

УДК 678+544.34; 544.45;544.47; 577.15; 577.34

## ЛЮЦИФЕРАЗА СВЕТЛЯКОВ КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ПОИСКА И ИЗУЧЕНИЯ МАГНИТНО-ИЗОТОПНЫХ ЭФФЕКТОВ В АТФ-ЗАВИСИМЫХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЯХ

Д.В. Смирнова<sup>1</sup>, В.К. Кольтовер<sup>2</sup>, С.В. Носенко<sup>3</sup>, И.А. Стрижова<sup>1,2</sup>,  
Н.Н. Угарова<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; <sup>2</sup> Институт проблем химической физики РАН; <sup>3</sup> Институт проблем технологии микроэлектроники и особо чистых материалов РАН; \*e-mail: nugarova@gmail.com)

Клетки и ткани состоят из атомов химических элементов, некоторые из которых имеют два типа стабильных изотопов: магнитные и немагнитные. Недавно в экспериментах с живыми клетками, обогащенными магнитными и немагнитными изотопами магния, были обнаружены магнитно-изотопные эффекты (МИЭ), которые могут быть обусловлены более высокой эффективностью ферментов в клетках, обогащенных магнитным изотопом магния. При изучении МИЭ в биологических системах необходим мониторинг концентрации АТФ как главного источника энергии в клетке. Наиболее чувствительный и быстрый метод определения АТФ основан на использовании люциферин-люциферазной системы светляков. Так как люцифераза сама является АТФ-зависимым ферментом и активируется ионами магния, необходимо выяснить, насколько фермент чувствителен к ядерному спину магнитного изотопа магния. В настоящей работе изучены спектры биолюминесценции и ферментативная активность люциферазы светляков в присутствии магнитного (<sup>25</sup>Mg) и немагнитных (<sup>24</sup>Mg и <sup>26</sup>Mg) изотопов магния. Установлено, что кинетика реакции окисления люциферина, катализируемой люциферазой, и спектры биолюминесценции не зависят от типа изотопа магния. Таким образом, магнитно-изотропные эффекты в люциферазной реакции не были обнаружены. Следовательно, биолюминесцентный метод может быть использован для поиска и изучения магнитно-изотопных эффектов в АТФ-зависимых ферментативных реакциях в биологических системах, включая ферментативный синтез и гидролиз АТФ.

**Ключевые слова:** люцифераза светляков, люциферин, комплекс АТФ–Mg, магнитно-изотопный эффект, магний.

**Принятые в статье сокращения:** МИЭ – магнитно-изотопный эффект, АТФ – аденозин-5'-трифосфат, P<sub>i</sub> – неорганический фосфат, <sup>np</sup>MgCl<sub>2</sub> – хлорид магния природного изотропного обогащения.

Клетки и ткани состоят из химических элементов, некоторые из них имеют два типа стабильных изотопов: магнитные и немагнитные. Атомные ядра некоторых магнитных изотопов создают магнитные поля (на расстоянии порядка длины химической связи), превышающие в десятки раз магнитное поле Земли (~0,05 мТ) [1]. Например, магний имеет три стабильных изотопа (<sup>24</sup>Mg; <sup>25</sup>Mg и <sup>26</sup>Mg с природным содержанием 78,70; 10,13 и 11,17% соответственно), один из которых (<sup>25</sup>Mg) обладает магнитным спином ( $I = 5/2$ ) и, как следствие, создает магнитное поле, в то время как два других (<sup>24</sup>Mg и <sup>26</sup>Mg) магнитным спином не обладают ( $I = 0$ ) и являются немагнитными [1]. Катион магния (Mg<sup>2+</sup>) служит кофактором многих важных фер-

ментов, в том числе ферментов синтеза и гидролиза АТФ. Недавно были обнаружены магнитно-изотопные эффекты (МИЭ) магния в живых клетках [2, 3]. Клетки дрожжей *S. cerevisiae*, обогащенные магнитным изотопом магния (<sup>25</sup>Mg) восстанавливаются после облучения коротковолновым ультрафиолетовым светом в два раза быстрее, чем клетки, обогащенные немагнитным изотопом магния [2]. В экспериментах с другой клеточной моделью, бактериями *E. coli*, было обнаружено, что клетки значительно быстрее адаптируются к среде, обогащенной магнитным изотопом магния по сравнению со средой, обогащенной немагнитным изотопом [3].

Хорошо известно, что для адаптации клеток к стрессовым условиям (пострадиационное

восстановление, пересадка на новую среду роста) нужен АТФ – главный источник энергии в клетке. На основании этого рационально предположить, что МИЭ, обнаруженные в экспериментах с живыми клетками, обусловлены более высокой эффективностью ферментов в клетках, обогащенных магнитным изотопом магния. Способность контролировать скорость реакций образования и разрушения АТФ посредством магнитных изотопов и магнитных полей может найти терапевтическое применение [4–6].

При изучении МИЭ в биологических системах необходим мониторинг концентрации АТФ или продукта его синтеза или гидролиза. Для этого используют разные методы. Например, определяют концентрацию неорганического фосфата ( $P_i$ ), образующегося в ходе реакции гидролиза АТФ, с помощью радиоактивной метки  $^{32}P$  [7], в сочетании с HPLC-разделением радиоактивных продуктов. Этот метод достаточно сложен и кропотлив, требует специальной пробоподготовки и специального оборудования для работы с радиоактивной меткой. Альтернативным методом мониторинга концентрации АТФ является метод Фиске–Суббароу, который основан на измерении концентрации окрашенного комплекса молибдата аммония с неорганическим фосфатом ( $P_i$ ), высвобождаемым в ходе реакции гидролиза АТФ. Однако данный метод обладает относительно низкой чувствительностью [8].

