

ОПТИКА И СПЕКТРОСКОПИЯ

УДК 535.371.372

ВЛИЯНИЕ МИКРООКРУЖЕНИЯ НА СПЕКТРАЛЬНО-КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛЮЦИФЕРИНА СВЕТЛЯКОВ

Л. Ю. Бровко, Е. Ю. Чередникова, А. Ю. Чикишев, Е. А. Чудинова

(кафедра химической энзимологии; кафедра общей физики и волновых процессов)

Проведено изучение флуоресцентных свойств люциферина — субстрата и аналога излучателя в биолюминесцентной системе светляков в зависимости от его микроокружения и структуры. Для фенолятной формы люциферина — аналога флуорофора — получена линейная зависимость между положением максимума спектра флуоресценции и ориентационной поляризуемостью растворителя. Показано, что микроокружение субстрата биолюминесцентной реакции является негидрофобным.

Введение

Белок-фермент люцифераза светляков катализирует окисление люциферина в биолюминесцентной реакции в присутствии аденозинтрифосфорной кислоты и ионов двухвалентного магния [1]. Продукт реакции — оксилуциферин — образуется в синглетно-возбужденном электронном состоянии [2], и его дезактивация сопровождается испусканием кванта света с длиной волны 540–590 нм в зависимости от вида светляков.

На первой стадии биолюминесцентной реакции люцифераза связывает люциферин с образованием фермент-субстратного комплекса. Механизм взаимодействия люциферина с ферментом в основном изучался с использованием различных аналогов субстрата, таких как дегидролюциферин, гидроксилуциферин и др. [3]. Участок связывания люциферина по этим данным является достаточно гидрофобным. Это подтверждается тем, что многие гидрофобные соединения ингибируют люциферазу конкурентно по отношению к люциферину [4].

О гидрофобности люциферин-связывающего участка люциферазы свидетельствуют также факты возникновения синей флуоресценции дегидролюциферина, характерной для неполярных сред, при связывании его с ферментом [5]. Одновременно наблюдается увеличение времени затухания синей флуоресценции по отношению к желто-зеленой, что обусловлено замедлением скорости переноса протона и образованием ионизированного возбужденного состояния [6]. Подобные явления наблюдаются при переводе флуорофора в более гидрофобную среду.

С другой стороны, изучение спектров биолюминесценции и сравнение их со спектрами флуоресценции оксилуциферина показало, что за биолюминесценцию ответственна фенолят-анионная форма оксилуциферина (рис. 1). Это говорит о том, что в участке связывания люциферина имеется акцепторная группа, способствующая отщеплению протона. Кроме того, измерения стационарных спектров флуоресценции оксилуциферина в водных и водно-спир-

товых растворах для различных pH среды показали, что водный раствор оксилуциферина является наиболее адекватной моделью биолюминесценции [7]. Сходные флуоресцентные свойства микроокружения оксилуциферина в биолюминесцентной реакции и в водных растворах позволяют предположить, что оксилуциферин не находится в гидрофобном кармане белковой глобулы, как можно было бы предположить исходя из гидрофобности люциферин-связывающего участка люциферазы. Измерение кинетик затухания анизотропии флуоресценции комплекса мет-оксилуциферин-люцифераза показало, что флуорофор после возбуждения свободно вращается.

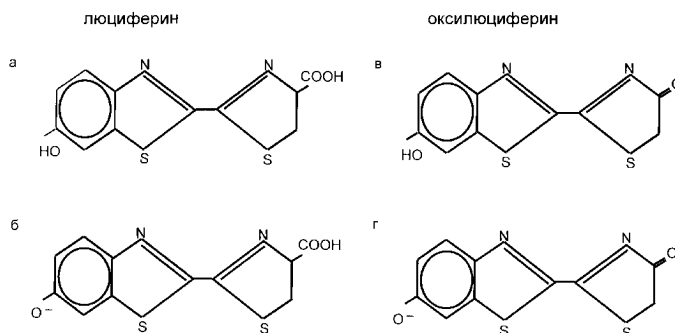


Рис. 1. Структурные формулы люциферина (а — фенолятная, б — фенолят-анионная форма) и оксилуциферина (а — кетонная; б — енольная форма)

Предложено следующее объяснение этих фактов [8]. В процессе образования электронно-возбужденного продукта происходит немедленная диссоциация комплекса. Возбужденный оксилуциферин оказывается в «водном» микроокружении, дезактивируется с излучением кванта света и вновь связывается с ферментом в прочный комплекс «фермент-продукт». Участок связывания продукта неидентичен участку связывания исходного субстрата.

