

УДК 577.152

ЭМИТТЕР КАК ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНАЯ МЕТКА В АКТИВНОМ ЦЕНТРЕ ЛЮЦИФЕРАЗЫ СВЕТЛЯКОВ

Н.Н. Угарова^{1*}, Г.Ю. Ломакина^{1,2}

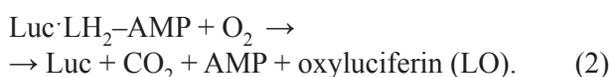
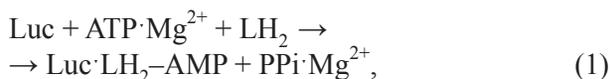
(¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии; ² МГТУ имени Н.Э. Баумана; *e-mail: nugarova@gmail.com)

Особенность биолюминесценции люцифераз светляков заключается в сложных изменениях формы спектров и λ_{\max} биолюминесценции при варьировании pH, температуры, структуры фермента. Анализ литературных данных и собственных результатов авторов приводит к выводу, что наиболее достоверно объясняет наблюдаемые сложные спектральные изменения кето-енольная таутомерия молекулы оксилюциферина. В активном центре фермента образуется только одна молекула электронно-возбужденного продукта, поэтому эмиттер можно рассматривать как внутримолекулярную метку, характеризующую свойства микроокружения эмиттера в активном центре фермента. Суперпозиция двух или трех форм эмиттера, фиксируемых в спектрах биолюминесценции, указывает на сосуществование в реакционной среде различных конформационных форм люциферазы, находящихся в динамическом равновесии. Анализ спектров биолюминесценции позволяет идентифицировать качественно и количественно различные конформеры фермента и их изменение при варьировании внешних условий и структуры люциферазы.

Ключевые слова: биолюминесценция, люцифераза светляков, кето-енольная таутомерия, оксилюциферин.

Использованные в статье сокращения: АТФ – аденозин-5'-трифосфат, АМФ – аденозин-5'-монофосфат, Luc – люцифераза, LH₂ – люциферин, LO – оксилюциферин, M-LO – монометил-оксилюциферин, DM-LO – диметил-оксилюциферин.

Термины «люциферин» и «люцифераза» впервые появились в 1875 г. в публикации французского ученого Дюбуа, который исследуя биолюминесценцию экстрактов ряда светящихся организмов, установил, что для генерации свечения необходимы фермент (люцифераза), содержащийся в экстракте, полученном при низкой температуре, и субстрат (люциферин), полученный экстракцией при кипячении. Современный период изучения люциферин-люциферазной системы светляков начался в сороковые годы XX в. [1]. Было показано, что биолюминесценция светляков генерируется при наличии в системе четырех компонентов: фермента люциферазы (Luc), субстрата – люциферина (LH₂), АТФ·Mg²⁺ и кислорода. В продуктах реакции были обнаружены пирогосфат (PPi) и АМФ, на основании чего была предложена схема люциферазной реакции, которая широко применяется и в настоящее время [2, 3].



Изучение структур субстрата – люциферина [4, 5], промежуточного продукта – аденилат люциферина [6], а также использование модельных хемиллюминесцентных систем позволило предложить схему и механизм люциферазной реакции, что стало предметом исследования многих авторов [7] (рис. 1).

Интерес к изучению спектров биолюминесценции и структуры эмиттера в люциферин-люциферазной системе светляков возник уже в первых работах по изучению механизма люциферазной реакции. Анализ зависимости спектров эмиссии от pH показал, что при pH 7,6 спектр биолюминесценции *in vitro* идентичен со спектром биолюминесценции *in vivo*, но сдвигается в красную область при подкислении среды. Для светляков в природе $\lambda_{\max, \text{em}}$ варьирует в широких пределах (от 545 до 610 нм), а это означает, что спектры биолюминесценции определяются микроокружением эмиттера в активном центре фермента [8]. В последующих работах было показано, что спектры хемиллюминесценции люциферина и его аналогов в растворе ДМСО в присутствии оснований сходны со спектрами флуоресценции продуктов окисления данных соединений. Это позволило широко