В настоящее время как наиболее чувствительный, надежный и простой в исполнении способ определения концентраций АТФ в биологических системах можно рассматривать биолюминесцентный люциферин-люциферазный метод [9, 10]. Люцифераза светлячков катализирует реакцию окисления люциферина молекулярным кислородом в присутствии комплекса АТФ с магнием ( $Mg-ATP$ ). Оксилуциферин (продукт реакции) образуется в синглетном электронно-возбужденном состоянии, и его переход в основное состояние сопровождается излучением кванта света в видимой области спектра [11]. При этом интенсивность свечения в присутствии люциферазы, люциферина и  $O_2$  прямо пропорциональна концентрации АТФ и служит показателем содержания АТФ в реакционной смеси [12]. Биолюминесцентный метод был использован в работе [13] для изучения влияния изотопов магния на образование АТФ в реакции, катализируемой креатин фосфокиназой. Реакционную смесь, содержащую АТФ

и изотопы магния, перед измерением биолюминесценции разбавляли более чем в 200 раз. Важно отметить, что после разбавления концентрации изотопных форм магния становились пренебрежимо малы по сравнению с концентрацией природного магния, содержащегося в люциферин-люциферазном реагенте (5 мМ), а потому не могли повлиять на детектируемый сигнал. Поскольку люцифераза является АТФ-зависимым ферментом и активируется ионами магния, то для использования данного метода без большого разбавления реакционной смеси (например, при анализе более низких концентраций АТФ), необходимо выяснить, насколько сама люциферазная реакция чувствительна к ядерному спину магнитного изотопа магния. В настоящей работе представлены результаты изучения влияния магнитного ( $^{25}Mg$ ) и немагнитных ( $^{24}Mg$  и  $^{26}Mg$ ) изотопов на спектры биолюминесценции и ферментативную активность люциферазы светлячков.

### Материалы и методы

**Использованные вещества.** В работе были использованы оксиды магния  $^{24}MgO$ ,  $^{25}MgO$  и  $^{26}MgO$  с изотопным обогащением 99,8; 98,2 и 99,7 атом.% соответственно («Электрохимприбор», Россия); хлорид магния ( $MgCl_2$ ) природного изотопного состава («Мерск», Германия); динатриевая соль аденозин-5'-трифосфата (АТФ); бычий сывороточный альбумин (БСА); этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) и трегалоза («Sigma Aldrich», США); D-люциферин ( $LH_2$ ) и термостабильная мутантная люцифераза светлячков *Luciola mingrelica* («Люмтек», Россия). Остальные реагенты имели аналитическую чистоту. Для приготовления растворов использовали деионизированную воду, очищенную системой «Milli-Q». Биолюминесцентный анализ проводили в полистирольных 96-луночных планшетах с поверхностью средней сорбционной емкости («Greiner», Германия).

**Изотопный состав магния и элементный состав образцов.** Базовые растворы хлоридов магния  $^{24}MgCl_2$ ,  $^{25}MgCl_2$  и  $^{26}MgCl_2$  были приготовлены по стандартной методике [14] из соответствующих оксидов магния ( $^{24}MgO$ ,  $^{25}MgO$  и  $^{26}MgO$ ) с использованием концентрированной  $HCl$  аналитической чистоты. Концентрацию магния в базовых растворах измеряли методом атомной эмиссионной спектроскопии (ICP-AES), после чего все растворы выравняли по концентрации магния. Изотопный со-

став магния в растворах определяли методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ICP-MS) на спектрометре «X-Series II ICP-MS» («Thermo Scientific», США), как описано в работе [15]. Содержание Li, Na, Mg, Al, P, S, K, Ca, V, Mn, Fe, Cu, Zn, Sr и Ba определяли, используя спектрометр для атомной эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (ICP-AES) «iCAP-6500 Dual» («Thermo Scientific», США). Содержание B, Be, Al, Sc, Ti, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Ge, As, Se, Br, Rb, Sr, Y, Zr, Nb, Mo, Ru, Rh, Pd, Ag, Cd, In, Sn, Sb, Te, Cs, Ba, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Hf, Ta, W, Re, Os, Ir, Pt, Au, Hg, Tl, Pb, Bi, Th и U определяли методом ICP-MS [15].

**Измерения биолюминесценции.** Для измерения биолюминесценции в отсутствие стабилизаторов все растворы были приготовлены в Трис-ацетатном буфере (50 мМ, pH 7,8), содержащем 2 мМ ЭДТА. В люминометрическую кювету вносили 100 мкл раствора  $MgCl_2$  (50 мМ), 200 мкл раствора АТФ (2,5 мМ), 50 мкл раствора люциферазы (0,01 мг/мл), содержащего 1% БСА, и перемешивали. Далее инжестрировали 150 мкл 0,5 мМ раствора люциферина ( $LH_2$ ) в том же буфере и регистрировали интенсивность биолюминесценции в режиме реального времени на люминометре FB 12 Femtomaster «Zylux Corp» («Bertold», Германия). Для измерения интенсивности биолюминесценции и получения спектров в присутствии стабилизаторов был приготовлен раствор LLTA, содержащий  $LH_2$  (0,5 мМ) и люциферазу (50 нМ) в Трис-ацетатном буфере (150 мМ, pH 7,8) с БСА (1,5%), трегалозой (270 мг/мл), ЭДТА (2 мМ),  $Na_4P_2O_7$  (75 мкМ). Для измерения биолюминесцентного сигнала при разной концентрации магния к 30 мкл раствора LLTA добавляли 20 мкл водного раствора  $MgCl_2$  с концентрацией

