

УДК 577.158.54

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛЮЦИФЕРАЗЫ СВЕТЛЯКОВ С ДИМЕТИЛОКСИЛЮЦИФЕРИНОМ

О.В. Леонтьева, Т.Н. Власова, Н.Н. Угарова

(Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии; e-mail: ovl@enz.chem.msu.ru)

Анализ спектров поглощения и флуоресценции диметилноксилюциферина (ДМОЛ) в диапазоне рН 3,9–12,0 показал, что при рН 12,0 значение $\lambda_{\text{макс}}$ поглощения сдвигается с 485 нм (рН 9,6) до 356 нм. При рН 3,9–8,0 $\lambda_{\text{макс}}$ флуоресценции для ДМОЛ составляет 639 нм. При более высоких рН наблюдается дополнительный пик флуоресценции, $\lambda_{\text{макс}} = 537$ нм ($\lambda_{\text{ex}} = 383$ нм), интенсивность которого растет во времени. Показано, что этот пик относится к продукту химического превращения ДМОЛ при рН > 9, которое описывается реакцией первого порядка ($k = 0,02 \text{ мин}^{-1}$). Изучены каталитические и флуоресцентные свойства люциферазы светляков в присутствии 20–140 мкМ ДМОЛ при рН 7,8. Из данных по тушению собственной флуоресценции белка определена константа связывания люциферазы с ДМОЛ ($K_s = 45,7 \text{ мкМ}$). Показано, что ДМОЛ является сильным ингибитором люциферазы ($K_i = 10 \text{ мкМ}$).

Люцифераза светляков катализирует реакцию окисления кислородом воздуха специфического субстрата люциферина (LH_2) в присутствии аденозин-5'-трифосфата (АТФ) и ионов Mg^{2+} ; продукт реакции – оксилюциферин (рис. 1) в синглетном электронно-возбужденном состоянии, переход которого в основное состояние сопровождается эмиссией видимого света.

Поведение электронно-возбужденной молекулы в растворе не зависит от механизма ее образования. При хемиллюминесценции и биоллюминесценции молекула переходит в электронно-возбужденное состояние за счет энергии химической реакции, при фотолюминесценции – за счет поглощения энергии света, поэтому хорошей моделью биоллюминесценции может служить флуоресценция оксилюциферина [1]. Однако оксилюциферин в водном растворе нестабилен, вместо него был выбран его более стабильный аналог – диметилноксилюциферин (ДМОЛ) (рис. 1). Оксилюциферин может существовать как в кетонной (при рН < 6), так и в енольной (при рН > 7) форме. ДМОЛ содержит две метильные груп-

пы, препятствующие превращению кетона в енол. Целью данной работы было изучение спектральных и флуоресцентных свойств ДМОЛ, а также его взаимодействия с люциферазой светляков.

Материалы и методы

Использованные вещества. Использовали диметилноксилюциферин (ДМОЛ), синтезированный доктором Д. Вейсом [2], люциферин, синтезированный по методу [3]. Рекombинантную люциферазу светляков *Luciola mingrelica* выделяли из клеток *E. coli* (штамм LE 392), несущих плазмиду суперпродукент рLR с геном люциферазы, и очищали по методу [4]. Растворы готовили на дистиллированной деионизированной воде (*Milli Q*, США).

Регистрацию спектров поглощения выполняли на спектрофотометре *Shimadzu UV 1202* в интервале от 250 до 600 нм, используя 2 мл буферного раствора с фиксированным рН и 40 мкл этанольного раствора ДМОЛ с концентрацией 10^{-3} М.

Регистрацию спектров флуоресценции выполняли на спектрофлуориметре LS50B “Perkin Elmer” в интервале 450–750 нм ($\lambda_{\text{возб}} = 383, 425, 485 \text{ нм}$), используя 2 мл буферного раствора с фиксированным рН и 10 мкл спиртового раствора ДМОЛ с концентрацией 10^{-3} М.