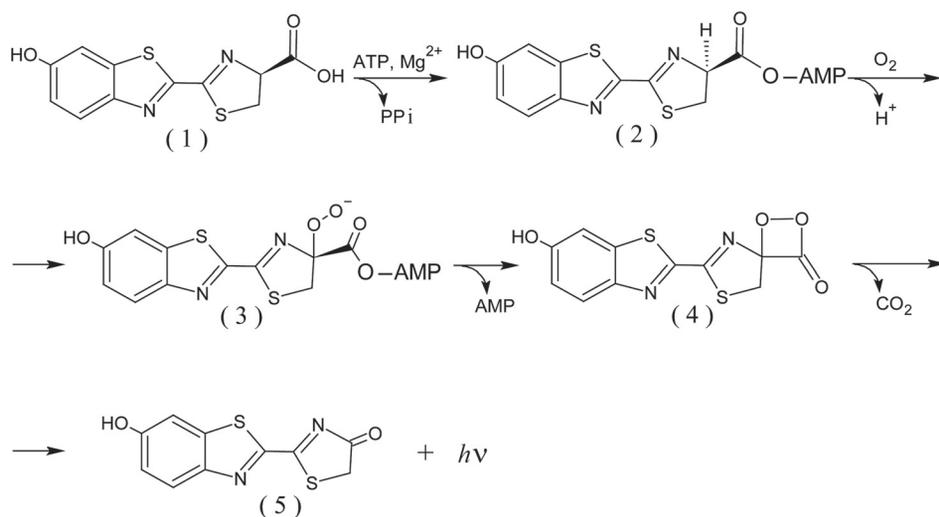


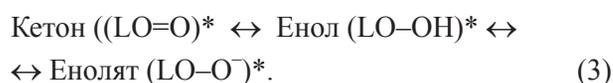
Рис. 1. Схема ферментативного окисления люциферина: (1) – люциферин, (2) – люциферил аденилат, (3) – промежуточное гидропероксидное производное люциферил аденилата, (4) – диоксетанон, (5) – оксилуциферин в форме кетона

использовать спектральные методы для идентификации структуры возможных эмиттеров биолюминесценции светляков. Было установлено [9–11], что одна из причин варибельности спектров биолюминесценции заключается в особой структуре продукта реакции, оксилуциферина, для которого реализуется кето-енольная таутомерия, благодаря чему это соединение может существовать в шести различных формах (рис. 2).

Анализ спектров поглощения стационарной и времязрешенной флуоресценции оксилуциферина и его аналогов (6'-метоксилюциферина и 2-циано-6-гидроксибензотиазола (ВТ)) в водных растворах в интервале pH 1–10 [12–13] позволил идентифицировать три эмиттера флуоресценции оксилуциферина: синий – фенол (очень слабая флуоресценция), желто-зеленый – енол-фенолят и красный – кето-фенолят. Был сделан вывод, что водные растворы оксилуциферина представляют собой модельную систему, близкую биолюминесценции светляков (pH-зависимость спектров флуоресценции оксилуциферина в водных растворах аналогична pH-зависимости спектров биолюминесценции) [12].

Анализ спектров поглощения и флуоресценции для замещенных по C₅-положению оксилуциферин (M-LO) и (DM-LO) [14] в водных растворах в интервале pH 6,5–9,6 экспериментально подтвердил схему возможных равновесий для оксилуциферина и его производных в водных растворах (рис. 2). Для DM-LO были зафиксированы фенольная форма I ($\lambda_{\text{max.abs}} = 383$ нм) и фенолятная форма VI ($\lambda_{\text{max.abs}} = 485$ нм, $\lambda_{\text{max.em}} = 639$ нм с $pK = 7,8$). При возбуждении фенолятной формы ($\lambda_{\text{max.ex}} = 485$ нм) наблюдался только один пик

флуоресценции с $\lambda_{\text{max.em}} = 639$ нм во всем изученном интервале pH (от 5,7 до 10,5). По спектрам абсорбции для M-LO были выявлены три формы: нейтральная – форма II ($\lambda_{\text{max.abs}} = 375$ нм), моноанион – форма III ($\lambda_{\text{max.abs}} = 390$ нм) и дианион – форма VI ($\lambda_{\text{max.abs}} = 440$ нм). Спектры флуоресценции M-LO независимо от длины волны возбуждения имели один максимум при 550 нм, что соответствует эмиссии дианиона (форма VI). Таким образом, красная эмиссия соответствует флуоресценции кетона, а желто-зеленая – флуоресценции енол-енолята.



Все эти эмиттеры в возбужденном состоянии находятся в фенолятной форме, поскольку pK диссоциации фенольной группы как люциферина, так и оксилуциферина в основном и возбужденном состоянии сильно различаются (8,5 и –0,5 соответственно) [14]. 6'-Метоксилюциферины, не содержащие свободной фенольной группы, практически не обладают флуоресценцией в видимой области спектра [11].