0,5–50 мМ. Затем вносили 50 мкл 2 мМ водного раствора АТФ, интенсивно перемешивали и регистрировали биолюминесцентный сигнал на люминометре FB 12 Femtomaster «Zylux Corp». Для измерения биолюминесцентного сигнала и регистрации спектров биолюминесценции при разных концентрациях АТФ к 30 мкл LLTA добавляли 20 мкл 25 мМ водного раствора  $^{24}MgCl_2$  или  $^{25}MgCl_2$ . Затем вносили 50 мкл водного раствора АТФ, концентрация которого варьировала от  $2 \cdot 10^{-3}$  до  $2 \cdot 10^{-7}$  М, и регистрировали биолюминесцентный сигнал на спектрометре «Spectramax M5» («Molecular Devices», США).

**Обработка результатов измерений.** Для проведения анализа экспериментальных данных использовали стандартные методы дисперсионного анализа (ANOVA), а также программы MS Office, OriginPro 8.6 и Statistica 4.5.

## Результаты

**Изотопный состав магния в базовых растворах.** Изотопный состав препаратов магния в реакционных растворах, использованных для измерений биолюминесценции, представлен в табл. 1. Эти данные однозначно свидетельствуют о высокой степени обогащения этих растворов изотопами  $^{24}Mg$ ,  $^{25}Mg$  и  $^{26}Mg$ .

**Кинетика биолюминесценции в присутствии различных изотопов магния.** Ранее было показано, что при высоких концентрациях субстратов кинетика биолюминесценции описывается кривой с максимумом [16]. Исследование таких кривых представляет интерес для выяснения закономерностей влияния различных условий и факторов (в том числе, различных изотопов магния) на ферментативную активность. Однако для практического применения люциферазной реакции, в частности для количественного определения АТФ в пробе, необходим высокий, стабильный во времени биолюминесцентный

Таблица 1

**Изотопный состав базовых растворов хлорида магния. Представлены средние значения  $\pm$  среднее квадратичное отклонение ( $m \pm SD$ ); число независимых измерений в каждом растворе  $n = 5$**

| Изотоп    | Изотопное обогащение, % |                |                 |                 |
|-----------|-------------------------|----------------|-----------------|-----------------|
|           | природный Mg            | $^{24}MgCl_2$  | $^{25}MgCl_2$   | $^{26}MgCl_2$   |
| $^{24}Mg$ | 79,2 $\pm$ 0,4          | 99,7 $\pm$ 0,1 | 0,17 $\pm$ 0,02 | 0,16 $\pm$ 0,03 |
| $^{25}Mg$ | 10,1 $\pm$ 0,1          | 1,3 $\pm$ 0,1  | 98,2 $\pm$ 0,2  | 0,46 $\pm$ 0,1  |
| $^{26}Mg$ | 10,7 $\pm$ 0,2          | 1,1 $\pm$ 0,1  | 0,22 $\pm$ 0,1  | 98,7 $\pm$ 0,3  |

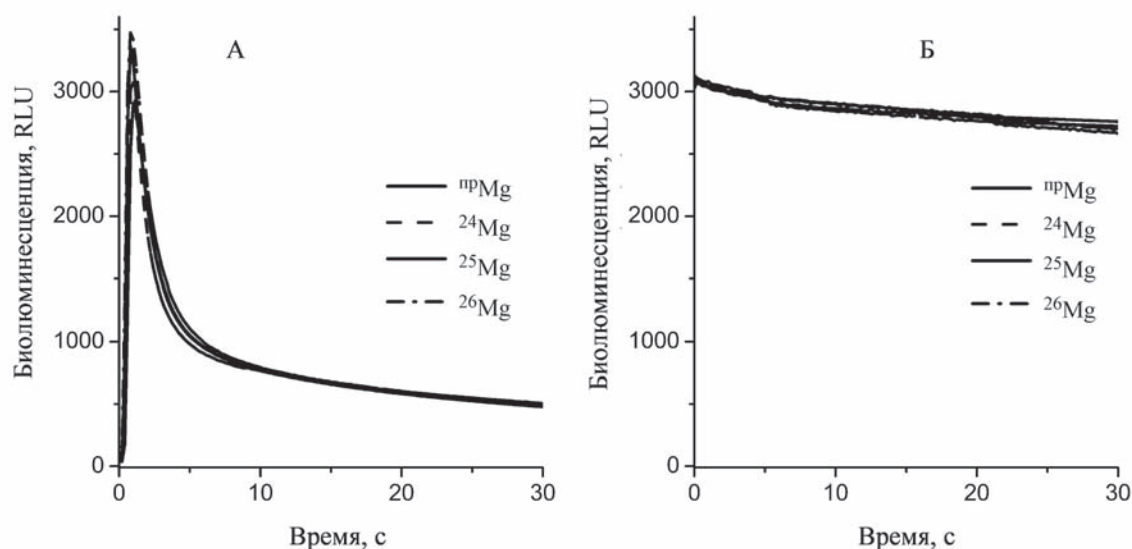


Рис. 1. Зависимость от времени интенсивности сигнала биоломинесценции растворов с разными изотопами магния. Состав реакционной смеси: Трис-ацетат (50 мМ, pH 7,8), ЭДТА (2 мМ), БСА (0,1%), люцифераза (1 мкг/мл), растворы АТФ и люциферин насыщающих концентраций (1 мМ АТФ и 0,15 мМ люциферин),  $\text{MgCl}_2$  (5 мМ). В отсутствие стабилизаторов (А); в присутствии 25 мкМ  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 0,5 % БСА и 80 мг/мл трегалозы в качестве стабилизаторов (Б)

