

Механизм электронного возбуждения в биолюминесцентной реакции бактерий

Е.В.Немцева, Н.С.Кудряшева

Красноярский государственный университет, Физический факультет

660041 Красноярск, просп. Свободный, 79, факс (3912)44–8781

Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук

660036 Красноярск, Академгородок, факс (3912)43–3400

Проанализировано современное состояние проблемы образования электронно-возбужденного продукта в хемилюминесцентной реакции, лежащей в основе свечения бактерий. Рассмотрены различные схемы химических превращений, которые могут приводить к образованию эмиттера бактериальной биолюминесценции. Освещена проблема возбуждения вторичных эмиттеров реакции; проанализированы два возможных механизма их возбуждения.

Библиография — 76 ссылок.

Оглавление

I. Введение	101
II. Общая характеристика биолюминесцентной реакции бактерий	102
III. Образование эмиттера в биолюминесцентной реакции	104
IV. Возбуждение вторичных эмиттеров бактериальной биолюминесценции	107
V. Заключение	111

I. Введение

В основе биолюминесценции, т.е. свечения живых организмов, лежат хемилюминесцентные реакции, катализируемые биологическими катализаторами — ферментами, которые принято называть люциферазами.^{1,2} Свечением обладают более 700 видов организмов, наиболее изученными из которых являются бактерии, жуки-светляки, морские кишечнополостные (медузы, полипы и т.п.), рыбы и др.¹ Среди светящихся организмов только бактерии излучают свет непрерывно. Развиваясь на образующихся в море органических остатках, они вносят заметный вклад в свечение океана. Считается, что свечением бактерии привлекают более высокоразвитые организмы (например, рыб, креветок) и получают возможность заселить их органы в качестве симбионтов или паразитов.¹ В то же время сигнальная функция биолюминесценции, возможно, вторична. Многие исследователи предполагают важное метаболическое зна-

чение светопроизводящих систем,³ в частности, рассматривают связь биолюминесцентных реакций с антиоксидантной системой организмов.^{4–6} Есть мнение, что биолюминесценция — это результат наследственного изменения механизмов, защищающих от самоуничтожения клетки, которые специально выделяют активные формы кислорода для тех или иных целей.⁷ Кроме того, существуют предположения, что люциферазы и их субстраты выполняют в клетках только метаболические функции, а испускание кванта света является «случайным» процессом.^{4–6} Согласно одной из гипотез, с помощью биолюминесцентной реакции клетки осуществляют дезактивацию пероксида водорода в условиях интенсивного энергетического обмена.⁸ При этом избыточная энергия, рассеяние которой в виде тепла или побочных химических реакций угрожает жизнеспособности клеток, излучается в виде кванта света.

У разных организмов субстраты биолюминесцентных реакций (их традиционно называют люциферинами) несхожи по химическому строению и принадлежат к разным классам органических соединений.^{1,9} Аминокислотный состав и строение люцифераз также различаются даже у родственных видов светящихся бактерий.¹⁰ В настоящее время известно около 30 биолюминесцентных реакций, т.е. около 30 сочетаний люциферин — люцифераза.

В отличие от большинства хемилюминесцентных процессов в неживой природе люминесценция организмов характеризуется высокой интенсивностью. Это связано, во-первых, с высокими скоростями ферментативных хемилюминесцентных реакций, а во-вторых, с высокими квантовыми выходами люминесценции продуктов этих реакций — эмиттеров. Несмотря на то что молекулы эмиттеров различных биолюминесцентных организмов относятся к различным клас-

Е.В.Немцева. Кандидат физико-математических наук, старший преподаватель кафедры биофизики Физического факультета КрасГУ. Телефон: (3912)44–0841, e-mail: NEV@lan.krasu.ru

Область научных интересов: биолюминесценция, хемилюминесценция, перенос энергии электронного возбуждения, спектроскопия.

Н.С.Кудряшева. Доктор физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории фотобиологии Института биофизики СО РАН. Телефон: (3912)49–4242, e-mail: kudr@ibp.ru
Область научных интересов: физико-химия биологических систем, спектроскопия, строение молекул, биолюминесценция.

Дата поступления 25 мая 2006 г.

сам химических соединений, их объединяет сходство в электронной структуре: они принадлежат к одной спектрально-люминесцентной группе систематики молекул по спектрально-люминесцентным свойствам.¹¹ Молекулы этой группы характеризуются высокими квантовыми выходами $\pi\pi^*$ -флуоресценции и высокой эффективностью внутримолекулярной релаксации возбуждения из высших возбужденных состояний.

Кроме того, определенный вклад в высокие выходы биолюминесценции (количество квантов на один акт реакции) вносит белковое окружение эмиттеров биолюминесценции, защищающее от процессов переноса и превращения энергии, которые конкурируют с испусканием света. При этом белок может играть роль матрицы, обеспечивающей жесткую фиксацию флуорофора. В некоторых биолюминесцентных реакциях выходы биолюминесценции близки к единице.^{2,9}

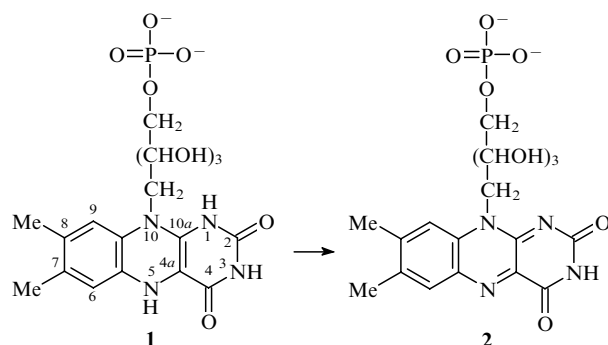
Высокая эффективность образования кванта света отличает биолюминесценцию от другого биологического свечения — слабой и сверхслабой хемилюминесценции, всегда сопровождающей жизнедеятельность организмов. При сверхслабом свечении тканей животных фотоны обычно являются побочным продуктом реакций свободнорадикального автоокисления ненасыщенных жирных кислот.¹² В то же время биолюминесценция, как правило, выполняет определенную биологическую функцию (например, привлечение партнера или отпугивание хищника), и в этом смысле квант света является физиологически главным продуктом реакции.

Общая особенность всех биологических светоизлучающих реакций состоит в том, что одним из компонентов реакции является молекулярный кислород.

Свечение бактерий привлекает внимание исследователей уже в течение четырех десятилетий, и по некоторым аспектам это один из самых изученных биолюминесцентных процессов.^{2,13} Последнее, однако, не относится к химическому механизму образования электронно-возбужденного продукта в биолюминесцентной реакции; данный вопрос остается открытым по сей день, вызывая интерес химиков и физиков, специализирующихся в области хемилюминесценции. За всю историю исследования свечения бактерий было предложено более десятка возможных путей возбуждения хемилюминесценции в реакции, катализируемой бактериальной люциферазой. В настоящем обзоре проведен сравнительный анализ основных механизмов возбуждения в биолюминесцентной реакции бактерий.

II. Общая характеристика биолюминесцентной реакции бактерий

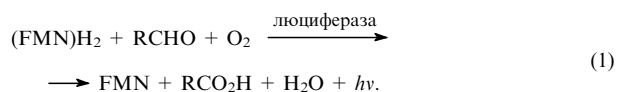
Давно установлено,¹³ что химической основой свечения бактерий является ферментативное окисление восстановленного флавиномононуклеотида ((FMN)H₂, **1**) до флавиномононуклеотида (FMN, **2**) и длинноцепочечного альдегида **3** до миристиновой кислоты (**4**) кислородом воздуха.



3

4

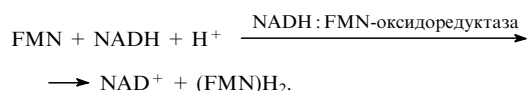
Суммарное уравнение процесса может быть записано так:



Бактериальная люцифераза представляет собой гетеродимер с молекулярной массой ~ 80 кДа. Компоненты биолюминесцентной реакции способны реагировать и в отсутствие фермента, но эффективность хемилюминесценции такого процесса на 10 порядков ниже.² С этой точки зрения некоторые исследователи называют бактериальную люциферазу самым каталитически активным ферментом из всех известных.

Тепловой эффект реакции составляет $110 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$; он складывается из теплот окисления (FMN)H₂ ($40 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$) и альдегида ($70 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$) (см.⁷). Суммарный тепловой эффект реакции превосходит энергию кванта биолюминесценции, равную $\sim 60 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$. В то же время видно, что энергии окисления только (FMN)H₂ недостаточно для излучения наблюдаемого кванта света.

