

УДК 577.158.54

## КИНЕТИКА И МЕХАНИЗМ ТЕРМОИНАКТИВАЦИИ РЕКОМБИНАНТНОЙ ЛЮЦИФЕРАЗЫ СВЕТЛЯКОВ *Luciola mingrelica*

И. А. Лундовских, Е. И. Дементьева\*, 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)

Исследованы субъединичные взаимодействия и механизм термоинактивации рекомбинантной люциферазы светляков *Luciola mingrelica*. Методами ультрацентрифугирования и гель-фильтрации показано присутствие мономеров и димеров в растворе активного фермента и тримеров для инактивированной люциферазы. Кинетическими методами показано, что и димер и мономер каталитически активны, причем активность мономеров в составе димера в два раза выше, чем в свободном состоянии. Предложена кинетическая схема термоинактивации люциферазы, включающая обратимую диссоциацию активных димеров в активные мономеры, инактивацию мономеров, агрегацию неактивных мономеров. Показано, что термоинактивированная люцифераза при охлаждении способна самопроизвольно восстанавливать каталитическую активность за счет ассоциации обратимо инактивированных мономеров в активные димеры.

Люцифераза светляков катализирует окисление люциферина в присутствии аденозинтрифосфата (АТФ) и ионов  $Mg^{2+}$ , сопровождающееся излучением видимого света. На основе люциферин-люциферазной системы получены высокоэффективные реагенты, позволяющие определять ультрамалые ( $10^{-14}$  моль и ниже) количества АТФ [1, 2]. Поскольку даже фемтомолярные количества люциферазы легко регистрируются биoluminesцентным методом, ген люциферазы используется в качестве маркерного при изучении процессов транскрипции и трансляции генетического материала, а также при выяснении роли шаперонов в сворачивании белков *in vivo* [3, 4]. Практическое использование фермента ограничивается его низкой стабильностью в растворе, особенно при повышенной температуре. Выяснение механизма термоинактивации позволит предложить методы стабилизации люциферазы.

Использованная в нашей работе рекомбинантная люцифераза светляков *L. mingrelica* по аминокислотному составу и физико-химическим свойствам аналогична нативной люциферазе, выделяемой из светляков [5]. Вопрос об олигомерной структуре люцифераз светляков и о том, какая частица обладает каталитической активностью, до сих пор остается открытым. Еще в 1982 г. в работах нашей лаборатории по изучению термоинактивации нативной люциферазы светляков *L. mingrelica* было показано, что инактивация фермента включает в себя диссоциацию димерной формы фермента на менее стабильные мономеры [6]. В ранних работах по исследованию люцифера-

зы светляков *P. pyralis* было обнаружено существование мономеров и димеров люциферазы с молекулярной массой 50–52 и 92–95 кДа соответственно [7, 8], распад димеров на мономеры наблюдали в присутствии гуанидинхлорида и додецилсульфата натрия. Методами гель-фильтрации и равновесного центрифугирования показано, что люциферазы светляков *P. pyralis* и *P. pennsylvanica* представляют собой мономеры, способные ассоциировать в димеры, тогда как активная люцифераза жуков-щелкунов *P. plagiophthalmus* находится преимущественно в димерной форме [9]. Все люциферазы способны образовывать и агрегаты более высоких порядков. Гель-фильтрация люциферазы *P. pyralis* в присутствии 0,2 % Твин-20 показала наличие мономера; для инактивированной люциферазы наблюдали также тримеры [10, 11]. На результаты экспериментов по определению молекулярной массы методами гель-фильтрации и ультрацентрифугирования могут значительно влиять условия эксперимента и предварительного хранения фермента. Замораживание-размораживание препаратов люциферазы, присутствие поверхностно-активных веществ могут приводить к инактивации фермента и/или диссоциации олигомерных частиц на субъединицы. Авторы не всегда приводят данные по изменению активности люциферазы в ходе экспериментов, что затрудняет сравнение данных, полученных при разных условиях.

В литературе отмечалось, что термоденатурированная люцифераза светляков *P. pyralis* не способна к самопроизвольной реактивации, но восстановление каталитичес-

\*Адресат для переписки.

