

УДК 541.127/128

НОВЫЕ ГИБРИДНЫЕ БЕЛКИ С АКТИВНОСТЬЮ ОРГАНОФОСФАТГИДРОЛАЗЫ И ФЛЮОРЕСЦЕНЦИЕЙ БЕЛКА deGFP4

Д.А. Гудков, И.В. Лягин, В.В. Верхуша*, Е.Н. Ефременко

(кафедра химической энзимологии; e-mail: elena_efremenko@list.ru)

Разработаны новые генетические конструкции, кодирующие синтез гибридных белков, обладающих органофосфатгидролазной активностью и свойствами аналога зеленого флуоресцентного белка с рН-чувствительной флуоресценцией. Установлено, что для получения максимального выхода гибридных белков в растворимой активной форме в клетках *E. coli* необходимо 0,1 мМ индуктора биосинтеза и 10 ч культивирования после индукции синтеза белков. Достигнутый уровень синтеза одного из новых белков в растворимой активной форме оказался в 2–25 раз выше выходов в растворимой форме гибридных белков-аналогов, известных из литературы. Установлено, что органофосфатгидролаза в составе гибридных белков обладает характеристиками (рН-оптимум действия, термостабильность, субстратная специфичность и каталитическая эффективность действия), отличными от соответствующих характеристик, известных для нативного фермента. Показано, что флуоресценция зеленого флуоресцентного белка, находящегося в составе гибридных белков, зависит от рН среды аналогично индивидуальному белку. На примере одного из гибридных белков показана взаимозависимость его флуоресцентных характеристик и ОРН-активности, проявляющейся в реакциях гидролиза фосфорорганических соединений.

Ключевые слова: *органофосфатгидролаза, зеленый флуоресцентный белок, гибридные белки, фосфорорганические соединения.*

Введение

Органофосфатгидролаза (ОРН, ЕС 3.1.8.1) является ключевым ферментом в процессе биодеструкции фосфорорганических соединений (ФОС), к числу которых относятся пестициды, широко применяемые в сельском хозяйстве, и боевые отравляющие вещества (зарин, зоман, Vx) [1]. Известно, что ФОС обладают нейротоксичным действием с сильными кумулятивным и мутагенным эффектами [2]. В настоящее время в мире активно разрабатываются методы биологической детекции и деградации ФОС, в том числе с применением ОРН [3].

Создание высокоэффективной системы экспрессии генетической конструкции, кодирующей синтез рекомбинантной ОРН, обеспечило получение фермента в больших количествах (12 мг из 1 г клеток) в клетках *E. coli* DH5 α при 30°C и 0,2 мМ ИПТГ [4]. Для выделения и очистки фермента с использованием хроматографических носителей были созданы генетичес-

кие конструкции, кодирующие синтез ферментов, содержащих гексагистидиновые (His₆-) последовательности на N-конце (His₆-ОРН) [5] или С-конце (ОРН-His₆) [6] молекулы белка. Ферменты были успешно выделены с помощью макропористых носителей на основе полиакриламидного (ПАА) криогеля, модифицированного иминодиуксусной кислотой (ИДК) и заряженных ионами Co²⁺ [7]. При этом было показано, что каталитические характеристики модифицированных ферментов изменились по сравнению с ОРН [6, 8–9].

Исследования синтеза His₆-ОРН в клетках *E. coli* показали, что до 50% белка образуется в нерастворимой неактивной форме, в результате его выход оказался сниженным по сравнению с ферментом ОРН более чем в 2 раза [10]. Однако наличие такой последовательности значительно упрощает процедуру выделения и очистки белка.

* Медицинский колледж Альберта Эйнштейна, кафедра анатомии и структурной биологии (США).

Известно, что для увеличения выхода растворимой активной формы белка может быть использован “гибридный партнер”, т.е. белок, связанный с целевым продуктом спейсером из нескольких аминокислот [11–12]. Гибридный партнер синтезируется раньше целевого белка, проходит процедуру фолдинга и удерживает целевой продукт в растворенном состоянии. Кроме того, в данном случае работает принцип ингибирования процесса совместной агрегации белков.

В настоящее время в качестве гибридного партнера для различных целевых белков часто используют зеленый флуоресцентный белок (GFP), что помимо увеличения выхода растворимой формы целевого белка позволяет придать ему дополнительные свойства [13]. В ряде работ было описано создание гибридного белка GFP-ОРН, в котором молекулы GFP и ОРН были соединены последовательностью из пяти аминокислотных остатков $-(Asp)_4-Lys$ [13–14], а также аналогичного гибридного белка, содержащего His_6 -последовательность на N-конце молекулы [15]. Несмотря на попытки оптимизации условий биосинтеза данных белков авторам не удалось существенно увеличить выход их растворимой формы [16].

Вместе с этим было установлено, что в связке с GFP каталитическая активность ОРН сохраняется. При этом флуоресценция GFP в составе гибридных белков была пропорциональна каталитической активности ОРН, что давало разработчикам таких гибридных белков возможность определения присутствия очень малых количеств рекомбинантного фермента в анализируемых средах по флуоресценции.