Флуоресцентное титрование люциферазы *L. mingrelica* диметилноксилюциферин выполняли, используя раствор люциферазы с активностью $1,2 \cdot 10^7$ мВ/мл в 0,05 М Трис-ацетатном буфере (2 мМ ЭДТА, 10 мМ MgSO_4 , рН 7,8) и 1 мМ раствор ДМОЛ в том же буфере. К 2 мл раствора люциферазы добавляли по 10 мкл раствора ДМОЛ и регистрировали спектр собственной флуоресцен-

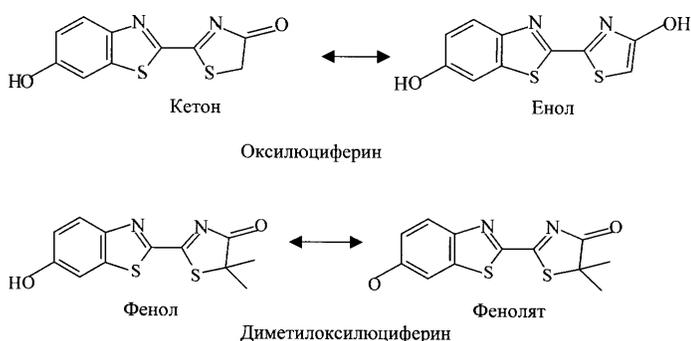


Рис. 1. Оксилюциферин и диметилноксилюциферин (ДМОЛ)

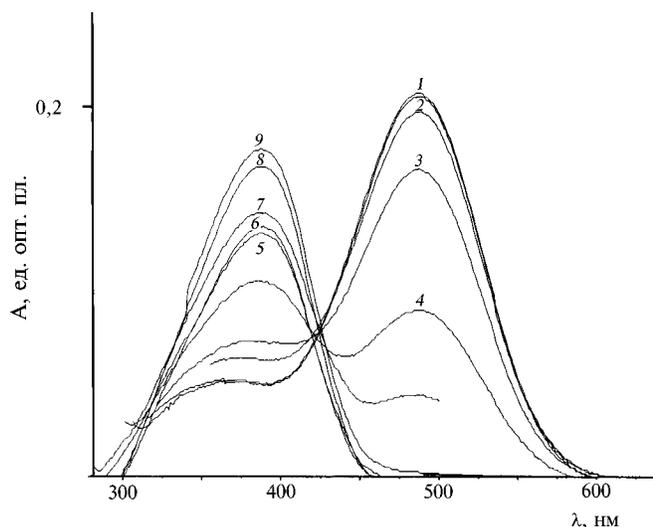


Рис. 2. Спектры поглощения ДМОЛ в буферных растворах с разными значениями pH: 1 – 9,62; 2 – 8,60; 3 – 8,24; 4 – 7,66; 5 – 7,12; 6 – 6,37; 7 – 5,75; 8 – 5,08; 9 – 4,63

ции белка в интервале от 300 до 400 нм ($\lambda_{\text{ex}} = 290$ нм). Степень тушения флуоресценции определяли с учетом разбавления, проводя в тех же условиях титрование белка буферным раствором. Полученные данные обрабатывали по уравнению Штерна–Фольмера [5].

Ингибирование люциферазы диметилоксилюциферином. Получали зависимости интенсивности биолюминесценции, пропорциональной скорости ферментативной реакции [6], от концентрации одного субстрата при фиксированной концентрации другого в присутствии ДМОЛ, концентрация которого составляла от 0 до 25 мкМ. Тип ингибирования определяли по методу Лайнуивера–Берка [7]; константы ингибирования ($K_{\text{ин}}$) в

случае конкурентного и неконкурентного ингибирования определяли по методу Диксона, а в случае бесконкурентного ингибирования – по методу, описанному в [7].

Результаты и обсуждение

Спектры поглощения и флуоресценции ДМОЛ. Диметилоксилюциферин содержит фенольную группу, которая депротонируется при щелочных pH. Спектры поглощения ДМОЛ в диапазоне pH 4,6–9,6 (рис. 2) указывают на существование равновесия между фенольной ($\lambda_{\text{макс}} = 383$ нм) и фенолятной ($\lambda_{\text{макс}} = 485$ нм) формами ДМОЛ с величиной pK = 7,8, которая несколько отличается от pK фенольной группы оксилуциферина (7,4) [8]. Известно, что для возбужденной молекулы фенола pK значительно уменьшается. Приближительная оценка pK* в возбужденном состоянии из спектров поглощения по методу Ферстера [4] дает величину pK* = –3,91. Следовательно, ДМОЛ в возбужденном состоянии – сильная кислота, существующая в фенолятной форме при всех изученных pH.

