

УДК 577.158.54

## **ИНАКТИВАЦИЯ ЛЮЦИФЕРАЗЫ СВЕТЛЯКОВ *Luciola mingrelica* ГУАНИДИНХЛОРИДОМ И ЕЕ РЕАКТИВАЦИЯ**

**Е. И. Дементьева\*, Л. Г. Малошенок, Н. Н. Угарова**

*(кафедра энзимологии химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова; Воробьевы горы, Москва 119899, Россия;  
факс: (095) 939-54-17; e-mail: eid@enz.chem.msu.su)*

**Исследована кинетика и механизм инактивации рекомбинантной люциферазы светляков *Luciola mingrelica* под действием гуанидинхлорида и реактивация фермента после удаления денатурирующего агента. Показано, что субъединичные взаимодействия играют главную роль в процессе инактивации. Кинетика инактивации включает следующие стадии: 1) лаг-период без изменения люциферазной активности, который, возможно, связан с конформационными изменениями активных димеров; 2) инактивация фермента вследствие обратимой диссоциации димеров в неактивные мономеры; 3) необратимая инактивация мономеров. Кинетика инактивации под действием гуанидинхлорида аналогична кинетике инактивации фермента при повышенных температурах. Реактивация люциферазы после удаления гуанидинхлорида подчиняется кинетике второго порядка и включает ассоциацию неактивных мономеров с образованием активных димеров.**

---

\*Адресат для переписки.

Проблема денатурации белков является актуальной как с практической, так и с теоретической точки зрения. Интерес к процессам сворачивания-разворачивания белков обусловлен также развитием генно-инженерных работ, клонированием генов большого числа белков, исследованием сворачивания и приобретения каталитически активной конформации рекомбинантных белков в различных клетках-хозяевах. Люциферин-люциферазная система светляков широко используется в аналитической биохимии для определения ультрамалых количеств АТФ и других важных компонентов клеточного метаболизма [1, 2]. Клонирование генов люцифераз дало возможность получения рекомбинантных белков и открыло новые перспективы в практическом использовании биoluminesцентных систем. Одним из факторов, ограничивающих применение люциферазы, является низкая стабильность фермента в растворе. Целью данной работы является исследование кинетики и механизма денатурации люциферазы светляков *Luciola mingrelica* под действием гуанидинхлорида и выяснение возможности ее ренатурации.

**Методы исследования**

Использовали рекомбинантную люциферазу светляков *L. mingrelica*, которую выделяли из клеток *E. coli*, штамм LE 392, несущих плазмиду pLR с геном люциферазы [3], и очищали до гомогенного состояния [4]. Были использованы гуанидинхлорид фирмы «Aristar» (Англия), АТФ фирмы «Reanal» (Венгрия), дитиотреитол фирмы «Serva» (ФРГ), кислоты и соли марки «ос.ч.». Растворы готовили на деионизованной воде.

Активность люциферазы измеряли по величине максимальной интенсивности биoluminesценции при насыщающих концентрациях субстратов (1,3 мМ АТФ и 0,3 мМ  $LH_2$ ) на люминометре 1250 фирмы «LKB-Wallac» (Финляндия) и выражали в условных единицах: 1 усл. ед. =  $10^9$  квант/с.

Спектры триптофановой флуоресценции люциферазы регистрировали на спектрофлуориметре «LS 50B» фирмы «Perkin Elmer» (Англия), возбуждение 290 нм, ширина щелей 5 нм.

Инактивация люциферазы гуанидинхлоридом. К раствору люциферазы с концентрацией 2,8 мкМ в 0,1 М Na-фосфатном буфере (pH 7,8), содержащем 2 мМ ЭДТА, 0,1 М NaCl и 6,5 мМ дитиотреитола, добавляли различные концентрации гуанидинхлорида (GdmCl) и через определенные промежутки времени регистрировали активность люциферазы и спектры триптофановой флуоресценции белка.

Реактивация люциферазы. Образцы фермента, денатурированного гуанидинхлоридом, разбавляли в 100 раз буферным раствором, не содержащим денатурирующего агента, и в течение нескольких дней регистрировали изменение активности люциферазы.