Цвет биолюминесценции для разных видов светляков может изменяться от зеленого до оранжевого (540–590 нм). Различия в цвете биолюминесценции

можно, по-видимому, объяснить отличиями в структуре фермента, поскольку структура излучателя одинакова у всех видов светляков [9]. Это явление до сих пор изучено недостаточно, однако существуют три точки зрения на эту проблему.

1. В работе [10] был проведен статистический анализ зависимости спектра биолюминесценции от изменений в аминокислотных последовательностях люциферазы светляков. Установлено, что изменения положения максимума спектра флуоресценции ν_{\max} в подавляющем большинстве случаев связаны с заменой любой из пар аминокислотных остатков, объединяющих позицию 223 или 238 с одной из позиций 247, 352 или 358. При проведении линейного регрессионного анализа зависимости ν_{\max} от суммарных физико-химических характеристик аминокислотных участков была обнаружена линейная зависимость между ν_{\max} спектра биолюминесценции и суммарной величиной параметра поляризуемости аминокислотных остатков в участках 223, 247 (основной вклад) и в участках 351, 352. Было сделано предположение, что эти участки находятся в пространственной близости от флуорофора и являются ответственными за изменения цвета биолюминесценции. Влияние структуры фермента на спектр биолюминесценции носит общий характер, поскольку при рассмотрении третичной структуры фермента мутация в данной точке приводит лишь к изменению положения максимума люминесценции, но не к изменению формы спектра.

2. Второй механизм базируется на геометрическом строении оксильюциферина, находящегося в возбужденном состоянии, при этом учитывается вращение бензотиазолильного и тиазолильного колец вокруг C—C-связи. Если угол равен 90° , то энергия электронного перехода минимальна и цвет люминесценции такой структуры красный. При образовании фермент-субстратного комплекса угол становится меньше 90° , что приводит к увеличению энергии электронного перехода и сдвигу максимума люминесценции в коротковолновую часть спектра [11].

3. В третьей гипотезе принимается во внимание существование в растворе двух форм оксильюциферина: кетонной и енольной, которым соответствует красная и желто-зеленая флуоресценция (рис. 1). Присутствие той или иной формы оксильюциферина в растворе зависит от полярности среды [7]. Суперпозиция двух спектров и определяет изменение цвета биолюминесценции.

В настоящей работе проведено изучение влияния параметров микроокружения на флуоресцентные свойства люциферина светляков методами флуоресцентной спектроскопии — стационарной и с временным разрешением с целью моделирования свойств микроокружения излучателя в биолюминесцентной реакции.

Для описания влияния физических свойств растворителей на спектры используется модель [12], согласно которой значение волнового числа, соответствующее

максимуму спектра флуоресценции, линейно зависит от ориентационной поляризуемости растворителя Δf , связанной с диэлектрической проницаемостью ε и показателем преломления n :

$$\Delta f = \frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1},$$

$$\nu_f = -C_1 \Delta f + C_2.$$

Согласно уравнению Липперта [13] разность между максимумами спектра поглощения и спектра флуоресценции пропорциональна ориентационной поляризуемости среды Δf :

$$\nu_a - \nu_f \approx \frac{2}{hc} \frac{\Delta f (\mu^* - \mu)^2}{a^3} + C,$$

где h — постоянная Планка, c — скорость света, a — радиус полости, внутри которой находится флуорофор, μ^* и μ — дипольные моменты флуорофора в возбужденном и основном состоянии соответственно, ν_a и ν_f — волновые числа, соответствующие максимумам поглощения и испускания.

Материалы и методы

1. Реактивы. В работе использовали люциферин светляков, синтезированный по методу Талеборовской [14]. Растворы готовили по навеске, концентрация составляла 10^{-5} М. Высокоочищенную люциферазу светляков *L. mingrelica* выделяли по методу [15]. И использованные растворители (этанол, диметилформамид (ДМФА), дихлорметан, ацетон, ацетонитрил, хлороформ) были очищены перегонкой непосредственно перед использованием.

