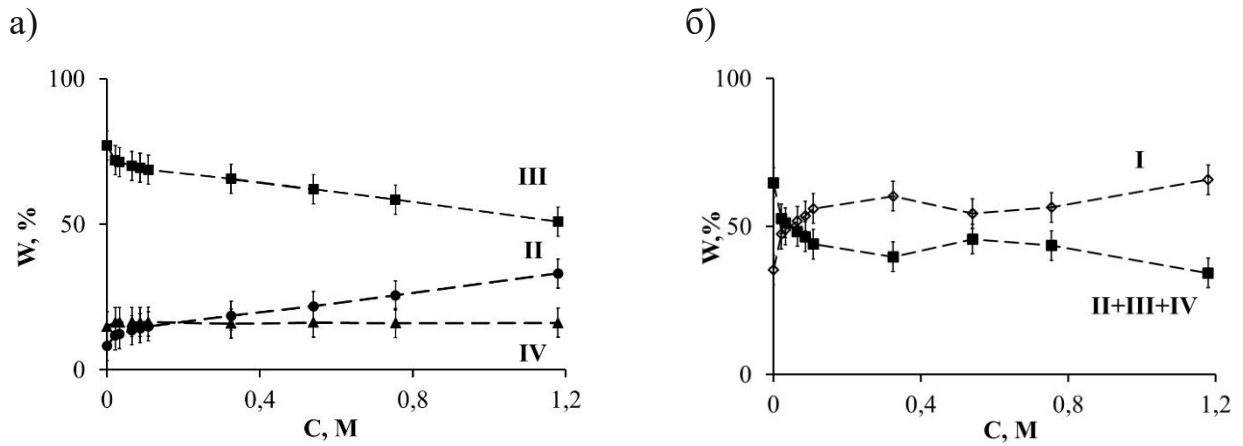


Рисунок Г.1. Вклады, W , компонент I-IV в спектрах испускания разряженного обелина при различных концентрациях (C , M) этанола при фотовозбуждении 350 нм (а) [Alieva et al., 2014] и 280 нм (б).

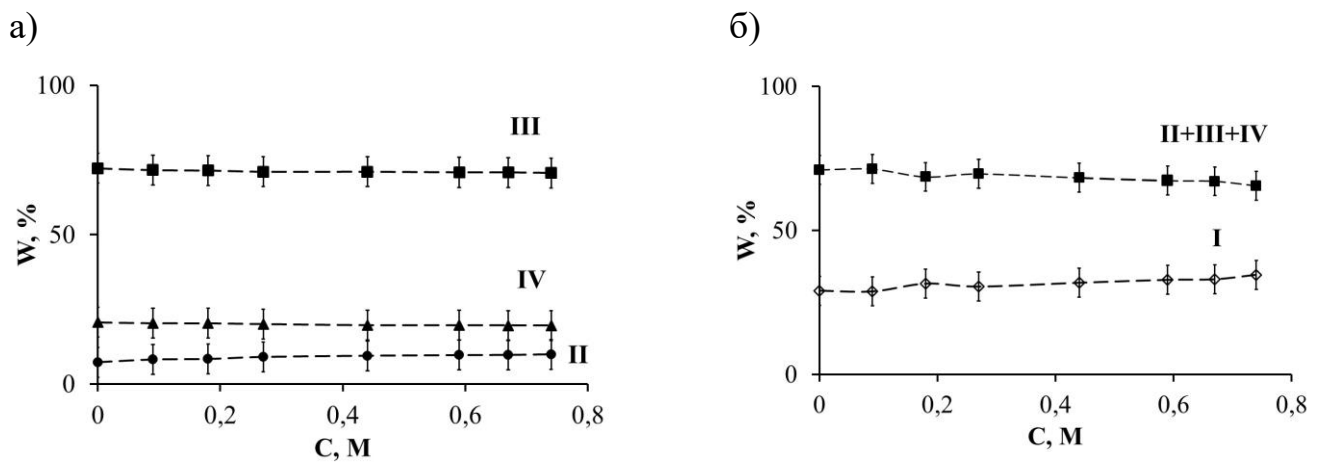


Рисунок Г.2. Вклады, W , компонент I-IV в спектрах испускания разряженного обелина в присутствии этиленгликоля при фотовозбуждении 350 нм (а) и 280 нм (б).

