

О ПРИРОДЕ ЭМИТТЕРА В ЛЮЦИФЕРИН-ЛЮЦИФЕРАЗНОЙ СИСТЕМЕ СВЕТЛЯКОВ

Угарова Н.Н., Ломакина Г.Ю.

МГУ имени М.В.Ломоносова

Ленинские горы, 1, стр.3, Москва, 119992, РФ; e-mail: nugarova@gmail.com

Поступила в редакцию: 05.06.2018

Аннотация. Отличительной особенностью биолюминесценции люцифераз светляков являются сложные спектральные изменения в форме и максимумах биолюминесценции при варьировании pH, температуры, структуры фермента. Анализ литературных данных и собственных результатов авторов о природе эмиттера в люциферин-люциферазной системе светляков приводит к заключению, что кето-энольная таутомерия молекулы оксилуциферина наиболее достоверно объясняет наблюдаемые сложные спектральные изменения. Каждая молекула люциферазы может содержать лишь одну молекулу эмиттера в момент биолюминесценции, поэтому можно рассматривать эмиттер как внутримолекулярную метку, характеризующую свойства ее микроокружения в активном центре фермента. Суперпозиция двух или трех форм эмиттера, фиксируемых в спектрах биолюминесценции, указывает на то, что в реакционной среде сосуществуют различные конформационные формы фермента, находящиеся в динамическом равновесии, каждая из которых генерирует одну из форм эмиттера.

Ключевые слова: биолюминесценция, люцифераза светляков, кето-энольная таутомерия, оксилуциферин.

Люцифераза жуков [люциферин 4-монооксигеназа (гидролиз АТФ); люциферин: кислород 4-оксидоредуктаза (декарбоксилирование, гидролиз АТФ), КФ 1.13.12.7] катализирует окисление люциферина светляков кислородом воздуха в присутствии MgATP [1-3]. Свечение сопровождается излучением видимого света с высоким квантовым выходом (более 40 %) [4, 5]. Как показано на рисунке 1, на первой стадии фермент связывается со своими субстратами – люциферин (1) и АТФ.

В тройном комплексе люциферин ковалентно взаимодействует с АТФ, образуя смешанный ангидрид карбоновой и фосфорной кислот – люциферил-аденилат (2) и пирофосфат (PP_i). Люциферил-аденилат через ряд промежуточных стадий окисляется кислородом воздуха, превращаясь в циклический пероксид – диокситанон (3). Разложение диокситанона приводит к его декарбоксилированию. В результате внутримолекулярной рекомбинации радикалов образуется продукт реакции – оксилуциферин (4) в синглетном электронно-возбужденном состоянии, который дезактивируется с излучением кванта света (λ_{max} = от 540 до 612 нм, в зависимости от структуры люциферазы, pH и температуры).

Молекулы люцифераз светляков состоят из одной полипептидной цепи (542-552 остатков), не содержат кофакторов и имеют сходный аминокислотный состав. Гомология аминокислотных последовательностей для различных люцифераз соответствует отношениям, основанным на их биологической классификации. Для люцифераз рода *Luciola* гомология составляет около 80 %, а начиная с 200 остатка - более 90 %. Люцифераза *L. mingrelica* наиболее близка по структуре к люциферазе японских светляков *Hotaria parvula* (98 % гомологии).