кой активности возможно в присутствии шаперонов DnaK, DnaJ и GrpE [3]. Рекombинантная люцифераза светляков *L. mingrelica* внутри клеток *E. coli* приобретает каталитически активную конформацию при участии шаперона DnaK и АТР [12]. Целью настоящей работы является исследование субъединичных взаимодействий в люциферазе светляков *L. mingrelica*, их роли в процессе термоинактивации, а также выяснение возможности самопроизвольной реактивации фермента.

### Экспериментальная часть

Использовали рекombинантную люциферазу светляков *L. mingrelica*, которую выделяли из клеток *E. coli*, штамм LE 392, несущих плазмиду pLR с геном люциферазы [5], и очищали до гомогенного состояния [13]. Носитель для хроматографии *Superdex-200* и набор для определения молекулярной массы белков методом гель-фильтрации были фирмы «Amersham Pharmacia Biotech», АТР («Reanal», Венгрия), кислоты и соли марки «ос.ч.». Растворы готовили на деионизованной воде.

*Активность люциферазы* измеряли по величине максимальной интенсивности биолюминесценции при насыщающих концентрациях субстратов (1,3 мМ АТР и 0,3 мМ LH<sub>2</sub>) на люминометре 1250 («LKB-Wallac») и выражали в условных единицах: 1 усл. ед. = 10<sup>9</sup> квант/с.

*Определение молекулярной массы методом гель-фильтрации.* Гомогенные препараты люциферазы (0,5 мл) пропускали через колонку (1,6×70 см) с *Superdex-200*, уравновешенную 0,1 М Трис-ацетатным буфером (2 мМ ЭДТА, 60 мМ MgSO<sub>4</sub>, pH 7,8). За элюцией фермента следили по поглощению раствора при 280 нм и по активности люциферазы. Молекулярную массу люциферазы определяли по калибровочному графику зависимости logM<sub>r</sub> от K<sub>av</sub>, построенному для данной колонки с помощью набора белков с известной молекулярной массой.

*Седиментацию* раствора люциферазы (0,2 мг/мл) проводили в аналитической ультрацентрифуге *Spinco*, модель Е («Beckman»), снабженной абсорбционной сканирующей системой (49 000 об/мин, 10°). Коэффициенты седиментации рассчитывали с поправкой на вязкость и плотность растворов.

*Термоинактивация рекombинантной люциферазы.* Растворы люциферазы (0,01–100 мкг/мл) в 0,1 М Трис-ацетатном буфере (2 мМ ЭДТА, 60 мМ MgSO<sub>4</sub>, 1 мМ дитиотреитол, pH 7,8) инкубировали при 8–42°. Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты (0,9 мл) и измеряли интенсивность биолюминесценции при добавлении 90 мкл раствора субстратов (12 мМ АТР, 3 мМ LH<sub>2</sub>).

### Результаты и их обсуждение

*Молекулярные формы люциферазы светляков L. mingrelica.* Для выяснения возможности существования различных молекулярных форм рекombинантной люцифе-

разы светляков *L. mingrelica* использовали седиментационный анализ и гель-фильтрацию. Для препарата люциферазы с высокой удельной активностью методом седиментации были обнаружены мономеры (60 кДа) и незначительное количество димеров (112 кДа). Если люциферазу предварительно инкубировать в течение 2 мин при 42°, то можно обнаружить только мономеры; а после инкубации при 42° в течение 10 мин – мономеры и агрегаты большего порядка. Однако определение активности люциферазы показало, что в ходе ультрацентрифугирования происходит значительная инактивация фермента. Аналитическая гель-фильтрация активной люциферазы показала присутствие двух зон, обладающих каталитической активностью, соответствующих белкам с молекулярной массой 60±4 и 124±7 кДа. Однако и в этом случае наблюдается сильное разбавление образца и частичная инактивация люциферазы, поэтому невозможно точно определить удельную активность мономерных и димерных частиц. Таким образом, методы ультрацентрифугирования и гель-фильтрации качественно показывают наличие в водном растворе фермента активных мономеров и димеров, а в случае термоинактивированной люциферазы и более высокомолекулярных агрегатов. Для исследования процессов ассоциации-диссоциации и механизма термоинактивации рекombинантной люциферазы были использованы кинетические методы.

