

На правах рукописи



Алиева Роза Ришатовна

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

03.01.02 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Красноярск – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский федеральный университет»

Научный руководитель: **Кудряшева Надежда Степановна,**
доктор физико-математических наук, профессор, ведущий сотрудник Федерального государственного бюджетного научного учреждения ФИЦ КНЦ СО РАН обособленного подразделения «Институт биофизики СО РАН», лаборатории фотобиологии.

Официальные оппоненты: **Исмаилов Анвар Джураевич,**
доктор биологических наук Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», биологического факультета, кафедры микробиологии;

Векшин Николай Лазаревич,
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биофизики клетки РАН», лаборатории внутриклеточной сигнализации.

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет».

Защита состоится «15» февраля 2017 г. в 12:00 часов на заседании диссертационного совета Д 002.039.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н. М. Эмануэля Российской академии наук по адресу: 119334, Москва, ул. Косыгина, 4.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической физики им. Н. Н. Семенова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, Ленинский проспект, 38 и на сайте <http://new.chph.ras.ru/diss-sovet/razmeshchennye-dissertatsii/129-fststgd>.

Автореферат разослан «___» _____ 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 002.039.01
кандидат химических наук

Мазалецкая Лидия Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. 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. В настоящее время известно достаточно много флуоресцентных белков, гомологичных GFP, характеризующихся различными флуоресцентными свойствами [1]; 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* и *Phialidium (Clytia)*, гидроидном полипе *Obelia longissima* и др.). Их флуорофором является молекула целентерамида (ЦЛМ), связанная нековалентно с белком внутри его гидрофобной полости.

ЦЛМ-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, ассиметричные и включают несколько компонент (эммиттеров), соответствующих различным формам ЦЛМ. Соотношение компонент может меняться под действием различных факторов. Такие изменения связаны с химией возбужденных состояний [2], а именно, с эффективностью переноса протона от фенольной группы ЦЛМ к протоно-акцепторной группе аминокислотного окружения в белке.

В настоящее время особый интерес представляет фотопротеин обелин, выделенный из гидроидного полипа *Obelia longissima*. Получены генетически модифицированные формы обелина с различными характеристиками биолюминесценции [3, 4]. Показано, что воздействие экзогенных ароматических химических соединений и варьирование концентрации ионов кальция изменяют интенсивность биолюминесценции обелина, но не ее спектральный состав [5, 6]. Кроме того, продемонстрировано, что интенсивность и форма спектра фотолюминесценции продукта

биоломинесцентной реакции (разряженного обелина) зависит от концентрации ионов кальция [6].

Однако возможность варьирования спектров фотолуминесценции 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 фотолуминесценции 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 обелина, 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 разряженного обелина.

Практическая значимость. Выявленная варибельность 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 на основе ЦЛМ-содержащих флуоресцентных белков. Т.к. биолуминесценция обелина уже применяется для определения содержания кальция и мониторинга кальций-зависимых процессов, использование продукта биолуминесцентной реакции (разряженного обелина) для флуоресцентного биотестирования токсичности способно придать препарату обелина многофункциональность и повысить эффективность его использования.

Поскольку оптимальная температура функционирования фотопротеина обелина, выделенного из гидроидного полипа *Obelia longissima* (обитателя северных морей), менее 20 °С, необходимо учитывать изменение

интенсивности и цвета фотолюминесценции 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 конференции по импульсным лазерам и их применению (Томск, 2015), V-ом съезде биофизиков России (Ростов-на-Дону, 2015), биолюминесцентных семинарах Сибирского федерального университета, 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 современному научному представлению 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 биоллюминесценции и хемиллюминесценции.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 120 страницах машинописного текста, состоит из содержания, введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, выводов, списков сокращений и литературы, приложений. Работа проиллюстрирована 39 рисунками и содержит 3 таблицы, не включая приложения. Библиография включает 144 источников.

Список сокращений и обозначений: ЦЛМ – целентерамид; ДМСО – диметилсульфоксид, ВЗМО – высшая занятая молекулярная орбиталь, НВМО – низшая вакантная молекулярная орбиталь.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе диссертации «**Флуоресцентные белки: структура, свойства и использование**» рассмотрены структурные особенности, свойства и применение флуоресцентных белков (GFP, GFP-подобных и целентерамид-содержащих), продемонстрированы отличия разряженного обелина от других флуоресцентных белков. Описаны способы получения разряженных фотопротеинов. Проанализированы имеющиеся в настоящее время теоретические и экспериментальные исследования флуоресцентных свойств продукта биоллюминесцентной реакции обелина (разряженного обелина) и его флуорофора (ЦЛМ), а также гипотезы о механизме образования эмиттеров люминесценции фотопротеинов. Описаны флуоресцентные свойства ароматических аминокислот, присутствующих в белках. Проанализированы механизмы действия экзогенных соединений на свечение ферментативных систем. Показаны перспективы использования флуоресценции разряженного обелина, обоснована необходимость изучения его спектральных свойств.

Во второй главе «Материалы и методы» описаны приборы и реагенты, а также методические подходы, используемые в работе.

Рекомбинантные препараты фотопротеинов: обелина, акворина и клитина были получены в лаборатории фотобиологии Института биофизики СО РАН. Был использован целентерамид фирмы NanoLight (США).

Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметрах *LS55* Perkin Elmer (Shelton, Connecticut, США) и *Fluorolog 3 (HORIBA Jobin Yvon, США)*. Для записи спектров поглощения использовали двулучевой

регистрирующий спектрофотометр UVIKON 943 (KONTRON Instruments, Италия).

Разряженный обелин получали в результате инициирования биоллюминесцентной реакции хлоридом кальция, либо путем выдерживания раствора обелина при 40 °С в течение 1-2 часов в отсутствие Ca^{2+} до максимальной интенсивности флуоресценции.

Для изучения флуоресцентных характеристик разряженного обелина при хроническом воздействии повышенной температуры препарат выдерживали при 40 °С в течение 12,5 ч.

Экзогенные соединения (этанол, этиленгликоль, глицерин и ДМСО) добавляли в раствор разряженного обелина после проведения биоллюминесцентной реакции.

Для количественного анализа изменений спектрального состава флуоресценции разряженного обелина, все спектры были разделены на компоненты, описываемые распределением Гаусса в координатах: интенсивность люминесценции – волновое число. Для нахождения количества спектральных компонент и положения их максимумов использовали метод второй производной. Разложение на компоненты проводили в программе Origin 8.5.1, достоверность аппроксимации оценивали коэффициентом детерминации (0,98-0,99).

