

УДК 577.332

**КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ  
ОБРАЗОВАНИЯ 2-ГИДРОПЕРОКСИ-ЦЕЛЕНТЕРАЗИНА  
В  $\text{Ca}^{2+}$ -РЕГУЛИРУЕМОМ ФОТОПРОТЕИНЕ ОБЕЛИНЕ**© 2011 Л.Ю. Антипина<sup>1,3\*</sup>, Ф.Н. Томилин<sup>1</sup>, Е.С. Высоцкий<sup>2</sup>, С.Г. Овчинников<sup>1,3</sup><sup>1</sup>Учреждение Российской академии наук Институт физики им. Л.В. Киренского СО РАН, Красноярск<sup>2</sup>Учреждение Российской академии наук Институт биофизики СО РАН, Красноярск<sup>3</sup>Сибирский аэрокосмический университет, Красноярск

Статья поступила 26 января 2010 г.

С доработки — 8 октября 2010 г.

$\text{Ca}^{2+}$ -регулируемый фотопротеин обелин определяет свечение морского гидроида *Obelia longissima*. Биоломинесценция инициируется кальцием и возникает вследствие окислительного декарбоксилирования связанного с белком субстрата целентеразина. Люцифераза светящегося морского коралла *Renilla muelleri* (RM) также использует целентеразин в качестве субстрата. Однако в биоломинесценцию этих животных *in vivo* вовлечено три белка: люцифераза, зеленый флуоресцентный белок и  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемый целентеразин-связывающий белок (coelenterazine-binding protein (CBP)). Фактически, "субстратом" люциферазы RM в биоломинесцентной реакции *in vivo* является CBP, содержащий одну молекулу прочно связанного целентеразина. Целентеразин становится доступным для реакции с люциферазой и кислорода только после связывания с CBP ионов кальция. В отличие от  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых фотопротеинов в молекуле CBP не происходит активации кислородом молекулы целентеразина. В работе с помощью квантово-химических методов исследовано поведение субстратов в данных белках. Показано, что целентеразин может образовывать различные таутомерные формы — CLZ(2H) и CLZ(7H). Исследован механизм образования 2-гидроперокси-целентеразина. Согласно полученным данным эти белки используют для реакции различные формы субстратов: в обелине субстрат находится в форме CLZ(2H), из которой и происходит образование гидроперокси. В RM целентеразин находится в форме CLZ(7H), и поэтому активации кислородом в CBP не происходит.

**Ключевые слова:** целентеразин, 2-гидроперокси-целентеразин, *Obelia longissima*, *Renilla muelleri*.

**ВВЕДЕНИЕ**

Биоломинесценция — результат биохимической реакции, в которой химическая энергия превращается в световую. В ходе реакции субстрат окисляется под действием фермента. Все хемилюминесцентные реакции требуют молекулярного кислорода и протекают с образованием промежуточных комплексов — органических пероксидных соединений. При распаде этих комплексов высвобождается энергия, возбуждающая молекулы вещества, ответственного за световое излучение.

Одной из наиболее изученных биоломинесцентных систем являются фотопротеины, ответственные за свечение морских животных. К их числу относятся  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемый фотопротеин обелин, выделенный из гидрополипа *Obelia longissima* (OL) и  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемый целентеразин-связывающий белок (coelenterazine-binding protein (CBP)), выделенный из светяще-