Использование вместо GFP его рН-чувствительного аналога – белка deGFP4 [17] – могло позволить контролировать синтез гибридного белка и проводить оценку эффективности действия ОРН в реакциях гидролиза ФОС, протекающих с изменением рН среды ввиду выделения кислых продуктов. Белок deGFP4 обратимо изменяет флуоресцентные свойства в зависимости от изменения рН раствора. Таким образом, помимо увеличения выхода растворимой формы фермента введение молекулы deGFP4 в состав гибридного белка, содержащего молекулу ОРН, может позволить не только осуществлять гидролиз ФОС, но и иметь высокочувствительного “свидетеля” данного процесса непосредственно в реакционной среде. Получение и исследование свойств подобных гибридных белков и было целью данного исследования.

Экспериментальная часть

В работе использовали параоксон (диэтил *n*-нитрофенилфосфат), диизопропилфторфосфат (ДФФ), имидазол, CHES (2-[N-циклогексил-амино]этансульфоновая кислота, HEPES (N-[2-гидроксиэтил]пиперазин-N'-[2-этансульфоновая кислота), хлорид кобальта шестиводный, хлорид никеля, глицерин, бромфеноловый синий, кумасси бриллиантовый синий R-250, натриевую соль ампициллина, дисульфат канамицина, яичный альбумин, додецилсульфат натрия препараты фирмы “Sigma” (США); триптон и дрожжевой экстракт фирмы “Difco” (США); акриламид, N,N'-метилен-бисакриламид, этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА) фирмы “Merck” (Германия); изопропил-в-D-тио-галактопиранозид (ИПТГ), маркеры для белкового электрофореза (набор белков с молекулярными массами 26,0; 34,0; 43,0; 55,0; 72,0; 95,0; 130,0 кДа) фирмы “Fermentas” (Литва); N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД), персульфат аммония фирмы “Bio-Rad” (США). В качестве носителя для аффинной хроматографии использовали Co^{2+} ИДК-криогель-ПАА (полиакриламидный гель, полимеризованный при температурах ниже 0°C, модифицированный остатками иминодиуксусной кислоты и заряженный ионами Co^{2+}) фирмы “Protiste” (Швеция). Все остальные использованные в работе реактивы марки ч.д.а. были приобретены в фирмах “Лабтехника” и “Химмед” (Россия).

Для создания генетических конструкций, кодирующих синтез гибридных белков, использовали вектор pTES- His_6 -ОРН [5], кодирующий синтез His_6 -ОРН и вектор pGEX-4T2-deGFP4, предоставленный В.В. Верхушей (профессор Медицинского Колледжа А. Эйнштейна, Нью-Йорк, США) в качестве источника гена *degfp4* [17], кодирующего белок deGFP4.

Аmplификацию гена *degfp4* с праймерами рН-F (AGGAGAGGATCCAGTAAAGGAGAAGAАСТТТТ) и AS-R (AGGAGCGAGCTCGCGTCTGGGCTCTTTGTATAGTTCATCCATGC) или RA-R

(AGGAGTGCTAGCGCTTGCACTGGCTTTGTATAGTTCATCCATGC) проводили для получения генетических конструкций, кодирующих синтез гибридных белков с межмолекулярными спейсерами $-(AS)_5$ - и $-(RA)_5$ - соответственно; праймер рН-F использовали для введения сайта рестрикции *Bam*HI в начало кодирующей области гена *degfp4*. Праймеры AS-R или RA-R использовали для введения на 3'-конец гена области, кодирующей части межмолекулярных спейсеров $-(AS)_5$ - или –

(RA)₅– соответственно и следующий за ними сайт рестрикции *SacI* или *NheI*.

Для введения второй части гена, кодирующего межмолекулярные спейсеры $-(AS)_5-$ или $-(RA)_5-$, а также сайт рестрикции *NheI*, на 5'-конец гена *opd*, кодирующего ОРН, плазмиду pTES-His₆-ОРН амплифицировали с праймерами AS-F или RA-F. Праймер ОРН-R был комплиментарен внутренней области гена *opd*.

Сборку векторов проводили путем совместного лигирования полученных фрагментов ДНК с помощью Т4-ДНК-лигазы в течение 3 ч при 10°C. Полученными лигазными сшивками были трансформированы компетентные клетки *E. coli* XL1 Blue. Клетки были высеяны на среду LB, содержащую бактоагар (1,7%) и 100 мкг/мл ампициллина. Для анализа правильности сборки полученных генетических конструкций было отобрано по 6 клонов, из которых (после выращивания клеток в течение 16–18 ч при 37°C в 50 мл среды LB с ампициллином) были выделены плазмидные ДНК. Проведенный электрофоретический анализ выделенных плазмидных ДНК позволил выявить по две молекулы ДНК, имеющих фрагмент-вставку длиной 738 п.о., соответствующую участку гена, кодирующего флуоресцентный белок deGFP4.