Отклонение площади расчетного суммарного спектра от экспериментального оценивали величиной d , определяемой по следующей формуле:

$$d = \frac{|S_{\text{экс}} - S_{\text{расч}}|}{S_{\text{экс}}} \cdot 100\%, \quad (1)$$

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):

$$W = (S_{\text{комп}} / S_{\text{общ}}) \cdot 100 \%, \quad (2)$$

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 :

$$I / I_0 = e^{-KC}, \quad (3)$$

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

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

$$I/I_0 = e^{-K' t}, \quad (4)$$

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

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

Квантово-химические расчеты проводили с использованием метода функционала плотности B3LYP в базисе cc-pVDZ в программе GAMESS. Растворитель учитывали с помощью моделей PCM (Polarized Continuum Model) и SMD (Solvation Model based on Density). Расчёт проводился как для вертикальных (SMD), так и для адиабатических (SMD*) возбуждений. В работе приведены результаты использования модели SMD*, которые лучше совпадают с экспериментальными данными. Метод TD (Time-dependent) использовали для расчёта спектров поглощения и поиска возбуждённого состояния. В качестве стартовой геометрии для расчётов брали структуру ЦЛМ из фотопротейна обелина (PDB код 1S36). Находили равновесную геометрию молекулы для основного и возбуждённого состояния. Далее был выполнен расчет спектров поглощения и флуоресценции ЦЛМ.

В третьей главе «Зависимость флуоресценции разряженного фотопротейна обелина от энергии фотовозбуждения» изучено влияние длины волны фотовозбуждения на флуоресценцию разряженного фотопротейна обелина и его флуорофора ЦЛМ.

3.1 Спектры флуоресценции разряженных фотопротейнов при различных длинах волн возбуждения

На рисунке 1 приведены 3D и 2D спектры флуоресценции разряженного обелина. Как видно из рисунка 1а, б, фотовозбуждение в интервале длин волн 310-380 нм инициирует излучение в сине-зеленой области с максимумом 507 нм и плечом в фиолетовой области спектра. Коротковолновое фотовозбуждение (260-300 нм) дополнительно инициирует излучение в ультрафиолетовой области с максимумом 345 нм (рисунок 1а, в). Аналогичное ультрафиолетовое излучение обнаружено и у других разряженных фотопротейнов акворина (332 нм) и клитина (339 нм), выделенных соответственно из медуз *Aequorea* и *Phialidium (Clytia)* (рисунок 2).

Ультрафиолетовую флуоресценцию белков и белковых комплексов принято связывать с ароматическими фрагментами боковых групп аминокислотных остатков (триптофана, тирозина, фенилаланина) [7]. Не исключено также участие частично изолированных сопряженных электронных подсистем низкомолекулярных ароматических соединений, в частности, ЦЛМ – флуорофора разряженных фотопротейнов.

а)

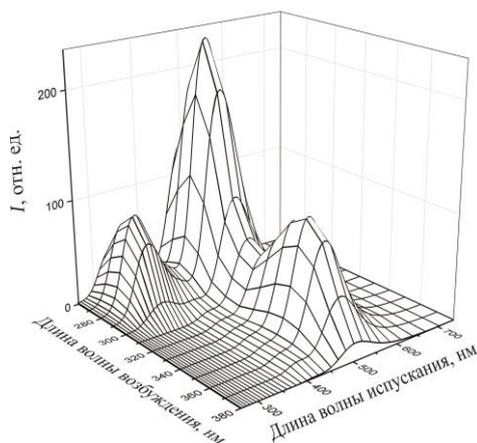
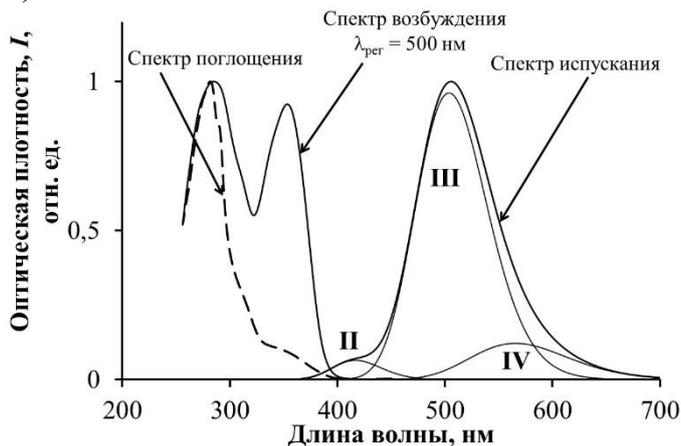
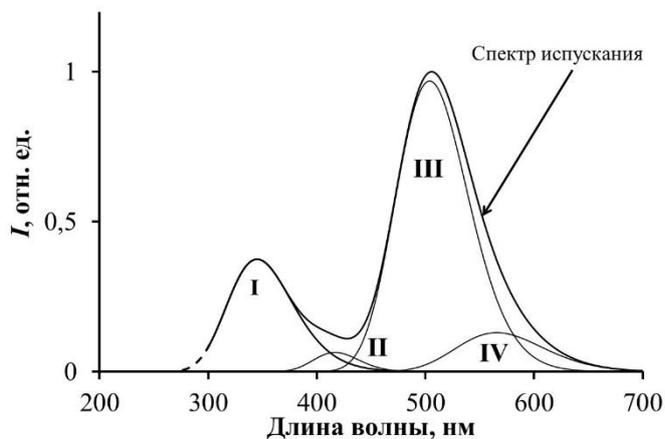


Рисунок 1. Спектры флуоресценции разряженного обелина: 3D-спектр (а); 2D-спектры и их компоненты I-IV при фотовозбуждении 350 нм (б) и 280 нм (в), $C_{\text{обелина}} = 10^{-5}$ М.

б)

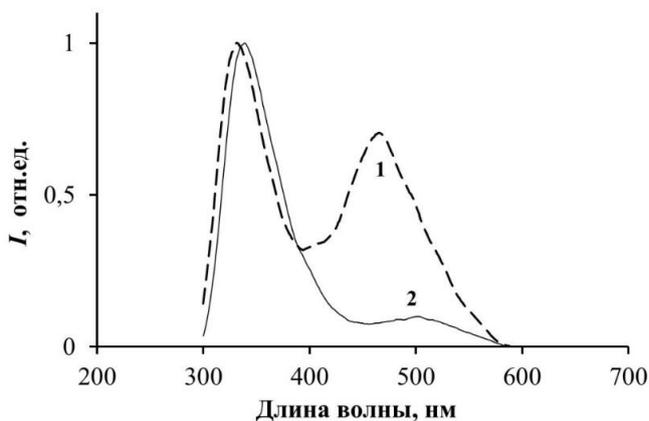


в)



Для понимания природы ультрафиолетового излучения разряженных фотопротеинов были проведены дополнительные эксперименты по изучению спектрально-люминесцентных свойств молекулы ЦЛМ при различных энергиях фотовозбуждения, а также выполнены квантово-химические расчеты.