---

\* E-mail: antipinalyu@gmail.com

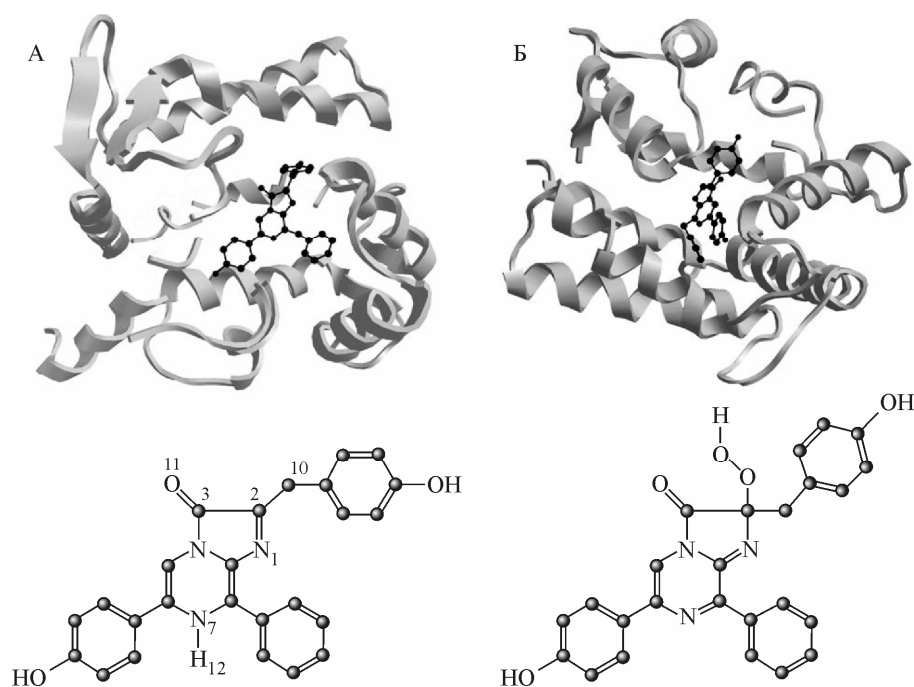


Рис. 1. Структура белков и их субстратов.

А — белок, выделенный из *Renilla muelleri* и его субстрат, целентеразин; Б — белок, выделенный из *Obelia longissima* и его субстрат, 2-гидроперокси-целентеразин

гося морского коралла *Renilla muelleri* (RM) [ 1, 2 ]. В отличие от  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых фотопротеинов в молекуле СВР не происходит активации кислородом молекулы целентеразина. Из рентгеноструктурного анализа видно, что структуры субстратов и окружения OL и RM заметно отличаются (рис. 1) [ 3—5 ].

До сих пор остается невыясненным вопрос, почему в OL происходит активация кислородом молекулы целентеразина, а в RM — нет. В данной работе проведено исследование активации целентеразина кислородом методами квантовой химии. Квантово-химические исследования хорошо зарекомендовали себя при исследовании процессов, происходящих в биологических системах [ 6—8 ]. Для анализа атомной структуры и электронных зарядов CLZ(7H) и CLZ(2H) использовали методы теории функционала плотности (Density Functional Theory, DFT) с применением гибридного функционала B3LYP [ 9—11 ] и Хартри—Фока (HF) с базисом 6-311\*\*. Расчеты проводили в программе GAMESS [ 12 ]. Для учета сил Ван-дер-Ваальса и водородных связей между молекулами при расчете механизмов реакции в присутствии молекул воды и/или аминокислот были использованы полуэмпирические методы PM3 и PM6 [ 13—16 ]. Полуэмпирические расчеты проводили в программе MOPAC2007. Переходные состояния считали методом квадратичного синхронного перехода, реализованного в программе HyperChem7. Для исследования были взяты структуры двух белков OL и RM, данные для которых получены из рентгеноструктурного анализа.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В литературе предлагается несколько механизмов образования гидроперекиси CLZ [ 17, 18 ]. Во всех случаях предполагается, что процесс идет через образование аниона (рис. 2).