Таким образом, уже в начале XXI в. были получены весомые экспериментальные подтверждения кето-енольного механизма, который ответственен за биолюминесценцию в люциферазной реакции. Следует отметить, что описанные выше исследования были выполнены на модельных системах, однако наблюдавшееся сходство спектров хемилюминесценции и флуоресценции в этих системах со спектрами биолюминесценции для люцифераз в условиях *in vitro*, позволяло использовать те же подходы для расшифровки и объяснения

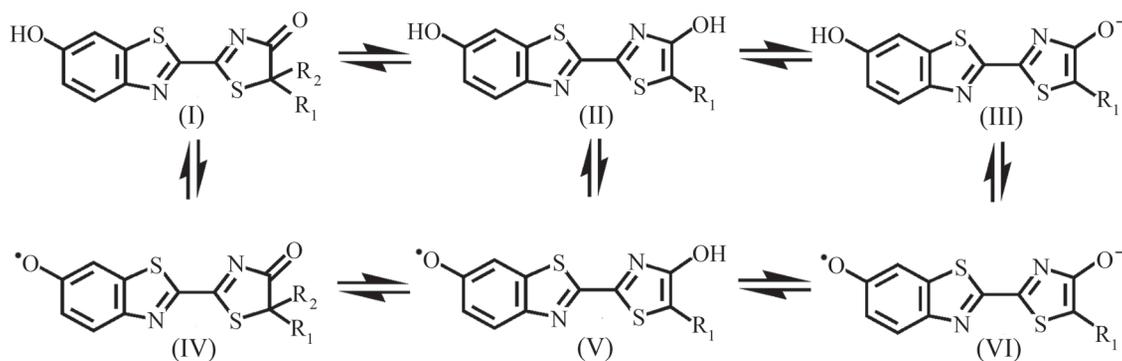
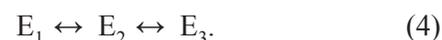


Рис. 2. Различные формы оксилуциферина и его производных: (I) – (III) – фенольные, (IV) – (VI) – фенолятные; (I), (IV) – кетонные; (II), (V) – енольные; (III), (VI) – енолятные. Различные замещенные оксилуциферины: $R_1, R_2 = H$ – оксилуциферин (LO); $R_1 = H, R_2 = CH_3$ – монометилуциферин (M-LO), $R_1, R_2 = CH_3$ – диметилуциферин (DM-LO)

pH-зависимости спектров биолюминесценции различных люцифераз. Новые экспериментальные доказательства существования кето-енольной таутомерии для оксилуциферина в растворе и в комплексе с люциферазой были получены в последние годы при изучении спектральных свойств и структуры оксилуциферина и его аналогов в разных системах: кристаллы, растворы, комплексы с люциферазой светляков *Luciola cruciata*. [15–17]. Изучение оксилуциферина и его производных в водном растворе в отсутствие фермента внесло много нового в понимание фотохимии этих соединений, но для экстраполяции сделанных выводов на реальные ферментативные системы требуются определенные сведения о полярности и протеолитических свойствах активного центра фермента. С помощью суб-наносекундной флуоресцентной спектроскопии была изучена динамика процессов в возбужденном состоянии оксилуциферина в комплексе с люциферазой *L. cruciata* [18], что позволило охарактеризовать фотохимические процессы, которые в принципе возможны в активном центре люциферазы. Сложной химической структурой оксилуциферина в основном состоянии обусловлено существование комплексов люциферазы с разными формами оксилуциферина, которые возбуждаются одновременно, при этом полученные результаты открывают скорее возможные, чем наиболее вероятные процессы в активном центре фермента в момент эмиссии. Показано, что эмиссия возбужденного флуорофора представляет собой сложный каскад фотоиндуцированных процессов переноса протона и может быть интерпретирована как pH-зависимость флуоресценции. Причем перенос протона служит центральным звеном в спектрохимии этой системы, для которой любое отнесение pH-зависимой эмиссии к одному

какому-либо хромофору будет большим упрощением. Эти результаты дают ценную информацию о сложных фотофизических процессах, протекающих в широком интервале pH, но они не могут полностью соответствовать процессам, протекающим в активном центре люциферазы в момент акта биолюминесценции.