**Результаты и их обсуждение**

Аминокислотный состав и физико-химические свойства рекомбинантной люциферазы светляков *L. mingrelica*, синтезируемой клетками *E. coli*, несущими плазмиду pLR, аналогичны нативной люциферазе, выделяемой из светля-

ков [3]. В литературе описана денатурация люциферазы светляков *Photinus pyralis* под действием гуанидинхлорида [5, 6] и показано, что кинетика инактивации фермента включает несколько обратимых стадий. После удаления денатурирующего агента возможно самопроизвольное восстановление активности. Люцифераза *P. pyralis* в 0,1 М Na-фосфатном буфере (pH 7,8), содержащем 2 мМ ЭДТА, при 8° в отсутствие гуанидинхлорида сохраняла 100%-ю активность в течение нескольких дней, тогда как активность люциферазы *L. mingrelica* при этих условиях уменьшалась за 1 сут в 10 раз. В связи этим на первом этапе работы были подобраны условия, при которых активность фермента в отсутствие гуанидинхлорида не менялась в течение нескольких дней: добавили 0,1 М NaCl и 6,5 мМ дитиотреитола. В этих условиях активность фермента без гуанидинхлорида при 8° не менялась за время проведения эксперимента (3–4 дня).

Кинетика инактивации люциферазы под действием гуанидинхлорида. При добавлении гуанидинхлорида к раствору люциферазы в указанном выше буфере наблюдалось постепенное уменьшение активности. При малых концентрациях GdmCl наблюдался лаг-период, при котором изменения активности не происходило. Спектр триптофановой флуоресценции белка при этом также не менялся. При увеличении концентрации гуанидинхлорида от 0,04 до 0,8 М длительность лаг-периода постепенно уменьшалась от 120 до 0 мин. По сравнению с общим временем инактивации люциферазы (около трех суток) длительность лаг-периода небольшая. По-видимому, на этом этапе происходят конформационные изменения структуры белка, не затрагивающие активный центр фермента, переход от более стабильной формы люциферазы к менее стабильной. Подобный лаг-период наблюдали и для других белков, например, при термоинактивации

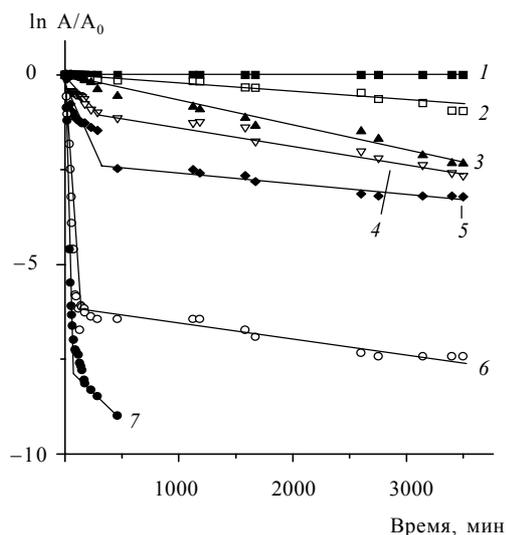


Рис. 1. Кинетические кривые инактивации рекомбинантной люциферазы светляков *L. mingrelica* гуанидинхлоридом в полулогарифмических координатах при [GdmCl], М: 1 – 0,04; 2 – 0,32; 3 – 0,5; 4 – 0,8; 5 – 1; 6 – 1,5; 7 – 2. Условия: 0,1 М Na-фосфатный буфер (pH 7,8), 2 мМ ЭДТА, 0,1 М NaCl, 6,5 мМ дитиотреитола (pH 7,8), 8°, 2,8 мкМ люцифераза

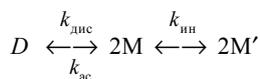
кислой фосфатазы возникала промежуточная форма, активность которой соизмерима с исходной [7].

Кинетические кривые инактивации люциферазы светляков под действием гуанидинхлорида при 8° в течение трех дней (рис. 1) показывают, что при концентрации GdmCl до 0,5 М зависимость активности от времени можно представить в виде одной экспоненты. При [GdmCl] ≥ 0,8 М кинетику инактивации можно описать двумя экспонентами. При [GdmCl] = 2 М люцифераза полностью теряет активность в течение 5 мин. Известно, что люцифераза *L. mingrelica* представляет собой димер (мол. масса 120 кДа). Термоинактивация люциферазы протекает по диссоциативному механизму: распад димера на менее стабильные мономеры с последующей инактивацией мономеров [8]. Кинетические кривые инактивации люциферазы гуанидинхлоридом (рис. 1) аналогичны кривым для термоинактивации люциферазы при повышенных температурах (30–42°) и характерны для олигомерных белков, когда первая стадия описывает обратимую диссоциацию олигомера, а вторая – необратимую инактивацию мономерных форм.