При исследовании поведения целентеразина *in vitro* в щелочной среде наблюдается быстрая реакция декарбоксилирования, сопровождающаяся свечением с образованием целентерамида. Данный факт находит подтверждение в наших расчетах. Примерный механизм поведения целентеразина в щелочной среде представлен на рис. 2, Б. Расчет проводили в присутствии мо-

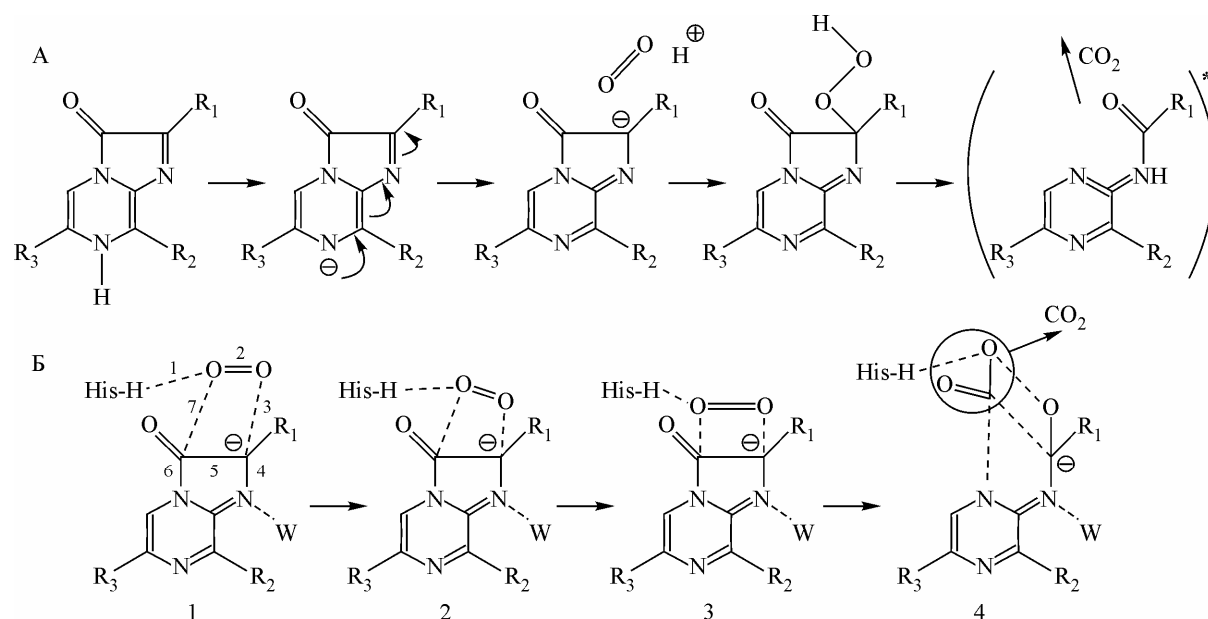


Рис. 2. Примерный механизм образования целентерамида.

А — механизм, предложенный в литературных данных [ 14, 15 ]. Б — механизм, полученный из наших расчетов

лекулы гистидина и воды полуэмпирическими методами РМ3 и РМ6. Из-за присутствия в системе молекулярного кислорода первые два шага реакции рассчитывались в триплетном состоянии, два последних — в синглетном. Изменение связей в ходе реакции от структуры 1 к структуре 4 представлены в табл. 1.

Энергетический барьер для реакции образования аниона ( $\text{CLZ}(7\text{H}) + \text{OH}^- \rightarrow \text{CLZ}(7^-) + \text{H}_2\text{O}$ ) достаточно мал (56 кДж/моль), вследствие чего реакция должна идти достаточно легко. Это согласуется с экспериментом, согласно которому в щелочной среде реакция образования целентерамида идет практически мгновенно. Исследование кинетики процессов, происходящих в белке OL, показало, что захват целентеразина в белок длится не более 3 с. Дальнейшее превращение целентеразина при участии кислорода в 2-гидроперокси-целентеразин происходит в течение 2—3 ч.

Вследствие сложности получения рентгеноструктурных данных фотопротеинов, экспериментально сложно сказать, что происходит в системе при захвате апо-белком субстрата, тем более что реакция происходит достаточно быстро. Имеются только некоторые кристаллические

Т а б л и ц а 1

Изменение длин связи при расчете механизма реакции образования целентерамида. Номера связи соответствуют рис. 2, Б

Номер связи	Длина связи, Å	
	Структура 1	Структура 4
1	1,5	1,7
2	1,2	1,6
3	1,7	1,4
4	1,4	1,5
5	1,4	1,6
6	1,4	1,7
7	2,0	1,5

структуры фотопротеинов на различных промежуточных стадиях [ 3, 4 ]. В нашем случае это OL, содержащий 2-гидроперокси-целентеразин, и RM, содержащий неактивированный целентеразин (см. рис. 1).