В первую очередь, это обусловлено образованием только одной электронно-возбужденной молекулы эмиттера в активном центре каждой молекулы люциферазы при окислительном декарбонилировании диокситанона (рис. 1), и в зависимости от его микроокружения она может иметь только одну определенную форму. В растворе в зависимости от условий могут сосуществовать различные конформеры фермента:



Каждый из конформеров люциферазы может инициировать только одну из трех форм эмиттера (кетон, енол или енолят):



Мономодальные спектры биолюминесценции соответствуют одному конформеру фермента, что определяется как структурой фермента, так и значениями pH или температуры. Если наблюдаются не мономодальные, а более сложные (би- и даже тримодальные) спектры биолюминесценции, значит в данных условиях в реакционной среде присутствуют различные конформеры фермента, в которых реализуется та или иная форма эмиттера. Таким образом, молекула эмиттера представляет по сути внутримолекулярную люминесцентную метку, характеризующая свойства микроокружения эмиттера в момент эмиссии света.

К настоящему времени опубликовано много работ, где приведены спектры биолюминесценции для нативных и мутантных люцифераз при разных значениях pH или температуры. Но в большинстве опубликованных работ авторы обращали внимание только на положение максимума биолюминесценции, а не на форму спектров биолюминесценции и не на ее изменение при варьировании pH или температуры. Имеются лишь единичные примеры анализа спектров биолюминесценции в широком интервале значений pH или температуры для люцифераз светляков. Некоторые из них рассмотрены ниже.

Ранее были изучены pH-зависимости спектров биолюминесценции для рекомбинантной WT-люциферазы *Luciola mingrelica* и ее мутантной формы с заменой His433Tyr [19]. Гомология аминокислотной последовательности люциферазы *Luciola mingrelica* составляет более 80% с люциферазами из японских светляков вида *Luciola* [20]. Данная мутация привела к сдвигу $\lambda_{\text{max.em}}$ биолюминесценции с 566 до 606 нм при pH 7,8 (pH-оптимум активности). Получены спектры биолюминесценции для мутантной и WT-люциферазы в интервале pH 5,6–10,2. Для WT-люциферазы при pH $\geq 7,0$ наблюдалась только желто-зеленая биолюминесценция, при pH 5,6 – красная, а при промежуточных pH – обе ее формы. Для мутантной люциферазы при pH $\leq 6,1$ наблюдалась красная биолюминесценция. С увеличением pH появлялось плечо в желто-зеленой области, интенсивность которого росла с увеличением pH, и только при \sim pH 10,2 доля желто-зеленой биолюминесценции преобладала над красной. Сдвиг $\lambda_{\text{max.em}}$ биолюминесценции для мутантной люциферазы в pH-оптимуме активности можно объяснить изменением соотношения разных форм оксилици-

ферина. Использование метода Гаусса для разложения спектров биолюминесценции позволило установить, что наблюдаемые спектры являются суперпозицией спектров трех форм электронно-возбужденного оксилициферина: енолята (LO-O^- , $\lambda_{\text{max.em}} = 556$ нм), енола (LO-OH , $\lambda_{\text{max.em}} = 587$ нм) и кетона (LO=O , $\lambda_{\text{max.em}} = 618$ нм). Изменение относительного содержания различных форм эмиттера с варьированием pH привело к сдвигу положения максимума, а также к изменению формы спектра биолюминесценции [19]. Определено относительное содержание каждой из форм комплексов фермент–эмиттер при разных значениях pH, которое варьирует с изменением pH вследствие сдвига равновесий между тремя формами эмиттера (табл. 1).

Идентификация трех форм эмиттера указывает на сосуществование в реакционной среде трех различных конформеров люциферазы, соотношение между которыми изменяется при варьировании pH [21]. Интересно отметить, что сходные результаты были получены из анализа спектров флуоресценции для комплексов оксилициферина с нативной люциферазой *Luciola cruciata* [18], хотя соотнесение спектров к разным формам оксилициферина отличалось в этих двух работах. Таким образом, эмиттеры биолюминесценции служат внутримолекулярными маркерами микроокружения эмиттера в активном центре люцифераз, которое зависит от pH, поляризуемости, ориентации и подвижности ключевых аминокислотных групп [22].

Возникает вопрос, каким образом единичная мутация His433Tyr (замена остатка, расположенного на расстоянии 12 Å от активного центра) повлияла на спектры биолюминесценции? Из рентгеноструктурных данных для люцифераз и

Т а б л и ц а 1

Относительное содержание (%) конформеров люциферазы с различными формами электронно-возбужденного оксилициферина для WT-люциферазы светляков *Luciola mingrelica* и (His433Tyr) мутанта при разных значениях pH [19]

pH	E ₁ (LO=O)*		E ₂ (LO-OH)*		E ₃ (LO-O ⁻)*		Сумма	
	WT	His433Tyr	WT	His433Tyr	WT	His433Tyr	WT	His433Tyr
6,0	81	84	12	13	8	3	101	100
6,5	54	71	24	23	21	6	99	100
7,0	35	62	30	30	36	8	101	100
7,5	25	54	32	37	43	10	100	101
7,8	21	49	29	40	51	12	101	101
8,5	21	44	22	41	58	16	101	101