**Реактивация люциферазы *L. mingrelica*.** Если первая стадия инактивации под действием гуанидинхлорида обратима, то при снятии денатурирующего воздействия должна наблюдаться реактивация люциферазы. При удалении денатурирующего агента разбавлением исходного раствора в 100 раз происходит полное или частичное восстановление активности люциферазы (рис. 2). Если степень инактивации соответствует первой экспоненте на рис. 1, то при удалении денатурирующего агента наблюдается полная реактивация люциферазы. При больших степенях инактивации, соответствующих второй экспоненте, при удалении GdmCl наблюдается лишь частичное восстановление активности фермента. Таким образом, стадия инактивации, описываемая первой экспонентой, является полностью обратимой. Кинетические кривые реактивации спрямляются в координатах 1/A – время (рис. 2, б), т.е. реактивация является реакцией второго порядка – ассоциацией неактивных мономеров с образованием активной димерной формы люциферазы.

Таким образом, денатурацию люциферазы светляков под действием гуанидинхлорида можно представить в виде следующей схемы 1.

С х е м а 1



*D* – активный димер; *M* – неактивный мономер, способный к обратной ренатурации, *M'* – необратимо инактивированный мономер

**Исследование денатурации люциферазы светляком гуанидинхлоридом флуоресцентным методом.** За конформационными изменениями люциферазы в процессе инактивации люциферазы гуанидинхлоридом следили также флуоресцентным методом по спектрам триптофано-

вой флуоресценции белка. Люцифераза *L. mingrelica* содержит единственный триптофановый остаток Trp-419. По изменению микроокружения триптофана можно судить о степени разворачивания белковой глобулы. При малых степенях инактивации, соответствующих первой экспоненте (рис. 1), квантовый выход флуоресценции изменяется незначительно, а максимум спектра флуоресценции смещается от 342 до 346 нм. Полуширина спектров флуоресценции и спектры возбуждения при этом не меняются. Это говорит о том, что на первой стадии инактивации наблюдаются лишь незначительные конформационные изменения в белке. На этой стадии люцифераза способна к полной реактивации при удалении денатурирующего агента. При больших степенях инактивации заметно уменьшается квантовый выход и максимум спектра триптофановой флуоресценции смещается до 353 нм, указывая на то, что Trp-419 полностью переходит в водное окружение [9]. Таким образом, при больших концентрациях гуанидинхлорида люцифераза претерпевает сильные

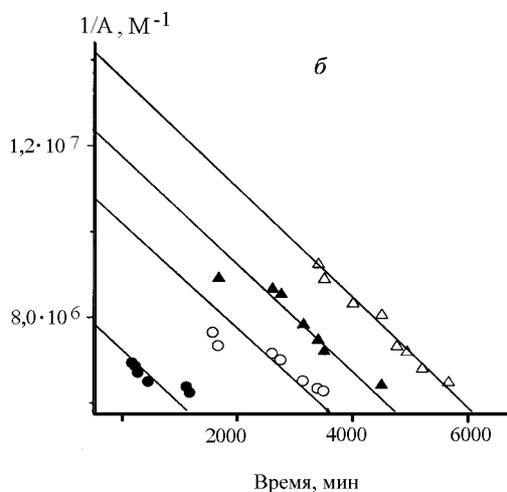
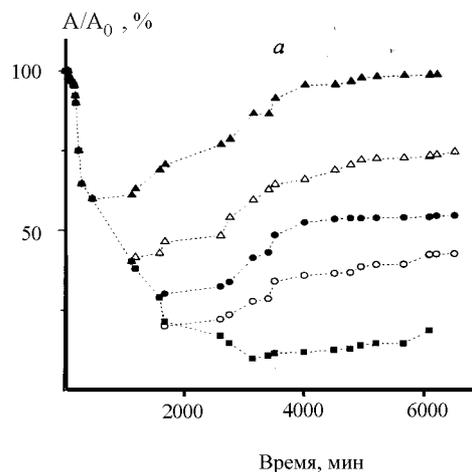