Таким образом, в спектрах флуоресценции можно было ожидать наличие только одного пика независимо от длины волны возбуждения. Ранее [2] были получены спектры флуоресценции ДМОЛ при $\lambda_{\text{ex}} = 390$ нм ($\lambda_{\text{макс}}$ поглощения фенольной формы). При pH 6,0 авторы наблюдали красную флуоресценцию, а при pH > 8 – желто-зеленую. Однако это явление не было объяснено. Нами были получены спектры флуоресценции ДМОЛ в диапазоне pH 3,9–10,5 при трех величинах длины волны возбуждения: 485 нм ($\lambda_{\text{макс}}$ поглощения фенолятной формы), 425 нм (изобестическая точка), 383 нм ($\lambda_{\text{макс}}$ поглощения фенольной формы). При $\lambda_{\text{ex}} = 485$ нм наблюдали

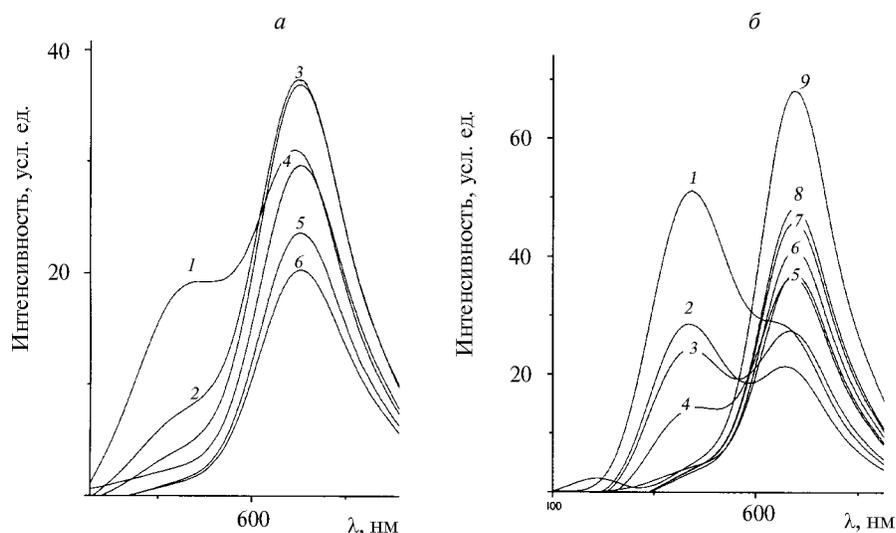


Рис. 3. Спектры флуоресценции ДМОЛ в буферных растворах с разными значениями pH. а: $\lambda_{\text{ex}} = 425$ нм при pH: 1 – 10,5; 2 – 9,18; 3 – 8,24; 4 – 7,66; 5 – 5,75; 6 – 4,63; б: $\lambda_{\text{ex}} = 383$ нм при pH: 1 – 10,5; 2 – 10,23; 3 – 9,18; 4 – 8,24; 5 – 7,12; 6 – 6,37; 7 – 5,97; 8 – 4,97; 9 – 3,94

один пик ($\lambda_{\text{макс}} = 639 \text{ нм}$) при любом pH. Интенсивность флуоресценции уменьшалась с понижением pH, что можно объяснить снижением концентрации фенолят-иона. При $\lambda_{\text{ex}} = 425$ и 383 нм при $\text{pH} > 8,0$ наблюдали два пика флуоресценции ($\lambda_{\text{макс}} = 537$ и 639 нм) (рис. 3).

Интенсивность желто-зеленой флуоресценции ($\lambda_{\text{макс}} = 537 \text{ нм}$) увеличивалась с ростом pH, тогда как интенсивность красной ($\lambda_{\text{макс}} = 639 \text{ нм}$) наоборот уменьшалась. Необходимо отметить, что интенсивность желто-зеленой флуоресценции увеличивалась со временем и не исчезала при сдвиге pH в кислую область. В спектрах поглощения после инкубации при щелочном pH в течение 15–20 мин появлялся новый пик с $\lambda_{\text{макс}} = 356 \text{ нм}$. Таким образом, изменения в спектрах поглощения и флуоресценции, по-видимому, объясняются тем, что ДМОЛ претерпевает некие химические превращения при щелочных pH. Дополни-

тельные пики в спектрах поглощения и флуоресценции соответствуют продукту этой химической реакции. Скорость данной реакции сильно зависит от pH. Так, при pH 9,2 продукт реакции регистрируется сразу после внесения ДМОЛ в раствор. При pH 10,3 кинетика накопления продукта этой реакции соответствует кривой первого порядка с $k = 0,02 \text{ мин}^{-1}$. В то же время при pH 7,8 ($\text{pH}_{\text{макс}}$ активности люциферазы) спектры поглощения и флуоресценции ДМОЛ не меняются в течение 6 часов. Это позволило использовать ДМОЛ для изучения его взаимодействия с люциферазой при pH 7,8.