Следует отметить, что ни один из исходных реагентов обсуждаемой реакции не может существовать в бактериальной клетке в свободном виде: (FMN)H₂ (**1**) подвергается быстрому автоокислению, альдегид **3** является ядом и не производится организмами. Поэтому бактерии имеют специальные ферментативные системы, способствующие восстановлению FMN (**2**) и карбоновой кислоты **4** исключительно для нужд биолюминесценции. Считается, что восстановление FMN в бактериях происходит в реакции, катализируемой NADH:FMN-оксидоредуктазой (NADH — восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотида):



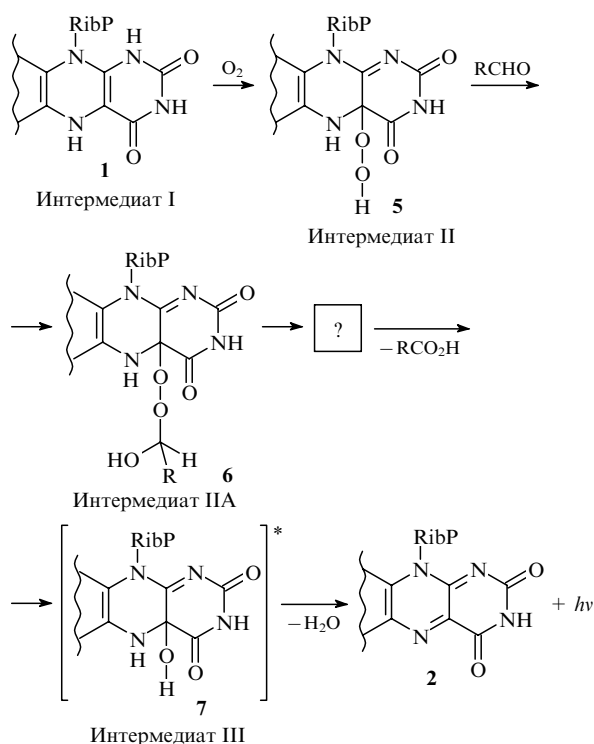
Вопрос о механизме переноса восстановленного флавиномононуклеотида между оксидоредуктазой и бактериальной люциферазой остается до сих пор открытым. Существуют косвенные свидетельства как независимой работы этих ферментов,¹⁴ так и образования прочного комплекса между ними.^{15,16} Данная проблема подробно исследована в работах^{16–18}.

По отношению ко второму субстрату реакции (альдегиду) люциферазы разных источников имеют различную специфичность. Сродство альдегида к люциферазе обусловлено гидрофобными взаимодействиями между алифатическим фрагментом альдегида и гидрофобными группами фермента. Благодаря этому с увеличением длины углеродной цепи альдегид прочнее связывается с люциферазой.^{1,13} Кроме того, длина алифатической цепи определяет положение карбонильной группы альдегида, участвующей в химических перестройках в активном центре люциферазы. Возможно, поэтому альдегиды с более короткой цепью, чем у октанола, не участвуют в люминесцентной реакции. Природным субстратом бактериальной люциферазы считается¹⁹ тетрадеканаль (**3**), поскольку в бактериях ферментативная система, восстанавливающая для нужд биолюминесценции карбоновую кислоту, имеет специфичность именно к миристиновой кислоте (**4**).²⁰

Общая схема преобразования реагентов в реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, была предложена более сорока лет назад,²¹ последующие исследования под-

твердили ее правильность. Согласно этой схеме, реакция проходит через образование трех промежуточных комплексов (интермедиатов) флавиновых производных с люциферазой (схема 1). Комплекс I образует восстановленная форма (FMN)H₂, комплекс II — гидропероксид флавина, а комплекс III — пероксиполуацеталь флавина (номера 1, 2, 5–7 относятся к самим субстратам, а не к их комплексам). Существование интермедиатов I и II было доказано методом спектроскопии ЯМР.²² Образование интермедиата III пока экспериментально не доказано, но признается неизбежной стадией реакции.⁹ Методами ЯМР показано, что основные химические перестройки в ходе реакции происходят на атоме C(4a) изоаллоксазинового фрагмента FMN.²² Результаты этих исследований позволили составить последовательность химических превращений восстановленного флавиномононуклеотида в активном центре бактериальной люциферазы (см. схему 1) (на этой схеме и далее показана только та часть флавина, которая участвует в превращениях).

Схема 1



Здесь и далее RibP = CH₂(CHOH)₃CH₂OP(O)(OH)₂.

Относительно механизма преобразования интермедиата III (4a-пероксиполуацеталь-5-гидрофлавиномононуклеотида (6), связанного с люциферазой) в возбужденный эмиттер до сих пор не существует единого мнения. Этот этап, обозначенный на схеме 1 вопросительным знаком, возможно, включает в себя несколько стадий. Проблема идентификации структуры излучающего хромофора (эмиттера) также не решена полностью. Большинство исследователей приняло, что эмиттером бактериальной билюминесценции является связанный с люциферазой 4a-гидрокси-5-гидрофлавиномононуклеотид (7). Назовем этот комплекс интермедиатом III. Спектр фотолуминесценции соединения 7 (в связанном состоянии) близок спектру излучения, регистрируемому в результате билюминесцентной реакции. Более подробно проблема формирования эмиттера рассмотрена в разделе III.

Основные стадии билюминесцентной реакции бактерий следующие.^{12, 23}

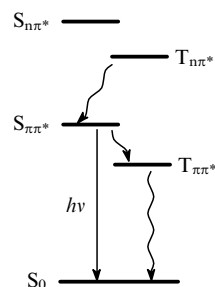
1. Образование интермедиатов I, II, III (энергетический интервал возможных возбужденных состояний интермедиатов приблизительно 260–390 кДж·моль⁻¹ (21 700–32 700 см⁻¹)).

2. Элементарный акт возбуждения, в котором интермедиат III превращается в эмиттер P* (интермедиат IV).

3. Стадия испускания кванта света P* → P + hν.

Следует обратить внимание на оптические свойства участников реакции. Спектр бактериальной билюминесценции представляет собой почти симметричное гауссовское распределение по шкале частот с максимумом, соответствующим длине волны ~490 нм. Положение спектра бактериальной билюминесценции не зависит от кислотности или температуры реакционной смеси. Выход билюминесценции данной реакции в оптимальных условиях составляет от 0.1 до 0.3 в зависимости от типа люциферазы и альдегида.² В соответствии с результатами исследований методом ЯМР,²² восстановленная форма (FMN)H₂ (1) связывается с люциферазой в виде аниона (FMN)H⁻. Спектры поглощения интермедиатов I, II, III мало отличаются друг от друга и характеризуются присущим всем гидрофлавином максимумом в области 380 нм.^{2, 21} Среди этих интермедиатов заметной флуоресценцией (с максимумом ~490 нм) обладает только связанный с люциферазой гидроксифлавин 7.

Эмиттер бактериальной билюминесценции 7 принадлежит к V группе систематики молекул по спектрально-люминесцентным свойствам.¹¹ К этой группе относятся все ароматические гетероциклические соединения, характеризующиеся высокими квантовыми выходами флуоресценции. Относительное положение уровней энергии электронно-возбужденных состояний молекул этой группы с учетом их орбитальной природы и мультиплетности можно представить следующим образом.



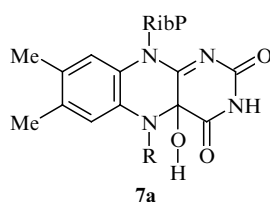
Такие молекулы характеризуются высшими возбужденными состояниями np*-типа и эффективной конверсией возбуждения во флуоресцентное Snp*-состояние из Tnp*- и Snp*-состояний.²⁴

Как уже упоминалось, интересен тот факт, что эмиттеры билюминесцентных реакций других организмов (например, светлячков, медуз), несмотря на отличное от бактериального эмиттера химическое строение, также принадлежат к V спектрально-люминесцентной группе систематики.

Таким образом, билюминесцентная реакция бактерий является эффективным хемилюминесцентным процессом, проходящим, как и большинство известных сейчас жидкофазных хемилюминесцентных реакций, через стадии образования и распада пероксидных форм органических соединений. Но в то же время эта реакция является пока исключением из правил, поскольку других эффективных хемилюминесцентных процессов с участием гидропероксидов (которым является производное 5) до сих пор не обнаружено.⁹