Рис. 2. а – Реактивация рекомбинантной люциферазы после удаления гуанидинхлорида; б – кинетические кривые реактивации в координатах реакции второго порядка. Условия приведены в подписи к рис. 1

Т а б л и ц а 1

**Кинетические параметры инактивации рекомбинантной люциферазы светлячков под действием гуанидинхлорида (условия приведены в подписи к рис. 1)**

[GdmCl], М	$K_{\text{дис}}$ , М	$k_{\text{дис}}$ , мин <sup>-1</sup>	$k_{\text{ас}}$ , мин <sup>-1</sup> , М <sup>-1</sup>	$k_{\text{ин}}$ , мин <sup>-1</sup>
0,016	$(0,4 \pm 0,1) \cdot 10^{-8}$	$(2,5 \pm 0,5) \cdot 10^{-4}$	$(6 \pm 1) \cdot 10^4$	—*
0,04	$(0,4 \pm 0,1) \cdot 10^{-8}$	$(2,5 \pm 0,5) \cdot 10^{-4}$	$(6 \pm 1) \cdot 10^4$	—*
0,32	$(1,0 \pm 0,1) \cdot 10^{-8}$	$(6,2 \pm 0,4) \cdot 10^{-4}$	$(6 \pm 1) \cdot 10^4$	—*
0,5	$(1,1 \pm 0,2) \cdot 10^{-8}$	$(6,6 \pm 0,4) \cdot 10^{-4}$	$(6 \pm 1) \cdot 10^4$	—*
0,8	$(0,9 \pm 0,1) \cdot 10^{-6}$	$(1,6 \pm 0,3) \cdot 10^{-3}$	$(1,8 \pm 0,4) \cdot 10^3$	$(3,2 \pm 0,5) \cdot 10^{-4}$
1	$(4,9 \pm 0,7) \cdot 10^{-6}$	$(1,5 \pm 0,1) \cdot 10^{-2}$	$(3,0 \pm 0,5) \cdot 10^3$	$(2,4 \pm 0,4) \cdot 10^{-4}$
1,5	$6,5 \cdot 10^{-5}$	$(2,6 \pm 0,3) \cdot 10^{-2}$	$4 \cdot 10^2$	$(2,8 \pm 0,4) \cdot 10^{-4}$
2	—**	—**	—**	$\sim 1,4 \cdot 10^{-3}$
0***	$0,38 \cdot 10^{-8}$	$1,1 \cdot 10^{-2}$	$2,9 \cdot 10^6$	—*

\*Не происходило инактивации мономеров за время эксперимента (3 суток).  
 \*\*Диссоциация димеров происходила очень быстро.  
 \*\*\*По данным работы [8] (рассчитано из кинетических кривых диссоциации димеров в отсутствие гуанидинхлорида).

конформационные изменения, и эти изменения носят необратимый характер. Изменение спектров флуоресценции люциферазы при денатурации гуанидинхлоридом коррелирует с изменением активности фермента. Это означает, что потеря активности и разворачивание белковой глобулы происходят одновременно. Это не соответствует теории Цоя [10] (потеря активности фермента предшествует разворачиванию белковой глобулы).

Расчет кинетических констант инактивации люциферазы под действием гуанидинхлорида. Закономерности процесса инактивации олигомерных белков подробно исследованы в работах О.М. Полторака и Е.С. Чухрай [7, 11], согласно которым кинетические параметры можно определить из экспериментальных кинетических кривых, используя уравнения, полученные на основе ряда приближений. Значение константы скорости диссоциации находили на основе следующего приближенного уравнения из зависимости активности люциферазы от времени в начальный период инактивации:

$$2 \left( \frac{a}{a_0} \right) - \frac{1}{2} \left( \frac{a}{a_0} \right)^2 = \frac{3}{2} - k_{\text{дис}} t, \quad (1)$$

