

УДК 577.152.1

## БАКТЕРИАЛЬНАЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ С ФЛАВИНМОНОНУКЛЕОТИДОМ, АКТИВИРОВАННЫМ N-МЕТИЛИМИДАЗОЛОМ

О.И. Краснова, Н.А. Тюлькова, И.О. Дорошенко, Л.А. Франк

(Институт биофизики СО РАН, Красноярск, 660036, e-mail: biotech@ibp.ru)

Субстрат бактериальной люциферазы (флавинонуклеотид) был активирован N-метилимидазолом по фосфатной группе. Исследованы свойства полученного производного и его взаимодействие с люциферазой из *Photobacterium leiognathi*. Активированный субстрат в невосстановленной форме модифицирует фермент по SH-группам, что приводит к его необратимой инактивации. Восстановленная форма активированного производного ФМН в зависимости от способа восстановления обладает разными свойствами. При фотовосстановлении активированного ФМН в реакции с люциферазой не наблюдается светоизлучения. При химическом восстановлении активированного ФМН наблюдается длительное свечение низкой интенсивности. Активированный ФМН конкурирует с исходным за активный центр фермента. Рассчитаны константы Михаэлиса и константы скорости ингибирования реакции. Предполагается, что разное поведение активированного производного флавина определяется усилением электроотрицательности его фосфатной группы.

Бактериальная люцифераза – флавинзависимая монооксигеназа, катализирующая окисление ФМНН<sub>2</sub> и длинноцепочечного алифатического альдегида в присутствии кислорода до ФМН, Н<sub>2</sub>О и соответствующей жирной кислоты с испусканием кванта света в видимой области [1]. Высокая специфичность люциферазы по отношению к восстановленному флавинонуклеотиду [2, 3] проявляется в том, что любые модификации изоаллоксазинового кольца и остатка рибитила молекулы флавина оказывают сильное влияние на каталитические свойства фермента [4]. Известно, что фосфатная группа ФМНН<sub>2</sub> чрезвычайно важна для связывания флавина с белком [5], имеющим фосфатный сайт, расположенный очень близко к активному центру [6]. Считается, что отрицательный заряд фосфата необходим для оптимальной ориентации молекулы субстрата на люциферазе и стабилизации активной конформации фермент-субстратного комплекса.

Перспективным для изучения роли фосфатной группы в ферментативном катализе представляется метод активации фосфатной группы моно- и олигонуклеоти-

дов 4-диметиламинопиридином или N-метилимидазолом. N-метилимидазольные производные обладают повышенной реакционной способностью по отношению к ряду нуклеофилов, особенно к аминам [7, 8], в роли которых могут выступать функциональные аминокислотные остатки активного центра фермента или сайта связывания флавина.

Цель данной работы состояла в изучении взаимодействия бактериальной люциферазы с флавинонуклеотидом, активированным N-метилимидазолом по фосфатной группе.

### Методы исследования

**Очистка люциферазы.** Люцифераза была выделена из рекомбинантного штамма *Escherichia coli* SL60, в котором клонированы гены Lux A и B *Photobacterium leiognathi* из коллекции Института биофизики (СО РАН). Фермент очищали сначала с помощью ионообменной хроматографии на колонке с ДЕ-целлюлозой, а затем на голубой агарозе, как описано ранее [9]. Степень чистоты фермента определяли по электрофорезу

в полиакриамидном геле в присутствии DS-Na по методу Лэммли [10].