Рисунок 2. Спектры флуоресценции фотопротеинов, разряженных в присутствии Ca^{2+} , при фотовозбуждении 280 нм. 1 - акворин ($2 \cdot 10^{-6}$ М), 2 - клитин ($8 \cdot 10^{-5}$ М).



3.2 Спектрально-люминесцентные свойства целентерамида – флуорофора разряженных фотопротеинов

Химическая структура ЦЛМ приведена на рисунке 3а. Ароматические фрагменты ЦЛМ – пиазиновый (*P*), фенольный (*F*) и бензольный (*B*) – способны участвовать в формировании спектров люминесценции.

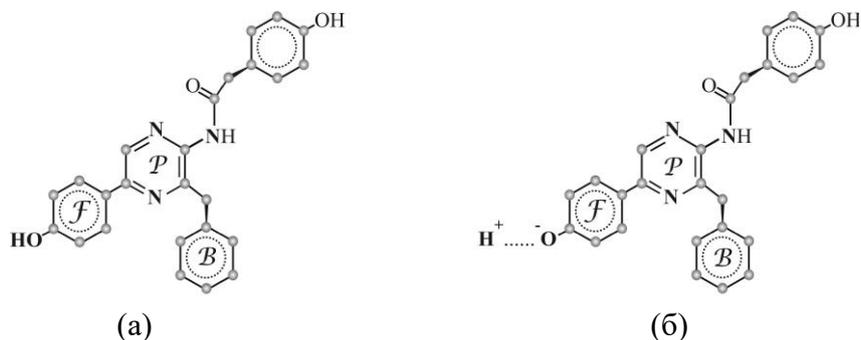


Рисунок 3. Химическая структура молекулы целентерамида. (а) протонированная, (б) депротонированная формы. Фрагменты молекулы: *P* – пиазиновый, *F* – фенольный, *B* – бензольный.

Зарегистрированы спектры испускания ЦЛМ ($2,2 \cdot 10^{-6}$ М) в растворе метанола в интервале длин волн 290-600 нм при варьировании длины волны фотовозбуждения 260-400 нм (рисунок 4). Малая константа диссоциации по кислотному типу фенольной группы в метаноле ($pK_a = 14$ [8]) указывает на то, что молекула ЦЛМ в этом растворителе практически полностью находится в недиссоциированной форме (рисунок 3а).

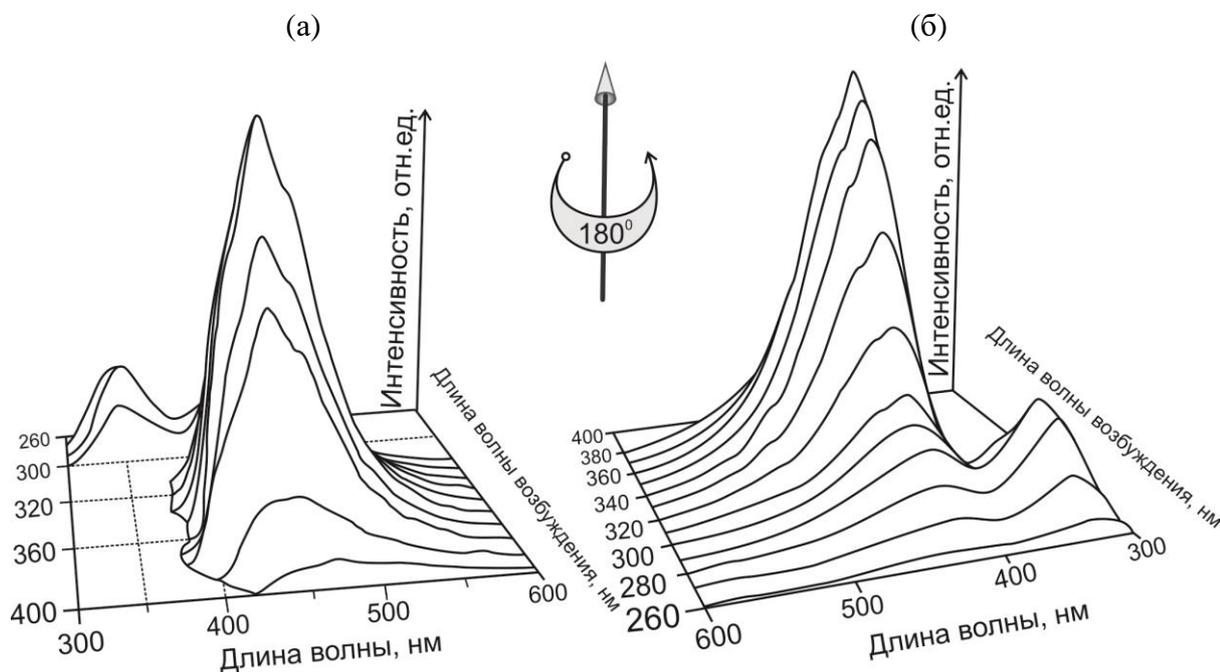


Рисунок 4. 3D спектры флуоресценции целентерамида в метаноле ($2,2 \cdot 10^{-6}$ М). (а) и (б) различаются поворотом на 180° .

Из рисунка 4 видно, что спектры флуоресценции свободного ЦЛМ в растворе метанола зависят от энергии возбуждения: при фотовозбуждении в высшие электронно-возбужденные состояния (260-300 нм) возникает дополнительное излучение в ультрафиолетовой области с максимумом 330 нм.

Рассчитан квантовый выход флуоресценции ЦЛМ в метаноле при фотовозбуждении 270-340 нм; он оказался равным $0,028 \pm 0,005$ (расчет подтверждается данными работы [9] для длины волны фотовозбуждения 355 нм), что ниже квантового выхода разряженного обелина, определенного ранее ($\phi = 0,17$ [10]).

На рисунке 5а, б приведены экспериментальные и расчетные спектры поглощения ЦЛМ, а также спектры его флуоресценции при высокоэнергетическом фотовозбуждении (280 нм).