Для биосинтеза гибридных белков использовали клетки *E. coli* DH5 α . Для получения инокулята культивирование клеток *E. coli* DH5 α проводили при 37°C на среде LB с ампициллином (100 мкг/мл) при постоянном перемешивании (180 об/мин) на термостатируемой качалке “*Adolf Kuhner AG*” (Швейцария). Для определения концентрации ИПТГ, необходимой для получения максимального количества растворимой формы гибридных белков, 16-часовой инокулят (1%) вносили в питательную среду следующего состава: триптон (12,0 г/л), дрожжевой экстракт (24,0 г/л), глицерин (4,0 г/л), КН₂РО₄ (6,95 г/л), К₂НРО₄·3Н₂О (12,54 г/л), СоСl₂ (10⁻⁵ М), рН 7,0. При достижении оптической плотности 0,7 ($\lambda = 540$ нм) индуцировали синтез гибридных белков введением в среду ИПТГ до конечной концентрации от 0,10 до 0,75 мМ. Контролем являлась культура, выращивание которой осуществлялось в отсутствие ИПТГ в среде. Культивировали клетки при 28°C в течение 21–24 ч.

Для выделения и очистки гибридных белков биомассу клеток, выращенную в оптимальных условиях, отделяли от среды центрифугированием (5000g, 20 мин) на центрифуге “*Beckman J2-21*” (США).

Выделение и очистку гибридного белка His₆-deGFP4-(AS)₅-ОРН проводили в соответствии с хорошо известной методикой [18].

Для выделения и очистки гибридного белка His₆-deGFP4-(RA)₅-ОРН использовали Со²⁺-ИДК-криогель-ПАА. Влажную биомассу взвешивали и ресуспендировали в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,5), содержащем 0,3 М NaCl, 0,05 М NaHCO₃, 10⁻⁵ М СоСl₂, до концентрации 0,2 г/мл. Далее проводили ультразвуковую дезинтеграцию клеток в суспензии (4 раза по 2 мин, 44 кГц). Клеточный дебрис отделяли центрифугированием (15000g, 30 мин). Полученный супернатант наносили на Со²⁺-ИДК-криогель-ПАА (5 мл), предварительно уравновешенный тем же буфером. Носитель с иммобилизованным белком промывали 0,1 М фосфатным буфером (рН 7,5), содержащим 0,3 М NaCl, 0,05 М NaHCO₃, 10⁻⁵ М СоСl₂ и 0,01 М имидазола, со скоростью 2 мл/мин до достижения оптической плотности 0,01 ($\lambda = 280$ нм). Затем элюировали гибридный белок в линейном градиенте имидазола (0,01–0,50 М). Имидазол из собранных фракций удаляли диализом против 0,05 М фосфатного буфера (рН 7,5).

Доли гибридных белков в общем количестве синтезируемых внутриклеточных белков, а также гомогенность ферментных препаратов оценивали электрофоретически в денатурирующих и неденатурирующих условиях в 12%-м полиакриламидном геле с использованием ячейки “*Miniprotean II*” (“*Bio-Rad*”, США) с последующим окрашиванием гелей кумасси R-250.

Концентрацию белка определяли методом Бредфорд с применением реагента фирмы “*Bio Rad*” (США). При обработке всех экспериментальных данных рассчитывали средние значения и значения стандартного отклонения. Все эксперименты проводили по три раза.

Определение ОРН-активности гибридных белков

Ферментативную ОРН-активность гибридных белков определяли спектрофотометрически с использованием спектрофотометра “*Agilent 8453-UV*” (Германия), оборудованного термостатируемой ячейкой, при 25°C, следя за накоплением продукта гидролиза параоксона (4-нитрофенолят аниона) при 405 нм ($\epsilon = 18000$ М⁻¹см⁻¹, рН 10,5). Для определения каталитической активности использовали 0,1 М карбонатный буфер (рН 10,5). Для исследования субстратной специфичности ферментов использовали водные ра-

створы параоксона и ДФФ, их концентрация в реакционной среде составляла 1 мМ. Каталитическую реакцию инициировали внесением раствора гибридного белка в кювету с буфером и субстратом так, чтобы концентрация каждого из ферментов в реакционной среде составляла 10^{-10} – 10^{-9} М (E_0).

За единицу ферментативной активности принимали такое количество фермента, которое необходимо для гидролиза 1 мкмоль субстрата за 1 мин при 25°C и pH 10,5.

Расчет скоростей ферментативных реакций проводили по начальным линейным участкам кинетических кривых ($v_0 = tg\alpha$). Максимальную скорость ферментативной реакции (V_{\max}) и константу Михаэлиса (K_m) определяли как с использованием системы двойных обратных координат $1/v_0-1[S]$ (Лайнуивера–Берка), так и из полной кривой зависимости скорости реакции от концентрации субстрата.

При изучении зависимости каталитической активности ферментов от pH использовали 50 мМ буферы с перекрывающимися значениями pH: HEPES (pH 7,5–8,5), CHES (pH 8,5–10,0), фосфатно-карбонатный (pH 9,5–12,0).