При оптимизации геометрии структуры целентеразина, полученной методом рентгеноструктурного анализа СВР в аминокислотном окружении обелина, происходит разрушение структуры целентеразина, так как одним из своих заместителей ( $\text{R}_3$ ) целентеразин пересекается с аминокислотами окружения (рис. 3, А). И оптимальное положение целентеразина в структуре белка найти не удастся. В связи с этим было предложено, что в OL и RM целентеразин находится в разных изомерных формах: в RM — в форме  $\text{CLZ}(7\text{H})$ , в OL — в форме  $\text{CLZ}(2\text{H})$  (см. рис. 3, Б). Вероятно, это происходит из-за разной геометрии полости, где находится целентеразин.

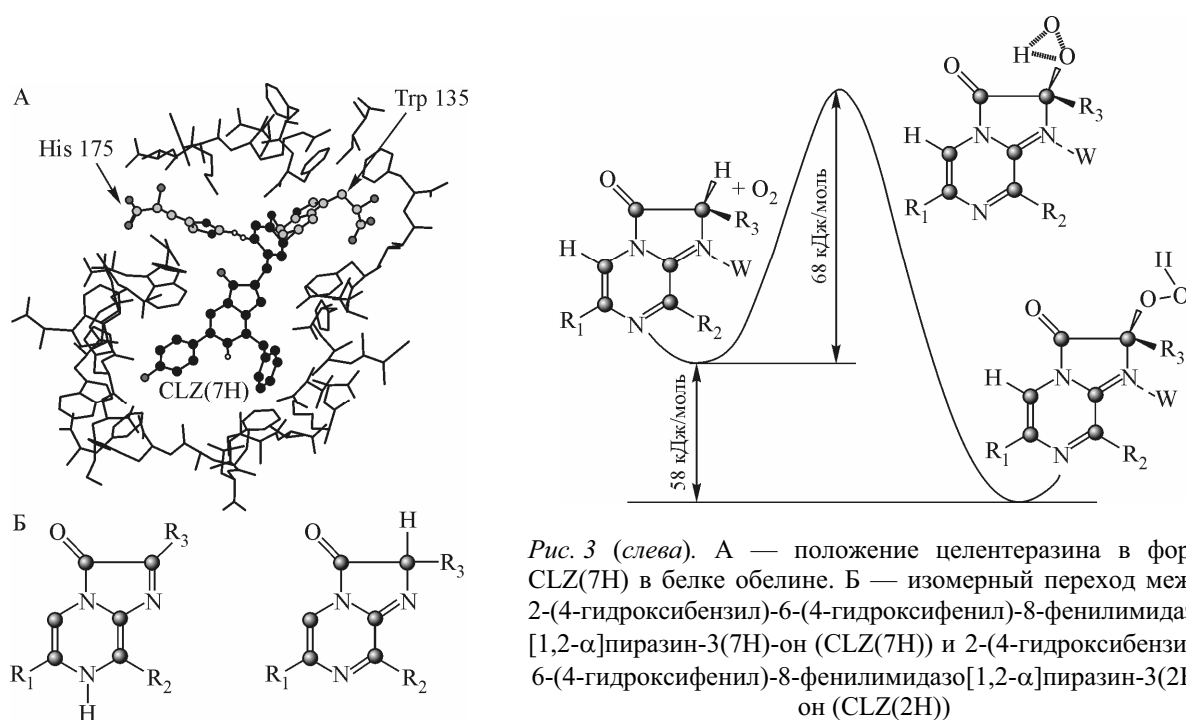


Рис. 3 (слева). А — положение целентеразина в форме CLZ(7H) в белке обелине. Б — изомерный переход между 2-(4-гидроксibenзил)-6-(4-гидроксифенил)-8-фенилимидазо[1,2- $\alpha$ ]пиразин-3(7H)-он (CLZ(7H)) и 2-(4-гидроксibenзил)-6-(4-гидроксифенил)-8-фенилимидазо[1,2- $\alpha$ ]пиразин-3(2H)-он (CLZ(2H))