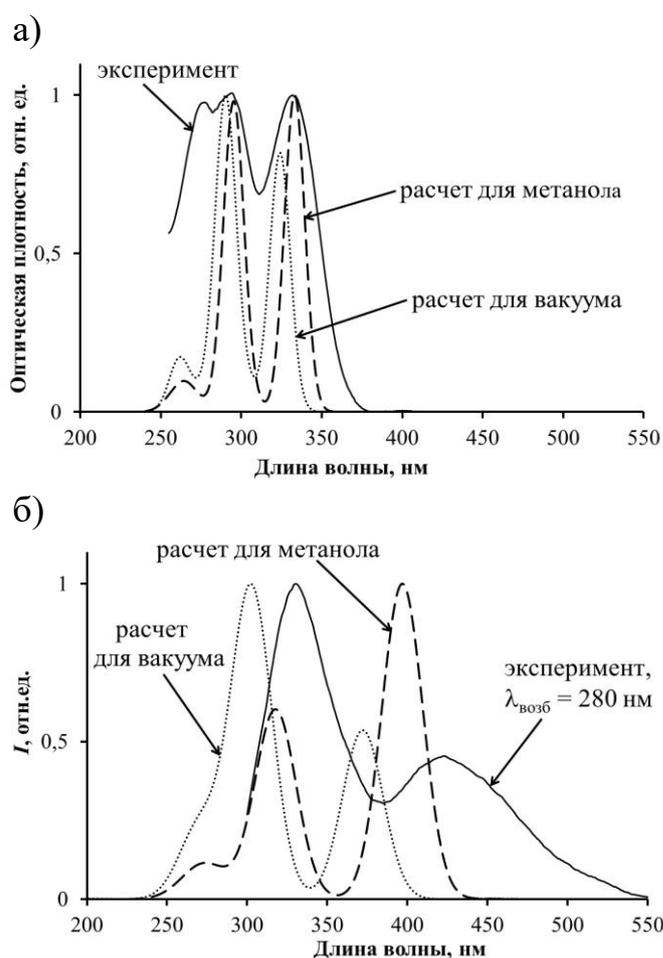


Рисунок 5. Расчетные и экспериментальные спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) целентерамида в метаноле. Расчеты проведены для вакуума и метанола с помощью SMD*/TD/B3LYP/cc-pVDZ, $C_{\text{ЦЛМ}} = 2,2 \cdot 10^{-6}$ М.

Максимум спектров испускания в видимой области (420 нм) соответствует протонированной форме ЦЛМ в белке (компонента II, рисунок 1б, в). При высокоэнергетическом фотовозбуждении (280 нм, рисунок 5б) в спектре флуоресценции наблюдается ультрафиолетовая полоса с максимумом

330 нм, аналогично спектрам флуоресценции фотопротеинов (рисунок 1а, рисунок 2).

Проведенные квантово-химические расчеты показывают, что теоретический спектр поглощения ЦЛМ в метаноле близок экспериментальному: максимумы экспериментального спектра 277 нм, 294 нм и 332 нм соответствуют максимумам расчетного 264 нм, 295 нм и 332 нм (рисунок 5а). Максимумы расчетного (318 нм, 397 нм) и экспериментального (330 нм, 420 нм) спектров флуоресценции ЦЛМ (рисунок 5б) имеют некоторое расхождение, связанное с несовершенством расчётной модели.

На рисунке 6 схематически представлены молекулярные орбитали ЦЛМ, участвующие в образовании спектров его флуоресценции, и соответствующие электронные переходы.

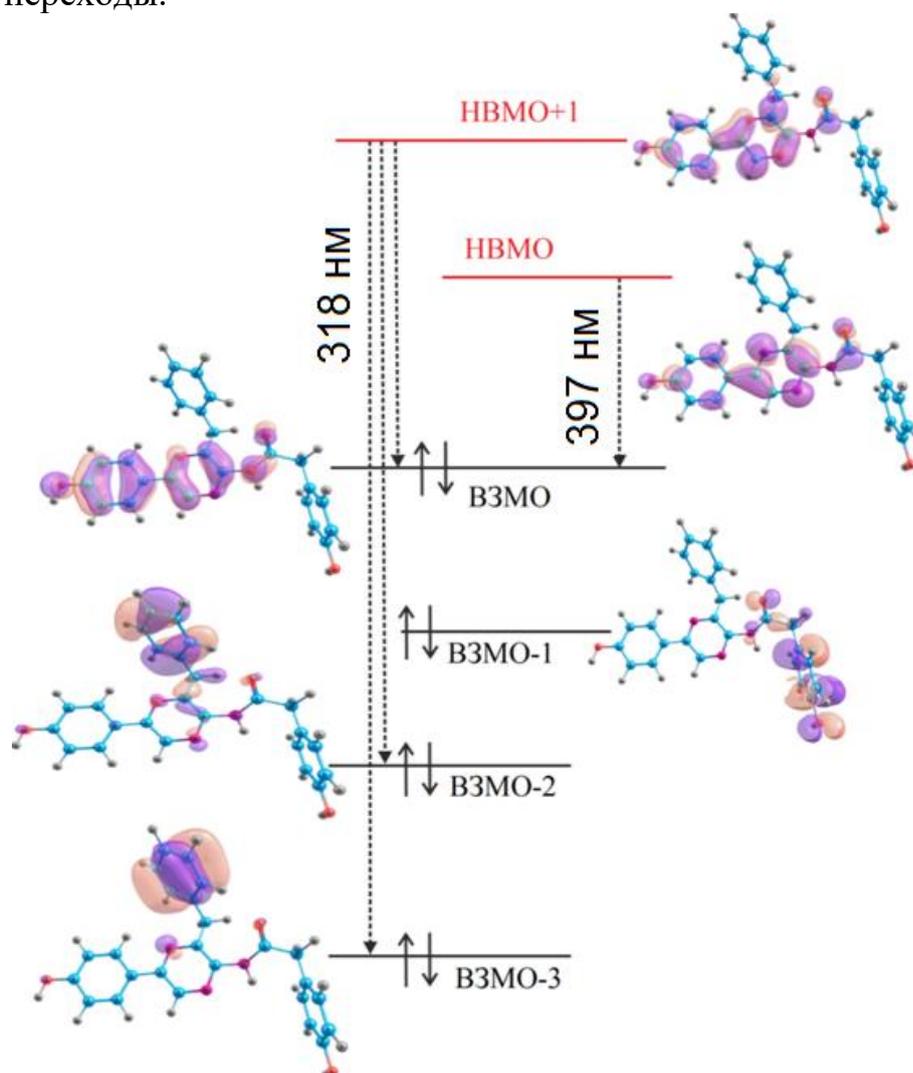


Рисунок 6. Схема электронных переходов в спектрах флуоресценции молекулы целентерамида, рассчитанных SMD*/TD/B3LYP/cc-pVDZ.