Т а б л и ц а 2

Эффект мутаций остатка Glu490 в С-домене люциферазы *Luciola mingrelica* на спектры биолюминесценции при разных значениях pH [26]

Фермент	Максимум биолюминесценции (полуширина спектра), нм					
	pH 6,1		pH 7,0		pH 8,8	
WT	615	(81)	576	(98)	564	(74)
Glu490Lys	572	(100)	566	(79)	562	(66)
Glu490Val	566	(90)	564	(71)	563	(68)

других аденилирующих ферментов, к которым относятся люциферазы светляков, известно, что остаток His433 расположен в подвижной петле, образованной остатками Tyr427 – Phe435, которая соединяет N- и С-домены люциферазы [23, 24]. Эту петлю можно рассматривать как «шарнир», соединяющий два домена люциферазы. Имидазольный цикл остатка His433 образует водородную связь с карбоксильной группой остатка Asp431, что повышает жесткость шарнира и уменьшает амплитуду тепловых флуктуаций N- и С-доменов относительно друг друга. Это обеспечивает достаточно жесткую фиксацию аминокислотных остатков Thr529 и Lys531 из С-домена, которые входят в ближайшее окружение атома кислорода тиазольной группы оксильюциферина в N-доме через координирующую их молекулу воды [23] и, возможно, непосредственно участвуют в образовании желто-зеленого эмиттера – енолята. Компьютерное моделирование позволило обнаружить существенное изменение конформации остатка 433 после замены His433Tyr. Фенольное кольцо Tyr в мутантной люциферазе оказалось повернутым почти на 60° относительно положения имидазольного кольца His в WT-ферменте [19]. При замене His433Tyr водородная связь между остатками His433 и Asp431 становится невозможной, вследствие чего уменьшается жесткость шарнира Tyr427 – Phe435 и увеличивается амплитуда тепловых колебаний доменов относительно друг друга. Микроокружение излучателя становится более «рыхлым», нарушается взаимодействие енольной группы с молекулой воды, вследствие чего наблюдается сдвиг равновесия от енолята в сторону енола и кетона.

Большая роль С-домена в генерировании зеленой биолюминесценции подтверждается и другими данными: люцифераза, из молекулы которой был удален малый С-домен, генерировала только очень слабое красное свечение [25]. Кроме того, мутации Glu490Lys и Glu490Val в С-доме привели к сдвигу λ_{\max} биолюминесценции для люцифе-

разы *Luciola mingrelica* в зеленую область спектра [26]. (табл. 2). Тем не менее, большая полуширина спектров для мутантов при pH 6,1 указывает на значительный вклад «красного» эмиттера в суммарные спектры биолюминесценции. Однако уже при pH $\geq 7,0$ спектры биолюминесценции мутантов становятся практически мономодальными, что свидетельствует о преобладании в этих условиях конформера люциферазы, связанного в комплекс $E_3 (LO-O)^*$.

Таким образом, детальное изучение спектров биолюминесценции в широком интервале pH, количественная оценка вклада различных форм излучателя в наблюдаемые спектры биолюминесценции, привлечение данных о структуре люцифераз и их комплексов с субстратами и продуктами реакции, а также использование компьютерных моделей позволяют выяснить взаимосвязь между характеристиками спектров биолюминесценции и структурой люцифераз.

Сайт-направленный или случайный мутагенез белковой глобулы люциферазы позволяет модулировать физико-химические свойства микроокружения эмиттера в активном центре фермента и тем самым изменять соотношение между его конформерами фермента, сдвигать равновесие в сторону «зеленой» или, наоборот, «красной» биолюминесценции. Известно, что для WT-люциферазы *L. mingrelica* λ_{\max} биолюминесценции смещается с 564 до 610 нм при понижении pH от 7,8 до 6,0. Единичная мутация Tyr35His привела к образованию люциферазы *L. mingrelica*, для которой $\lambda_{\max} = 564$ нм сохраняется в спектрах биолюминесценции во всем интервале pH (от 6,0 до 7,8). Мономодальный спектр с λ_{\max} при 564 нм свидетельствует о том, что данный мутант существует в виде одного конформера [27]. Замена Tyr35His дала эффект, сходный с тем, что был описан выше для люциферазы *L. mingrelica* при замене His433Tyr [19]. Ферменты, содержащие остаток His, испускали при pH 7,8 зеленое све-

чение, а ферменты, содержащие остаток Туг – красное.