При исследовании термостабильности гибридных белков образец препарата фермента (0,5 мл) в 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,5) или в 0,1 М карбонатном буфере (pH 10,5) помещали в термостат при разных температурах и через определенные промежутки времени отбирали пробы объемом 10 мкл и измеряли в них ОРН-активность. Интервал между отбором проб

подбирали таким образом, чтобы за время эксперимента активность фермента в образцах упала в 210 раз.

Константу скорости термоинактивации определяли по тангенсу угла наклона прямой на графике зависимости натурального логарифма остаточной ферментативной активности от времени.

Результаты и их обсуждение

Для создания генетических конструкций, кодирующих синтез гибридных белков His₆-deGFP4-(RA)₅-ОРН (I) и His₆-deGFP4-(AS)₅-ОРН (II), в качестве экспрессионного вектора была использована ранее разработанная плазмида pTES-His₆-ОРН [5], в состав которой генно-инженерными методами были введены нуклеотидные последовательности, кодирующие белок deGFP4 и различные по составу межбелковые спейсеры (-(ArgAla)₅-[-(RA)₅-] или -(AlaSer)₅-[-(AS)₅-]). На N-конец молекул гибридных белков была введена His₆-последовательность для выделения и очистки белков с использованием Co²⁺-ИДК-криогель ПАА. Для исследования уровней экспрессии полученных генетических конструкций pTES-His₆-deGFP4-(RA)₅-ОРН и pTES-His₆-deGFP4-(AS)₅-ОРН были использованы клетки *E. coli* DH5α. Анализ данных белкового электрофореза позволил установить, что увеличение концентрации индуктора ИПТГ в среде культивирования от 0,1 мМ до 0,75 мМ приводит к увеличению доли гибридных белков в общем количестве синтезируемых внутриклеточных белков (рис. 1). Однако па-

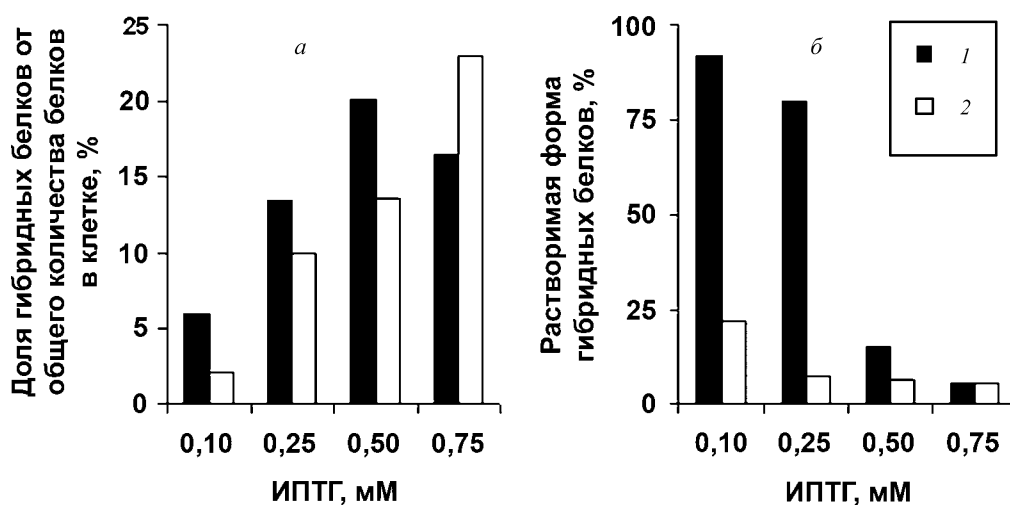


Рис. 1. *a* – Доля гибридных белков His₆-deGFP4-(RA)₅-ОРН (1) и His₆-deGFP4-(AS)₅-ОРН (2) в клетках *E. coli* DH5α, достигаемая к десятому часу роста клеток после индукции синтеза белков различными концентрациями ИПТГ в среде культивирования (28°C) от общего количества синтезируемого клетками белков; *б* – содержание в клетках растворимой формы белков

Таблица 1

Накопление ОРН-активности в клетках *E. coli*, трансформированных плазмидами рTES-His₆-deGFP4-(RA)₅-ОРН, рTES-His₆-deGFP4-(AS)₅-ОРН и рTES-His₆-ОРН при оптимальной концентрации индуктора биосинтеза белков в среде культивирования

Параметры	His ₆ -deGFP4-(RA) ₅ -ОРН	His ₆ -deGFP4-(AS) ₅ -ОРН	His ₆ -ОРН [10]	His ₆ -GFP-ЕК-ОРН [14]
Конечная концентрация ИПТГ, мМ	0,10	0,10	0,20	0,75
Максимальная удельная активность, ед/г клеток	76	101	62	100
Доля целевого белка в общем количестве внутриклеточных белков, %	5,5	2,1	12,6	0,4
Доля растворимой формы от общего количества целевого белка, %	92	22	50	46

раллельно с этим наблюдалось снижение содержания в клетках растворимой формы данных белков. Максимальная внутриклеточная ОРН-активность накапливалась к десятому часу роста клеток после введения индуктора в среду культивирования. Следует отметить, что ОРН-активность не накапливалась в рекомбинантных клетках в процессе их роста при тех же условиях в отсутствие ИПТГ в среде культивирования. Таким образом, условия максимального выхода активной формы гибридных белков были следующими: 0,10 мМ ИПТГ, 10 ч роста клеток после индукции синтеза белков.