*Удельная активность мономера и димера люциферазы.* Для субъединичных ферментов, олигомерные формы которых обладают различной активностью, характерно изменение активности с течением времени при разбавлении раствора [14]. Были получены зависимости активности люциферазы от времени для растворов с начальной концентрацией фермента от 5,3·10<sup>-6</sup> до 5,3·10<sup>-12</sup> М при 8 и 22° в условиях, когда не наблюдается термоинактивации

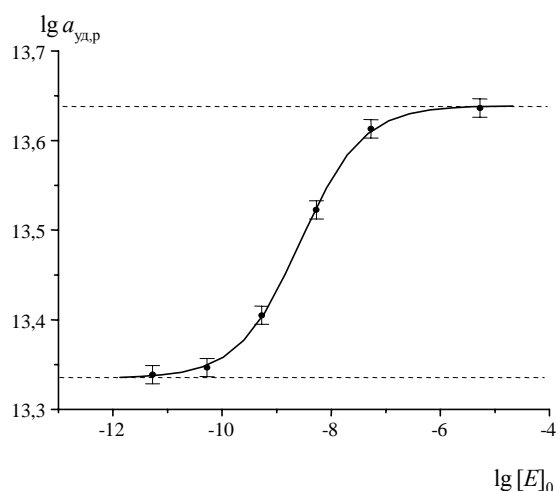


Рис. 1. Зависимость равновесной удельной активности ( $a_{уд.р.}$ , усл. ед./моль) рекombинантной люциферазы светляков *L. mingrelica* от концентрации фермента ( $[E]_0$ , М) при 8°. Условия: 0,1 М Трис-ацетатный буфер, 2 мМ ЭДТА, 60 мМ MgSO<sub>4</sub>, 6,5 мМ ДТТ, pH 7,8

Т а б л и ц а 1

**Кинетические параметры системы димер – мономер рекомбинантной люциферазы светляков  
*L. mingrelica* при 8–22° (схема 1, удельная активность рассчитана на 1 моль мономера)**

$T, ^\circ\text{C}$	$K_{\text{дис}}, \text{M}$	Уд. активность димера, усл. ед./моль	Уд. активность мономера, усл. ед./моль	$k_{\text{дис}}, \text{мин}^{-1}$	$k_{\text{ас}}, \text{M}^{-1} \text{мин}^{-1}$	$k_{\text{ин}} \text{ мономера}, \text{мин}^{-1}$
8	$3,8 \cdot 10^{-9}$	$(4,4 \pm 0,2) \cdot 10^{13}$	$(2,1 \pm 0,1) \cdot 10^{13}$	$(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^{-2}$	$2,9 \cdot 10^6$	$(1,4 \pm 0,3) \cdot 10^{-4}$
22	$3,0 \cdot 10^{-8}$	$(5,3 \pm 0,2) \cdot 10^{13}$	$(2,4 \pm 0,1) \cdot 10^{13}$	$0,1 \pm 0,01$	$3,4 \cdot 10^6$	$(6,5 \pm 0,5) \cdot 10^{-3}$

люциферазы. При концентрации фермента  $5,3 \cdot 10^{-9}$  М и менее удельная активность люциферазы уменьшалась в течение 60 мин, достигая равновесного значения, и затем оставалась постоянной в течение нескольких часов. Зависимость равновесных значений удельной активности люциферазы ( $a_{\text{уд.р}}$ ) от ее концентрации (рис. 1) показывает существование двух форм люциферазы, причем обе обладают каталитической активностью. Экстраполяцией значений  $a_{\text{уд}}$  к бесконечно большим концентрациям фермента определена удельная активность димера  $a_{2,\text{уд}}$ . Удельная активность мономера ( $a_{1,\text{уд}}$ ) и константа диссоциации ( $K_{\text{дис}} = 1/K_{\text{ас}}$ ) были определены по уравнению [14]:

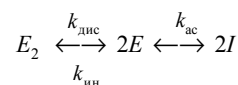
$$a_{\text{уд}} = a_{1,\text{уд}} \frac{2 K_{\text{ас}}}{(a_{1,\text{уд}} - a_{2,\text{уд}})} (a_{\text{уд}} - a_{2,\text{уд}})^2 [E]_0 \quad (1)$$

Рассчитанные значения кинетических параметров приведены в табл. 1. Таким образом, при 8° и димер, и мономер люциферазы обладают каталитической активностью, и мономер в составе димера в два раза более активен, чем в свободном состоянии.

**Кинетика инактивации люциферазы при 8–22°.** При длительном инкубировании (около 20 ч) разбавленных растворов люциферазы ( $10^{-10}$  М и ниже) при 8° наблюдается инактивация фермента. Кривые инактивации спрямлялись в координатах первого порядка, откуда были рассчитаны эффективные константы инактивации ( $k_{\text{ин,эф}}$ ). Значения  $k_{\text{ин,эф}}$  зависят от начальной концентрации фермента, увеличиваясь с ростом доли мономера в растворе. При концентрациях фермента ниже  $10^{-10}$  М доля мономера составляет более 90%, поэтому при малых концентра-

циях фермента  $k_{\text{ин,эф}}$  характеризует  $k_{\text{ин}}$  мономера. Инактивация димера при данных условиях не наблюдалась, поэтому процесс инактивации люциферазы при 8°С может быть описан схемой 1.

С х е м а 1



$E_2$  – активный димер,  $E$  – активный мономер,  
 $I$  – неактивный мономер

Зависимости активности люциферазы от времени при различных концентрациях белка, полученные при 22°, аналогичны зависимостям, полученным при 8°, только инактивация фермента протекает быстрее. Сравнение кинетических параметров, рассчитанных для этих двух значений температур (табл. 1), показывает, что удельная активность димера и мономера люциферазы при 22° немного выше, чем при 8°, что понятно, так как 22° – температура, близкая к оптимальной для люциферазы. При переходе от 8 к 22°  $K_{\text{дис}}$  возрастает

Т а б л и ц а 2

**Кинетические параметры инактивации рекомбинантной люциферазы *L. mingrelica* при 30–42°С (схема 2)**

$T, ^\circ\text{C}$	$K_{\text{дис}}, \text{M}$	$k_{\text{дис}}, \text{мин}^{-1}$	$k_{\text{ас}}, \text{M}^{-1} \text{мин}^{-1}$	$k'_{\text{ин}}, \text{мин}^{-1}$
30	$1,63 \cdot 10^{-7}$	$0,22 \pm 0,01$	$1,35 \cdot 10^6$	$0,020 \pm 0,003$
37	$3,3 \cdot 10^{-7}$	$0,40 \pm 0,05$	$1,21 \cdot 10^6$	$0,028 \pm 0,005$
42	$7,5 \cdot 10^{-7}$	$0,7 \pm 0,1$	$0,93 \cdot 10^6$	$0,061 \pm 0,005$

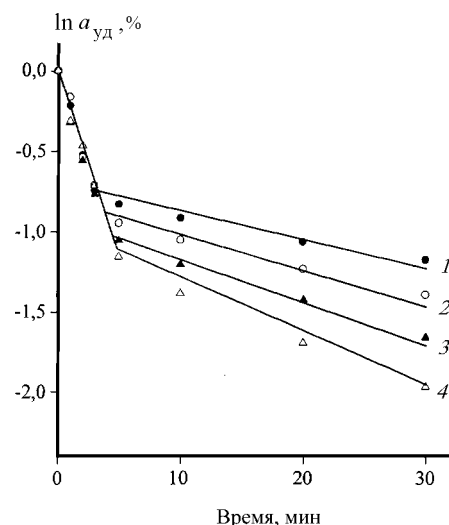
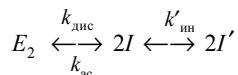