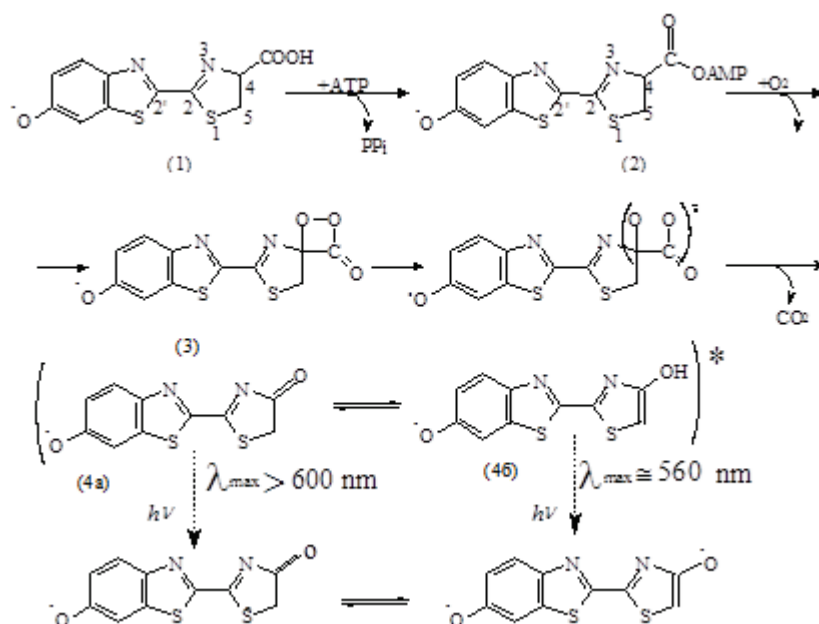


Рисунок 1. Схема люциферазной реакции

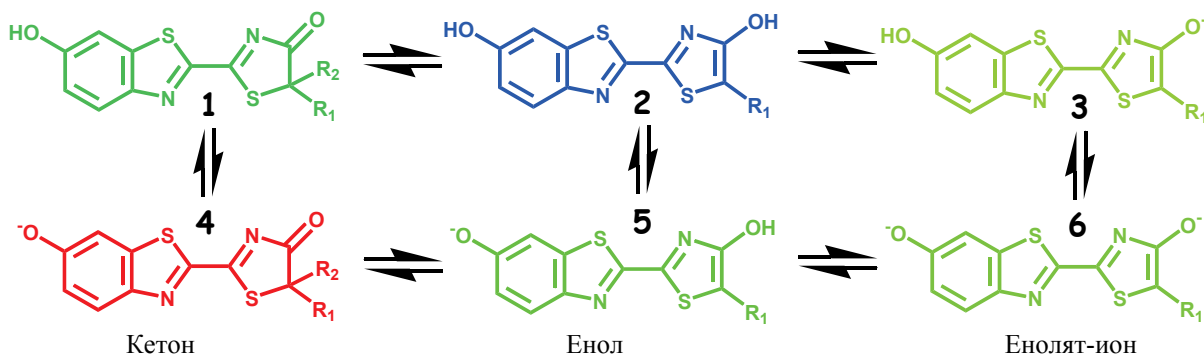


Рисунок 2. Молекулярные формы оксилуциферина и его аналогов

Природа эмиттера в люциферин-люциферазной системе светляков. Химическая схема реакции, катализируемой люциферазой светляков, идентична для всех известных люцифераз, однако максимум биолюминесценции варьируется в широком интервале длин волн для разных люцифераз и для разных условий наблюдения свечения. В природе (*in vivo*) светляки излучают желто-зеленый свет (540-580 нм). При проведении реакции *in vitro* наблюдаемый цвет биолюминесценции совпадает с цветом *in vivo* при нейтральных pH, но сдвигается в красную область при понижении pH реакционной среды [6,7]. Сдвиги в спектрах биолюминесценции при изменении pH, температуры являются отличительной особенностью именно люцифераз светляков.