При данных условиях культивирования биомассы доля растворимой формы гибридного белка His₆-deGFP4-(RA)₅-ОРН от общего количества целевого белка в клетке была в ~2 раза больше доли известного белка His₆-ОРН [10] (табл. 1). Кроме того, доля белка His₆-deGFP4-(RA)₅-ОРН (5,5%) в общем количестве внутриклеточных белков оказалась в ~13 раз больше данного показателя, характерного для гибридного аналога ОРН, известного из литературы (0,4%) [14] (табл. 1). С учетом того, что доля растворимой формы разработанного гибридного белка His₆-deGFP4-(RA)₅-ОРН (92%) была в 2 раза выше доли растворимой формы известного белка His₆-GFP-Asp₄-Lys-ОРН [14], общее количество полученной растворимой формы созданного гибридного белка было в ~25 раз больше, чем в случае его аналога.

Для выделения и очистки His₆-deGFP4-(RA)₅-ОРН был использован макропористый металл-хелатирую-

щий носитель Co²⁺-ИДК-криогель ПАА [7], который ранее успешно применялся для выделения His₆-ОРН и ОРН-His₆ [6–8, 10]. Степень гомогенности полученного белкового препарата была подтверждена электрофоретически (данные не приводятся) и составила 96±1%. Было показано, что фермент элюируется с носителя в градиенте имидазола при его концентрации 125–175 мМ. Установлено, что из 1 г влажной биомассы (влажность 85%) клеток *E. coli* DH5α можно получить 3,8 мг высокоочищенного препарата фермента His₆-deGFP4-(RA)₅-ОРН, что лишь на 7% ниже выхода His₆-ОРН из клеток *E. coli* SG13009[pREP4] [8].

В процессе выделения гибридного белка His₆-deGFP4-(AS)₅-ОРН на том же носителе оказалось невозможным достижение приемлемой степени гомогенности препарата. По-видимому, данный факт связан с индивидуальной особенностью пространственного строения данного белка, что приводит к заметному снижению эффективности его связывания с примененным в работе хроматографическим носителем. Слабое связывание белка с носителем приводит к преждевременному элюированию белка при низких концентрациях имидазола, которые использовались для отмывки носителя от неспецифически связавшихся балластных белков, присутствующих в супернатанте клеточного дезинтеграта, наносимого на носитель.

В связи с неэффективностью выделения и очистки гибридного белка His₆-deGFP4-(AS)₅-ОРН с помощью Co²⁺-ИДК-криогеля ПАА было решено провести очистку этого белка методом, применяемым для

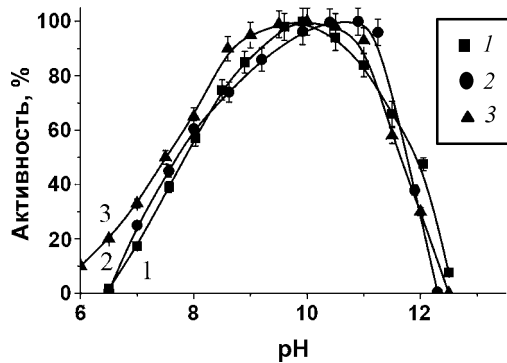


Рис. 2. pH-Зависимость реакции гидролиза параоксона, катализируемой ферментами His₆-deGFP4-(RA)₅-OPH (1), His₆-deGFP4-(AS)₅-OPH (2), OPH (3)

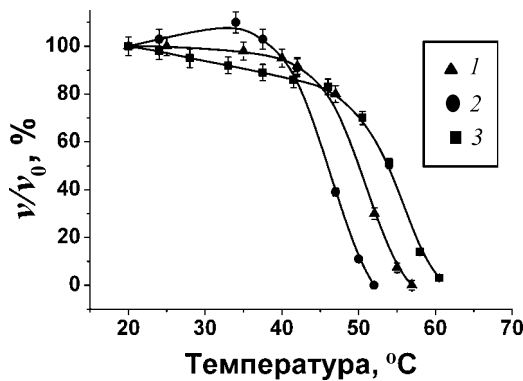


Рис. 3. Остаточная активность белков: 1 – OPH в 0,1 М Tris-HCl буфере (pH 8,5), 2 – His₆-deGFP4-(RA)₅-OPH в 0,1 М карбонатном буфере (pH 10,5), 3 – His₆-deGFP4-(RA)₅-OPH в 0,05 М фосфатном буфере (pH 7,5) после их экспонирования при различных температурах в течение 15 мин

выделения нативной OPH [18]. Чистота выделенного этим методом ферментного препарата была подтверждена электрофоретически (данные не приводятся) и составила 94±1%. Было установлено, что в процессе

очистки белка His₆-deGFP4-(AS)₅-OPH из 1 г влажной биомассы (влажность 83%) может быть получено 1,3 мг белка.