**Подготовка флавиномононуклеотида.** ФМН (*Sigma*, США) очищали от примесей путем хроматографирования на колонке с ДЕ-целлюлозой. Активацию ФМН осуществляли *N*-метилимидазолом в присутствии 3-фенилфосфина и дипиридилдисульфида, соблюдая молярные соотношения по методу, предложенному для модификации олигонуклеотидов [7]. Для этого ФМН переводили в триэтиламинную форму путем проведения ионообменной хроматографии на ДЕ-целлюлозе, уравновешенной триэтиламино (ТЭА) при pH 7,0. Упаренный досуха ФМН-ТЭА перерастворяли в диметилсульфоксиде и активировали. Продукт реакции осаждали 2%-м  $\text{LiClO}_4$  в ацетоне. Наличие активации проверяли реакцией переаминирования 1,6-дигексоэтилендиамином. Анализ амида методом хроматографии на анионном сорбенте полисил-А показал, что фосфамид элюируется как соединение, имеющее заряд на единицу меньший, чем исходный ФМН. Фракционирование методом ионообменной хроматографии показало, что исходный и активированный ФМН элюируются при 4,8 и 3,8% градиента NaCl соответственно. Степень активации составляла 100%. Спектры флавина снимали на спектрофотометре "UVIKON 933A" (Италия). Фотовосстановление ФМН проводили в стеклянной "рубашке" на свету при температуре 25° в присутствии 0,01 М ЭДТА. Химическое восстановление активированного ФМН осуществляли с помощью никотинамиддинуклеотида (НАДН) или дитиотрейтола (ДТТ) непосредственно в реакционной смеси.

Активность люциферазы измеряли двумя методами: 1) методом инъекции флавина, при котором 500 мкл фотовосстановленного ФМН быстро смешивали с 500 мкл раствора, содержащего люциферазу, тетрадеканаль (4,7 мкМ) и 20 мМ фосфатного буфера (pH 7,0); 2) методом, при котором в кювету, содержащую люциферазу, тетрадеканаль, фосфатный буфер и ФМН, впрыскивали НАДН или ДТТ (в этом случае наблюдалось длительное свечение, обусловленное множественными оборотами фермента).

Константу скорости ингибирования первого порядка определяли как тангенс угла наклона на графике зависимости логарифма остаточной интенсивности от времени. Константу скорости ингибирования второго порядка вычисляли из наклона прямой, аппроксимирующей зависимость константы скорости ингибирования первого порядка от концентрации активированного флавина.

### Результаты и их обсуждение

Спектры поглощения невосстановленных форм исходного и активированного ФМН представлены на рис. 1. Коэффициент экстинкции 1 М раствора невосстановленного активированного флавина приблизительно на порядок ниже коэффициента экстинкции 1 М

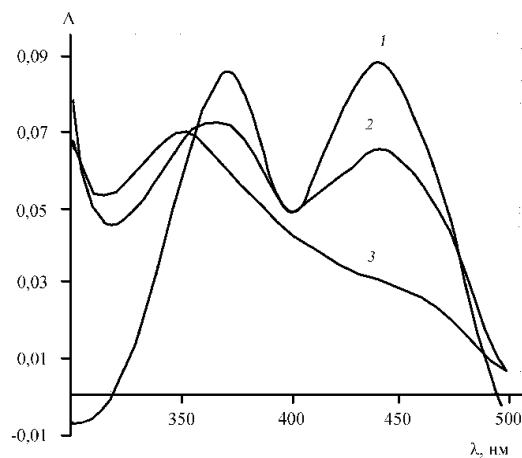


Рис. 1. Спектры поглощения флавина: исходного ФМН<sub>2</sub> (1), активированного флавина в невосстановленной (2) и восстановленной (3) формах. Условия: температура 20°, концентрация исходного и активированного флавина составляли соответственно 8,7 мкМ и 0,7 мМ в 20 мМ фосфатном буфере (pH 7,0). Спектр активированного фотовосстановленного ФМН<sub>2</sub> снимали после 40-минутного облучения видимым светом. Коэффициент молярной экстинкции невосстановленного активированного флавина составлял около 1000 см<sup>-1</sup>

раствора исходного ФМН и составляет около 1000 см<sup>-1</sup>. Фотовосстановление активированного флавина происходит медленнее, чем исходного, однако фотовосстановленный активированный ФМН<sub>2</sub> при встряхивании или перемешивании не окисляется полностью, как это происходит с исходным флавином. Вероятно, фотовосстановление вызывает конформационные изменения в структуре и молекулы флавина стабилизируются *N*-метилимидазольным остатком.