Продолжение Приложение Г

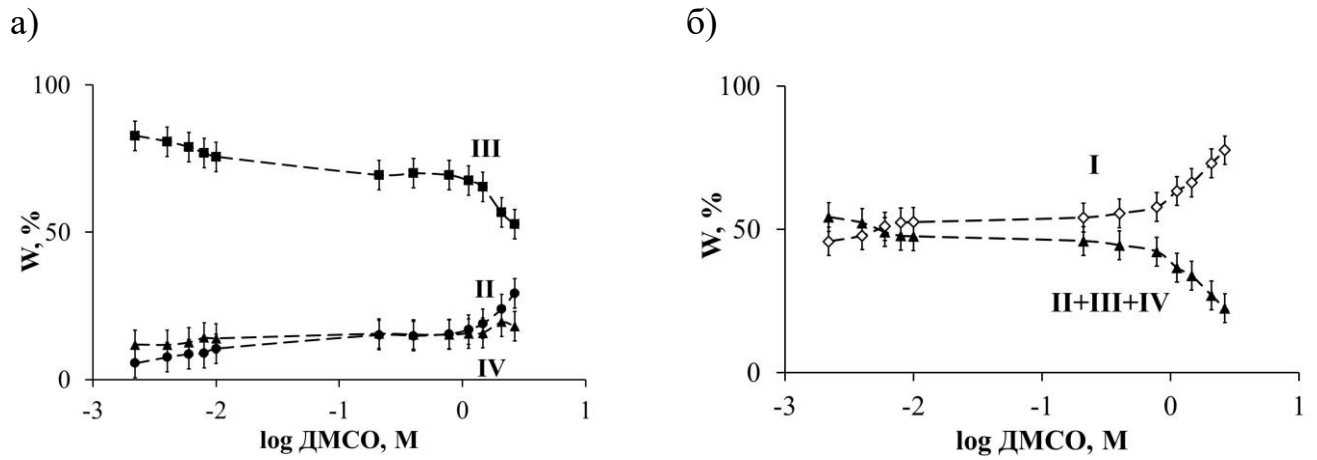


Рисунок Г.3. Вклады, W , компонент I-IV в спектрах испускания разряженного обелина при различных концентрациях (С, М) ДМСО при фотовозбуждении 350 нм (а) и 280 нм (б) [Петрова и др., 2016].

Приложение Д

(рекомендуемое)

Влияние экзогенных веществ на спектральный состав флуоресценции
разряженного обелина, полученного из лиофилизированного препарата

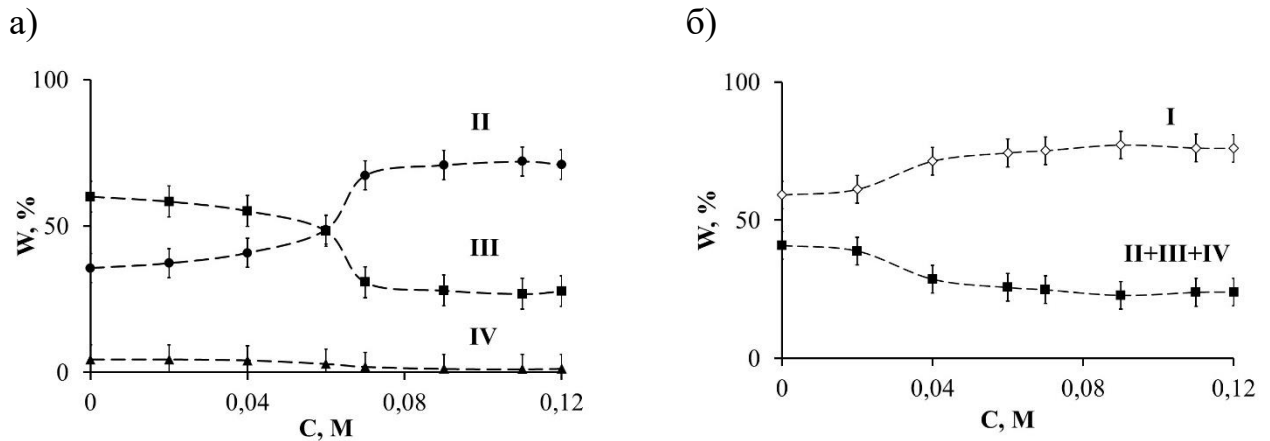


Рисунок Д.1. Вклады, W , компонент I-IV в спектрах испускания разряженного обелина, полученного из лиофилизированного препарата, при различных концентрациях (C, M) этанола. Фотовозбуждение –350 нм (а) и 280 нм (б).