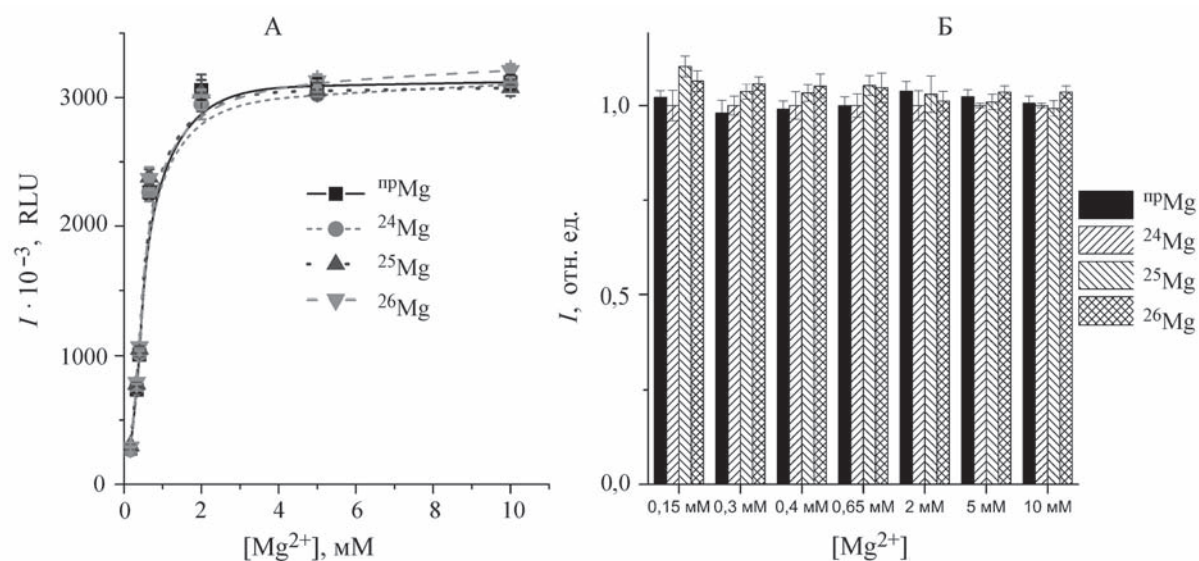


Рис. 2. Зависимости интенсивности биоломинесценции от концентрации ионов магния, полученные для разных изотопов магния: в абсолютных единицах интенсивности, RLU (А); в относительных единицах (Б). Для каждой концентрации изотопов магния за 1 принимали биоломинесцентный сигнал, полученный для  $^{24}\text{Mg}$ . Состав реакционной смеси: Трис-ацетат (50 мМ, pH 7,8), ЭДТА (2 мМ), люцифераза (1 мкг/мл), АТФ (1 мМ), люциферин (0,15 мМ),  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  (25 мкМ), БСА (0,5%) и трегалоза (80 мг/мл). Представлены средние значения  $\pm$  среднее квадратичное отклонение ( $m \pm \text{SD}$ ); число независимых измерений в каждом растворе  $n = 5$

сигнал. Для решения этой задачи в нашей лаборатории был разработан специальный состав АТФ-реагента [17]. На рис. 1 представлены кинетические кривые зависимости интенсивности биоломинесцентного сигнала от времени в экспериментах с разными изотопами магния. Были проведены две серии экспериментов: в присут-

ствии (А) и в отсутствие (Б) стабилизирующих добавок (пирофосфата натрия и трегалозы).

Как следует из данных рис. 1, форма кинетической кривой и величина интенсивности биоломинесценции не зависят от природы изотопа магния. Использование стабилизирующих добавок обеспечивает высокое стабильное значе-

ние сигнала биолюминесценции. Поэтому все дальнейшие эксперименты были проведены с помощью буферных растворов, содержащих стабилизирующие добавки. На рис. 2 представлены зависимости интенсивности биолюминесценции от концентрации ионов магния разных изотопов ( $^{24}\text{Mg}$ ,  $^{25}\text{Mg}$ ,  $^{26}\text{Mg}$  или  $^{np}\text{Mg}$ ) в присутствии насыщающих концентраций люциферина и АТФ.