Рис. 4 (справа). Механизм образования гидроперекиси

В дальнейшем для формы CLZ(2H) в присутствии молекулы кислорода происходит реакция с образованием стабильной структуры 2-гидроперокси-целентеразина. На рис. 4 представлена схема и энергетическая диаграмма данного процесса.

Моделирование химических реакций проводили следующим образом. В качестве отправной точки рассчитывали молекулу CLZ в присутствии воды и молекулу кислорода в основном триплетном состоянии. Продуктом реакции являлась структура 2-гидроперокси-целентеразина и молекула воды. Далее проводили расчет путей реакций, который заключался в нахождении максимальной энергии вдоль координаты реакции на поверхности потенциальной энергии методом квадратичного синхронного перехода (КСП) [19]. Чтобы найти седловую точку первого порядка (т.е. переходное состояние), максимум должен быть найден в одном (и только одном) направлении, а минимум — во всех направлениях. Переходное состояние характеризуется точкой, где все первые производные энергии с учетом геометрических параметров равны нулю (как для оптимизации геометрии), а вторая производная матрицы, гессиан, имеет одно и только одно отрицательное собственное значение. Метод синхронного перехода (СП) позволяет рассчитать переходное состояние системы и сочетается с методами квази-Ньютона для расчета переходного состояния. Расчет переходного состояния методом СП осуществляется двумя способами. Метод линейного синхронного перехода (ЛСП) ищет максимум энергии вдоль линейного пути между реагентами и продуктами. В результате применения данного метода можно получить структуру, имеющую два и более отрицательных собственных значения. Метод квадратичного синхронного перехода — это усовершенствованный метод ЛСП, который позволяет найти энергетический максимум вдоль параболы, связывающей реагенты и продукты, и минимум для всех перпендикулярных направлений к параболе [19].

В связи с тем что молекула кислорода находится в основном триплетном состоянии, реакцию присоединения кислорода в направлении от реагентов до переходного состояния считали в триплетном состоянии, т.е. в расчетах фактически получен барьер для прямой реакции. Так как продукт реакции имеет синглетное состояние, то мы предполагаем, что в момент присоединения молекулы кислорода (возможно, в переходном состоянии) происходит изменение спинового состояния с триплетного на синглетное, и далее реакция идет в синглетном состоянии до

Распределение зарядов на атомах, рассчитанных с использованием методов DFT и HF в базе 6-311\*\*. Номера атомов соответствуют рис. 1

Атом	CLZ(7H)		CLZ(2H)	
	HF/6-311**	DFT/6-311**	HF/6-311**	DFT/6-311**
N(1)	-0,41	-0,55	-0,61	-0,54
C(2)	0,01	0,21	-0,04	-0,04
C(3)	0,59	0,55	0,76	0,57
N(7)	-0,62	-0,67	-0,59	-0,53
C(10)	-0,15	-0,30	-0,23	-0,24
O(11)	-0,51	-0,57	-0,57	-0,48
H(12)	0,24	0,26	0,19	0,15

продуктов реакции. Мы предполагаем, что это может происходить под влиянием полярных молекул, когда связи в молекуле кислорода незначительно изменяются и поляризуются.

Процесс формирования 2-гидроперокси-целентеразина можно описать в одну стадию, с образованием промежуточного состояния, когда протон от C2 переходит на кислород с дальнейшим образованием 2-гидроперокси-целентеразина. Барьер активации данной реакции согласно расчетам составляет 68 кДж/моль.