III. Образование эмиттера в биолюминесцентной реакции

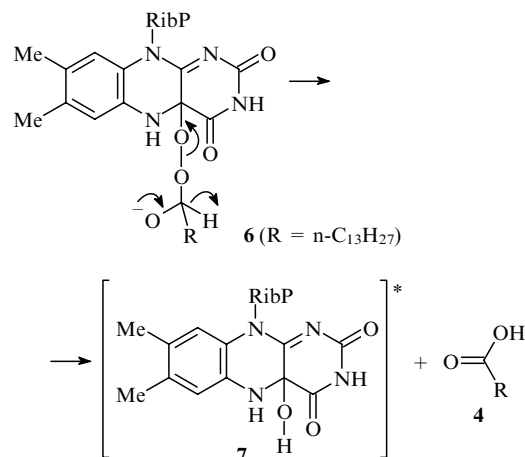
Курфюрст и Гастингс идентифицировали и охарактеризовали излучающий промежуточный продукт реакции (1).²⁵ Наблюдая одновременно за изменением поглощения реакционной смеси и интенсивностью биолюминесценции в ходе взаимодействия интермедиата II (комплекса люциферазы и 4*a*-гидроперокси-5-гидрофлавиномононуклеотида (**5**)) с деканалем, авторы зарегистрировали образование двух форм связанного с ферментом флавина. Большая часть связанного флавина представляла собой FMN (**2**) с характерными максимумами поглощения при 370 и 440 нм и максимумом флуоресценции при 530 нм. Вторая форма комплекса фермента с флавином характеризовалась максимумом поглощения при 360 нм и максимумом флуоресценции при 490 нм и была признана интермедиатом, ответственным за явление биолюминесценции. Исходя из спектрально-люминесцентных характеристик, авторы постулировали, что флуорофор этого интермедиата имеет структуру 4*a*-гидроксифлавина **7**. Было установлено, что излучающий интермедиат характеризуется относительно коротким временем жизни (7 мин при 9°C), а его флуорофор легко окисляется растворенным кислородом до FMN (**2**) (энергия активации этого процесса составляет 83 кДж·моль⁻¹).²⁶ Проблема окончательной идентификации 4*a*-гидроксифлавина **7** как излучающего флуорофора (т.е. эмиттера) заключается в том, что до сих пор не удалось синтезировать это соединение в стабильной форме, чтобы подробно описать его спектрально-люминесцентные свойства. Исследованные стабильные аналоги этого соединения, даже если имели подходящие спектры поглощения, очень слабо люминесцировали и вступали в хемилюминесцентные реакции с несравнимо меньшим выходом (10⁻⁴–10⁻⁷).^{27, 28} Лишь недавно появилась публикация, описывающая модельное производное флавина, которое имеет подходящие люминесцентные характеристики.²⁹ Авторы этой работы изучили связывание с бактериальной люциферазой и квантовые выходы флуоресценции 5-децил-4*a*-гидрокси-флавиномононуклеотида (**7a**). Установлено, что данное соединение, слабо флуоресцирующее в свободном состоянии, после связывания с бактериальной люциферазой флуоресцирует с квантовым выходом 0.08 (что составляет приблизительно 50% от выхода бактериальной биолюминесценции) и максимальной интенсивностью при 440 нм. По мнению авторов исследования, данный факт подтверждает идентичность 4*a*-гидроксифлавина **7** и эмиттера природной биолюминесценции бактерий.



R = n-C₁₀H₂₁.

Из множества предложенных к настоящему моменту механизмов возбуждения эмиттера бактериальной биолюминесценции наиболее интересны, по нашему мнению, шесть основных, представленных ниже.

Первый механизм был предложен в свое время Эберхардом и Гастингсом.³⁰ Постулируя основные стадии реакции (1), они предположили, что пероксиполуацеталь флавина **6** в составе интермедиата IIА подвергается перегруппировке Байера–Виллигера с прямым образованием карбоновой кислоты **4** и возбужденного гидроксифлавина **7**.



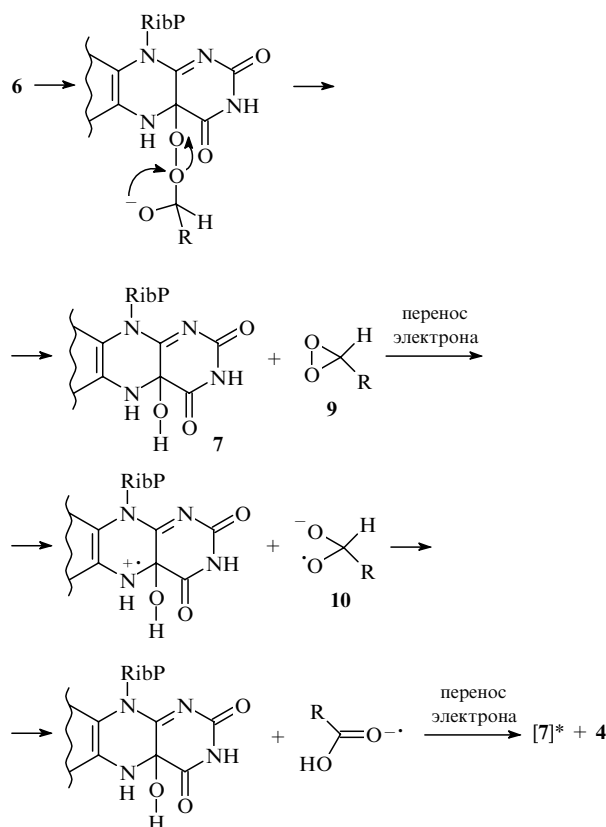
Одним из возражений против этой гипотезы является тот факт, что в химических реакциях перегруппировка Байера–Виллигера не приводит к образованию электронно-возбужденного продукта.³¹

В дальнейшем Косовер предложил свою схему образования эмиттера биолюминесценции.³² Следует отметить, что его механизм — это первая попытка объяснения процесса возбуждения на основе анализа элементарных физико-химических процессов. Согласно данной гипотезе (схема 2), возбужденное состояние формируется в результате диссоциативного переноса электрона от семихинон-радикала флавина **8a**. Образующийся после атаки супероксида пероксид-анион-радикал RCH(O₂)O^{-•} отрывает от SH-группы люциферазы атом водорода, после чего следует разрыв C–H-связи альдегида и образование протонированного флавиномононуклеотида **8b** в возбужденном состоянии, который и играет роль эмиттера.

По поводу приведенного механизма можно высказать три замечания. Во-первых, данную гипотезу считают сомнительной по той причине, что она подразумевает существование в реакции свободнорадикальных стадий, до сих пор не обнаруженных методом ЭПР.³³ (Хотя, возможно, это связано с ограничениями самого метода.) Во-вторых, данный механизм предполагает участие в процессе меркаптогруппы фермента. Действительно, к настоящему моменту выяснено,³⁴ что активный центр бактериальной люциферазы содержит цистеиновый аминокислотный остаток Cys106, который теоретически мог бы предоставить SH-группу для взаимодействия с пероксид-анион-радикалом RCH(O₂)O^{-•}. Но дальнейшие исследования показали, что этот аминокислотный остаток не участвует в биолюминесцентном процессе, поскольку замена его на серин, аланин или валин не ведет к потере биолюминесцентной активности фермента.³⁵ Установлено, что SH-группа остатка Cys106 влияет на связывание альдегида и стабильность интермедиата IIА.³⁶ В-третьих, был синтезирован аналог восстановленного флавина, который не может образовывать N(1)-протонированную форму (1-деаза-(FMN)H₂), но тем не менее участвует в реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, с испусканием кванта света.³⁷

В отношении схемы, предложенной Косовером, можно высказать много критических замечаний, но главная ее ценность в том, что впервые возбуждение молекул в процессе биолюминесценции связывалось с диссоциативным переносом электрона — одним из главных возможных механизмов хемилюминесценции.

После открытия³⁸ такого механизма хемилюминесцентных реакций, как химически инициированная электронно-обменная люминесценция (ХИЭОЛ), Магер и Аддингк попытались адаптировать³⁹ данный механизм для случая



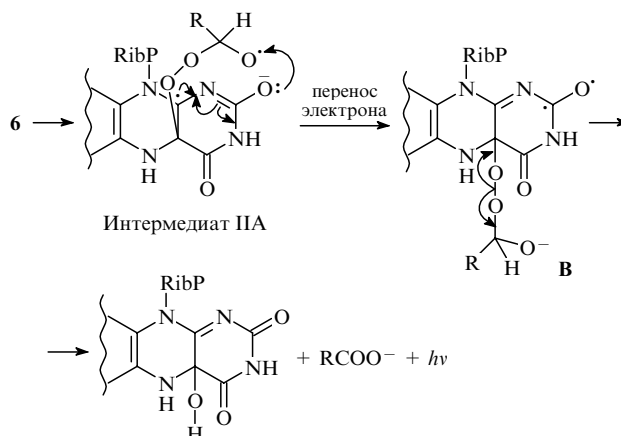
Образование диоксирана — ключевой момент данной гипотезы. Существуют два возможных пути распада диоксирана. Во-первых, диоксираны могут претерпевать гомолитический разрыв пероксидной связи с образованием анион-радикала **10**, который перегруппировывается в карбоновую кислоту (в синглетном или триплетном возбужденном состоянии). Этот путь имеет прямую аналогию с разложением диоксетанов. Гидроксифлавин **7** является таким флуорофором, который может акцептировать энергию электронного возбуждения как с триплетного, так и с синглетного состояния продукта распада диоксирана. Во-вторых, возбужденный флуорофор может образоваться путем ХИЭОЛ, при которой диоксиран получает электрон от флуорофора, таким образом формируя ион-радикальную пару. Затем преобразование диоксиранового анион-радикала в карбоксильный радикал и обратный перенос электрона дают электронно-возбужденный флуорофор. В результате как первого, так и второго пути распада диоксирана высвобождается достаточно энергии для заселения возбужденных состояний, способных при дезактивации излучить фотон даже в голубой области.