Взаимодействие диметилоксилюциферина с люциферазой светляков. Кинетические и флуоресцентные свойства люциферазы светляков были изучены при pH 7,8 в отсутствие и присутствии ДМОЛ. При титровании раствора фермента раствором ДМОЛ (0–120 мкМ) на-

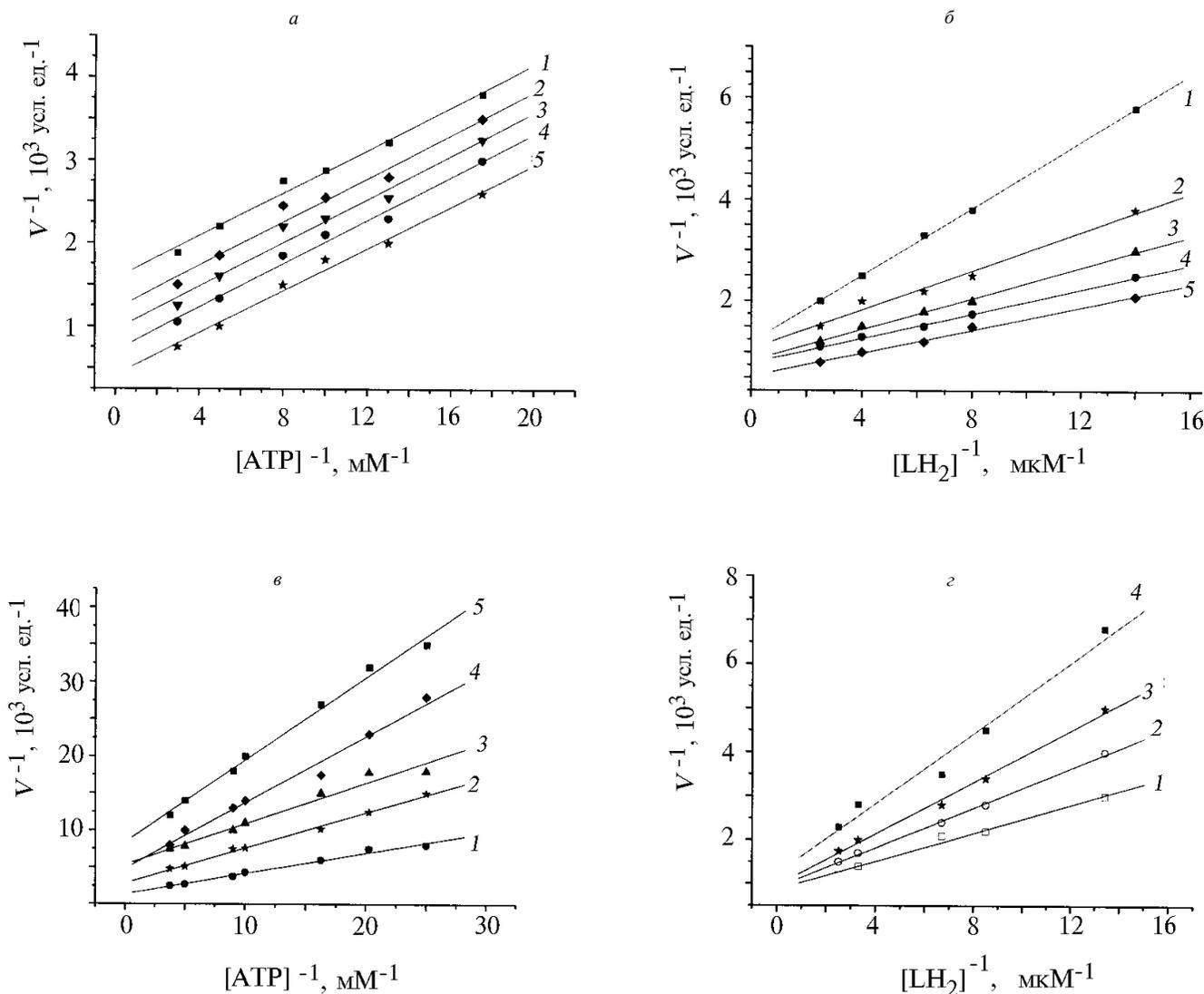


Рис. 4. Зависимость скорости люциферазной реакции от концентрации одного субстрата при постоянной насыщающей (а, б) и ненасыщающей (в, г) концентрации другого в координатах Лайнуивера–Берка. а: ДМОЛ, мкМ: 1 – 25; 2 – 18; 3 – 7; 4 – 2,5; 5 – 0 (концентрация люциферина 0,33 мМ); б: ДМОЛ, мкМ: 1 – 25; 2 – 18; 3 – 7; 4 – 2,5; 5 – 0 (концентрация АТФ 1 мМ); в: ДМОЛ, мкМ: 1 – 0; 2 – 1,28; 3 – 3,5; 4 – 10; 5 – 17,5 (концентрация люциферина 1 мМ); г: ДМОЛ, мкМ: 1 – 0; 2 – 1,28; 3 – 3,5; 4 – 10 (концентрация АТФ 1 мМ)

Ингибирование люциферазы диметилоксилюциферином

Условия	Тип ингибирования
$[LH_2] \gg K_m LH_2$	Бесконкурентное по АТР
$[АТР] \gg K_m АТР$	Неконкурентное по LH_2
$[LH_2] \ll K_m LH_2$	Неконкурентное по АТР
$[АТР] \ll K_m АТР$	Конкурентное по LH_2

блюдали тушение собственной флуоресценции люциферазы (флуоресценции единственного остатка Trp в люциферазе *Luciola mingrelica*), которое описывается константой связывания (K_s), равной 45,7 мкМ, что достаточно близко к константе связывания люциферзы с субстратом люциферином (34 мкМ) [9].

Были получены зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации одного из субстратов (АТР или LH_2) при фиксированной насыщающей (1 мМ АТР или 0,33 мМ LH_2) и ненасыщающей (1 мкМ АТР или 1 мкМ LH_2) концентрации другого субстрата в присутствии ДМОЛ, концентрация которого менялась от 0 до 25 мкМ. Полученные зависимости показали, что

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 02-04-48-961) и INTAS (проект 2000-0562).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Plant P. J., White E.H., McElroy W.D. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1968. **31**. N 1. P. 98.