Комплекс люциферин–люцифераза получали путем удаления избытка люциферина из препарата фермента методом гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-25 (молекулярное сито). Полученные фракции концентрировали методом ультрафильтрации на установке 8010 фирмы Amicon (США), снабженной мембраной DIAFLO UM10. Относительная концентрация связанного люциферина, рассчитанная из константы диссоциации комплекса, составляла 70%.

Для получения фенолятной формы люциферина в растворитель добавляли триэтиламин (ТЭА) в концентрации 3% (по объему).

2. Измерение стационарных спектров поглощения и флуоресценции. Стационарные спектры флуоресценции люциферина в модельных растворителях были измерены на флуориметре Perkin Elmer LS 50B. Спектральное разрешение составляло 2,5 нм. Все спектры были скорректированы с учетом фоновой флуоресценции и спектральной чувствительности детектора. Спектры поглощения были получены на оптоволоконном спектрометре PC1000 (Ocean Optics Inc.).

3. Флуоресцентная спектроскопия с временным разрешением. Для измерения кинетик затухания флуоресценции использовался метод счета фотонов с временным разрешением. Используемая экспериментальная установка подробно описана в работе [16]. Флуоресценция люциферина возбуждалась третьей гармоникой основного излучения YAG:Nd³⁺-лазера, работающего в режиме модуляции добротности и синхронизации мод.

Для определения времени затухания флуоресценции функция отклика представлялась в виде суммы экспонент. Ограничивая сверху диапазон возможных времен затухания и разбивая его на несколько интервалов, после процедуры обратной свертки мы получали амплитуды экспонент для каждого из интервалов [17]. Значения характерных времен затухания флуоресценции и амплитудный вклад соответствующих компонент определялись из минимального значения среднеквадратичного отклонения расчетной кривой от экспериментальной. Ошибка при определении времен затухания флуоресценции не превышала 1,5%.

Экспериментальные результаты и их обсуждение

Измеренные в данной работе характерные времена затухания флуоресценции люциферина в модельных растворителях приведены в табл. 1.

Таблица 1
Времена затухания флуоресценции люциферина в модельных средах

Растворитель	τ_1 , нс	τ_2 , нс	a_2/a_1	$\langle \tau \rangle$, нс
Вода	4,2	—	—	4,2
Дихлорметан	1,14	2,41	0,28	1,62
Ацетонитрил	2,28	—	—	2,28
ДМФА	1,69	2,47	4,57	2,38
Этанол	0,27	1,35	2,87	1,44
Дихлорметан + 3% ТЭА	2,95	—	—	2,95
Ацетонитрил + 3% ТЭА	3,35	—	—	3,35
ДМФА + 3% ТЭА	0,31	0,99	2,35	0,90
Этанол + 3% ТЭА	4,36	—	—	4,36
ТЭА	1,39	2,76	0,16	1,72
Люцифераза <i>L. mingrelica</i>	3,59	—	—	3,59

Измерялось также время затухания для комплекса люциферин-люцифераза. Однако в этом случае в растворе присутствовал свободный люциферин (~ 30%), поэтому нами производилась коррекция кинетики затухания: из кинетики затухания для раствора с 70% связыванием люциферина в комплексе вычиталась кинетика затухания люциферина в воде. При этом

кинетика затухания люциферина в воде нормировалась таким образом, чтобы интегральная интенсивность составляла 30% ее значения в исходном растворе, поскольку известно, что квантовый выход флуоресценции люциферина в воде и в комплексе с люциферазой одинаков [18].

Время затухания флуоресценции люциферина в комплексе с люциферазой находится в промежутке между временами затухания флуоресценции люциферина в воде и ацетонитриле. Можно сделать вывод, что микроокружение субстрата в биолуминесцентной реакции является не столь гидрофобным, как считалось ранее.