Исследовательская группа Раушела и Болдуина изучила изотопный эффект, производимый дейтерированным альдегидом на скорость биолюминесцентной реакции при разных условиях.⁴⁴ Была получена невысокая, но достоверная величина k_H/k_D , лежащая в диапазоне 1.5–1.9, что согласуется с теоретическими расчетами авторов, предполагающими участие в процессе диоксирановых форм в качестве промежуточного продукта реакции.

Однако существует несколько серьезных возражений против образования диоксиранов в ходе реакции бактериальной люциферазы, высказанных, в частности, МакКапрой.⁹ Во-первых, до сих пор не известны случаи образования диоксирана из альдегида.⁴⁵ Обычно потеря альдегидом протона приводит напрямую к образованию карбоновой кислоты. Во-вторых, диоксираны относятся к чрезвычайно

реакционноспособным молекулам,⁴⁵ и их образование привело бы к окислению (повреждению) фермента в активном центре.

Отличительной чертой следующего механизма, предложенного Кудряшевой с соавт.,⁴⁶ является осуществление только внутримолекулярных перегруппировок в процессе формирования возбужденной структуры биолюминесцентного эмиттера при переходе между структурами **6** и **7**. В работе⁴⁶ обосновывается возможность заселения высших возбужденных состояний эмиттера биолюминесценции в качестве первично-возбужденного состояния через внутримолекулярный перенос электрона с депротонированной кетонимидной группы на пероксиполюацетальный фрагмент интермедиата **1А**.



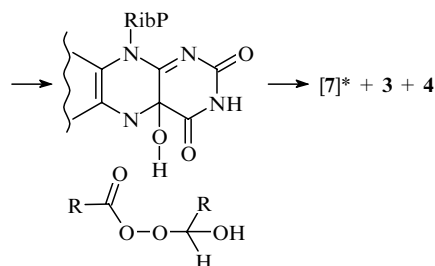
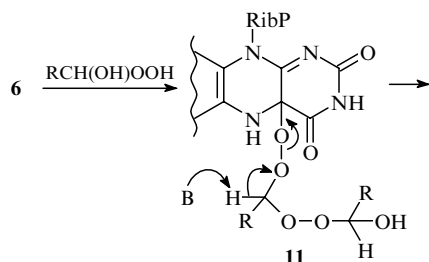
Для флавинов **5–7** $T_{пл}^*$ -состояния не являются низшими возбужденными. Авторами выдвинуто предположение, что в результате биолюминесцентной реакции происходит образование флавина именно в этом возбужденном состоянии (структура **В**). Согласно данной гипотезе, за образованием возбужденной карбонильной группы следует внутримолекулярный перенос энергии во флуоресцентное состояние $T_{пл}^* \rightarrow S_{пл}^*$, который является разрешенным как переход между уровнями разной орбитальной природы и мультиплетности (правило Эль-Сазда⁴⁷). При этом запрет по мультиплетности снимается в результате спин-орбитальных взаимодействий. Этот факт объяснен ранее в работе Плотникова²⁴, где рассчитаны константы скоростей внутримолекулярных переходов в молекулах подобного типа; их величины высоки и составляют $10^{10}–10^{11} \text{ с}^{-1}$. Важность спин-орбитальных взаимодействий в физико-химических процессах подчеркивается в работах Минаева с соавт.^{48–50} Эффективность внутримолекулярных переходов между уровнями разной мультиплетности доказывается для многих сложных гетероароматических соединений. Так, известно, что для целого ряда ароматических соединений, включая флавины, при фотовозбуждении характерно такое явление, как обратная интеркомбинационная конверсия из высоковозбужденных триплетных состояний молекул на возбужденные синглетные уровни с последующей флуоресценцией при переходе в основное состояние.⁵¹

Описанный выше процесс релаксации возбуждения в эмиттере биолюминесценции связан с перестройками электронной структуры молекулы эмиттера. При этом возбуждение, локализованное на карбонильной группе ($\pi\pi^*$ -возбуждение), делокализуется по всей молекуле ($\pi\pi^*$ -возбуждение). Процесс завершается излучательным переходом $S_{пл}^* \rightarrow S_0$. Авторы отмечают,²⁴ что время жизни высших триплетных состояний в аналогичных структурах слишком мало ($10^{-10}–10^{-11} \text{ с}$), чтобы они могли быть зарегистрированы методами ЭПР. Следует отметить, что такой ход биолюминесцентной реакции также предсказывает обрат-

ную зависимость между константой скорости реакции первого порядка и одноэлектронным окислительным потенциалом аналогов FMN, упомянутую выше в связи с механизмом ХИЭОЛ.³⁹ Согласуются с этой гипотезой и данные, полученные при использовании в качестве субстрата биолюминесцентной реакции производного FMN, в котором кислород при атоме C(2) был заменен на серу (2-тио-1,5-дигидрофлавиномононуклеотид).⁵² При этом наблюдался сдвиг спектра биолюминесценции в длинноволновую область (до 535 нм).

С применением методов флуоресцентной спектроскопии был проведен ряд исследований, направленных на обнаружение высоковозбужденных состояний эмиттера бактериальной биолюминесценции.^{53–55} В частности, исследована возможность переноса энергии на экзогенные молекулы, внесенные в биолюминесцентную реакцию.^{53, 54} В качестве экзогенных молекул (потенциальных акцепторов энергии возбуждения) были выбраны флуоресцентные ароматические соединения с энергией первого синглетного возбужденного состояния в интервале 22 000–32 000 см⁻¹ (т.е. большей, чем аналогичная энергия молекулы эмиттера). При этом спектры поглощения выбранных молекул не перекрывались со спектром биолюминесценции. В ходе биолюминесцентной реакции в присутствии этих соединений была обнаружена их сенсibilizированная люминесценция, которая проявлялась в виде малоинтенсивных полос в коротковолновой части спектра. Этот результат был объяснен осуществлением безызлучательного переноса энергии с высших электронно-возбужденных состояний эмиттера на уровни данных экзогенных молекул, вероятно, по обменно-резонансному механизму. Поскольку сенсibilizированная люминесценция была зарегистрирована только для соединений с энергией флуоресцентного состояния не более 26 000 см⁻¹, эта энергия была признана характеристикой высшего электронно-возбужденного состояния эмиттера бактериальной биолюминесценции.⁵⁴ В результате исследования спада анизотропии флуоресценции молекул акцепторов в присутствии бактериальной люциферазы была доказана возможность гидрофобного связывания молекул акцепторов с люциферазой, а следовательно, и сближения с эмиттером на расстояния, достаточные для осуществления переноса энергии по обменному механизму.⁵⁵

Последний механизм бактериальной биолюминесценции, который следует упомянуть, был предложен МакКапрой.⁹ По мнению автора, он имеет следующие преимущества перед всеми остальными: 1) согласуется с данными по изотопному эффекту⁴⁴ и с результатами экспериментов с варьированием заместителей;⁴¹ 2) имеет хемиллюминесцентную аналогию — реакцию пероксиэфиров с флуоресцентными соединениями. МакКапра постулировал, что в реакции бактериальной люциферазы после образования интермедиата ПА происходит присоединение пероксида водорода и второй молекулы альдегида к пероксиполуацетальному фрагменту комплекса.⁹



В — основание.

Образовавшийся аддукт **11** распадается на гидроксифлавин и пероксиэфир. Следующая стадия заключается в распаде эфира в присутствии флуоресцентного соединения (гидроксифлавина) с образованием возбужденных молекул последнего. В пользу такого хода реакции говорит зарегистрированное усиление биолюминесценции при добавлении пероксида водорода.⁵⁶ Спонтанное образование молекулами H₂O₂ аддуктов с двумя молекулами альдегида также является доказанным фактом.⁵⁶ Схема МакКапры, предложенная для бактериальной биолюминесценции, является достаточно оригинальной и обоснованной, но, как признает и сам автор, она не объясняет ключевой стадии — образования эмиттера, поскольку сам механизм хемиллюминесценции пероксиэфиров еще окончательно не установлен.

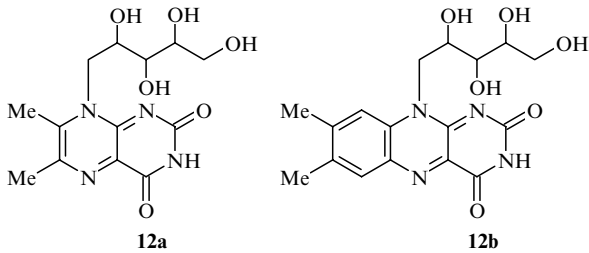
Таким образом, в настоящее время вопрос о механизме возбуждения молекул в реакции, катализируемой бактериальной люциферазой, все еще остается дискуссионным. Предложенные схемы разнообразны и охватывают практически все механизмы, применяемые в настоящее время к жидкофазным хемиллюминесцентным реакциям. Но пока, по замечанию некоторых исследователей, ни один из предложенных механизмов реакции не согласуется с полным набором экспериментальных данных, накопленных за полувековую историю изучения биолюминесценции.