2. Weiss D, Beckert R, Lamm K, Baader W.J. et al. // Bioluminescence and chemiluminescence. World scientific. 2001. P. 197.
3. Талебаровская И.К., Каткова В.А., Рыжова В.В., Щеголев А.А и др. Способ получения D-люциферина. Авт. св. №1192324. 1983.
4. Кутузова Г.Д., Дементьева Е.И., Болдвин Т.О., Угарова Н.Н. // Биотехнология. 1992. N5. С. 43.
5. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. М., 1986.
6. Ugarova N.N. // J. Biolum. Chemilumin. 1989. **4**. P. 406.
7. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. М., 1978.
8. Gandelman O.A., Brovko L.Yu., Ugarova N.N., Chikishev A.Yu. et al. // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 1993. **19**. № 19. P. 187.
9. Чудинова Е.А., Дементьева Е.И., Бровко Л.Ю., Савицкий А.П. и др. //Биохимия. 1999. **64**. №10. С. 1097.
10. Дементьева Е.И. // Дис. ... канд. хим. наук. М., 1986.

Поступила в редакцию 25.10.02

ДМОЛ является сильным ингибитором люциферазы. Экспериментальные данные, представленные в координатах Лайнуивера–Берка (рис. 4), показывают, что тип ингибирования (таблица) зависит от соотношения концентраций субстратов люциферазы: LH_2 и АТР.

Экспериментальные данные были представлены в координатах Диксона для конкурентного и неконкурентного ингибирования и в координатах $[АТР]/v - [ДМОЛ]$ для бесконкурентного ингибирования, откуда были определены константы ингибирования $K_{ин}$. Во всех случаях константа ингибирования была одинакова и равна 10 мкМ. Эта величина значительно выше, чем аналогичная для оксилуциферина (одного из самых сильных ингибиторов люциферазы), однако характер ингибирования люциферазы совпадает для ДМОЛ и оксилуциферина [10].

Таким образом, ДМОЛ является ингибитором люциферазы, который, по-видимому, связывается в области, близкой к центру связывания люциферина и оксилуциферина, но в силу возможных стерических затруднений его сродство к белку значительно ниже.