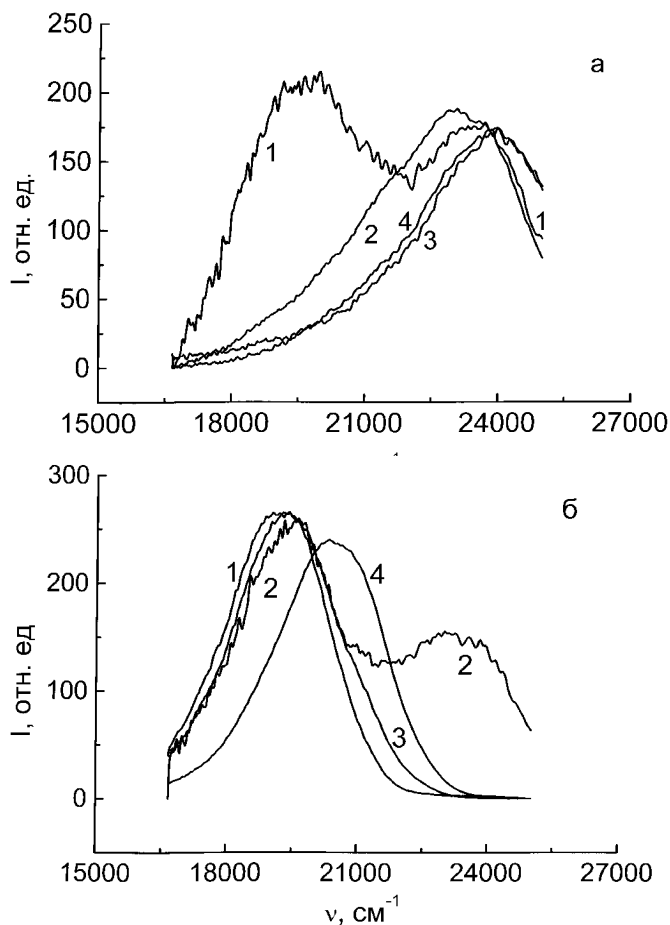


Рис. 2. Спектры флуоресценции люциферина в модельных растворах (а — фенольная; б — фенолят-анионная форма): 1 — этанол; 2 — ДМФА, 3 — ацетонитрил, 4 — дихлорметан

В работе были исследованы параметры флуоресценции люциферина (времена затухания флуоресценции и положение максимума спектра) в зависимости от ориентационной поляризуемости среды Δf . Спектры флуоресценции люциферина в модельных растворителях представлены на рис. 2.

В табл. 2 приведены значения максимума спектра флуоресценции люциферина для разных сред. Установлено, что для растворов люциферина в форме фенола (рис. 1) не наблюдается корреляции между по-

положением максимума спектра флуоресценции и ориентационной поляризуемостью. При добавлении в растворитель триэтиламина (люциферин переходит в форму фенолят-аниона (рис. 1)) связь между Δf и ν_f можно аппроксимировать линейной зависимостью (рис. 3). Это связано с тем, что фенолятная форма люциферина является полярной молекулой, которая подвержена влиянию растворителя сильнее, чем нейтральная молекула.

Т а б л и ц а 2
Максимум спектра флуоресценции люциферина
в модельных растворителях с добавлением ТЭА

Растворитель	ϵ	Δf	ν_{\max} , см^{-1}
Хлороформ	4,72	0,254	20704
Дихлорметан	9,08	0,310	20466
Ацетон	20,9	0,375	19841
ДМФА	36,71	0,377	19342
Этанол	25	0,379	19380
Ацетонитрил	35,94	0,396	19377
Вода	78,25	0,405	18832

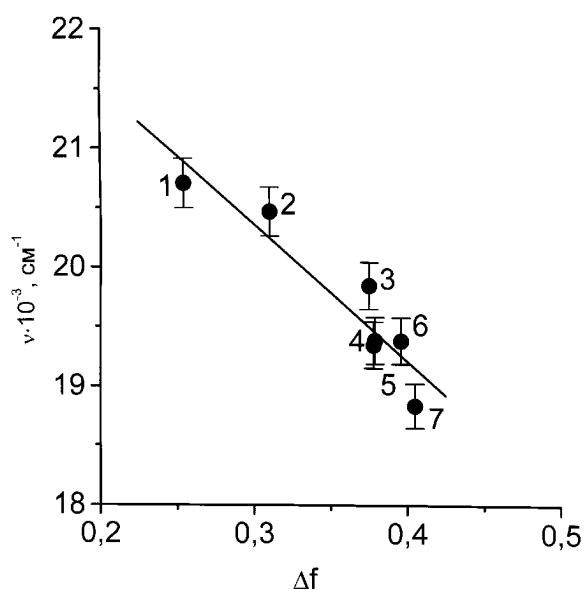


Рис. 3. Зависимость положения максимума спектра флуоресценции люциферина от ориентационной поляризуемости растворителя: 1 — хлороформ, 2 — дихлорметан, 3 — ацетон, 4 — ДМФА, 5 — этанол, 6 — ацетонитрил, 7 — вода