При исследовании каталитических характеристик полученных гибридных белков было установлено, что оптимумы их OPH-активности смещены на 1–1,5 ед. в щелочную область относительно оптимума действия нативной OPH (рис. 2).

Было проведено определение кинетических параметров реакции ферментативного гидролиза пестицида параоксона, катализируемого гибридными белками His₆-deGFP4-(RA)₅-OPH и His₆-deGFP4-(AS)₅-OPH, при значениях pH реакционной среды, соответствующих оптимумам их OPH-активности (табл. 2). Для гибридных белков наблюдалось увеличение констант Михаэлиса (K_m) в 8–12 раз по сравнению со значением K_m , характерным для OPH, и снижение в 1,5–3 раза значений $V_{\text{макс}}$, определение которых для всех белков проводили при концентрации 10^{-9} М.

Снижение эффективности действия гибридных белков по отношению к такому субстрату, как параоксон, очевидно, было связано с изменением пространственной конфигурации белковой глобулы OPH, вызванным взаимным влиянием партнеров друг на друга в составе гибридного белка.

Для гибридного белка His₆-deGFP4-(RA)₅-OPH были определены константы его инактивации при различных температурах (табл. 3) и зависимость его остаточной каталитической активности от температуры его экспонирования в течение 15 мин (рис. 3). При увеличении температуры в интервале 40–52°C (pH 10,5) происходит резкое падение OPH-активности исследуемого гибридного белка His₆-deGFP4-(RA)₅-OPH, и при 50°C его активность составляет менее 20% от исходной (рис. 3). При том же значении pH термостабильность гибридного аналога OPH оказа-

Таблица 2

Каталитические характеристики гибридных белков и OPH в реакции гидролиза параоксона при оптимальном значении pH (для гибридных белков – pH 10,5, для OPH – pH 8,5)

Каталитические параметры	His ₆ -deGFP4-(RA) ₅ -OPH	His ₆ -deGFP4-(AS) ₅ -OPH	OPH [8]
K_m , mM	0,13	0,20	0,02
$V_{\text{макс}} \times 10^{-7}$ М·с ⁻¹	2,5	5,6	8,5

Т а б л и ц а 3

Константы термоинактивации белка His₆-deGFP4-(RA)₅-ОРН в 0,05 М фосфатном буфере (рН 7,5)

Температура, °С	$k_{инь}$, с ⁻¹
25	$2,3 \cdot 10^{-5}$
36	$8,9 \cdot 10^{-5}$
55	$4,8 \cdot 10^{-4}$
60	$3,3 \cdot 10^{-3}$

лась ниже, чем термостабильность нативного фермента. Однако при снижении рН буфера до 7,5 при 50°С гибридный белок сохраняет 70% исходной ОРН-активности. Таким образом, было установлено, что при нейтральных значениях рН среды гибридный белок может быть успешно использован для гидролиза ФОС при повышенной температуре.

Линейный характер кинетики инактивации белка His₆-deGFP4-(RA)₅-ОРН при рН 7,5 и различных температурах наблюдался в широком интервале концентраций белка (0,1–1 мг/мл).

Температурная инактивация олигомерных белков может проходить по диссоциативному и недиссоциативному механизмам [19]. Согласно теории диссоциативной инактивации олигомерных белков, зависимости $\ln(v/v_0)$ от времени представляют собой прямые линии с изломом, свидетельствующим о диссоциации белка на субъединицы [19]. Напротив, поскольку при термоинактивации мономерных белков снижение их активности связано лишь с изменениями их третичной структуры, вызванными увеличением температуры, зависимости $\ln(v/v_0)$ от времени представляют собой прямые линии без изломов [20]. Логично предположить, что термоинактивация белков, образующих олигомеры с высокой энергией стабилизации, не распадающихся на субъединицы даже при повышенных температурах, проходит по механизму, характерному для мономерных белков. Изменения третичной структуры активных субъединиц таких олигомеров вызваны исключительно температурным фактором и не связаны с влиянием на их конфигурацию явления димеризации, как в случае диссоциативного механизма [19]. Зависимости $\ln(v/v_0)$ от времени для таких белков должны иметь форму аналогичных зависимостей, характерных для термоинактивации мономерных

белков. Таким образом, термоинактивация гибридного белка His₆-deGFP4-(RA)₅-ОРН при рН 7,5 и различных температурах проходит по механизму, отличному от диссоциативного, а именно в состоянии димера или мономера.

Достоверно известно, что ОРН образует исключительно стабильный димер с энергией стабилизации 40 ккал/моль [21–22]. На электрофореграммах гомогенизированных препаратов ОРН, полученных даже в денатурирующих условиях, отмечалось наличие двух отчетливо выраженных полос, соответствующих димерной и мономерной форме белка (данные не приводятся).