Какова структура излучателя в люциферин-люциферазной системе светляков? Этот вопрос до сих пор является предметом дискуссии в научной литературе. Долгое время наиболее популярным было предложенное в [8] объяснение, что изменения спектров биолюминесценции люциферазы, особенно pH-зависимость спектров, вызваны кето-енольной таутомерией оксилуциферина. Как показано на рисунке 2, оксилуциферин может существовать в шести молекулярных формах. Для кето-аниона (4) характерны красная флуоресценция и хемиллюминесценция ($\lambda_{max} = 620-633$ нм) [8]. Анионные енольные формы (3, 5, 6) флуоресцируют в желто-зеленой области спектра ($\lambda_{max} = 540-560$ нм) [8], что примерно соответствует области желто-зеленой биолюминесценции люцифераз. Поэтому было сделано предположение, что кето-анион является «красным» излучателем в биолюминесценции, а енольные формы – «желто-зеленым».

Равновесие между формами кетона, енола и енолята может сдвигаться в ту или иную сторону в зависимости от свойств микроокружения эмиттера при изменении pH, температуры и физико-химических свойств микроокружения [6,7]. Поскольку в возбужденном состоянии обычно фенольная группа существует в форме фенолят-иона, то можно допустить, что только три формы (4, 5, и 6) могут реально излучать в люциферин-люциферазной системе светляков.

Позже ряд известных авторов высказали альтернативные данные о структуре эмиттера. В частности, МакКапра в 1994 г. предположил [9], что единственным эмиттером в данной системе является кето-форма оксилуциферина, которая может существовать в виде двух стереоформ – с планарным и перпендикулярным расположением бензотиазольного и тиазолинового колец. При этом квантово-механические расчеты группы МакКапра показали, что в возбужденном состоянии перпендикулярная конформация соответствует минимуму на поверхности потенциальной энергии возбужденного оксилуциферина и испусканию красного света, а планарная конформация отвечает седловой точке с более высокой энергией испускания. Однако квантово-механические расчёты, проведенные позднее другими авторами, показали, что оптимальной является планарная конформация [10, 11], поэтому в настоящее время теория МакКапра обычно не рассматривается.

В известной монографии Шимомуры [12] отмечалось, что оксилуциферин образуется при термическом разложении хемивозбужденного нестабильного производного в его ионной кетоформе. Бранчини также считал, что единственным эмиттером в люциферазной реакции является кетон [13]. Причем, зеленой биолюминесценции соответствует фенолятная структура продукта, а цвет биолюминесценции контролируется резонансной стабилизацией фенолятной формы кето-аниона за счет кулоновского взаимодействия с отрицательно заряженными фосфатными группами АМР и катионом остатка R220 [13]. Однако такой резонансный механизм хорошо объясняет непрерывное изменение спектров, но не дискретный сдвиг, наблюдаемый при понижении pH, который больше соответствует наличию двух индивидуальных молекулярных форм излучателя. Ряд работ по теоретическому моделированию спектров испускания оксилуциферина в белковом окружении показывает, что взаимодействия с окружающими группами теоретически могут приводить к переходу от красного к зеленому спектру испускания кето-аниона оксилуциферина [10], но эти результаты во многом спорные, и к ним следует относиться с осторожностью.

Для нас наиболее близкой всегда оставалась классическая теория кето-енольной таутомерии. Этот вывод был подтвержден нами при изучении спектров флуоресценции для синтетического оксилуциферина и его синтетических аналогов – метил- и диметил-оксилуциферина. Как известно [6, 14], в данной системе спектры флуоресценции являются близкой моделью спектров биолюминесценции. Диметил-оксилуциферин не содержит атома водорода, способного к енолизации, поэтому его спектры флуоресценции не зависят от pH и

имеют λ_{max} в красной области спектра, в то время как для оксילוциферина и метилоксילוциферина наблюдается зависимость спектров флуоресценции от pH [15, 16]. В последние годы и другие авторы приходят к заключению, что различия в спектрах биолюминесценции люцифераз светлячков трудно объяснить без использования представлений о кето-енольной таутомерии оксילוциферина [17].