Электронный переход для длинноволнового максимума расчетного спектра флуоресценции 397 нм (рисунок 5б) формируется с участием HOMO и VMO (рисунок 6). Из анализа локализации возбуждения молекулярных

орбиталей следует, что в этом переходе участвуют два сопряженных фрагмента ЦЛМ – пиразиновый (*P*, рисунок 3) и фенольный (*F*, рисунок 3). При формировании полосы флуоресценции с максимумом 318 нм (рисунок 5б) имеют место электронные переходы с участием НВМО+1 и ВЗМО, а также занятых орбиталей более низких энергий ВЗМО-2, ВЗМО-3 (рисунок 6). В формировании этой ультрафиолетовой полосы дополнительно участвует бензольный фрагмент ЦЛМ (*B*, рисунок 3).

Ультрафиолетовая полоса флуоресценции свободного ЦЛМ (318 нм в расчетном, 330 нм в экспериментальном спектрах) и ее электронные переходы описаны нами впервые. Ранее, в теоретических работах [11-12], рассматривалась только длинноволновая полоса флуоресценции ЦЛМ.

Вероятно, аналогичные переходы ЦЛМ характерны и для ультрафиолетовой полосы флуоресценции фотопротеинов, регистрируемой при высокоэнергетическом фотовозбуждении (рисунок 1а, в, рисунок 2).

Таким образом, на примере обелина установлено, что ультрафиолетовое излучение разряженных фотопротеинов может формироваться не только за счет флуоресценции аминокислотных остатков белка, но и флуорофора (ЦЛМ). Полученные результаты могут служить основой для дальнейших исследований взаимодействий белок-ЦЛМ в разряженных фотопротеинах, а также закономерностей миграции энергии возбуждения в биологических структурах – комплексах белков с низкомолекулярными ароматическими соединениями.

В главе 4 «Влияние деструктивных физико-химических факторов на флуоресценцию разряженного фотопротеина обелина» проведено изучение воздействий на флуоресценцию разряженного обелина ряда физико-химических факторов – экзогенных веществ (этанола, этиленгликоля, глицерина, 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. На рисунке 7а-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. Для случая, представленного на рисунке 7г наблюдали полное перераспределение интенсивности в максимумах спектров флуоресценции. Следует отметить, что лиофилизация препарата обелина увеличивает его чувствительность к экзогенным соединениям.

Для анализа воздействия внешних факторов все спектры флуоресценции были разделены на гауссовы компоненты. В качестве примера на рисунке 1б, в представлены спектры флуоресценции разряженного обелина и его компоненты I-IV при низкоэнергетическом (350 нм) и высокоэнергетическом (280 нм) фотовозбуждении.

Спектр флуоресценции разряженного обелина при фотовозбуждении 350 нм (рисунок 1б) 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 (344 ± 1 нм, рисунок 1б). Эта компонента связана с испусканием ароматических структур с низкой степенью сопряжения. За нее могут быть ответственны как боковые группы аминокислотных остатков, так и фрагменты молекулы флуорофора, как показано в разделе 3.2.

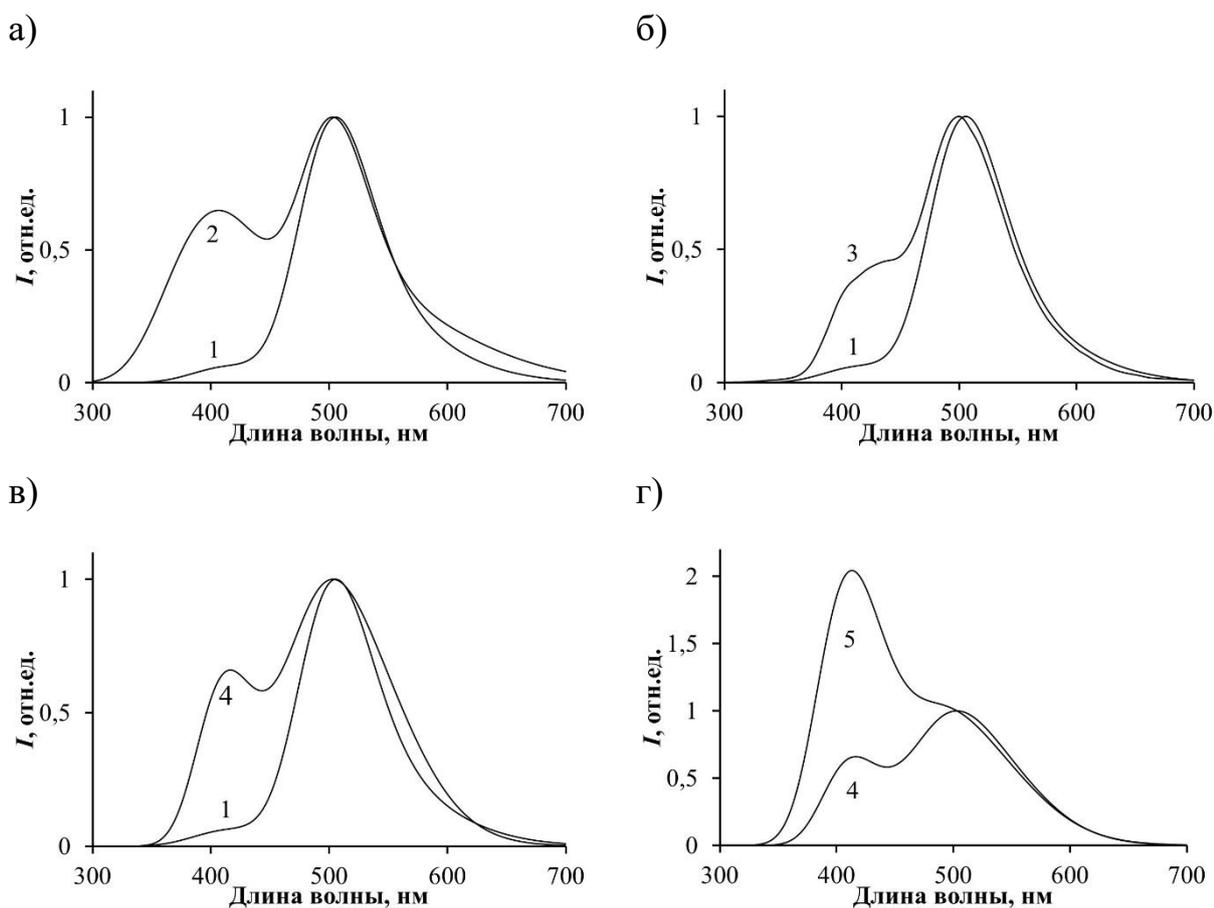


Рисунок 7. Варьирование спектров испускания флуоресценции разряженного обелина различными физико-химическими факторами: (а, г) – влияние спиртов, (б) – термическое воздействие 40 °С, (в, г) лиофилизация. Фотовозбуждение – 350 нм. Спектры испускания разряженного обелина: 1 – контрольный образец, 2 – в 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).