Сравнительный анализ кристаллических структур для комплексов WT и мутантной (Ser286Asn) люциферазы *L. cruciata* с аналогом аденилата люциферина (DLSA) (комплексы LucDLSA и mLucDLSA) позволил авторам сделать вывод, что степень молекулярной жесткости за счет гидрофобизации микроокружения оксилуциферина в возбужденном состоянии обеспечивает зеленое свечение. Изменение ориентации остатка Ile288 в комплексе mLucDLSA приводит к более «открытой» конформации активного центра с менее «жестким» окружением субстрата, за счет чего наблюдается красная биолюминесценция [23]. Пространственные структуры этих комплексов почти совпадают, однако изменяется ориентация участка петли 233–237, с которой граничит остаток Туг35. Можно предположить, что такая локализация необходима для формирования конформации фермента, приводящей к зеленому свечению. Понижение pH приводит к «открытой» конформации активного центра фермента, что вызывает смещение спектра биолюминесценции в красную область. При замене объемного ароматического остатка Туг35 на меньший по размеру остаток His плотная упаковка вблизи остатка 35 становится более устойчивой. Петля 233–237 сохраняет свое положение при понижении pH, поэтому «закрытая» конформация не нарушается.

Можно дать и другое объяснение этим результатам. Для образования енола и енолята требуется строгая фиксация донора и акцептора протонов в ближайшем окружении к кислородному атому тиазольной группы оксилуциферина. Роль этих соединений могут выполнять молекулы воды, связанные водородной связью с атомом кислорода тиазольного цикла оксилуциферина, с одной стороны, и с остатками Lys-531 и Thr529 из C-домена, с другой, как это было отмечено выше для комплекса люциферазы с DLSA [23]. Разрушение этих водородных связей в мутантной люциферазе приводит к увеличению содержания конформера люциферазы, генерирующего «красную» форму эмиттера. По нашему мнению, именно водородные связи могут стабилизировать конформеры люциферазы, ответственные за «зеленое» свечение, а их удаление приводит к конформеру люциферазы, ответственному за красное свечение. Остаток Туг35 консервативен во всех люциферазах светляков. В «зеленых» люциферазах жуков-щелкунов в положении 35 находится остаток His [28].

Возможно, это один из участков в структуре люциферазы, аминокислотные остатки которого ответственны за формирование pH-нечувствительности спектров биолюминесценции для этих ферментов. Следует отметить, что формирование микроокружения оксилуциферина в активном центре и реализация «зеленой» (или «красной») биолюминесценции определяется балансом взаимодействий многих аминокислотных остатков в обширной области фермента. В частности, важную роль играют такие факторы, как сеть водородных связей остатков Arg220, Asn231, Ser286, Glu313, Lys339 [29] в области канала связывания люциферина, гидрофобная упаковка внутренних остатков [30], взаимодействия в центре связывания АТФ [31] и взаимодействия между двумя подвижными доменами люциферазы [19, 32]. Конформация петли 233–237 может быть лишь одним из необходимых факторов. Поэтому все попытки найти строго специфичные остатки, определяющие зависимость спектров биолюминесценции люцифераз от pH, безуспешны. Известно множество удаленных друг от друга мутаций, которые прямо или опосредованно нарушают необходимые взаимодействия и приводят к возрастанию доли «красной» или «зеленой» биолюминесценции [19, 22, 33], а так же мутации, стабилизирующие структуру активного центра и понижающие зависимость спектра биолюминесценции от внешних условий [30, 32].

Несомненно, водородные связи могут стабилизировать конформеры люциферазы, ответственные за «зеленое» свечение, а их удаление приводит к более рыхлой структуре комплекса фермент–продукт, т.е. к конформеру люциферазы, генерирующему «красное» свечение. Особенно это четко проявляется при анализе температурных зависимостей спектров биолюминесценции для люциферазы *L. mingrelica* и ряда ее мутантов (табл. 3). При 42 °С для большинства мутантов исчезает «зеленое» свечение, поскольку с повышением температуры многие водородные связи разрушаются и содержание конформеров люциферазы, генерирующих еноляты, становится очень низким. Это хорошо видно на примере спектров биолюминесценции термостабильной люциферазы светляков *L. mingrelica* и ее единичных мутантов по остатку Glu457 (Glu457Asp/Gln/Lys), измеренных при температуре 10, 25 и 42 °С [34]. Для всех люцифераз суммарные спектры биолюминесценции представляют собой суперпозицию спектров «зеленого» ($\lambda_{\text{max.em.}} = 554 \pm 3$ нм) и «красного» эмиттеров ($\lambda_{\text{max.em.}} = 595 \pm 5$ нм), соотношение между которыми с повышением температуры