Для разработанных гибридных белков оказалась характерна обратная ситуация. При проведении нативного электрофореза очищенного препарата белка His₆-deGFP4-(RA)₅-ОРН было показано, что 85% гибридного белка находится в мономерном состоянии и лишь 15% в димерном (рис. 4). Низкая концентрация димерной формы гибридного белка в ферментном препарате свидетельствует о его функционировании преимущественно в мономерном состоянии и может указывать на значительное снижение энергии стабилизации димерной формы фермента по сравнению с нативной ОРН. Легкость диссоциации гомодимера гибридного белка на субъединицы отражается на форме зависимостей $\ln(v/v_0)$ от времени, полученных при исследовании его термоинактивации.

Исследование каталитических характеристик гибридных белков показало, что значение K_m белка His₆-deGFP4-(RA)₅-ОРН для ДФФ оказалось ниже в ~2

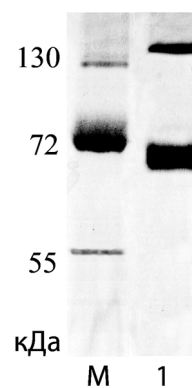


Рис. 4. Электрофореграмма, отражающая белковый состав очищенного препарата белка His₆-deGFP4-(RA)₅-ОРН (1) в неденатурирующих условиях, М – маркеры молекулярного веса

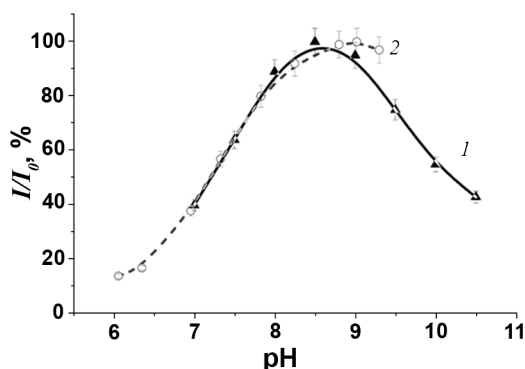


Рис. 5. pH-зависимость интенсивности флуоресценции белков His₆-deGFP4-(RA)₅-ORN (1) и deGFP4 (2) при длинах волн возбуждения 400 нм и эмиссии 515 нм

раза значения K_m , известного для реакции гидролиза ДФФ под действием нативной ОРН, и составило 0,5 мМ. Было установлено, что величина $V_{\text{макс}}$ реакции гидролиза ДФФ под действием гибридного белка снизилась в ~2 раза по сравнению со значением $V_{\text{макс}}$ реакции гидролиза ДФФ, катализируемой нативной ОРН, и составила 10^{-8} М·с⁻¹.

Анализ флуоресцентных свойств гибридного белка His₆-deGFP4-(RA)₅-ORN показал, что белок deGFP4, присутствующий в его составе, имеет максимум

поглощения при длине волны 400 нм и два максимума флуоресценции при длинах волн 461 нм и 515 нм, что соответствует характеристикам свободного белка deGFP4. При исследовании влияния pH среды на интенсивность флуоресценции гибридного белка было показано (рис. 5), что максимум флуоресценции при длине волны 515 нм находится при pH 8,5. Это всего на 0,5 ед. ниже, чем для индивидуального белка deGFP4.

В процессе гидролиза $4 \cdot 10^{-5}$ М параоксона гибридным белком His₆-deGFP4-(RA)₅-ORN в 1 мМ фосфатном буфере (pH 7,5) с добавлением 100 мМ NaCl выявлено снижение pH раствора на ~0,2 ед. Кроме того, гидролиз данной концентрации параоксона приводит к хорошо регистрируемому изменению интенсивности флуоресценции белка при длине волны эмиссии 515 нм на ~15%.

Таким образом, белковая молекула deGFP4 может стать внутренним “свидетелем” гидролиза даже малых концентраций ФОС под действием молекулы ОРН. Полученная в работе растворимая форма His₆-deGFP4-(RA)₅-ORN может быть предложена для использования при проведении исследований по гидролизу ФОС *in vivo* на культурах тканей при физиологических значениях pH (7,5) и повышенной температуре (37°C) для изучения токсичности ФОС и возможности ее снижения под действием ОРН [23].