Константу реактивации, т. е. константу ассоциации мономеров в димеры, рассчитывали из тангенса угла наклона прямых на рис. 2, б:

$$k_{\text{ас}} = \text{tg} \alpha. \quad (2)$$

При малых концентрациях GdmCl, когда на кинетических кривых инактивации наблюдается одна экспонента, константу равновесия диссоциации вычисляли как

$$K_{\text{дис}} = \frac{k_{\text{дис}}}{k_{\text{ас}}}. \quad (3)$$

При больших концентрациях гуанидинхлорида, когда на кривых денатурации люциферазы светлячков наблюдали две экспоненты, константу диссоциации вычисляли по координатам точки перегиба  $\tau$  (точки пересечения экспонент):

$$K_{\text{дис}} = 4[E]_0 \left( \frac{a_0 - a_\tau}{a_0 a_\tau} \right)^2. \quad (4)$$

Значение константы скорости инактивации определяли при условии, что процесс диссоциации практически закончился ( $t > \tau$ ). При этом справедливо уравнение:

$$k_{\text{ин}} = \frac{k_{\text{ин,эф}} (a_0 + a_\tau)}{2(a_0 - a_\tau)}, \quad (5)$$

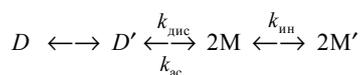
где  $k_{\text{ин,эф}}$  – тангенс угла наклона прямых в полулогарифмических координатах при больших степенях инактивации.

Кинетические параметры инактивации рекомбинантной люциферазы светлячков под действием гуанидинхлорида, соответствующие схеме 1, представлены в табл. 1. Константа диссоциации димеров на мономеры при малых концентрациях гуанидинхлорида (0,04 М и ниже) равна  $K_{\text{дис}}$ , рассчитанной в работе [8] из кинетических кривых диссоциации димеров люциферазы в отсутствие гуанидинхлорида (табл. 1). При увеличении концентрации гуанидинхлорида  $K_{\text{дис}}$  сильно возрастает. При  $[E]_0 \gg K_{\text{дис}}$  равновесие сдвинуто в сторону образования димера, и при малых концентрациях GdmCl кинетические кривые инактивации хорошо описываются одной экспонентой. При  $[E]_0 \ll K_{\text{дис}}$  фермент находится почти полностью в мономерной форме, и мы наблюдаем только инактивацию мономера. При концентрациях люциферазы, сопоставимых с  $K_{\text{дис}}$ , фермент присутствует и в мономерной и

в димерной форме, что объясняет появление излома на кривых инактивации в полулогарифмических координатах. Таким образом, предложенная нами кинетическая схема инактивации (схема 1) и рассчитанные на ее основе кинетические константы хорошо описывают наблюдаемые экспериментальные данные. Следует отметить, что схема 1 полностью соответствует кинетической схеме термоинактивации люциферазы светляков при повышенных температурах [8].

Более общая схема инактивации люциферазы светляков под действием гуанидинхлорида (схема 2) включает помимо стадий, указанных на схеме 1, стадию конформационных изменений димерной формы люциферазы светляков, происходящих без потери ферментативной активности:

С х е м а 2



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Угарова Н.Н., Бровко Л.Ю., Кутузова Г.Д. // Биохимия. 1993. **58**. С. 1351.
2. Gould S.J., Subramani S. // Anal. Biochem. 1988. **175** P. 5.
3. Lundovskikh I.A., Leontieva O.V., Dementieva E.I., Ugarova N.N. // Bioluminescence and chemiluminescence. Perspectives for the 21 century. Eds. A. Roda, M. Pazzagli, L.J. Kricka, P.E. Stanley. Chichester, 1998. P. 420.
4. Дементьева Е. И., Кутузова Г. Д., Железнова Е. Е., Лундовских И. А., Угарова Н. Н. // Биохимия. 1996. **61**. С. 156.
5. Herbst R., Schefer U., Seckler R. // J. Biol. Chem. 1997. **272**. P. 7099.
6. Herbst R., Gast K., Seckler R. // Biochemistry. 1998. **37**. P. 6586.
7. Полторак О.М., Чухрай Е.С., Торшин И.Ю. // Биохимия. 1998. **63**. С. 360.
8. Лундовских И. А., Дементьева Е. И., Угарова Н. Н. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2000. С. 362.
9. Лакович Дж. // Основы флуоресцентной спектроскопии. М., 1986.
10. Tsou C.L. // Science. 1993. **262**. P. 380.
11. Полторак О.М., Чухрай Е.С. // ЖФХ. 1995. **69**. С. 330.

Поступила в редакцию 20.06.00