Видимо, в OL аминокислотное окружение вынуждает целентеразин переходить в форму CLZ(2H). При захвате молекулы целентеразина из раствора *in vitro*, аминокислотное окружение загибает заместитель R<sub>3</sub> на угол 125° относительно пиразинового основания молекулы. В структуре CLZ(7H) данный заместитель находится под углом 180°. При этом происходит общая перестройка связей, и водород переходит от азота N(7) к углероду C(2). Одновременно меняется и электронная плотность на атомах. На углероде C(2) создается заряд -0,04 (см. рис. 1, табл. 2). На водороде, связанном с C(2), заряд 0,15. Все это приводит к тому, что молекула кислорода притягивается к C(2).

## ВЫВОДЫ

По нашему мнению, в *Obelia longissima* и *Renilla muelleri* целентеразин находится в двух разных изомерных формах: CLZ(2H) и CLZ(7H) соответственно. Это обусловливается различным аминокислотным окружением белков, которое задает геометрию целентеразина.

Реакция активации кислородом целентеразина с образованием 2-гидроперокси-целентеразина возможна только для структуры CLZ(2H), именно поэтому в *Renilla muelleri* не происходит образования целентерамида. Для структуры CLZ(7H) реакция взаимодействия с молекулой кислорода происходит без образования промежуточной молекулы гидроперекиси, а идет до получения целентерамида и сопровождается испусканием света.

Авторы благодарят сотрудников Сибирского федерального университета П.В. Аврамова и А.А. Кузубова за помощь в работе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (07-04-00930-а), программы Президиума РАН "Молекулярная и клеточная биология" и программы Сибирского отделения РАН (проект № 2), в рамках реализации ФЦП "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России" на 2010 год (П333 и П213).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Высоцкий Е.С., Маркова С.В., Франк Л.А. // Молекуляр. биология. – 2006. – 40, № 3. – С. 404.
2. Shimotsuma O. Bioluminescence: chemical principles and methods. – World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2006.

3. *Stepanyuk G.A., Liu Z-J., Markova S.S. et al.* // Photochem. Photobiol. Sci. – 2008. – **7**. – P. 442.
4. *Liu Z-J., Vysotski E.S., Chen C-J. et al.* // Protein Science. – 2000. – **9**. – P. 2085.
5. *Vysotski E.S., Lee J.* // Acc. Chem. Res. – 2004. – **37**. – P. 405.
6. *Tomilin F.N., Antipina L.Yu., Vysotski E.S.* // Dokl. Biochem. Biophys. – 2008. – **422**. – P. 279.
7. *Томили́н Ф.Н., Антипина Л.Ю., Высоцкий Е.С.* // Биофизика. – 2009. – **54**, № 4. – С. 630.
8. *Nakai S., Yasui M., Nakazato M. et al.* // Bull. Chem. Soc. Jpn. – 2003. – **76**. – P. 2361.
9. *Hohenberg P., Kohn W.* // Phys. Rev. Lett. – 1964. – **136**. – P. B864.
10. *Kohn W., Sham L.* // Phys. Rev. Lett. – 1965. – **140**. – P. A1133.
11. *Becke A.D.* // J. Chem. Phys. – 1993. – **98**. – P. 5648.
12. *Schmidt M.W., Baldridge K.K., Boatz J.A. et al.* // J. Comput. Chem. – 1993. – **14**. – P. 1347.
13. *Stewart J.J.P.* // J. Comp. Chem. – 1989. – **10**. – P. 209.
14. *Stewart J.J.P.* // J. Mol. Model. – 2004. – **10**. – P. 155.
15. *Stewart J.J.P.* Computational Chemistry. – USA, CO, Colorado Springs, 2007.
16. *Stewart J.J.P.* // J. Mol. Model. – 2007. – **13**. – P. 1173.
17. *Prendergast F.G.* // Nature. – 2000. – **405**. – P. 291.
18. *Shimomura O.* // J. Microscopy. – 2005. – **217**, N 1. – P. 3.
19. *Peng C., Schlegel H.B.* // J. Chem. – 1993. – **33**. – P. 449.