Согласно полученным данным, интенсивность биолюминесценции с увеличением концентрации ионов магния растет с выходом на плато при концентрации более 2 мМ. Статистически значимые изотопные эффекты не обнаружены. Чтобы исключить возможную ошибку измерения, обусловленную зависимостью интенсивности биолюминесценции от концентрации ионов магния, и обеспечить более высокую точность измерений концентрации АТФ, дальнейшие эксперименты выполняли в присутствии  $\text{MgCl}_2$  (5 мМ) в реакционной смеси. Для магнитного ( $^{25}\text{Mg}$ ) и немагнитного ( $^{24}\text{Mg}$ ) изотопов магния были получены зависимости интенсивности биолюминесценции от концентрации АТФ в широком диапазоне концентраций ( $10^{-7}$ – $10^{-4}$  М АТФ) (рис. 3, а). Для каждого из использованных растворов были зарегистрированы спектры биолюминесценции (рис. 3, б). В данном случае анализ спектров был не-

обходим, поскольку фотоэлектронный умножитель люминометра имеет в «зеленой» области спектра более высокую чувствительность, чем в «красной», что может вызвать изменения интегрального сигнала биолюминесценции [16]. Однако полученные результаты свидетельствуют о том, что изотопный состав ионов магния не влияет ни на зависимость интенсивности биолюминесценции от концентрации АТФ, ни на форму спектров биолюминесценции. Все полученные спектры имели форму спектра биолюминесценции раствора с 0,1 мМ АТФ (рис. 3, б). Магнитно-изотопных эффектов обнаружено не было.

**Элементный состав реакционных сред для измерений биолюминесцентного сигнала.** Известно, что в присутствии больших концентраций многоэлектронных парамагнитных ионов, таких как ионы железа, наблюдение МИЭ становится невозможным. Это обусловлено тем, что локальные магнитные поля, создаваемые электронными спин-орбитальными моментами в этих ионах, существенно превосходят магнитное поле ядерного спина [18]. Поэтому можно было бы предположить, что отсутствие МИЭ в люциферин-люциферазной системе объясняется наличием в реакционной среде высоких концентраций парамагнитных ионов. Однако это предположение опровергают результаты элементного анализа реакционных растворов,

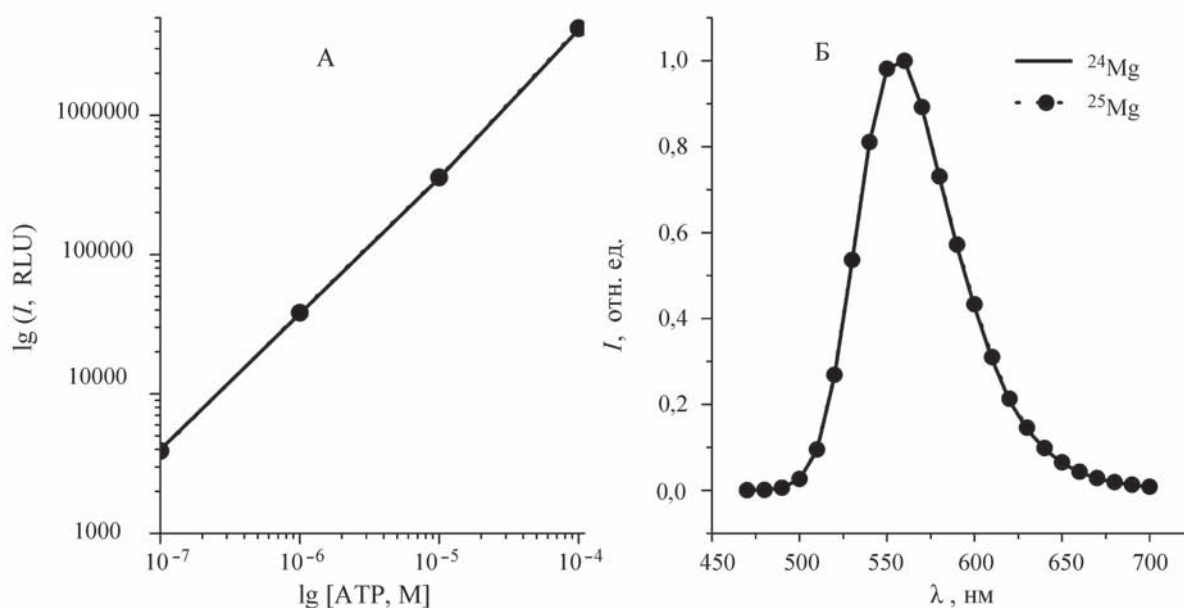


Рис. 3. Зависимость биолюминесцентного сигнала от концентрации АТФ (а); нормированные спектры биолюминесценции в экспериментах с двумя различными изотопами магния при концентрации АТФ 0,1 мМ (б). Состав реакционной смеси: Трис-ацетат (50 мМ, рН 7,8), ЭДТА (2 мМ), люцифераза (1 мкг/мл), люциферин (0,15 мМ),  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  (25 мкМ), БСА (0,5 %) и трегалоза (80 мг/мл)

Т а б л и ц а 2

**Элементный анализ состав реакционной смеси: 0,15 мМ  $\text{LH}_2$ , 1 мМ АТФ, 1 мкг/мл люцифераза, Три-ацетат (0,05 М, рН 7,8), ЭДТА (2 мМ),  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  (25 мкМ), БСА (0,5%), трегалоза (80 мг/мл),  $^{24}\text{MgCl}_2$ ,  $^{25}\text{MgCl}_2$  или  $^{26}\text{MgCl}_2$  (5 мМ); показаны средние величины пяти измерений**

| Элемент | Предел обнаружения, мг/л | Содержание в реакционной смеси, мг/л |                  |                  |
|---------|--------------------------|--------------------------------------|------------------|------------------|
|         |                          | $^{24}\text{Mg}$                     | $^{25}\text{Mg}$ | $^{26}\text{Mg}$ |
| Na      | 0,4                      | 64,0                                 | 64,7             | 65,8             |
| Mg      | 0,4                      | 116,8                                | 120,3            | 131,1            |
| P       | 1                        | 92,8                                 | 92,4             | 96               |
| S       | 1                        | 57,7                                 | 59,4             | 60,3             |
| K       | 1                        | 4,6                                  | 4,8              | 5,2              |
| Cu      | 0,09                     | 0,28                                 | 0,28             | 0,31             |