В соответствии с данными [13, 11-12], компонента II приписана излучению протонированной формы ЦЛМ, компоненты III и IV – излучению депротонированных форм ЦЛМ (рисунок 3б). Образование депротонированных форм связано с фотохимическим процессом, а именно, с переносом протона в электронно-возбужденном состоянии ЦЛМ в разряженном обелине (рисунок

За, б, рисунок 8). Из рисунка 8 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.

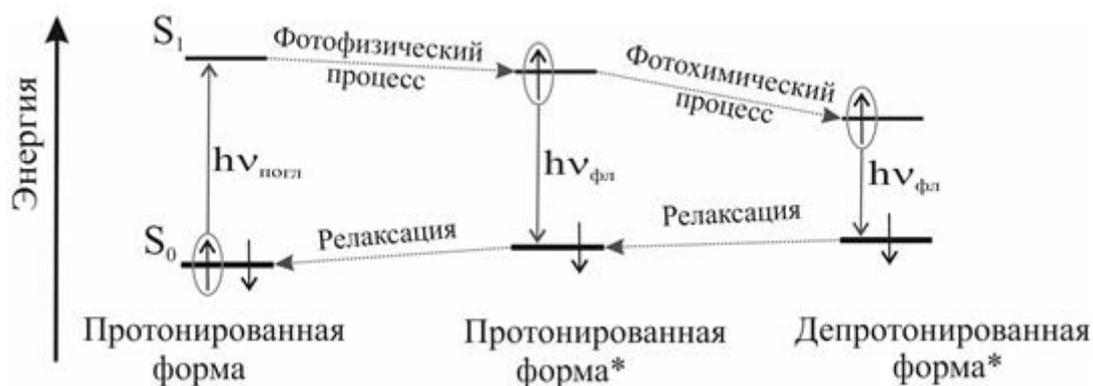


Рисунок 8. Схема фотофизических и фотохимических процессов, инициирующих образование флуоресцентных состояний целентерамида в разряженном обелине.

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 фотопротейна обелина

4.1.1 Влияние на интенсивность флуоресценции

Исследовано влияние ряда спиртов (этанола, этиленгликоля, глицерина) и ДМСО на интенсивность флуоресценции разряженного обелина при низкоэнергетическом (350 нм) и высокоэнергетическом (280 нм) фотовозбуждении, соответствующем первой и второй полосам поглощения обелина (рисунок 1б). Выявлены изменения спектров флуоресценции разряженного обелина при воздействии этих соединений. Все спектры были разложены на гауссовы компоненты. В соответствии с уравнением 3 рассчитаны коэффициенты тушения флуоресценции разряженного обелина (K) экзогенными соединениями. Значения этих коэффициентов для спектральных компонент представлены в таблице 1. Из этой таблицы, видно, что интенсивность компоненты I в присутствии всех экзогенных соединений 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.

Таблица 1. Коэффициенты тушения K экзогенными соединениями флуоресценции обелина, разряженного в присутствии Ca^{2+} . 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

4.1.2 Влияние на спектральный состав флуоресценции

Рассчитаны вклады спектральных компонент в спектры испускания разряженного обелина в присутствии спиртов (этанола, этиленгликоля, глицерина) и ДМСО. В качестве примера на рисунке 9 представлены вклады компонент разряженного обелина в присутствии глицерина при фотовозбуждении 350 нм (рисунок 9а) и 280 нм (рисунок 9б, в).