Таблица 3

Относительное содержание (в %) комплексов конформеров люциферазы с различными формами электронно-возбужденного оксильюциферина для термостабильной люциферазы светляков *Luciola mingrelica* (Glu457) и единичных мутантов по остатку Glu457 в С-доме при различных температурах [34]

T, °C	Glu457		Glu457Asp		Glu457Gln		Glu457Lys	
	E ₃ (LO-O ⁻)*	E ₁ (LO=O)*						
10	42	58	38	62	21	79	7	93
25	26	74	19	81	9	91	–	100
42	9	91	–	100	–	100	–	100

сдвигается в сторону «красного» (табл. 3). При 42 °C доля «красного» эмиттера увеличивается до 90% для WT-люциферазы, а для мутантов – до 100%. WT-люцифераза и мутант Glu457Asp имеют сходные зависимости спектров биолюминесценции от температуры. Для мутантов Glu457Gln «зеленый» эмиттер составляет всего ~20% при 10 °C и ~10% при 25 °C. Люцифераза с мутацией Glu457Lys имеет мономодальный спектр с максимумом при 600 нм во всем изученном интервале температур. Анализ спектров показывает, что для всех мутантов $\lambda_{\text{max,em}}$ «зеленого» и «красного» компонентов совпадают с величинами $\lambda_{\text{max,em}}$ для WT-

люциферазы, а с изменением температуры меняется лишь соотношение между ними. Этот результат показывает, что структура эмиттера не зависит от температуры, однако меняется соотношение между разными конформерами белка при изменении температуры. Следовательно, разрыхление структуры белка при нагревании приводит к смещению спектров биолюминесценции в сторону «красного» эмиттера.

Работа выполнена в рамках государственной темы МГУ имени М.В. Ломоносова № АААА-А16-116052010081-5.

Конфликта интересов нет.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. McElroy W.D. // Proc. Nat. Acad. Science. 1947. Vol. 33. P. 342.
2. Hastings J.W., McElroy W.D., Coulombre J. // J. Cell. Comp. Physiol. 1953. Vol. 42. P. 137.
3. McElroy W.D., Green A. // Arch. Biochem. Biophys. 1956. Vol. 46. P. 399.
4. Bitler B., McElroy W.D. // Arch. Biochem. Biophys. 1957. Vol. 72. P. 358.
5. White E.H., Field G.F., McElroy W.D., McCapra F. // J. Am. Chem. Soc. 1961. Vol. 83. P. 2402.
6. Rhodes W.C., McElroy W.D. // J. Biol. Chem. 1958. Vol. 233. P. 1528.
7. McCapra F., Chang Y.C., Francöis V.P. // Chem. Commun. 1968. P. 22.
8. Seliger H.H., McElroy W.D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1964. Vol. 52. P. 75.
9. Hopkins T.A., Seliger H.H., White E.H., Cass M.W. // J. Am. Chem. Soc. 1967. Vol. 89. P. 7148.
10. White E.H., Rapapor E., Hopkins T.A., Seliger H.H. // J. Am. Chem. Soc. 1969. Vol. 91. P. 2178.
11. Morton R.A., Hopkins T.A., Seliger H.H. // Biochemistry. 1969. Vol. 8. N 4. P. 1598.
12. Gandelman O.A., Brovko L.Y., Ugarova N.N., Chikishev A.Y., Shkurimov A.P. // J. Photochem. Photobiol. B. 1993. Vol. 19. P. 187.
13. Gandelman O.A., Brovko L.Yu., Chikishev A.Y., Shkurimov A.P., Ugarova N.N. // J. Photochem. Photobiol. B. 1994. Vol. 22. P. 203.
14. Leontieva O.V., Vlasova T.N., Ugarova, N.N. // Biochemistry (Moscow). 2006. Vol. 71. P. 51.
15. Naumov P., Ozawa Y., Ohkubo K., Fukuzumi S. // J. Am. Chem. Soc. 2009. Vol. 131. P. 11590.
16. Solntsev K.M., Laptinok S.P., Naumov P. // J. Am. Chem. Soc. 2012. Vol. 134. P. 16452.
17. Ghose A., Rebarz M., Maltsev O. V., Hintermann L., Ruckebusch C., Fron E., Hofkens J., Mély Y., Naumov P., Sliwa M., Didier M. // J. Phys. Chem. B, 2015. Vol. 119. P. 2638.
18. Snellenburg J. J., Laptinok S.P., DeSa R.J., Naumov P., Solntsev K.M. // J. Am. Chem. Soc. 2016. Vol. 138. P. 16252.
19. Ugarova N.N., Maloshenok L.G., Uporov I.V., Koksharov M.I. // Biochemistry (Moscow). 2005. Vol. 70. N 11. P. 1262.
20. Devine J.H., Kutuzova G.D., Green V.A., Ugarova N.N., Baldwin T.O. // Biochim. Biophys. Acta. Gene Struct. Expression. 1993. Vol. 1173. P. 121.
21. Ugarova N. N. // Proceedings of the 15th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence. Light Emission: Biology and Scientific Applications / Ed. Xun Shen et al. Singapore, 2009. P. 75.
22. Ugarova N.N., Brovko L.Yu. // Luminescence. 2002. Vol. 17. P. 321.
23. Nakatsu T., Ichiyama S., Hiratake J., Saldanha A., Kobashi N., Sakata K., Kato H. // Nature. 2006. Vol. 440. P. 372.