IV. Возбуждение вторичных эмиттеров бактериальной биолюминесценции

1. Характеристика флуоресцентных белков — вторичных эмиттеров светящихся бактерий

То, что в основе свечения бактерий лежит реакция (1), было установлено уже к 1965 г. Но еще долгое время оставалась неясной причина различия спектральных характеристик биолюминесценции самих бактерий (биолюминесценции *in vivo*) и люминесценции в ходе реакций выделенных из них реагентов (биолюминесценции *in vitro*). Положение максимумов спектров биолюминесцентных реакций зависит от типа люциферазы, но ограничивается диапазоном 487–505 нм. Вместе с тем максимумы биолюминесценции живых бактерий различаются в гораздо большей степени. Так, некоторые яркие штаммы светящихся бактерий рода *Photobacterium* излучают свет с максимумом при 475 нм,¹³ а биолюминесценция открытого в середине 1970-х гг. Y1-штамма *Vibrio fischeri* имеет максимум при 545 нм.⁵⁷ К настоящему времени доказано, что причиной изменения спектрального состава излучения упомянутых выше бактерий является наличие специфических флуоресцентных белков, играющих роль эмиттера биолюминесценции, т.е. в данных случаях имеет место не прямая, или сенсibilizированная, хемиллюминесценция.

Флуоресцентные белки светящихся бактерий представляют собой комплексы белка и низкомолекулярного флуорофора, способного флуоресцировать в видимой области спектра. Из бактерий *Photobacterium* был выделен флуоресцентный белок, названный люмазиновым белком (LumP), так как его флуорофором является 6,7-диметил-8-(1-D-рибидил)люмазин (**12a**).⁵⁸ В желто-зеленом штамме *V. fischeri* был найден^{59, 60} так называемый желтый флуоресцентный белок (YFP) с аналогичной массой и, как позже выяснилось,^{61, 62} со сходной с LumP первичной структурой. Флуорофором YFP является FMN (**2**) или рибофлавин (**12b**).⁶³



Основные характеристики данных флуоресцентных белков приведены в табл. 1. Во избежание путаницы обозначим белковую часть LumP и YFP, которая остается после удаления флуорофора (она называется апопротеином), как LumP_A и YFP_A соответственно. Белки LumP_A и YFP_A замечательны тем, что, в отличие от большинства других белков, не тушат флуоресценцию связанного с ними флавина.⁶⁴ При связывании с LumP_A и YFP_A максимумы флуоресценции их природных флуорофоров сдвигаются в противоположных направлениях (см. табл. 1): у люмазина **12a** наблюдается гипсохромный сдвиг, у флавина **2** — bathохромный. Но оба этих факта свидетельствуют о высокой полярности микроокружения упомянутых флуорофоров в связывающем центре соответ-

ствующего белка (так как известно, что с уменьшением полярности растворителя максимум флуоресценции флавинов сдвигается в коротковолновую область, а люминесценции люмазина — в длинноволновую).^{2, 64} Было обнаружено, что в присутствии микромолярных концентраций LumP или YFP в зависимости от типа люциферазы, длины углеродной цепи альдегида и источника флуоресцентного белка могут наблюдаться следующие эффекты: 1) смещение максимума испускания (гипсохромное в присутствии LumP, bathохромное — в присутствии YFP); 2) увеличение интенсивности излучения (до трехкратного в присутствии LumP, до десятикратного в присутствии YFP).² На механизмах, лежащих в основе таких эффектов, мы остановимся более подробно далее. Низкие эффективные концентрации, при которых начинается воздействие флуоресцентных белков на характеристики биолуминесцентной реакции бактерий, указывают на возможность (или даже необходимость) образования ими комплекса с интермедиатами реакции. Методами флуоресцентной спектроскопии и хроматографии было показано, что LumP и YFP формируют комплексы состава 1 : 1 с интермедиатами II и III (но не с люциферазой в чистом виде).^{65, 66} Отсутствие взаимодействия с люциферазой выглядит закономерным, потому что в противном случае присоединение флуоресцентного белка закрыло бы субстратам биолуминесцентной реакции (главным образом восстановленному флавину **1**) доступ в активный центр этого фермента. Методом флуоресцентного титрования была определена константа связывания интермедиата III с YFP, равная 7 · 10⁻⁷ моль · л⁻¹ (0 °C), что сопоставимо с эффективной концентрацией, при которой начинается воздействие этого белка на биолуминесцентную реакцию.⁶⁶ Исследование кинетики биолуминесцентной реакции с участием LumP и YFP показало, что важную роль в образовании белковых комплексов играют алифатические компоненты (альдегиды, карбоновые кислоты, спирты).⁶⁷

Таблица 1. Сравнительные характеристики флуоресцентных белков светящихся бактерий.

Характеристика	Значение для белков ^a	
	LumP	YFP ^b
Молекулярная масса, кДа	21	24
Флуорофор	Производное люмазина 12a	FMN
Константа связывания флуорофора с белком, моль · л ⁻¹	1.6 · 10 ⁻⁸ (20 °C, pH 7)	1 · 10 ⁻⁸ (4 °C, pH 7)
Максимум длинноволновой полосы поглощения флуорофора в свободном/связанном состоянии, нм	406/417	445/470
Коэффициент молярного поглощения флуорофора в свободном/связанном состоянии, л · моль ⁻¹ · см ⁻¹	10 300 (406 нм)/10 300 (414 нм)	12 500 (445 нм)/12 500 (460 нм)
Максимум спектра флуоресценции флуорофора в свободном/связанном состоянии, нм	490/475 (вода)	525/538 (вода)
Квантовый выход флуоресценции флуорофора в свободном/связанном состоянии	0.45 (вода, 22 °C)/0.58 (вода, 20 °C)	0.26 (вода, 22 °C)/—
Время жизни флуоресцентного состояния флуорофора в свободном/связанном состоянии, нс	8.9 (20 °C)/1.7 (2 °C)	4.7 (20 °C)/5.5 (2 °C)
Время вращательной корреляции ^c флуорофора в свободном/связанном состоянии, нс	0.15 (2 °C)/20 (0 °C)	0.2 (0 °C)/20 (0 °C)
Интеграл перекрытия спектра поглощения флуоресцентного белка со спектром биолуминесценции, см ³ · л · моль ⁻¹	2 · 10 ⁻¹⁵	1.54 · 10 ⁻¹⁴

^a В скобках указаны условия регистрации параметра. ^b Приведены характеристики наиболее изученной формы YFP с FMN (**2**) в качестве флуорофора. ^c Время вращательной корреляции — характеристическое время экспоненциального спада анизотропии флуоресценции молекул при импульсном возбуждении.

В отсутствие алифатических компонентов взаимодействия между белками не обнаружено.

2. Механизм изменения спектрального состава биолюминесценции флуоресцентными белками

Сопоставление форм измененных спектров биолюминесценции со спектрами флуоресценции LumP и YFP при фото-возбуждении однозначно говорит о том, что эти белки участвуют в акте светоизлучения в результате реакции. Вопрос о механизме возбуждения флуоресцентных белков при внесении их в реакцию (1) до сих пор остается предметом обсуждения и споров. Самым простым и привлекательным механизмом, отвечающим за возбуждение вторичных эмиттеров, мог бы стать безызлучательный индуктивно-резонансный перенос энергии (ИРПЭ) с первичного эмиттера за счет слабого диполь-дипольного взаимодействия. Константа скорости такого переноса k_{ET} определяется уравнением Ферстера:

$$k_{ET} = A Q_D k^2 \tau^{-1} R^{-6} J,$$

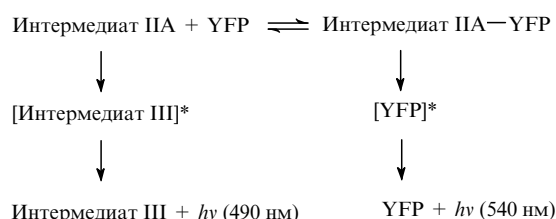
где A — постоянная, Q_D — квантовый выход флуоресценции донора, k^2 — ориентационный фактор, τ — время жизни флуоресцентного состояния донора в отсутствие акцептора, R — расстояние между донором и акцептором энергии, J — интеграл перекрывания спектра поглощения акцептора со спектром испускания донора. Со свойствами акцептора в этой формуле связаны три величины: расстояние R , ориентационный фактор k^2 и интеграл перекрывания J . Первые две величины могут принимать значения, способствующие высокой скорости ИРПЭ с гидроксифлавином 7 на флуоресцентные белки: доказанное существование комплексов интермедиата III с LumP и YFP может обеспечивать близкое расположение и выгодную ориентацию флуорофоров. Остается последний фактор — интеграл перекрывания спектров, который в случае YFP имеет высокое значение, а в случае LumP — низкое (см. табл. 1).