Инъекция активированного фотовосстановленного ФМН<sub>2</sub> в кювету, содержащую люциферазу, тетрадеканаль и фосфатный буфер, не приводит к эмиссии света. Однако при этом сама люцифераза не теряет своих каталитических свойств. Добавление в эту же смесь исходного фотовосстановленного флавина дает вспышку света с соответствующими кинетическими параметрами. Инкубирование люциферазы с восстановленной формой активированного ФМН<sub>2</sub> приводит к потере активности фермента примерно на 15% в течение 45 мин при молярном соотношении фермента и флавина 1:1000. Константа скорости ингибирования составила 0,004 мин<sup>-1</sup>.

Инкубирование люциферазы с невосстановленным активированным флавином также приводит к необратимому ингибированию фермента (рис. 2).

При определении порядка реакции по активированному ФМН получен коэффициент 1,05. Таким образом, активированный флавином модифицирует люциферазу, при этом затрагивается не более одной функциональной группы белка. Константа скорости ингибирования второго порядка составила около 400 М<sup>-1</sup>·мин<sup>-1</sup>, что предполагает невысокую модифицирующую способность невосстановленного флавина по отношению к SH-группам белка. Добавление в инкубационную смесь до внесения

активированного флавина второго субстрата люциферазы – тетрадеканаль – не защищает люциферазу от инактивации. Добавление протекторов ДТТ (8 мМ) или меркаптоэтанола (1 мМ) приводит к существенному ослаблению ингибирования. В присутствии протекторов в реакционной смеси степень ингибирования (в течение 45 мин) составила около 20% с невосстановленной формой и полностью снималось при инкубации с фотовосстановленной формой активированного флавина при других равных условиях. Активированный фламин реагирует, скорее всего, с SH-группами люцифераз, которые, как известно, являются хорошими нуклеофилами [11]. Присутствие ДТТ или меркаптоэтанола в реакционной смеси (или добавление их одновременно с флавином) не делает фотовосстановленный активированный фламин субстратом реакции.

Ранее было показано, что ДТТ может выступать не только как протектор SH-групп, но и как восстанавливающий агент для флавиннуклеотидов. Если в реакционную смесь, содержащую люциферазу, тетрадеканаль и невосстановленный фламин в 20 мМ фосфатном буфере pH 7,0, добавить ДТТ, то наблюдается длительное свечение, интенсивность и константа спада которого зависят от концентраций ДТТ и люциферазы. Интенсивность свечения с исходным флавином достигает максимума при концентрации ДТТ в смеси равной 40 мМ. В таких условиях замена исходного флавинового субстрата на активированный также приводит к длительному свечению. Интенсивность светоизлучения в этом случае составила около 25% от интенсивности свечения с исходным ФМН. При добавлении в реакционную среду одновременно исходного и активированного флавина происходит свечение меньшей интенсивности, чем в присутствии одного исходного флавина та-

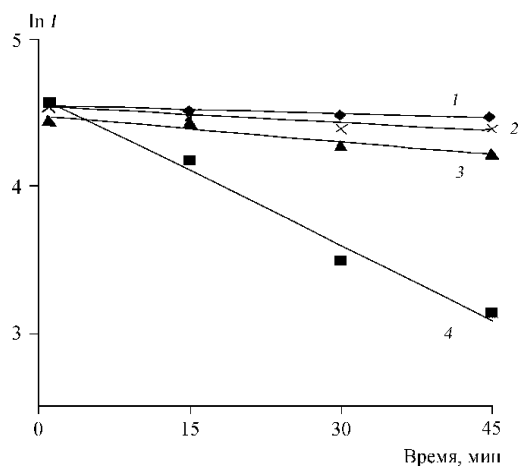


Рис. 2. Инактивация люциферазы *P. leiognathi* под действием невосстановленного активированного ФМН. Условия: 2 мкМ люциферазы в 20 мМ фосфатном буфере смешали с невосстановленным активированным флавином в концентрациях – 0,0088 мМ (2), 0,018 мМ (3), 0,088 мМ (4). В качестве контроля (1) использовали люциферазу в 20 мМ фосфатном буфере. Вычисленные значения констант скорости ингибирования  $k_i$ : 0,0041 мин<sup>-1</sup> (2), 0,0063 мин<sup>-1</sup> (3), 0,034 мин<sup>-1</sup> (4)