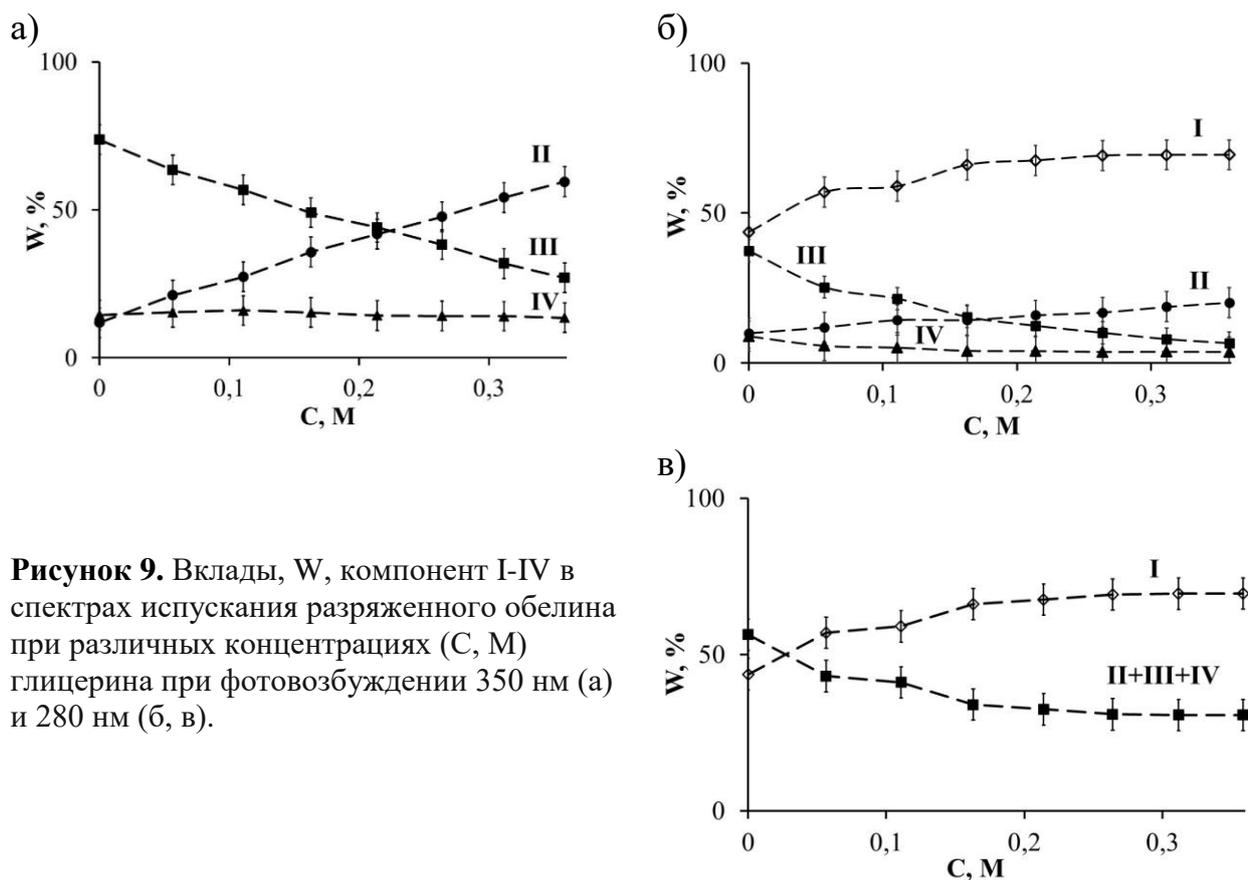


Рисунок 9. Вклады, W , компонент I-IV в спектрах испускания разряженного обелина при различных концентрациях (C, M) глицерина при фотовозбуждении 350 нм (а) и 280 нм (б, в).

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 также видно, что тенденции изменения вкладов компонент II-IV при фотовозбуждении 280 нм и 350 нм схожи.

На рисунке 9в 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 (этанола, этиленгликоля, ДМСО).

Таким образом, деструктивное 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. Вероятно, эти эффекты вызваны деструктивным воздействием экзогенных соединений, которое изменяет межатомные расстояния в аминокислотном окружении флуорофора, уменьшает эффективность переноса протона в возбужденном состоянии ЦЛМ, при этом увеличивая 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 физико-химических процессов; он связан с оценкой изменения эффективности элементарного фотохимического процесса – переноса протона в возбужденном состоянии флуорофора разряженного обелина (ЦЛМ) (рисунок 3а, б, рисунок 8).

4.2 Хроническое воздействие повышенной температуры на флуоресценцию разряженного обелина

Изучено хроническое влияние повышенной температуры (40 °С) на флуоресценцию разряженного обелина при различной энергии фотовозбуждения. Продемонстрировано, что увеличение времени температурного воздействия приводит к общему падению интенсивности флуоресценции разряженного обелина и изменению формы его спектров.

4.2.1 Влияние на интенсивность флуоресценции

Спектры флуоресценции разряженного обелина, полученные при различных временах температурного воздействия (40 °С), были разложены на компоненты. Обнаружены три компоненты (I-III) при фотовозбуждении 280 нм

и две (II, III) при фотовозбуждении 350 нм. Максимумы компонент I, II и III оказались равны соответственно 350 ± 1 , 420 ± 1 и 502 ± 1 нм. Определено, что положения максимумов выделенных компонент не зависят во времени воздействия (0-12,5 ч) и длины волны возбуждения (260-390 нм).

В соответствии с уравнением 4 рассчитаны коэффициенты спада флуоресценции разряженного обелина (K') под действием температуры при низкоэнергетическом (350 нм) и высокоэнергетическом (280 нм) фотовозбуждении (таблица 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 2. Коэффициенты спада K' флуоресценции обелина, разряженного в отсутствие Ca^{2+} , при 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, хроническое действие повышенной температуры на разряженный обелин приводит к спаду интенсивности флуоресценции в видимой и ультрафиолетовой области спектра.

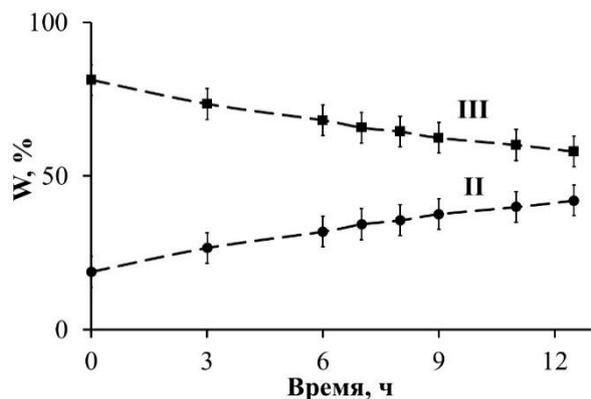
4.2.2 Влияние на спектральный состав

Хроническое воздействие повышенной температуры на разряженный обелин изменяет не только интенсивность флуоресценции, но и вклады спектральных компонент.

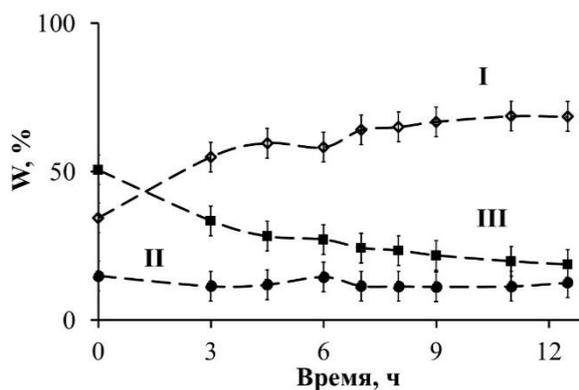
Установлено, что вклады компонент изменяются с ростом времени воздействия. На рисунке 10 представлены вклады компонент при различных временах температурного воздействия (40 °С) при фотовозбуждении 280 нм (рисунок 10а) и 350 нм (рисунок 10б). Из рисунка видно, что с увеличением времени нагревания вклад депротонированной формы ЦЛМ (компонента III) падает, а вклад протонированной формы (компонента II) растет (рисунок 10а), либо практически не изменяется (рисунок 10б).

На рисунке 10в 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 в присутствии экзогенных веществ (раздел 4.1.2).

а)



б)



в)

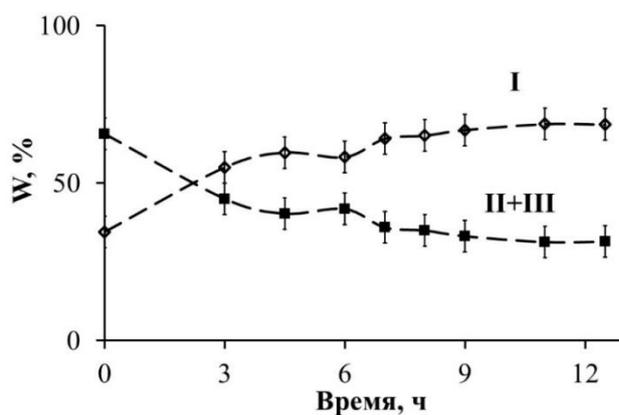


Рисунок 10. Вклады, W , компонент I-III спектра испускания разряженного обелина при различных временах высокотемпературного воздействия ($40\text{ }^{\circ}\text{C}$) при фотовозбуждении 350 нм (а) и 280 нм (б, в).