использованных для измерения интенсивности биолюминесценции. Было показано, что содержание большинства примесных элементов, включая парамагнитные ионы V, Cr, Mn и Fe, ниже порога определения. Хотя содержание меди и превышает порог определения, но его концентрация (0,004–0,005 мМ) в 1000 раз меньше концентрации ионов магния в реакционной смеси, т.е. слишком мала, чтобы элиминировать магнитно-изотопный эффект [18], если бы такой имел место в изучаемой реакции (табл. 2). Таким образом, с точностью в пределах экспериментальной ошибки можно сделать вывод о том, что тип изотопа (магнитный или немагнитный) не влияет на сигнал биолюминесценции и форму кинетической кривой.

### Обсуждение результатов

В химической физике магнитно-изотопные эффекты давно и хорошо известны. В частности, скорость и выход продуктов химической реакции с участием свободных радикалов и/или ион-радикальных пар существенно изменяются в зависимости от того, содержат ли исходные реагенты магнитный или немагнитный изотоп одного и того же элемента, например углерода (магнитный  $^{13}\text{C}$  / немагнитный  $^{12}\text{C}$ ), кислорода ( $^{16,18}\text{O}$  /  $^{17}\text{O}$ ) и ряда других элементов, в том числе урана ( $^{235}\text{U}$  /  $^{238}\text{U}$ ) [6]. Этот эффект является прямым следствием закона сохранения электронного углового момента – спина, т.е. для прохождения реакции необходимо, чтобы суммарный электронный спин ( $S$ ) продуктов был равен суммарному спину исходных реагентов. Чтобы снять спиновый запрет, наложенный законом сохранения спина, необходимо изменить спиновое состояние реагентов. Если спин-

орбитальное взаимодействие слабое, как это имеет место в органических радикалах, и нет парамагнитных ионов, то единственный способ обеспечения спиновой конверсии – это внешнее магнитное поле или поле ядерного спина атомного ядра [6]. Аналогичный спиновый запрет возникает при синглет-триплетных переходах в молекулах, и единственный способ устранить его (изменить спиновое состояние и тем самым ускорить синглет-триплетный переход) заключается в наложении магнитного поля [5, 6].

В целях обнаружения МИЭ в АТФ- и Mg-зависимых реакциях были поставлены эксперименты с изолированной креатинфосфокиназой [19]. Данный фермент катализирует перенос фосфатной группы с креатинфосфата на АДФ и обратный ему процесс гидролиза АТФ. С использованием метода радиоактивной метки  $^{32}\text{P}$  авторами работы [19] было установлено, что в реакции фосфорилирования АДФ (синтез АТФ) выход АТФ выше в два–три раза с магнитным изотопом магния ( $^{25}\text{Mg}$ ), чем в аналогичной реакции с немагнитными изотопами ( $^{24}\text{Mg}$  и  $^{26}\text{Mg}$ ). В обратной реакции гидролиза АТФ, катализируемой тем же ферментом, МИЭ не наблюдался [19]. Влияние различных изотопов магния на катализируемую креатинфосфокиназой реакцию фосфорилирования АДФ было изучено позднее британской группой биохимиков в двух независимых сериях экспериментов, где концентрации АТФ определяли люциферин-люциферазным методом или методом спектрофотометрии в режиме реального времени. МИЭ не был обнаружен: скорости образования АТФ по реакциям с немагнитным ( $^{24}\text{Mg}$ ) и магнитным ( $^{25}\text{Mg}$ ) изотопами магния не отличались [13].