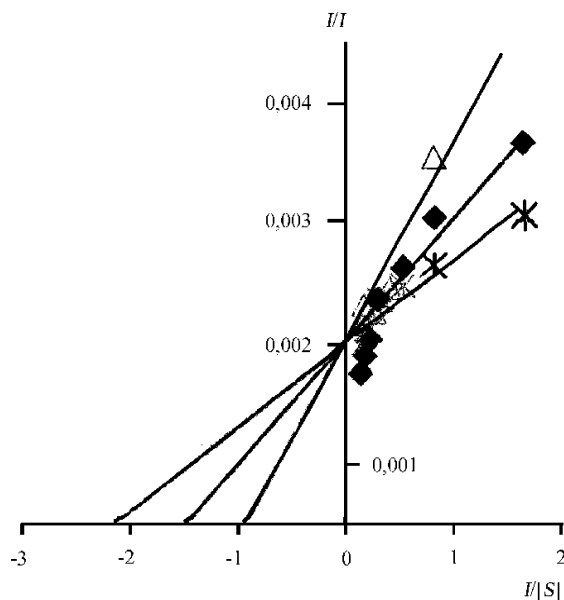


Рис. 3. Зависимость начальных скоростей биоломинесцентной реакции от концентрации активированного ФМН<sub>2</sub> в двойных обратных координатах. Реакционная смесь содержала: 20 мМ фосфатный буфер pH 7,0, 0,1 мкМ люциферазы, 18 мМ НАДН, 3 мМ ДТТ, 4 мкМ альдегида и 29 мкМ (1), 10 мкМ (2), 38 мкМ (3) активированного флавинмононуклеотида

кой же концентрации, т.е активированный фламин при восстановлении его ДТТ конкурирует с исходным флавином за активный центр люциферазы. Тип ингибирования и  $K_m$  определяли графически по методу Лайнуивера–Берка (рис. 3).

Значение  $K_m$  по активированному и исходному фламину составило  $17 \times 10^{-6}$  и  $5 \times 10^{-7}$  М соответственно. Значения  $K_m$  по тетрадеканалю для люциферазы с исходным и активированным флавином различались не столь значительно и составили  $1,4 \times 10^{-8}$  и  $5,6 \times 10^{-8}$  М соответственно, т.е. наличие N-метилимидазольного остатка в молекуле ФМН на порядок уменьшает сродство флавина к люциферазе, но не сказывается существенно на связывании альдегида.

Полученные эффекты свидетельствуют о том, что в зависимости от способа восстановления активированное производное флавина способно не только связываться с SH-группами люциферазы, вызывая ее инактивацию, но и проникать в активный центр фермента, приводя к светоизлучению. При этом протекция SH-групп не является определяющим фактором для каталитической активности люциферазы с активированным флавином. В том случае, когда протекторы SH-групп не добавляют в реакционную смесь, а в качестве восстановителя флавина используют НАДН в оптимальной концентрации (12 мМ), активированный ФМН служит субстратом для люциферазы и наблюдается реакция светоизлучения. При этом квантовый выход реакции люциферазы с активированным флавином при его восстановлении НАДН ниже, чем таковой при восстановлении активированного ФМН дитиотреитолом.