Таким образом, деструктивное влияние повышенной температуры аналогично действию экзогенных соединений: рост времени воздействия уменьшает общий выход флуоресценции разряженного обелина, изменяет соотношение между фиолетовой и сине-зеленой компонентами в пользу фиолетовой, а также увеличивает вклад ультрафиолетовой компоненты.

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 фотохимического процесса – 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 растет 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 ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. **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.
2. 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. (Petrova, A.S. Variation of spectral characteristics of coelenteramide-containing fluorescent protein from *Obelia longissima* exposed to dimethyl sulfoxide / A.S. Petrova, **R.R. Alieva**, N.V. Belogurova, L.S. Tirranen, N. S. Kudryasheva // *Russian Physics Journal*. – 2016. – V. 59, № 4. – P. 562-567.)
3. **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.
4. **Alieva, R.R.** Fluorescence properties of Ca²⁺-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.
5. Belogurova, N.V. Activity of upper electron-excited states in bioluminescence of coelenterates / N.V. Belogurova, **R.R. Alieva**, N.S. Kudryasheva // *Journal of Molecular Structure*. – 2009. – V. 924-926. – P.148-152.
6. Belogurova, N.V. Spectral components of bioluminescence of aequorin and obelin / N.V. Belogurova, N.S.Kudryasheva, **R.R. Alieva**, A.G. Sizykh // *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*. – 2008. – V. 92. – P. 117-122.

Тезисы докладов наиболее значимых конференций:

7. Белогурова, Н. Анализ спектров билюминесценции и фотолюминесценции фотопротеинов / Н. Белогурова, **Р. Алиева**, Н. Кудряшева // *Материалы VI Съезда Российского фотобиологического общества*. Москва: НИА-Природа. – 2011. – С. 154.
8. **Алиева, Р.Р.** Спектральные характеристики фотолюминесценции термоинактивированного фотопротеина обелина / Р.Р. Алиева, Н.В. Белогурова, А.С. Петрова, Н.С. Кудряшева // *Сборник статей 12-й международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные исследования, разработка и применение высоких технологий в*

- промышленности». – Санкт-Петербург: издательство Политехнического университета. – 2011. – Т.2. – С. 232-234.
9. **Alieva, R.R.** Spectral-luminescent properties of thermo-discharged photoprotein obelin / R.R. Alieva, N.V. Belogurova, A.S. Petrova, N.S. Kudryasheva // Abstract book XV International Symposium on Luminescence Spectrometry, Barcelona. – 2012. – P. 69.
 10. **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.
 11. **Алиева, Р.Р.** Флуоресцентные свойства Ca^{2+} -независимого разряженного фотопротейна обелина / Р.Р. Алиева, Н.В. Белогурова, А.С. Петрова, Н.С. Кудряшева // Экспериментальная и теоретическая биофизика. Сборник тезисов. – Пушкино: типография Fix-Print, 2013. – С. 133.
 12. Петрова, А.С. Влияние глицерина и этанола на спектрально-люминесцентные характеристики Ca^{2+} -разряженного фотопротейна обелина / А.С. Петрова, **Р.Р. Алиева**, Н.В. Белогурова // Экспериментальная и теоретическая биофизика. Сборник тезисов. – Пушкино: типография Fix-Print, 2013. – С. 138.
 13. **Alieva, R.R.** Fluorescence characteristics Ca^{2+} -independent discharged photoprotein obelin / R.R. Alieva, N.V. Belogurova, A.S. Petrova, N.S. Kudryasheva // 13th Kharkiv Young Scientists Conference on Radiophysics, Electronics, Photonics and Biophysics. – Kharkiv, 2013. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM). – Загл. с этикетки диска.
 14. **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.
 15. Petrova, A.N. Effect of DMSO on fluorescence properties of Ca^{2+} -discharged photoprotein obelin / A.S. Petrova, N.V. Belogurova, **R.R. Alieva**, N.S. Kudryasheva // Luminescence. – 2014. – V. 29, № 1. – P. 40.
 16. **Alieva R.R.** Variation of spectra of blue fluorescent protein by physicochemical factors / R.R. Alieva, N.S. Kudryasheva // The 12th International conference “Amotic and Molecular pulsed lasers”: Abstracts. – Tomsk: publishing House of IAO SB RAS. – 2015. – P. 56.
 17. **Алиева, Р.Р.** Влияние физико-химических факторов на флуоресценцию разряженного фотопротейна обелина / Р.Р. Алиева, Н.С. Кудряшева // V Съезд биофизиков России. Материалы докладов. – Ростов-на-Дону: Издательство Южного федерального университета. – 2015. – Т. 2. – С. 70.
 18. **Алиева, Р.Р.** Экспериментальное и теоретическое изучение ультрафиолетовой флуоресценции целентерамида и целентерамид-содержащих флуоресцентных белков / Р.Р. Алиева, Ф.Н. Томилин, Н.С. Кудряшева // Сборник тезисов XIX конференции молодых ученых КНЦ СО РАН. – Красноярск: Красноярский научный центр СО РАН. – 2016. – С. 11.

Цитируемая литература

1. 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.
2. Турро Н. Молекулярная фотохимия / Н. Турро. – Москва: Мир, 1967. – 328 с.
3. Высоцкий, Е.С. Кальций-регулируемые фотопротейны морских кишечнорастворимых / Е.С. Высоцкий, С.В. Маркова, Л.А. Франк // Молекулярная биология. – 2006. – Т. 40, № 3. – С. 404-417.
4. 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. – V. 554. – P. 184-188.
5. Belogurova, N.V. Activity of upper electron-excited states in bioluminescence of coelenterates / N.V. Belogurova, R.R. Alieva, N.S. Kudryasheva // Journal of Molecular Structure. – 2009. – V. 924-926. – P. 148-152.
6. Belogurova, N. Discharged photoprotein obelin: fluorescence peculiarities / N. Belogurova, N. Kudryasheva // Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology. – 2010. – V. 101. – P. 103-108.
7. Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy / J. R. Lakowicz. – New York, USA: Springer Science & Business Media, 2006. – 980 p.
8. Roya, K. Predictive QSPR modeling of the acidic dissociation constant (pKa) of phenols in different solvents / K. Roya, P.L.A. Popelier // Journal of Physical Organic Chemistry. – 2009. – V. 22. – P. 186-196.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Shimomura, O. Light-emitters involved in the luminescence of coelenterazine / O. Shimomura, K. Teranishi // Luminescence. – 2000. – V. 15. – P. 51-58.