Новые интересные результаты были получены группой авторов при изучении стационарных и время-разрешенных спектров флуоресценции оксילוциферина в различных системах: в кристаллах, водных растворах, а также в комплексах люциферазы светлячков *L. cruciata* с оксילוциферинами. Результаты по пико-нано-секундной динамике оксילוциферина и его аналогов в модельных системах позволили установить, что фотоокислотность енольной группы превосходит таковую для фенольной группы. Это указывает на то, что перенос протонов в возбужденном состоянии эмиттера может инициировать кето-енольную таутомерию [18]. Были определены спектральные характеристики различных форм оксילוциферина в водных растворах в основном состоянии (рис. 2), которые поглощают в относительно узком интервале (367-486 нм) при pH 6-11 [19, 20]. Близкие значения двух рКа (9.10 ± 0.12 и 7.40 ± 0.15 для фенола/фенолят и енол/енолят, соответственно) приводят к тому, что при pH 7 соотношение популяций фенол-енол/фенол-кето/фенол-енолят равно 2:1:1. Каждая из этих форм может поглощать энергию, переходить в возбужденное состояние и претерпевать фотохимические трансформации. Суб-наносекундная время-разрешенная флуоресценция была использована и для изучения комплексов оксילוциферина с японской люциферазой *L. cruciata*. Этот подход подтвердил идентичность флуоресцентных и биолюминесцентных состояний, которые были установлены компьютерными методами [21]. Результаты показывают, что эмиссия электронно возбужденного оксילוциферина представляет собой каскад фотоиндуцированных переносов протона и может быть интерпретирована как pH-зависимость излучаемого света. Авторы приходят к заключению, что центральным событием в спектроскопии этой системы является перенос протона, и приписывать pH-зависимость спектров биолюминесценции к единственной химической структуре было бы слишком большим упрощением [18, 22]. Результирующие данные по фотоиндуцированной динамике в этой системе были нацелены на выяснение всех фотохимических путей, которые возможны в активном центре люциферазы, по крайней мере, в принципе. Следует отметить, что благодаря сложной химической структуре эмиттера все существующие в основном состоянии формы возбуждаются одновременно, поэтому данные по флуоресценции отражают скорее возможные, чем наиболее вероятные явления в активном центре фермента.

Таким образом, основным фактором, определяющим цвет биолюминесценции, являются свойства микроокружения эмиттера, локализованного в активном центре фермента. Как показано на рисунке 3, протон С-5 тиазольного цикла образует водородную связь с боковым остатком аминокислоты (B_1), который действует как основание, удаляя С-5 протон. Кислород кетонной группы взаимодействует с протонированным основанием (B_2), принимая от него протон. Таким образом, процесс кето-енольной таутомеризации – это синхронный переход двух протонов: одного – от С-5 атома оксילוциферина на основание B_1 , и другого – от основания B_2 к атому кислорода карбонильной группы. Результатом таутомеризации является образование енола. Эффективность этого процесса зависит от правильной фиксации оснований B_1 и B_2 вблизи тиазольной группы оксילוциферина. Взаимодействие гидроксильной группы енола с основанием (B_3) приводит к образованию енолят-иона. При отсутствии основания B_1 (независимо от pH), либо при его протонировании (например, при pH < 6,0) будет наблюдаться только кето-форма оксילוциферина с максимумом биолюминесценции в красной области спектра. При промежуточных значениях pH в спектре биолюминесценции наблюдаются все составляющие: кетона, енола и енолята.

Пока нет полной ясности, какие аминокислотные остатки фермента участвуют в процессе, показанном на рисунке 3. Однако, некоторые предположения можно сделать, анализируя кристаллографические данные по структуре активного центра люциферазы светлячков *L. cruciata* в комплексе с аналогом промежуточного продукта реакции аденилирования DLSA (аденилат люциферина, в котором атом фосфора заменен на атом серы) [23]. В этом комплексе атом кислорода тиазольной группы связан водородной связью с молекулой воды, которая в свою очередь координирована на боковую NH_2 группу остатка Lys531 и на боковую OH-группу остатка Thr529. Вполне возможно, что именно эта молекула воды является модератором цвета эмиссии. К такому же предположению пришли и авторы работы [24] на основании теоретических расчетов спектров для комплекса оксילוциферина с молекулой воды в вакууме.