Именно малый интеграл перекрывания спектра поглощения LumP со спектром биолюминесценции вызывает возражения против эффективного акцептирования энергии этим белком по индуктивно-резонансному механизму. Кроме того, максимум флуоресценции гидроксифлавином 7 находится при 495 нм, а максимум спектра поглощения LumP — при ~420 нм, и после предполагаемого переноса энергии должно происходить увеличение энергии излучаемого кванта, чего не наблюдается при фотолуминесценции красителей в растворах. Большой вклад в изучение данной проблемы внесла исследовательская группа Ли.^{2,67–71} Первоначально эффект люмазинового белка Ли с коллегами объясняли⁶⁹ существованием высокоэнергетического предшественника эмиттера бактериальной биолюминесценции с энергией возбужденного состояния ~25 000 см⁻¹. Предполагалось, что этот предшественник передает энергию электронного возбуждения либо гидроксифлавино, либо люмазиновому белку. Впоследствии, однако, Ли отказался от концепции «высокоэнергетического предшественника», а стал объяснять^{2,64} эффективность ИРПЭ особой ориентацией донора и акцептора при малом интеграле перекрывания спектров. Исследования методами флуоресцентной спектроскопии^{64, 68} выявили существование коротковременной компоненты в спаде анизотропии флуоресценции интермедиатов II и III в комплексе с LumP (при возбуждении на полосе поглощения флавина — 370 нм). Такой быстрый спад анизотропии исследователи объяснили осуществлением ИРПЭ с флавином, входящего в состав интермедиатов, на люмазин 12а. Полученные данные хорошо описывались моделью, в которой константа скорости ИРПЭ имела значения от $4 \cdot 10^8$

до 10^9 с⁻¹ (в зависимости от типа люциферазы и источника LumP).^{65, 68} С учетом того что константа скорости излучательного перехода первичного эмиттера с флуорофором 7 составляет 10^8 с⁻¹, авторы сделали вывод, что изменение спектральных характеристик биолюминесцентной реакции в присутствии LumP может осуществляться посредством ИРПЭ. Расчеты Ли показали,⁶⁴ что фиксированное расстояние в 1.5 нм и выгодная взаимная ориентация между флавином 7 и люмазиновым флуорофором 12а могут компенсировать малый интеграл перекрывания спектров и объяснить наблюдаемую высокую эффективность «анти-стоксовой» миграции энергии возбуждения на LumP. Следует отметить, что спектральные свойства такой донорно-акцепторной пары, как интермедиат III — LumP, а именно близкое расположение максимумов спектров испускания донора и акцептора (490 и 475 нм соответственно), не позволяют исследовать перенос энергии классическими методами флуоресцентной спектроскопии. Обычно скорость переноса энергии определяют по изменению квантового выхода донора в присутствии акцептора (при возбуждении на полосе поглощения донора).

Изучение процессов передачи энергии в системе биолюминесцентный эмиттер — YFP облегчено по сравнению с системой, содержащей LumP, из-за наличия большого красного сдвига между максимумами излучения предполагаемых донора и акцептора энергии. Это позволяет эффективно разделить полосы испускания донора и акцептора и, как следствие, более точно измерить скорость переноса энергии по изменению времени жизни флуоресцентного состояния донора. Такое исследование было проведено.⁶⁷ По изменению скорости спада флуоресценции интермедиата III определена константа скорости ИРПЭ на YFP, равная $4 \cdot 10^9$ с⁻¹. Таким образом найдено, что скорость ИРПЭ для системы с YFP больше приблизительно в 10 раз, чем аналогичный параметр для системы с LumP.⁶⁰ При этом интегралы перекрывания спектра поглощения со спектром биолюминесценции LumP и YFP различаются в 7.7 раза. Авторы работы⁶⁷ считают это подтверждением предположения о том, что возбуждение вторичных эмиттеров происходит за счет слабого диполь-дипольного взаимодействия по ферстеровскому (индуктивно-резонансному) механизму.

Спектры биолюминесценции в присутствии YFP состоят из двух полос — интенсивной желто-зеленой с максимумом около 540 нм и слабоинтенсивной голубой с максимумом при 490 нм. Для более детального установления механизма формирования такого спектра Экштейн с соавт. исследовал кинетику реакции (1) в присутствии YFP.⁷² Обнаружено сложное и, что более важно, разное изменение скорости спада «голубой» и «желто-зеленой» составляющих биолюминесценции со временем. По мнению авторов, это свидетельствует о том, что только классический безызлучательный перенос энергии не может объяснить действие YFP на реакцию, катализируемую бактериальной люциферазой. Авторы предложили схему, согласно которой YFP образует комплекс с интермедиатом IIА, уменьшая его время жизни. Этот комплекс распадается с формированием возбужденного YFP, а «голубая» составляющая биолюминесценции излучается только несвязанным интермедиатом III.



Такой механизм похож на межмолекулярную активированную хемилюминесценцию, когда флуорофор катализирует распад пероксида посредством переноса заряда или электрона, переходя при этом в возбужденное состояние. Построенная согласно предложенной схеме математическая модель удовлетворительно описала полученные экспериментальные данные по кинетике двух составляющих биолюминесценции (при малых концентрациях YFP). Как уже упоминалось, последующие исследования показали, что при фотовозбуждении ИРПЭ в комплексе от интермедиата III на YFP является очень эффективным процессом.⁶⁷ Его скорость более чем на порядок превышает скорость излучательного перехода для гидроксифлавина **7** в составе интермедиата III. Поэтому, вероятно, нельзя недооценивать такой путь возбуждения желто-зеленой биолюминесценции в системе с участием YFP.

3. Изменение интенсивности биолюминесценции в присутствии флуоресцентных белков

Как уже упоминалось, оба природных флуоресцентных белка бактерий (LumP и YFP) вызывают увеличение интенсивности биолюминесценции реакции (1). Но, как выяснилось, осуществляется этот эффект по разным механизмам.

Установлено, что добавление в биолюминесцентную реакцию LumP приводит к увеличению выхода биолюминесценции. Причина этого увеличения (по мнению авторов работ^{2,67}, тривиальная) заключается в том, что квантовый выход флуоресценции LumP (0.58) почти в два раза превышает соответствующую характеристику связанного с люциферазой гидроксифлавина **7** (0.28–0.33). Поэтому сам акт излучения с LumP происходит более эффективно. Хотелось бы отметить, что такое объяснение оправдано, если скорость переноса энергии на LumP действительно значительно (в 4–10 раз) превышает скорость собственного излучательного перехода в гидроксифлавине **7**, как это было оценено в упомянутых выше работах.^{65,68} К сожалению, спектральные свойства системы интермедиат III–LumP не позволяют произвести точное измерение скорости переноса энергии, и объяснения высокой эффективности такого переноса вызывают сомнения по причине малого интеграла перекрытия спектров.

Квантовые выходы флуоресценции YFP и гидроксифлавина **7** отличаются мало, поэтому, несмотря на установленную⁶⁷ высокую константу скорости переноса энергии в системе с YFP, увеличения общего количества излученных квантов в реакции с участием этого вторичного эмиттера не происходит.

Интенсивность излучения биолюминесцентной реакции в присутствии YFP регулируется несколько иным образом. Установлено,⁷³ что в присутствии этого белка значительно возрастает скорость реакции (1). Уникальное свойство этой системы состоит в том, что с понижением температуры данный эффект усиливается. Максимальная эффективность YFP, выраженная как отношение интенсивности излучения при длине волны 540 нм (I_{540}) к интенсивности при длине волны 490 нм (I_{490}), наблюдается при 4°C. По мнению некоторых исследователей,⁷³ эта система чуть ли не единственная среди ферментативных систем, имеющая отрицательный температурный коэффициент. Потеря активности YFP с повышением температуры не может объясняться только диссоциацией флавина и YFP_A (например, при нагревании реакционной смеси от 4 до 15°C в присутствии $4 \cdot 10^{-6}$ моль $\cdot$ л⁻¹ YFP происходит диссоциация только 15% молекул YFP, а величина I_{540}/I_{490} уменьшается при этом в 3 раза). Дополнительным фактором, способствующим инактивации YFP с ростом температуры, может быть изменение конформации этого белка при нагревании, но это

явление пока не нашло экспериментального подтверждения или опровержения. Интересно также, что в присутствии YFP изменяется не только оптимальная температура реакции, но и оптимальная длина углеродной цепи альдегида.⁷⁴ Максимальная эффективность YFP достигается в реакции с участием октанала, в то время как в отсутствие YFP наибольшая интенсивность наблюдается в случае алифатических альдегидов, имеющих не менее 12 атомов углерода. Исследователи объясняют это тем, что в реакции (1) с участием октанала наблюдается самое большое время жизни интермедиата ПА (по сравнению с реакциями других альдегидов). Как следствие, YFP имеет больше возможностей для взаимодействия с этим интермедиатом и для «перевода» реакции на путь, ведущий к возбуждению именно «желто-зеленого» хромофора.⁷⁴

Биологическая роль вторичных эмиттеров светящихся бактерий не совсем ясна. Большая часть предположений по этому вопросу основывается на том, что главная функция биолюминесценции сигнальная. С этой точки зрения вовлечение в светоизлучающий процесс LumP как минимум дает выигрыш в интенсивности свечения (из-за увеличения выхода биолюминесценции). А YFP позволяет бактериям ярко светиться в широком диапазоне температур (от 5 до 25°C). Предполагают также, что высокая интенсивность свечения «желто-зеленых» бактерий при 4°C (т.е. при температуре, когда их метаболические процессы замедлены) делает их привлекательными симбионтами для рыб или других организмов.⁷³

Если принять за основу гипотезу «нетеплового сброса энергии» в биолюминесцентном процессе,⁸ то возможность изменения энергии «сбрасываемого» кванта в присутствии вторичных эмиттеров можно рассматривать как важное адаптационное свойство бактерий в условиях варьирования количества поступающей в клетку энергии (например, при появлении различных количеств пероксида водорода).