24. Conti E., Franks N.P., Brick P. // Structure. 1996. Vol. 4. P. 287.
25. Zako T., Ayabe K., Aburatani T., Kamiya N.A., Ueda H., Nagamune T. // Biochim. Biophys. Acta. 2003. Vol. 1649. P. 183.
26. Modestova Y., Ugarova N.N. // Biochim. Biophys. Acta. 2016. Vol. 1864. P. 1818.
27. Koksharov M.I., Ugarova N.N. // Biochemistry (Moscow). 2008. Vol. 73. N 8. P. 862.
28. Wood K.V., Lam Y.A., McElroy W.D., Seliger H.H. // J. Biolum. Chemilum. 1989. Vol. 4. P. 31.
29. Viviani V.R., Arnoldi F.G.C., Neto A.J. S., Oehlmeier T.L., Bechara E. J. H., Ohmiya Y. // Photochem. Photobiol. Sci. 2008. Vol. 7. P. 159.
30. Kajiya N., Nakano E. // Protein Eng. 1991. Vol. 4. P. 691.
31. Tisi L.C., Law G.H., Gandelman O., Lowe C.R., Murray J.A. // Proceedings of the 12th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence: Progress and Current Applications / Eds. P.E. Stanley, L.J. Kricka) 2002. Singapore, P. 57.
32. Law G.H., Gandelman O.A., Tisi L.C., Lowe C.R., Murray J.A. // Biochem. J. 2006. Vol. 397. P. 305.
33. Branchini B.R., Southworth T.L., Khattak N.F., Murtiashaw M. H., Fleet S.E. // Proc. SPIE. 2004. Vol. 5329. P. 170.
34. Modestova Y., Koksharov M.I., Ugarova N.N. // Biochim. Biophys. Acta. 2014. Vol. 1844. P. 1463.

Поступила в редакцию 24.05.2019
Получена после доработки 28.05.2019
Принята к публикации 14.06.2019

THE EMITTER AS AN INTRAMOLECULAR PROBE IN THE LUCIFERASE ACTIVE CENTER

N.N. Ugarova^{1*}, G.Yu. Lomakina^{1,2}

(¹ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Department of Chemical Enzymology; ² Bauman Moscow State Technical University; * e-mail: nugarova@gmail.com)

The distinctive features of firefly luciferase bioluminescence are the complex changes of the spectrum form and λ_{\max} of bioluminescence under variation of pH, temperature, and enzyme structure. Analysis of the literature data and the own results of the authors leads to the conclusion that the keto-enol tautomerism of oxyluciferin molecule explains the most authentically observable complex spectral changes. Only one molecule of electronically excited product is formed in the active site of each luciferase molecule. Hence, the emitter can be considered as the intramolecular probe, characterizing the properties of its microenvironment in the active center of the enzyme. Superposition of two or three forms of the emitter recorded in bioluminescence spectra indicates that various conformational forms of enzyme co-exist in the reaction medium, that are in a dynamic equilibrium. The analysis of the bioluminescence spectra permits to identify qualitatively and quantitatively the different enzyme conformers and their variations depending external conditions and the luciferase structure.

Key words: bioluminescence, firefly luciferase, keto-enol tautomerization, oxyluciferin.

Сведения об авторах: Угарова Наталья Николаевна – глав. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, докт. хим. наук (nugarova@gmail.com); Ломакина Галина Юрьевна – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, сотр. МГТУ им. Н.Э. Баумана, канд. хим. наук (lomakinagalina@yahoo.com).