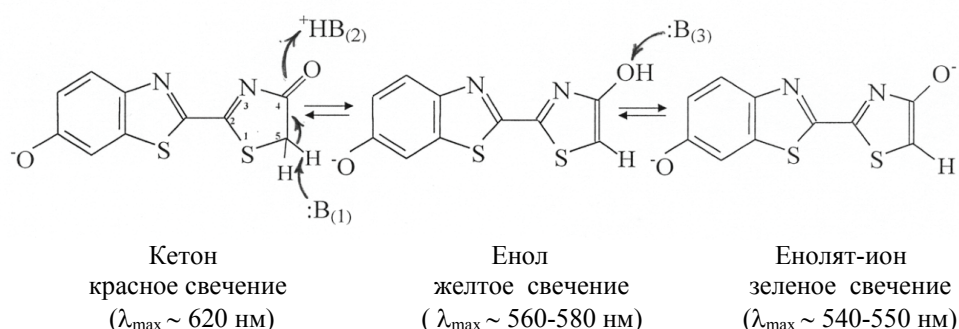


Рисунок 3. Схема взаимодействия эмиттера с микроокружением в активном центре фермента

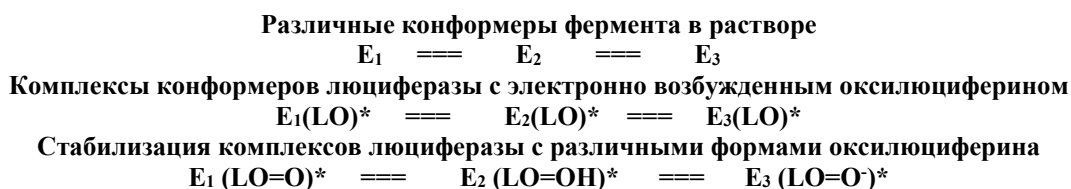


Рисунок 4. Модуляция микроокружения эмиттера в активном центре различных конформеров люциферазы

Эмиттер как маркер конформационного состояния активного центра люциферазы. В большинстве опубликованных работ авторы обращали внимание только на положение максимума биолюминесценции, но не анализировали наблюдавшиеся изменения формы спектров биолюминесценции. Изучение pH-зависимости спектров биолюминесценции при pH 7,8 нативной рекомбинантной люциферазы *Luciola mingrelica* и ее мутантной формы с заменой His433Tyr, количественная оценка вклада различных форм оксильюциферина в спектры биолюминесценции позволили выяснить решающую роль белка в наблюдаемых различиях в спектрах биолюминесценции нативной и мутантной люцифераз [25]. Данный мутант обладает высокой каталитической активностью, поскольку остаток His433 расположен на расстоянии 12 Å от активного центра фермента, и его мутация не оказала влияния на каталитические свойства фермента. Единичная замена His433Tyr привела к сдвигу λ_{\max} на 40 нм в красную область спектра. Проведенный анализ спектров биолюминесценции нативной и мутантной люциферазы в интервале pH от 5,6 до 10,2 показал, что для нативной люциферазы при pH $\geq 7,0$ наблюдается только желто-зеленая, при pH = 5,6 – красная биолюминесценция, а при промежуточных pH – обе ее формы. Использование метода Гаусса для разложения спектров биолюминесценции позволило установить, что наблюдаемые спектры являются суперпозицией спектров не двух, а трех форм электронно-возбужденного оксильюциферина: энولات-иона (λ_{\max} 556 нм), енола (λ_{\max} 587 нм) и кетона (λ_{\max} 618 нм). Было определено относительное содержание каждой из форм при различных pH, которое варьируется с изменением pH вследствие сдвига равновесий:



Изменение относительного содержания различных форм эмиттера с варьированием pH приводит как к сдвигу положения максимума, так и изменению формы спектра биолюминесценции [25].