Рис. 2. Кинетика термоинактивации рекомбинантной люциферазы *L. mingrelica* при 30°. Концентрация фермента: 1 –  $3,4 \cdot 10^{-7}$  М, 2 –  $0,9 \cdot 10^{-7}$  М, 3 –  $0,3 \cdot 10^{-7}$  М, 4 –  $0,1 \cdot 10^{-7}$  М. Условия см. в подписи к рис. 1

почти на порядок, в основном за счет увеличения  $k_{\text{дис}}$  димеров. Стабильность мономера люциферазы при 22° в 50 раз ниже, чем при 8°. Таким образом, процесс инактивации люциферазы в интервале температур 8–22° хорошо описывается схемой 1.

*Кинетика инактивации люциферазы при повышенных температурах.* На кинетических кривых инактивации в полулогарифмических координатах, полученных при 30–42°, имеется излом, свидетельствующий о том, что инактивация люциферазы включает быструю и медленную стадии (рис. 2 для 30°, аналогичные кривые получены для 37–42°). Положение излома зависит от концентрации фермента, наклон начальных участков кинетических кривых при концентрациях фермента  $0,1 \cdot 10^{-7}$ – $3,4 \cdot 10^{-7}$  М совпадает, однако наклон вторых участков тем больше, чем ниже концентрация люциферазы. Такой вид кинетических кривых типичен для инактивации ферментов по диссоциативному механизму [15, 16] (схема 2).

С х е м а 2



$E_2$  – активный димер,  $I$  – неактивный мономер, способный к обратной ренатурации,  $I'$  – необратимо инактивированный мономер,  $K_{\text{дис}}$  – константа равновесия между активными димерами и неактивными мономерами

Обратимая диссоциация более стабильного димера на мономеры, которые далее инактивируют необратимо, определяет наличие излома, который проявляется только в температурном интервале, когда  $k_{\text{дис}} \gg k'_{\text{ин}}$ , и при концентрации фермента, приблизительно равной численному значению константы диссоциации. Как показано выше, стабильность мономера быстро уменьшается с повышением температуры. При повышенных температурах мономер, по-видимому, настолько быстро теряет свою активность, что ею можно пренебречь, и кривые инактивации хорошо описываются схемой, где активный димер диссоциирует на неактивные мономеры.

Константы индивидуальных стадий процесса, описываемого схемой 2, определяли по уравнениям [15, 16]:

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

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

$$k'_{\text{ин}} = \frac{k_{\text{ин,эф}} (a_0 + a_\tau)}{2 (a_0 - a_\tau)}, \quad (4)$$

где  $E_0$  – начальная концентрация фермента,  $a_0$  и  $a$  – удельная активность фермента в начальный и текущий момент времени,  $a_\tau$  – удельная активность фермента в момент излома  $\tau$  на кинетических кривых инактивации в полулогарифмических координатах (пересечение двух экспонент).

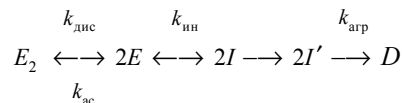
Кинетические параметры инактивации люциферазы *L. mingrelica* при 30–42° приведены в табл. 2. С повышением температуры растут константы диссоциации димера ( $k_{\text{дис}}$ ) и инактивации мономера ( $k'_{\text{ин}}$ ), константа диссоциации ( $K_{\text{дис}}$ ) и незначительно уменьшается  $k_{\text{ac}}$ .

*Реактивация люциферазы L. mingrelica.* Если первая стадия процесса термоинактивации (схема 2) обратима, то при снятии денатурирующего воздействия должна наблюдаться реактивация люциферазы. Действительно, инактивированная люцифераза самопроизвольно восстанавливает каталитическую активность после быстрого охлаждения во льду. При этом если остаточная активность люциферазы соответствует начальному участку кинетической кривой инактивации (рис. 2), то активность восстанавливается практически полностью. При более глубоких степенях инактивации наблюдается лишь частичная реактивация.