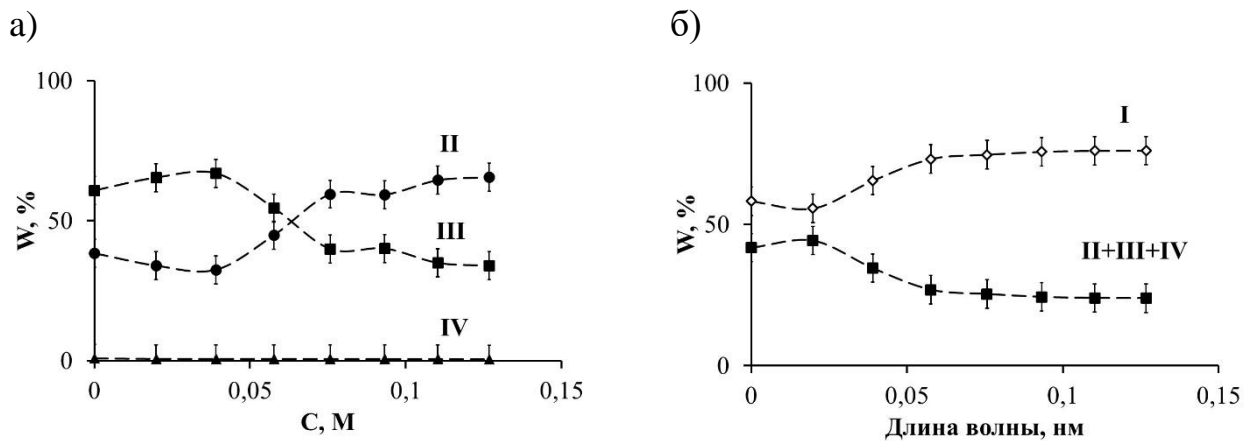


Рисунок Д.2. Вклады, W , компонент I-IV в спектрах испускания разряженного обелина, полученного из лиофилизированного препарата, при различных концентрациях (C, M) этиленгликоля при фотовозбуждении 350 нм (а) и 280 нм (б).

Приложение Е

(рекомендуемое)

Температурное воздействие на флуоресценцию обелина, разряженного в присутствии ионов кальция, при различных энергиях фотовозбуждения

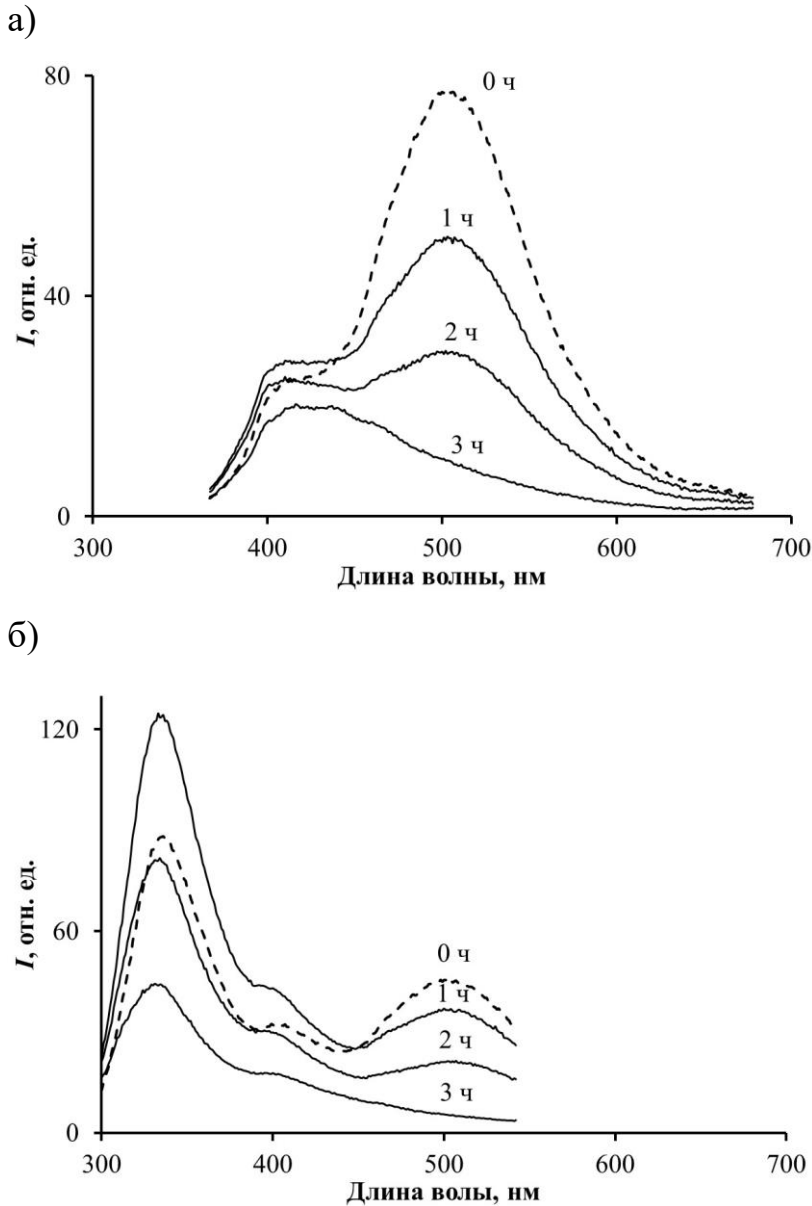


Рисунок Е.1. Спектры флуоресценции обелина, разряженного в присутствии Ca^{2+} , при различных временах температурного воздействия ($40\text{ }^\circ\text{C}$), $C(\text{обелин}) = 2 \cdot 10^{-5}$ М, $C(\text{CaCl}_2) = 4,76 \cdot 10^{-3}$ М. Фотовозбуждение 350 нм (а) и 280 нм (б).