В активном центре молекулы люциферазы может присутствовать только одна молекула эмиттера, которая является по сути дела внутримолекулярной люминесцентной меткой и характеризует свойства микроокружения эмиттера в момент эмиссии света. Если наблюдается суперпозиция двух или трех форм эмиттера, то это означает, что в реакционной среде присутствуют три различные конформационные формы фермента. В микроокружении каждой формы фермента образуется одна молекула электронно-возбужденного продукта, который стабилизируется в активном центре фермента в одной из трех форм – кетона, енола или енолята. Таким образом, идентификация трех форм эмиттера указывает на сосуществование в реакционной среде динамического равновесия между тремя различными конформерами люциферазы, соотношение между которыми изменяется при варьировании pH или температуры. На рисунке 4 показана схема, согласно которой люцифераза может модулировать микроокружение эмиттера:

Анализ спектров биолюминесценции для нативной и мутантной люциферазы, полученных в работе [25], позволил рассчитать соотношение между различными конформерами люциферазы при разных pH (табл. 1).

Для нативной люциферазы в pH оптимуме активности (pH 7,8) 50% составляет конформер, стабилизирующий форму енолята оксильюциферина. Для мутантной люциферазы при pH 6,8 преобладает конформер, стабилизирующий форму кетона, а при pH 7,8 появляются заметные количества конформера, стабилизирующего енол. Тем не менее при pH 8,3 доля конформера, стабилизирующего кетон, составляет еще 45%. Сходные результаты были получены для комплексов оксильюциферина с нативной люциферазой *Luciola cruciata* в работе на основании измерения спектров флуоресценции [22]. Таким образом, эмиттеры биолюминесценции являются внутримолекулярными маркерами структуры микроокружения эмиттера в активном центре люцифераз, которое зависит от поляризуемости, ориентации и подвижности ключевых аминокислотных групп [6].

Таблица 1. Распределение конформеров люциферазы для нативной и мутантной люциферазы при различных pH (в %)

pH	E ₁ (LO=O)*		E ₂ (LO=OH)*		E ₃ (LO=O ⁻)*		Сумма	
	нативная	мутантная	нативная	мутантная	нативная	мутантная	нативная	мутантная
6,8	38	63	28	28	27	6	93	97
7,8	22	50	32	40	50	12	104	102
8,3	21	45	26	42	54	16	101	103

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 различными конформерами фермента, сдвигать равновесие в сторону «зеленой» или, наоборот, «красной» биолюминесценции. Например, единичная мутация Tug35His привела к образованию люциферазы *L. mingrelica*, спектры биолюминесценции для которой практически не изменяются в интервале pH 6,0-7,8 [26]. Мономодальный спектр с λ_{\max} при 564 нм свидетельствует о том, что данный мутант существует в виде одного конформера.

Другой интересный результат был получен при изучении спектров биолюминесценции термостабильной люциферазы светляков *L. mingrelica* и ее мутантов по остатку глутаминовой кислоты (E457D, E457Q, E457V, E457K) при температурах 10, 25 и 42 °C [27]. Для всех люцифераз суммарные спектры биолюминесценции представляют собой суперпозицию спектров «зеленого» (λ_{\max} 554 ± 3 нм) и «красного» эмиттера (λ_{\max} 595 ± 5 нм), соотношение между которыми с повышением температуры сдвигается в сторону «красного» эмиттера. При 42 °C доля красного эмиттера увеличивается до 90 % для исходной люциферазы, а для мутантов – до 100 %. Исходная люцифераза и мутант E457D имеют сходные зависимости спектров биолюминесценции от температуры. Для мутантов E457Q, E457V «зеленый» эмиттер составляет всего ~ 20 % при 10 °C и ~ 10 % при 25 °C. Люцифераза с мутацией E457K имеет мономодальный спектр с максимумом при 600 нм во всем изученном интервале температур. Анализ спектров показывает, что для всех мутантов максимумы эмиссии «зеленого» и «красного» компонента совпадают с величинами для исходной люциферазы, а с температурой изменяется лишь соотношение между ними. Этот результат показывает, что природа эмиттера не зависит от температуры, но изменяется соотношение между различными конформерами белка при повышении температуры.