В заключение данного раздела следует отметить, что любая предлагаемая схема биолюминесцентной реакции должна согласовываться с описанными выше эффектами, производимыми флуоресцентными белками. В особенности это касается люмазинового белка, поскольку он дает гипсохромный сдвиг спектра биолюминесценции. Из шести представленных в предыдущем разделе схем четыре последние предполагают заселение электронно-возбужденных состояний вторичного эмиттера, которым может быть LumP. При протекании реакции по механизму ХИЭОЛ возможно образование возбужденной карбоновой кислоты, которая затем играет роль донора энергии для флуоресцентных молекул. Аналогичным образом распад диоксирана может протекать с участием LumP и приводить к возбуждению люмазинового хромофора. По схеме, предложенной авторами работы⁴⁶, LumP способен акцептировать энергию с высоковозбужденных уровней гидроксифлавинового интермедиата. В реакции, предложенной МакКапрой, также возможно участие другого флуорофора (помимо гидроксифлавина) на стадии распада пероксиэфира с последующим возбуждением этого флуорофора.

Таким образом, вторичные эмиттеры бактериальной биолюминесценции (люмазиновый и желтый флуоресцентный белки), хотя и вызывают разное изменение спектральных характеристик биолюминесцентной реакции, схожи по своим свойствам: их белки имеют аналогичную структуру, они эффективно взаимодействуют с интермедиатами биолюминесцентной реакции, создавая условия для возбуждения вторичного флуорофора. Исключительно эффективное изменение спектров и интенсивности биолюминесценции при добавлении флуоресцентных белков связано, в первую очередь, с образованием белковых комплексов. Благодаря этому их флуорофоры оказываются на близком расстоянии

от активного центра люциферазы, практически «в самой гуще событий» и могут участвовать как в некоторых химических стадиях реакции, так и в физическом переносе энергии возбуждения. На сегодняшний день можно констатировать, что ни «физический», ни «химический» путь возбуждения вторичных эмиттеров по отдельности не могут объяснить всю совокупность воздействий флуоресцентных белков на характеристики биолюминесценции бактерий. Следует заметить, что неопределенность в механизме передачи энергии на вторичные эмиттеры отчасти порождается неопределенностью механизма самой реакции, катализируемой бактериальной люциферазой. Дальнейшие исследования путей образования первичного эмиттера бактериальной биолюминесценции, по-видимому, внесут коррективы в предлагаемые схемы возбуждения флуоресцентных белков. И наоборот, изучение взаимодействия вторичных эмиттеров биолюминесценции с участниками основного химического процесса может в будущем пролить свет на механизм биолюминесцентной реакции.

В. Заключение

Биолюминесценция — это уникальное явление природы и чрезвычайно удобный инструмент для использования в различных областях человеческой деятельности — от экологического мониторинга и клинического анализа до исследования экспрессии и регуляции генов.^{3,75} Процесс преобразования энергии химической реакции в свет с высокой квантовой эффективностью в биолюминесцентных реакциях всегда интересовал ученых. К настоящему времени однозначно установлены последовательности образования химических интермедиатов, описаны спектральные и кинетические характеристики биолюминесцентных реакций с участием ферментов (люцифераз). Интенсивно ведутся генно-инженерные работы по модифицированию люцифераз.⁷⁶ Вместе с тем, поскольку с биолюминесценцией традиционно работают биологи (физиологи, микробиологи, биохимики), наиболее дискутируемым остается вопрос о процессе формирования возбуждения. Для решения этой проблемы необходимо использовать результаты, полученные в теориях строения вещества, люминесценции и хемилюминесценции, основанных на анализе элементарных физико-химических процессов. Так, разработанная в 1970–1980-х гг. классификация молекул по спектрально-люминесцентным свойствам позволяет определить принадлежность эмиттеров всех биолюминесцентных организмов к группе молекул, характеризующихся высокими квантовыми выходами $\pi\pi^*$ -флуоресценции. Именно принадлежность эмиттеров биолюминесценции к данной группе соединений и определяет (наряду с ферментативным катализом) высокую интенсивность биолюминесценции. Мы полагаем, что изучение процессов внутримолекулярного переноса энергии, применение теории межмолекулярной миграции энергии возбуждения, разработанной для растворов флуоресцентных красителей, и результатов исследования хемилюминесцентных реакций окисления позволят достигнуть значительного прогресса в прояснении процессов, ведущих к формированию электронно-возбужденных состояний молекул при биолюминесценции.

Обзор подготовлен при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации и Американского фонда гражданских исследований и развития (программа «Фундаментальные исследования и высшее образование», гранты RUX0-002-KR-06 и Y1-B-02-13), ФЦНТП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники» на 2002–2006 годы (программа «Проведение научных исследований молодыми учеными», грант 2006-ПИ-19.0/001/454), а также

Российской Академии наук (программа «Молекулярная и клеточная биология», грант «Молекулярные механизмы образования эмиттера в биолюминесцентных реакциях различных организмов» 2005–2007 гг.) и Красноярского краевого фонда науки (грант 15G120).

Литература

1. J.W.Hastings. In *Cell Physiology*. (3rd Edition). (Ed. N.Sperelakis). Academic Press, New York, 2001. P. 1115
2. J.Lee, I.B.C.Matheson, F.Muller, D.J.O'Kane, J.Vervoort, A.J.W.G.Visser. In *Chemistry and Biochemistry of Flavins and Flavoenzymes*. Vol. 2. (Ed. F.Muller). CRC Press, Orlando, FL, 1991. P. 109
3. И.И.Гительзон, В.А.Кратасюк, В.Н.Лопатин, А.Д.Апонасенко, В.С.Филимонов, В.В.Фишов, З.Г.Холостова, Н.А.Гаевский, Ю.С.Григорьев, А.А.Тихомиров. *Экологическая биофизика. Т. 1. Фотобиофизика экосистем*. Логос, Москва, 2002
4. J.F.Rees, B.de Wergifosse, O.Noiset, M.Dubuisson, B.Janssens, E.M.Thompson. *J. Exp. Biol.*, **201**, 1211 (1998)
5. H.Watanabe, T.Nagoshi, H.Inaba. *Biochim. Biophys. Acta*, **1141**, 297 (1993)
6. M.P.Barros, E.J.H.Bechara. *Free Radical Biol. Med.*, **24**, 767 (1998)
7. Ю.А.Лабас, А.В.Гордеева. *Природа*, (2), 25 (2003)
8. В.Н.Карнаухов. *Люминесцентный спектральный анализ клетки*. Наука, Москва, 1978
9. F.McCapra. *Methods Enzymol.*, **305**, 3 (2000)
10. Б.А.Илларионов, М.В.Протопопова, В.А.Каргинов, Н.П.Мертвецов, И.И.Гительзон. *Биоорг. химия*, **14**, 412 (1988)
11. Д.Н.Шигорин, Г.А.Валькова, Е.А.Гастилович, В.А.Годик, Г.Г.Коноплев, М.А.Пак, А.Н.Родионова, Н.С.Строкач. *Электронно-возбужденные состояния многоатомных молекул*. Наука, Москва, 1993
12. А.И.Журавлев. В кн. *Биохемилюминесценция*. (Под ред. А.И.Журавлева). Наука, Москва, 1983. С. 3
13. И.И.Гительзон, Э.К.Родичева, С.Е.Медведева, Г.А.Примакова, С.И.Барцев, Г.А.Кратасюк, В.Н.Петушков, В.В.Межевикин, Е.С.Высоцкий, В.В.Заворуев, В.А.Кратасюк. *Светящиеся бактерии*. Наука, Новосибирск, 1984
14. В.Н.Петушков, Г.А.Кратасюк, Н.С.Родионова, А.М.Фиш, П.И.Белобров. *Биохимия*, **49**, 692 (1984)
15. T.M.Schmidt, K.Kopecky, K.H.Nealson. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 2607 (1989)
16. J.C.Low, S.C.Tu. *Photochem. Photobiol.*, **77**, 446 (2003)
17. B.F.Lei, S.C.Tu. *Biochemistry*, **37**, 14623 (1998)
18. C.E.Jeffers, S.C.Tu. *Biochemistry*, **40**, 1749 (2001)
19. S.Ulitzur, J.W.Hastings. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 265 (1979)
20. E.A.Meighen. *FASEB J.*, **7**, 1016 (1993)
21. J.W.Hastings, Q.H.Gibson. *J. Biol. Chem.*, **238**, 2537 (1963)
22. J.Vervoort, F.Muller, D.J.O'Kane, J.Lee, A.Bacher. *Biochemistry*, **25**, 8067 (1986)
23. Р.Ф.Васильев. *Изв. АН СССР. Сер. физ.*, **46**, 323 (1982)
24. В.Г.Плотников. *Успехи химии*, **49**, 327 (1980)
25. M.Kurfurst, S.Ghisla, P.Macheroux, J.W.Hastings. In *Flavins and Flavoproteins*. (Eds R.C.Bray, P.C.Engel, S.C.Mayhew). Walter de Gruyter, Berlin; New York, 1984. P. 657
26. I.B.C.Matheson, J.Lee. *Photochem. Photobiol.*, **38**, 231 (1983)
27. H.I.X.Mager, D.Sazou, Y.H.Liu, S.C.Tu, K.M.Kadish. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 3759 (1988)
28. T.W.Kaaret, T.C.Bruice. *Photochem. Photobiol.*, **51**, 629 (1990)
29. B.F.Lei, Q.Z.Ding, S.C.Tu. *Biochemistry*, **43**, 15975 (2004)
30. A.Eberhard, J.W.Hastings. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 348 (1972)
31. K.-D.Gundermann, F.McCapra. *Chemiluminescence in Organic Chemistry*. Springer-Verlag, Berlin, 1987
32. E.M.Kosower. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **92**, 356 (1980)
33. В.Н.Петушков. *Биофизика*, **30**, 49 (1985)
34. A.J.Fischer, T.B.Thompson, J.B.Thoden, T.O.Baldwin, I.Rayment. *J. Biol. Chem.*, **271**, 21956 (1996)