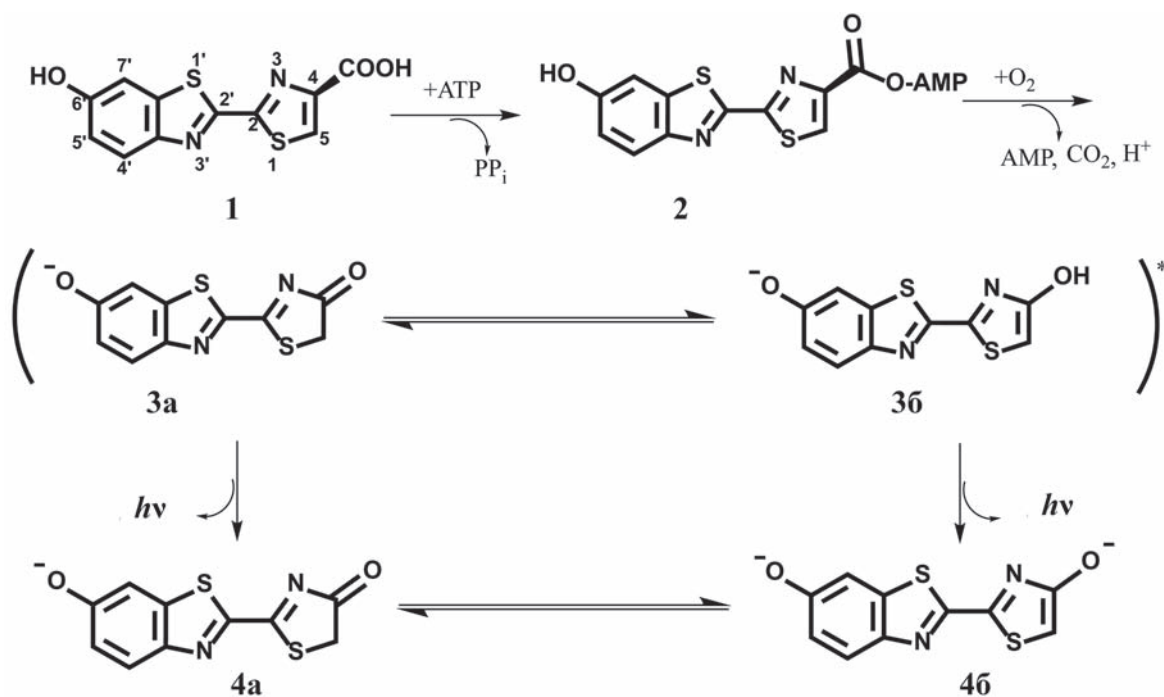


Рис. 4. Схема реакции окисления люциферина в присутствии люциферазы светляков и АТФ

Недавно МИЭ был обнаружен в реакции гидролиза АТФ, катализируемой миозином [20]. АТФ-гидролазная активность фермента была измерена с помощью метода Фиске–Суббароу. Скорость реакции гидролиза АТФ, катализируемой этим ферментом, в присутствии <sup>25</sup>Mg оказалась в 2–2,5 раза выше, чем скорость той же реакции в присутствии немагнитных изотопов (<sup>24</sup>Mg или <sup>26</sup>Mg). Полученные результаты можно объяснить следующим образом. Миозин катализирует реакцию гидролиза АТФ до АДФ и неорганического фосфата (P<sub>i</sub>). Энергия, высвобождаемая при гидролизе АТФ, запасается в виде энергии конформационного возбуждения макромолекулы миозина с последующим использованием ее для выполнения механической работы. Энергия гидролиза АТФ (~0,54 эВ) недостаточно велика для электронно-конформационного возбуждения макромолекулы миозина в синглетное состояние. Этой энергии достаточно для получения низколежащего триплетного состояния, но переход из основного состояния (*S* = 0) в триплетное (*S* = 1) запрещен законом сохранения спина. Ядерный спин <sup>25</sup>Mg устраняет проблему спинового запрета, обеспечивая таким образом необходимую спиновую конверсию в триплетное состояние и ускоряя тем самым гидролиз АТФ миозином [5, 20].

В случае окисления люциферина, катализируемого люциферазой светляков, реакция проходит в две стадии [11]. На первой стадии люцифераза, в отличие от миозина, гидролизует АТФ не до АДФ и фосфата, а до монофосфата и пирофосфата. При этом за счет энергии гидролиза происходит аденилирование люциферина с образованием люцифериладенилата (рис. 4).

На второй стадии люцифериладенилат через ряд промежуточных стадий окисляется кислородом воздуха, превращаясь в циклический пероксид – диокситанон [11]. Трансформация диокситанона приводит к образованию бирадикала, в результате декарбоксилирования которого образуется продукт реакции – оксилуциферин (3) в форме кетона или енола, в синглетном электронно-возбужденном состоянии. Переход этих эмиттеров в основное состояние сопровождается излучением красного (кетон) или желто-зеленого (енол) света (4). В зависимости от структуры и свойств микроокружения оксилуциферина в активном центре люциферазы соотношение концентраций двух эмиттеров может изменяться, что определяет параметры спектров биолюминесценции конкретной формы люциферазы в тех или иных условиях [21, 22]. В работе [16] было показано, что стадией, лимитирующей скорость реакции является окисле-