Список литературы / References:

1. Ugarova N.N. Luciferase of *Luciola mingrelica* fireflies. Kinetics and regulation mechanism. *J. Biolum. Chemilum.*, 1989, vol. 4, pp. 406-418.
2. Devine J.H., Kutuzova G.D., Green V.A., Ugarova N.N., Baldwin T.O. Luciferase from the East European firefly *Luciola mingrelica*: Cloning and nucleotide sequence of the cDNA, overexpression in *Escherichia coli* and purification of the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta, Gene Struct. Expression*, 1993, vol. 1173, pp. 121-132.
3. Hastings J.W., Johnson C.H. Bioluminescence and chemiluminescence. *Meth. Enzymol.*, 2003, vol. 360, pp. 75-104.
4. Seliger H.H., McElroy W.D. Spectral emission and quantum yield of firefly bioluminescence. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1960, vol. 88, pp. 136-141.
5. Ando Y., Niwa K., Yamada N., Enomoto T., Irie T., Kubota H., Ohmiya Y., Akiyama H. Firefly bioluminescence quantum yield and colour change by pH-sensitive green emission. *Nature Photon.*, 2008, vol. 2, pp. 44-47.
6. Ugarova N.N., Brovko L.Yu. Protein structure and bioluminescent spectra for firefly bioluminescence. *Luminescence*, 2002, vol. 17, pp. 321-330.
7. Viviani V.R. The origin, diversity, and structure function relationships of insect luciferases. *Cell Mol. Life Sci.*, 2002, vol. 59, pp. 1833-1850.
8. White E.H., Rapaport E., Hopkins T.A., Seliger H.H. Chemi- and bioluminescence of firefly luciferin. *J. Am. Chem. Soc.*, 1969, vol. 91, pp. 2178-2180.
9. MacCapra F., Gilfoyle D.J., Young D.W., Church N.J., Spencer P. The chemical origin of color differences in beetle bioluminescence. *Proceedings of the 8th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence*, 1994, pp. 387-391.
10. Nakatani N., Hasegawa J.y., Nakatsuji H. Red light in chemiluminescence and yellow-green light in bioluminescence: color-tuning mechanism of firefly, *Photinus pyralis*, studied by the symmetry-adapted cluster-configuration interaction method. *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, vol. 129, pp. 8756-8765.
11. Yang T., Goddard J.D. Predictions of the geometries and fluorescence emission energies of oxyluciferins. *J. Phys. Chem. A*, 2007, vol. 111, pp. 4489-4497.
12. Shimomura O. *Bioluminescence: Chemical principles and applications*. World Scientific, Singapore, 2008, pp. 151-153.
13. Branchini B.R., Southworth T.L., Murtiashaw M.H., Magyar R.A., Gonzalez S.A., Ruggiero M.C., Stroh J.G. An alternative mechanism of bioluminescence color determination in firefly luciferase. *Biochemistry*, 2004, vol. 43, pp. 7255-7262.
14. Gandelman O.A., Brovko L.Y., Ugarova N.N., Chikishev A.Y., Shkurimov A.P. Oxyluciferin fluorescence is a model of native bioluminescence in the firefly luciferin--luciferase system. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 1993, vol. 19, pp. 187-191.
15. Leont'eva O.V., Vlasova T.N., Ugarova N. N. Dimethyl and monomethyloxyluciferins as analogs of the product of the bioluminescence reaction catalyzed by firefly luciferase. *Biochemistry (Moscow)*, 2006, vol. 71, no.1, pp. 51-55.
16. Ugarova N.N. Interaction of firefly luciferase with substrates and their analogs: a study using fluorescence spectroscopy methods. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2008, vol. 7, pp. 218-227.