Наличие N-метилимидазола в молекуле флавина наряду с усилением электроотрицательных свойств фосфатной группы, очевидно, вызывает некоторые структурные изменения, отражающиеся на спектрах поглощения и коэффициенте молярной экстинкции полученного активированного производного. Фотовосстановленная форма активированного ФМН более устойчива к окислению по сравнению с фотовосстановленной формой исходного флавина. Даже после интенсивного механического воздействия спектр поглощения активированной восстановленной формы остается близким к таковому для фотовосстановленного исходного ФМН<sub>2</sub>. Подобным свойством обладает 5-деза ФМН [12], хотя здесь модификация затрагивает пятую позицию изоаллоксазинового кольца. В связи с этим возникает предположение, что под действием видимого света происходит фотохимическая реакция, в результате которой благодаря наличию N-метилимидазольного остатка в молекуле активированного флавина может происходить замыкание между N-метилимидазолом и 5 атомом изоаллоксазинового кольца ФМН, что приводит к образованию стабильной циклической конформации. В таком состоянии активированный флавин не способен связываться с активным центром люциферазы и участвовать в каталитическом процессе. Химическое восстановление активированного флавина с использованием ДТТ или НАДН в качестве доноров протонов, по-видимому, не приводит к столь сильным изменениям структуры молекулы активированного флавина, как при фотохимической реакции. Сродство альдегида к люциферазе при использовании химически восстановленного активированного субстрата, судя по значению  $K_m$ , мало отличается от исходного. В то время как модификация гидро-

ксильных групп остатка рибитила ФМН<sub>2</sub> оказывает сильное влияние на связывание альдегидного субстрата [13]. Можно предположить, что фосфатная группа, в отличие от рибитильного остатка, не влияет на связывание альдегида с люциферазой.

Как считается в настоящее время, связывание ФМН<sub>2</sub> с бактериальной люциферазой происходит как по изоаллоксазиновому кольцу, так и по фосфатной группе [6]. Можно предположить, что сайт связывания фосфатной группы флавина располагается на  $\alpha$ -субъединице гетеродимера люциферазы и представляет собой область, имеющую необычно высокую плотность основных остатков [14]. Считается, что между атомами кислорода фосфатной группы и аминокислотными остатками флаинового сайта возникают либо водородные связи, либо электростатические взаимодействия [14]. Введение N-метилимидазола, вероятно, оказывает двойной эффект на свойства фосфатной группы. Во-первых, происходит закрытие одного из атомов кислорода и замена его заряда на противоположный, что может исключать образование одной из связей, характерных для неактивированной фосфатной группы. Во-вторых, перераспределение электронной плотности увеличивает электроотрицательность свободного кислородного атома фосфата, что может приводить к усилению электростатических взаимодействий активированного субстрата с люциферазой. Нельзя исключить также образование ковалентной связи между активированной фосфатной группой и функциональными группами люциферазы. Эта возможность вполне вероятна, благодаря наличию в каталитическом сайте аминокислотных остатков, являющихся хорошими нуклеофилами.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hastings J.W., Portrikus C.J., Gupta S. et al.* // *Adv. Microb. Physiol.* 1985. **26**. P. 235.
2. *Mitchel G., Hasting J.W.* // *J. Biol. Chem.* 1969. **10**. P. 2572.
3. *Watanabe T., Nakamura T.* // *J. Biochem.* 1972. **3**. P. 647.
4. *Watanabe T., Matsui K., Kasai S., Nakamura T.* // *J. Biochem.* 1978. **4**. P. 1441.
5. *Meighen E.A., Mac-Kenzie R.E.* // *Biochemistry.* 1973. **8**. P. 1482.
6. *Horizman T.F., and Baldwin T.O.* // *Biochem. and Bioph. Res. Commun.* 1980. **4**. P. 1199.
7. *Годовикова Т.С., Зарытова В.Ф., Халимская Л.М.* // *Биоорганическая химия.* 1986. **12**. С. 475.
8. *Бунева В.Н., Годовикова Т.С., Зарытова В.Ф.* // *Биоорганическая химия.* 1986. **12**. С. 906.
9. *Илларионов Б. А., Тюлькова Н. А.* Патент № 2073714. 1997.
10. *Laemmli U.K.* // *Nature.* 1970. **277**. P. 680.
11. *Торчинский Ю.М.* Сера в белках. М., 1977.
12. *Edmonson D.E., Barman B., Tollin G.* // *Biochemistry.* 1972. **7**. P. 1133.
13. *Meighen E.A., MacKenzie R.E.* // *Biochemistry.* 1973. **12**. P. 1482.
14. *Tanner J., Mitchell D., Miller S. et al.* // *Biochemistry.* 1997. **36**. P. 665.

Поступила в редакцию 25.10.02.