Спектры поглощения люциферина во всех растворителях практически совпадают, а максимум находится на длине волны 330 ± 2 нм ($\nu_a = 30303 \text{ см}^{-1}$). Поскольку ν_f уменьшается с увеличением ориентационной поляризуемости, то разность $\nu_a - \nu_f$ при этом возрастает, что соответствует уравнению Липперта.

Принимая радиус ячейки растворителя равным $a = 4 \text{ \AA}$ [13] и используя значение тангенса угла наклона прямой на рис. 3, можно оценить величину разности дипольных моментов молекулы люциферина в возбужденном и основном состояниях: $\mu^* - \mu \approx 9 \text{ Д}$ ($1,26 \cdot 10^{-29} \text{ Кл}\cdot\text{м}$).

Заключение

В работе проведены измерения параметров флуоресценции субстрата биолюминесцентной реакции в модельных растворителях и в комплексе с люциферазой *L. mingrelica*. По этим данным установлено, что участок связывания люциферина с белком является не столь гидрофобным, как предполагалось ранее.

Для фенолятной формы люциферина получена линейная зависимость между положением максимума спектра флуоресценции и ориентационной поляризуемостью растворителя. Оценена разность между дипольными моментами люциферина в возбужденном и основном состояниях: $\mu^* - \mu \approx 9 \text{ Д}$.

Литература

1. McElroy W.D., DeLuca M. // Chemiluminescence and Bioluminescence. N.Y., 1974. P. 285.
2. Suzuki N., Goto T. // Tetrahedron Lett. 1971. **22**. P. 2021.
3. Gates B.J., DeLuca M. // Arch. Biochem. Biophys. 1975. **169**. P. 616.
4. Denburg J., McElroy W.D. // Ibid. 1970. **141**. P. 668.
5. Lee R.T., Denburg J.L., McElroy W.D. // Ibid. 1970. **141**. P. 38.
6. DeLuca M., Brand L., Cebula T. et al. // J. Biol. Chem. 1971. **246**. P. 6702.
7. Gandelman O.A., Brovko L.Yu., Ugarova N.N. et al. // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 1993. **19**. P. 187.
8. Gandelman O.A., Brovko L.Yu., Chikishev A.Yu. et al. // Ibid. 1984. **22**. P. 203.
9. Ohmiya Y., Hirano T., Ohashi M. // FEBS Lett. 1996. **384**. P. 83.
10. Морозов В.М., Иванищенко В.А., Ерошкин А.М., Угарова Н.Н. // Молекулярная биология. 1996. **30**. С. 1167.
11. McCapra F., Gilfoyle D., Young D.Y. et al. // Bioluminescence and Chemiluminescence: Fundamental and Applied Aspects. N.Y., 1994. P. 387.
12. Scherer T., Hielkema W., Krijnen B. et al. // Recl. Trav. Chim. 1993. **112**. P. 535.
13. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. М., 1986.
14. Талёборовская И.К., Каткова В.А., Рыжова В.В. и др. Синтез D-люциферина. А. с. 1192324 СССР, МКИ С07Д 417/04. 1983.
15. Дементьева Е.И., Кутузова Г.Д., Угарова Н.Н. // Вестн. Моск. ун-та. Химия. 1989. **30**, № 6. С. 601.
16. Камалов В.Ф., Разживин А.П., Толеутаев Б.Н. и др. // Квант. электроника. 1987. **14**. С. 1303.
17. Gakamsky D.M., Goldin A.A., Petrov E.E., Rubinov A.N. // Proc. SPIE. 1990. **1403**. P. 641.
18. Дементьева Е.И., Бровко Л.Ю., Дружинина Е.А. и др. // Биохимия. 1986. **51**. С. 130.

Поступила в редакцию
30.06.97