Работа выполнена при финансовой поддержке NATO (Linkage Grant No. CBP.NR.NRCLG.981752) и РФФИ (проекты № 08-04-12050-офи, 09-04-13594-офи_ц).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ефременко Е.Н., Варфоломеев С.Д. // Усп. биол. хим. 2004. **44**. С. 307.
2. Lambert W., Lasarev M., Muniz J., Scherer J., Rothlein J., Santana J., McCauley L. // Environ. Health Persp. 2005. **113**. N 4. P. 504.
3. Aubert S., Li Y., Raushel F. // Biochemistry. 2004. **43**. P. 5707.
4. Варфоломеев С.Д., Ефременко Е.Н., Алиев Т.К., Вотчицева Ю.А. // Пат. РФ на изобретение № 2232807 (20.07.2004).
5. Ефременко Е.Н., Вотчицева Ю.А., Алиев Т.К., Варфоломеев С.Д. // Пат. РФ на изобретение № 2255975. (10.07.2005).
6. Gudkov D.A., Votchitseva Yu.A., Efremenko E.N. // Rus. Chem. Bull. 2006. **61**. N 1. P. 1.
7. Efremenko E.N., Votchitseva Yu.A., Plieva F.A., Galaev I.A., Mattiasson B. // Appl. Microbiol. Biot. 2006. **70**. P. 558.
8. Вотчицева Ю.А., Ефременко Е.Н., Алиев Т.К., Варфоломеев С.Д. // Биохимия. 2006. **71**. № 2. С. 216.
9. Efremenko E.N., Lyagin I.A., Votchitseva Yu.A., Sirotkina M.A., Varfolomeev S.D. // Biocatal. Biotransfor. 2007. **25**. N 1. P. 103.
10. Efremenko E.N., Lyagin I.A., Votchitseva Yu.A., Gudkov D.A., Peregudov A.A., Aliev T.K., Varfolomeyev S.D. // Biotechnology: state of the art and prospects / Ed. G.E. Zaikov. N.Y., 2007. P. 87.
11. Liu Ya., Gotte G., Libonati M., Eisenberg D. // Nat. Struct. Biol. 2001. **8**. N 3. P. 211.
12. Rousseau F., Schymkowitz J., Wilkinson H., Itzhaki L. // Proc. Natl. Acad. Sci. 2001. **98**. N 10. P. 5596.
13. Wu C.-F., Cha H., Rao G., Valdes J., Bentley W. // Appl. Microbiol. Biot. 2000. **54**. P. 78.
14. Cha H., Wu Ch.-F., Valdes J., Rao G., Bentley W. // Biotechnol. Bioeng. 2000. **67**. N 5. P. 565.
15. Wu Ch.-F., Cha H., Valdes J., Bentley W. // Biotechnol. Bioeng. 2002. **77**. N 2. P. 212.

16. Wu Ch.-F., Valdes J., Bentley W. // *Biotechnol. Progr.* 2001. **17**. P. 606.
17. Hanson G., McAnaney T., Park E., Rendell M., Yarbrough D., Chu L., Xi S., Boxer S., Montrose M., Remington S. // *Biochemistry*. 2002. **41**. N 52. P. 15477.
18. Efremenko E.N., Voitchitseva Yu.A., Aliev T.K., Varfolomeyev S.D. // In: *Biocatalytic Technology and Nanotoxicology* / Ed. G.E. Zaikov) N.Y., 2004. P. 65.
19. Poltorak O.M., Chukhray E.S., Torshin I.A. // *Biochemistry-Moscow*. 1998. **63**. N 3. P. 303.
20. Трофимова Д.А., Камышиный А.А., Магдасси Ш., Левашов А.А. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия*. 2003. **44**. С. 48.
21. Grimsley J., Scholtz J., Pace C., Wild J. // *Biochemistry*. 1997. **36**. P. 14366.
22. Mei G., Venere A., Rosato N., Finazzi-Agro A. // *FEBS J.* 2005. **272**. P. 16.
23. Tuovinen K., Kaliste-Korhonen E., Raushel F., Hanninen O. // *Fundament. Appl. Toxicol.* 1996. **31**. P. 210.

Поступила в редакцию 20.01.10

NEW CHIMERIC PROTEINS POSSESSING ORGANOPHOSPHOROUS HYDROLASE ACTIVITY AND deGFP4 FLUORESCENCE

D.A. Gudkov, I.V. Lyagin, V.V. Verkhusha, Ye.N. Efremenko

(Division of Chemical Enzymology)

New genetic constructs encoding synthesis of chimeric proteins possessing organophosphorous hydrolase activity and fluorescence of pH-sensitive analogue of green fluorescent protein were developed. To obtain maximal yield of new chimeric proteins in soluble form in *E. coli* cells, the following conditions were revealed to be used: 0.1 mM of inductor of protein biosynthesis, cultivation of cells for 10 h after biosynthesis induction. Obtained level of biosynthesis of one of the chimeric proteins in soluble active form was 2-25-fold higher than the yields of soluble forms of analogue chimeric proteins described in literature. It was found that organophosphorous hydrolase as a part of the chimeric proteins possess features (pH-optimum, thermostability, substrate specificity and catalytic efficiency of action) differing from known characteristics of native enzyme. The fluorescence of green fluorescent protein being part of chimeric proteins depends on pH of medium by same manner known for fluorescence of the individual protein. The interrelation between fluorescence and OPH-activity possessing by obtained chimeric proteins was demonstrated in the reactions of hydrolysis of organophosphorous compounds.

Key words: *organophosphorous hydrolase, green fluorescent protein, chimeric protein, organophosphorous compounds.*

Сведения об авторах: *Гудков Денис Андреевич* – мл. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук; *Лягин Илья Владимирович* – науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук; *Верхуша Владислав Владимирович* – профессор кафедры анатомии и структурной биологии медицинского колледжа Альберта Эйнштейна, канд. хим. наук; *Ефременко Елена Николаевна* – зав. лаборатории экибиокатализа кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, докт. биол. наук (efremenko@enzyme.chem.msu.ru).