ние люцифериладенилата. Можно предположить, что влияние магнитного спина на «суммарный процесс» окисления люциферина можно было бы наблюдать на стадии окисления люцифериладенилата в оксилюциферин с последующим его переходом в основное состояние с испусканием кванта света. Однако полученные данные свидетельствуют об отсутствии влияния ядерного спина магния  $^{25}\text{Mg}$  как на переход продукта реакции (электронно-возбужденного оксилюциферина) в основное состояние (независимость интенсивности биолюминесценции), так и на стабилизацию одной из форм эмиттера (отсутствие изменения спектров биолюминесценции). Более того, полученные результаты хорошо согласуются с выводами, представленными ранее в работе [23], о том, что регуляция каталитической активности люциферазы светляков ионами магния осуществляется на стадии аденилирования, где происходит двухцентровое связывание комплекса  $[\text{Mg-ATP}]$  с молекулой люциферазы и, следовательно, влияние изотопов магния вряд ли будет проявляться на стадии окисления промежуточного продукта реакции – люцифериладенилата.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального агентства научных исследований (проект № 0120-1361-868) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 14-04-00593).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grant D.M., Harris R.K. // Encyclopedia of nuclear magnetic resonance. Chichester, 1996. P. 826.
2. Авдеева Л.В., Кольтовер В.К. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2016. Т. 57. № 3. С. 145.
3. Кольтовер В.К., Шевченко У.Г., Авдеева Л.В., Ройба Е.А., Бердинский В.Л., Кудряшова Е.А. // Докл. АН. 2012. Т. 442. № 2. С. 272.
4. Кольтовер В.К. // Изв. АН. Сер. хим. 2014. № 5. С. 1029.
5. Koltover V.K. // J. Mol. Liq. 2017. Vol. 235. P. 44.
6. Buchachenko A.L. // Magneto-biology and medicine. N.Y., 2015. P. 247.
7. Post R.L., Estabrook A.K.S.R.W., Pullman M.E. // Meth. Enzymol. 1967. Vol. 10. P. 773.
8. Chen P.S., Toribara T.Y., Warner H. // Anal. Chem. 1956. Vol. 28. P. 1756.
9. Deluca M., McElroy W.D. // Meth. Enzymol. 1978. Vol. 57. P. 3.
10. Lundin A. // Meth. Enzymol. 2000. Vol. 305. P. 346.
11. Ugarova N.N. // J. Biolum. Chemilum. 1989. Vol. 4. P. 406.
12. Ломакина Г.Ю., Модестова Ю.А., Угарова Н.Н. // Биохимия 2015. Т. 80. № 6. С. 829.
13. Crotty D., Silkstone G., Poddar S., Ranson R., Prina-Mello A., Wilson M.T., Coey J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. Vol. 109. P. 1437.
14. Карякин Ю.В., Ангелов И.И. // Чистые химические вещества. М., 1974. С. 408
15. Карандашев В.К., Туранов А.Н., Орлова Т.А., Лежнев А.Е., Носенко С.В., Золоторева Н.И., Москвина И.Р. // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2007. Т. 73. № 1. С. 12.
16. Бровко Л.Ю., Гандельман О.А., Поленова Т.Е., Угарова Н.Н. // Биохимия. 1994. Т. 59. № 2. С. 273.
17. Угарова Н.Н., Кокишаров М.И., Ломакина Г. Ю. // Пат. РФ 2420594. 2009.
18. Buchachenko A. // Bioelectromagnetics 2016. Vol. 37. P. 1.
19. Buchachenko A.L., Kouznetsov D.A., Breslavskaya N.N., Orlova M.A. // J. Phys. Chem. B 2008. Vol. 112. P. 2548.
20. Кольтовер В.К., Лабынцева Р.Д., Карандашев В.К., Костерин С.О. // Биофизика. 2016. Т. 61. № 2. С. 239.
21. Ugarova N.N. // Photochem. Photobiol. Sci. 2008. Т. 7. P. 218.
22. Snellenburg J.J., Laptinok S.P., DeSa R.J., Naumov P., Solntsev K.M. // J. Am. Chem. Soc. 2016. Vol. 138. P. 16252.
23. Духович А.Ф., Угарова Н.Н., Березин И.В., Филиппова Н.Ю. // ДАН СССР. Биохимия. 1986. Т. 288. № 6. С. 1500.



## FIREFLY LUCIFERASE BIOLUMINESCENCE AS A TOOL FOR SEARCHING MAGNETIC ISOTOPIC EFFECTS IN ATP-DEPENDENT ENZYME REACTIONS

D.V. Smirnova<sup>1</sup>, V.K. Koltover<sup>2</sup>, S.V. Nosenko<sup>3</sup>, I.A. Strizhova<sup>1,2</sup>, N.N. Ugarova<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> *M.V. Lomonosov State University*; <sup>2</sup> *Institute of Problems of Chemical Physics, RAS*; <sup>3</sup> *Institute of Microelectronics Technology and High Purity Materials*; \*e-mail: *nugarova@gmail.com*)

Cells and tissues are composed from atoms of chemical elements, some of which have two kinds of stable isotopes, magnetic and nonmagnetic ones. Not long ago, magnetic isotope effects (MIEs) have been discovered in experiments with the cells enriched with magnetic or nonmagnetic isotopes of magnesium. These MIEs can stem from higher efficiency of the enzymes in the cells enriched with magnetic magnesium isotope. In the studies of MIEs in biological systems, it is needed to monitor the ATP concentrations as the major energy currency in cells. The most sensitive and rapid method of the ATP assay is based on the use of the firefly luciferase-luciferin system. Since luciferase is the ATP-dependent enzyme and activated by Mg-ions, it is necessary to elucidate whether this enzyme is sensitive to magnetic field of the magnesium isotope's nuclear spin. Herein we present the results of studying the effects of different isotopes of magnesium, magnetic <sup>25</sup>Mg and nonmagnetic <sup>24</sup>Mg and <sup>26</sup>Mg, on bioluminescence spectra and enzymatic activity of firefly luciferase. It was shown, that neither kinetics of the bioluminescence nor the bioluminescence spectra have manifested any statistically significant dependence on the type of magnesium isotope. So, no MIEs have been revealed in the luciferase-catalyzed oxidation of luciferin. It means that firefly luciferase bioluminescence can serve as the tool for search and studies of magnetic isotope effects in ATP-dependent enzyme reactions in biological systems, including the enzymatic synthesis and hydrolysis of ATP.

**Key words:** firefly luciferase, luciferin, ATP-Mg, magnetic isotope effect, magnesium

**Сведения об авторах:** *Смирнова Дарья Васильевна* – науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (*S\_mir\_nova@mail.ru*); *Кольтовер Виталий Кимович* – глав. науч. сотр. отдела кинетики и катализа Института проблем химической физики РАН, докт. биол. наук, (*koltover@icp.ac.ru*); *Носенко Сергей Всеволодович* – ст. науч. сотр. Института проблем технологии микроэлектроники и особо чистых материалов РАН, канд. физ.-матем. наук (*nosenko@iptm.ru*); *Стрижова Ирина Александровна* – студентка физико-химического факультета МГУ (*strizh184@mail.ru*); *Угарова Наталья Николаевна* – глав. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, докт. хим. наук (*nugarova@gmail.com*).