35. H.M.Abu-Soud, A.C.Clark, W.A.Francisco, T.O.Baldwin, F.M.Raushel. *J. Biol. Chem.*, **268**, 7699 (1993)
36. O.Paquatte, S.C.Tu. *Photochem. Photobiol.*, **50**, 817 (1989)
37. M.Kurfurst, P.Macheroux, S.Ghisla, J.W.Hastings. *Eur. J. Biochem.*, **181**, 453 (1989)
38. G.B.Schuster. *Acc. Chem. Res.*, **12**, 366 (1979)
39. H.I.X.Mager, R.Addink. In *Flavins and Flavoproteins*. (Eds R.C.Bray, P.C.Engel, S.C.Mayhew). Walter de Gruyter, Berlin; New York, 1984. P. 37
40. H.I.X.Mager, S.C.Tu. *Photochem. Photobiol.*, **62**, 607 (1995)
41. J.W.Eckstein, J.W.Hastings, S.Ghisla. *Biochemistry*, **32**, 404 (1993)
42. F.McCapra. In *Proceedings of the 9th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence. Bioluminescence and Chemiluminescence: Molecular Reporting with Photons*. Woods Hole, MA, 1996. P. 7
43. F.M.Raushel, T.O.Baldwin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **164**, 1137 (1989)
44. W.A.Francisco, H.M.Abu-Soud, A.J.DelMonte, D.A.Singleton, T.O.Baldwin, F.M.Raushel. *Biochemistry*, **37**, 2596 (1998)
45. В.П.Казаков, А.И.Волошин, Д.В.Казаков. *Успехи химии*, **68**, 283 (1999)
46. Н.С.Кудряшева, П.И.Белобров, В.А.Кратасюк, Д.Н.Шигорин. *Докл. АН СССР*, **321**, 837 (1991)
47. M.A.El-Sayed. *J. Chem. Phys.*, **38**, 2834 (1963)
48. B.F.Minaev, S.Lunell. *Z. Phys. Chem.*, **182**, 263 (1993)
49. B.F.Minaev, S.Knuts, H.Agren. *Chem. Phys.*, **181**, 15 (1994)
50. S.Knuts, B.F.Minaev, O.Vahtras, H.Agren. *Int. J. Quantum Chem.*, **55**, 23 (1995)
51. В.Л.Ермолаев. *Успехи химии*, **70**, 539 (2001)
52. I.B.C.Matheson, J.Lee, F.Muller. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 948 (1981)
53. N.S.Kudryasheva, E.V.Nemtseva, Yu.P.Meshalkin, A.G.Sizykh. *Luminescence*, **16**, 243 (2001)
54. N.S.Kudryasheva, E.V.Nemtseva, A.G.Sizykh, V.A.Kratasyuk, A.J.W.G.Visser. *J. Photochem. Photobiol., B*, **68**, 88 (2002)
55. N.S.Kudryasheva, E.V.Nemtseva, A.J.W.G.Visser, A.van Hoek. *Luminescence*, **18**, 156 (2003)
56. H.Watanabe, J.W.Hastings. *J. Biochem. (Tokyo)*, **101**, 279 (1987)
57. E.G.Ruby, K.H.Nelson. *Science*, **196**, 432 (1977)
58. D.J.O'Kane, J.Lee. *Biochemistry*, **24**, 1467 (1985)
59. P.Macheroux, K.U.Schmidt, P.Steinerstauch, S.Ghisla, P.Colepicolo, R.Buntic, J.W.Hastings. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **146**, 101 (1987)
60. K.W.Cho, P.Colepicolo, J.W.Hastings. *Photochem. Photobiol.*, **50**, 671 (1989)
61. T.O.Baldwin, M.L.Treat, S.C.Daubner. *Biochemistry*, **29**, 5509 (1990)
62. D.J.O'Kane, B.Woodward, J.Lee, D.C.Prasher. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 1100 (1991)
63. V.N.Petushkov, B.G.Gibson, J.Lee. *Biophys. Biochem. Res. Commun.*, **211**, 774 (1995)
64. J.Lee. *Biophys. Chem.*, **48**, 149 (1993)
65. V.N.Petushkov, B.G.Gibson, J.Lee. *Biochemistry*, **34**, 3300 (1995)
66. V.N.Petushkov, B.G.Gibson, J.Lee. *Biochemistry*, **35**, 8413 (1996)
67. V.N.Petushkov, M.Ketelaars, B.G.Gibson, J.Lee. *Biochemistry*, **35**, 12086 (1996)
68. J.Lee, Y.Wang, B.G.Gibson. *Biochemistry*, **30**, 6825 (1991)
69. J.Lee, Y.Wang, B.G.Gibson. *J. Fluorescence*, **1**, 23 (1991)
70. J.Lee. *Photochem. Photobiol.*, **36**, 689 (1982)
71. J.Lee, Y.Wang, B.G.Gibson. *Anal. Biochem.*, **185**, 220 (1990)
72. J.W.Eckstein, K.W.Cho, P.Colepicolo, S.Ghisla, J.W.Hastings, T.Wilson. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 1466 (1990)
73. G.Sirokman, T.Wilson, J.W.Hastings. *Biochemistry*, **34**, 13074 (1995)
74. G.Sirokman, J.W.Hastings. *Photochem. Photobiol.*, **66**, 198 (1997)
75. A.Roda, P.Pasini, M.Mirasoli, E.Michellini, M.Guardigli. *Trends Biotechnol.*, **22**, 295 (2004)
76. *Bioluminescence and Chemiluminescence: Progress and Perspectives. Proceedings of the 13th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence*. (Eds A.Tsuji, M.Matsumoto, M.Maeda, L.J.Kricka, P.E.Stanley). World Scientific Publishing, Singapore, 2005

THE MECHANISM OF ELECTRONIC EXCITATION IN BACTERIAL BIOLUMINESCENT REACTION

E.V.Nemtseva, N.S.Kudryasheva

Department of Physic, Krasnoyarsk State University

79, Prosp. Svobodnyi, 660041 Krasnoyarsk, Russian Federation, Fax +7(3912)44-8781

Institute of Biophysics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

Akademgorodok, 660036 Krasnoyarsk, Russian Federation, Fax +7(3912)43-3400

The current state of the problem of formation of the electronically excited product in the chemiluminescent reaction that underlies the bacterial luminescence is analysed. Various schemes of chemical transformations able to produce a bacterial bioluminescence emitter are presented. The problem of excitation of secondary emitters is considered; two possible mechanisms of their excitation are analysed.

Bibliography — 76 references.

Received 25th May 2006