Кинетические кривые реактивации при разных начальных концентрациях фермента спрямляются в координатах  $\{1/C; \text{время}\}$  с наклоном, равным  $2k_{\text{ac}}$ , что соответствует реакции второго порядка (рис. 3), а именно ассоциации неактивных мономеров с образованием активных димеров. Экспериментально определенное значение  $k_{\text{ac}}$  равно  $(3,1 \pm 0,2) \cdot 10^6 \text{ М}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ , что близко к константе ассоциации ( $k_{\text{ac}}$ ) активных мономеров фермента при низких температурах (табл. 1).

*Механизм инактивации рекомбинантной люциферазы светляков L. mingrelica.* Общая схема термоинактивации люциферазы светляков может быть представлена следующим образом:

С х е м а 3



$E_2$  – активный димер,  $E$ ,  $I$  и  $I'$  – активный, обратимо инактивированный и необратимо инактивированный мономеры люциферазы соответственно;  $D$  – агрегаты необратимо инактивированного фермента

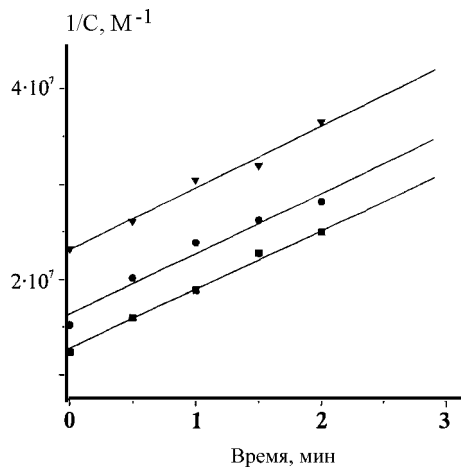


Рис. 3. Реактивация термоинактивированной люциферазы.  
Условия см. в подписи к рис. 1

При различных температурах экспериментально проявляются различные стадии процесса инактивации. При температурах ниже  $22^{\circ}$  процесс инактивации фермента описывается первыми двумя стадиями схемы 3, тогда как при повышенных температурах соотношение скоростей отдельных стадий таково, что первые две обратимые стадии кинетически проявляются как диссоциация активного димера на неактивные мономеры. Необратимая стадия инактивации связана с разворачиванием инактивированных молекул фермента и их последующей агрегацией сначала в тримеры, а затем и агрегаты более высоких порядков.

#### 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. Schruder H., Langer T., Hartl F.-U., Bukau B. // EMBO J. 1993. **12**. P. 4137.
4. Frydman J., Hartl F.-U. // Science. 1996. **272**. P. 1497.
5. 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. Chicheste, 1998. P. 420.
6. Бровко Л. Ю., Беляева Е. И., Угарова Н. Н. // Биохимия. 1982. **47**. С. 760.
7. Travis J., McElroy W.D. // Biochemistry. 1966. **5**. P. 2170.
8. Denburg J.L., McElroy W.D. // Biochemistry. 1970. **9**. P. 4619.
9. Hannah R.R., McCaslin D.R., Wood K.V. // In: Bioluminescence and chemiluminescence. Perspectives for the 21 century. Eds. A. Roda, M. Pazzagli, L.J. Kricka, P.E. Stanley. Chichester, 1998. P. 361.
10. Herbst R., Schdfer U., Seckler R. // J. Biol. Chem. 1997. **272**. P. 7099.
11. Herbst R., Gast K., Seckler R. // Biochemistry. 1998. **37**. P. 6586.
12. Леонтьева О.В., Угарова Н.Н. // Биохимия. 1996. **61**. С. 725.
13. Дементьева Е. И., Кутузова Г. Д., Железнова Е. Е., Лундовских И. А., Угарова Н. Н. // Биохимия. 1996. **61**. С. 156.
14. Курганов Б.И. // Аллостерические ферменты. М.: Наука, 1978.
15. Полторак О.М., Чухрай Е.С. // ЖФХ. 1995. **69**. С. 330.
16. Полторак О.М., Чухрай Е.С., Торшин И.Ю. // Биохимия. 1998. **63**. С. 360.

Поступила в редакцию 20.06.00