17. daSilva L.P., Simkovitch R., Huppert D., daSilva J.C.G.E., Oxyluciferin photoacidity: the missing element for solving the keto-enol mystery? *Chem.Phys.Chem.*, 2013, vol. 14, pp. 3441-3446.
18. Solntsev K.M., Laptенок S.P., Naumov P. Photoinduced dynamics of oxyluciferin analogues: unusual enol. "Super" photoacidity and evidence for keto-enol isomerization. *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, vol. 134, pp.16452-16455.
19. Naumov P., Ozawa Y., Ohkubo K., Fukuzumi S. Structure and Spectroscopy of Oxyluciferin, the Light Emitter of the Firefly Bioluminescence. *J.Am.Chem. Soc.*, 2009, vol. 131, pp. 11590-11605.
20. Rebarz M., Kurovec B.-M., Maltsev O.V., Ruckebusch C., Hintermann L., Naumov P., Sliwa M. Deciphering the protonation and tautomeric equilibria of firefly oxyluciferin in solution. *Chem. Sci.*, 2013, vol. 4, pp. 3803-3809.
21. Navizet I., Liu Y.-J., Ferre, N., Xiao H.-Y., Fang W.-H., Lindh R. Color-Tuning Mechanism of Firefly Investigated by Multi-Configurational Perturbation Method. *J. Am.Chem.Soc.*, 2010, vol. 132, pp. 706-712.
22. Snellenburg J.J., Laptенок S. P., DeSa R. J., Naumov P., Solntsev K.M. Excited-state dynamics of oxyluciferin in firefly luciferase. *J. Am. Chem. Soc.*, 2016, vol. 138, pp. 16252-16258.
23. Nakatsu T., Ichiyama S., Hiratake J., Saldanha A., Kobashi N., Sakata K., Kato H. Structural basis for the spectral difference in luciferase bioluminescence. *Nature*, 2006. vol. 440. pp. 372-376.
24. Stöckel K., Hansen C. N., Houmøller J., Nielsen L. M., Anggara K., Linares M., Norman P., Nogueira F., Maltsev O.V., Hintermann L., Nielsen S.B., Naumov P., Milne B.F. On the Influence of Water on the Electronic Structure of Firefly Oxyluciferin Anions from Absorption Spectroscopy of Bare and Monohydrated Ions in Vacuo. *J. Am.Chem. Soc.*, 2013, vol. 135, pp. 6485-6493.
25. Ugarova N.N., Maloshenok L.G., Uporov I.V., Koksharov M.I. Bioluminescence spectra of native and mutant firefly luciferases as a function of pH. *Biochemistry (Moscow)*, 2005, vol. 70, no. 11, pp. 1262-1267.

ON THE NATURE OF THE EMITTER IN LUCIFERIN-LUCIFERASE SYSTEM OF FIREFLIES

Ugarova N.N., Lomakina G.Yu.

Lomonosov Moscow State University

Lenin hills, 1, bld.3, Moscow, 119992, Russia; e-mail: nugarova@gmail.com

Abstract. The distinctive features of firefly luciferase bioluminescence are the complex spectral changes of the 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 on the nature of the emitter in luciferin-luciferase system leads to the conclusion that the keto-enol tautomerism of oxyluciferin molecule the most authentically explains observable complex spectral changes. Each molecule of luciferase can contain only one molecule of the emitter at the moment of bioluminescence. Hence, the emitter can be considered as the intramolecular label, 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 the enzyme co-exist in the reaction medium, that are in a dynamic equilibrium, each of which generates one of the emitter forms.

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