

DOI: 10.7868/S0041377118100181

**СТРУКТУРНЫЕ ПЕРЕХОДЫ ЛЮЦИФЕРАЗЫ *PHOTOBACTERIUM LEIOGNATHI*,
ОПРЕДЕЛЕННЫЕ РАЗЛИЧНЫМИ ОПТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ
ПРИ ДЕНАТУРАЦИИ МОЧЕВИНЫ**

© *Д. В. Гульнов, Е. В. Немцева, М. А. Герасимова, В. А. Кратасюк*^{1, 2}

¹ Сибирский федеральный университет, Красноярск, 660041, и

² Институт биофизики СО РАН Федерального исследовательского центра
«Красноярский научный центр СО РАН», Красноярск, 660036;

* электронный адрес: dgulnov@sfu-kras.ru

Целью работы являлось выявление конформационных переходов люциферазы бактерий *Photobacterium leiognathi* в ходе равновесной денатурации мочевины несколькими оптическими методами, включая круговой дихроизм, стационарную и время-разрешенную флуоресценцию. Были проанализированы центр тяжести и отношение интенсивностей I_{325}/I_{390} для спектров флуоресценции, молярная эллиптичность при 222 нм и времена жизни флуоресценции белка. Зависимости оптических параметров от концентрации мочевины выявили два возможных перехода при денатурации люциферазы *P. leiognathi* — с серединами около 0.5—1.1 и 3.5—4.2 М мочевины. При этом изменение значений двух времен жизни, характеризующих флуоресценцию люциферазы, отражает оба перехода, в то время как параметры стационарной флуоресценции (центр тяжести спектра и отношение I_{325}/I_{390}) — только второй из них. Спектры кругового дихроизма люциферазы *P. leiognathi* показали переход с серединой при 4.2 М мочевины. Проведено сравнение характеристик конформационных переходов люциферазы *P. leiognathi* и ранее изученной люциферазы *Vibrio harveyi* (Inlow et al., 2002). Поскольку, по опубликованным данным, для *V. harveyi* середина второго конформационного перехода лежит около 2.5 М мочевины, полученные результаты указывают на более стабильную структуру исследованной в данной работе люциферазы *P. leiognathi*. Наблюдаемые различия во флуоресцентных характеристиках двух высокогомологичных люцифераз при денатурации объясняны разницей в микроокружении триптофановых остатков с порядковыми номерами 131 и 277 на α -субъединице.

Ключевые слова: бактериальная люцифераза, денатурация, промежуточные состояния белка, время жизни флуоресценции белка, круговой дихроизм

Бактериальная люцифераза — это фермент, катализирующий окисление восстановленного флавинмононуклеотида и алифатического альдегида с получением карбоновой кислоты и электронно-возбужденного флавина и обеспечивающий таким образом свечение морских бактерий (Nemtseva, Kudryasheva, 2007; Lee, 2017). Многие детали этого биохимического процесса все еще плохо поняты (Lee, 2017). Это касается структурных особенностей фермента, важных для выполнения функции, деталей химического превращения субстратов, приводящих к образованию электронно-возбужденных состояний. Между тем данная биолюминесцентная реакция применяется как репортерная система для мониторинга окружающей среды, биолюминесцентного имиджинга и тестирования пищевых продуктов (Roda et al., 2004; Esimbekova et al., 2014). Таким образом, понимание последовательности сворачивания (разворачивания) люциферазы имеет фундаментальное значение и важно для ее успешного биотехнологического применения.

Бактериальная люцифераза представляет собой гетеродимер с мол. массой около 80 кДа, не содержащий

металлов или кофакторов. Собственную флуоресценцию люциферазы *Photobacterium leiognathi* определяют 7 аминокислотных остатков триптофана, большинство из которых расположено внутри белковой глобулы (Campbell et al., 2009). Денатурация люциферазы *Vibrio harveyi* была изучена ранее по изменениям спектров стационарной флуоресценции и кругового дихроизма (Clark et al., 1993; Inlow et al., 2002). Ранее было показано, что люциферазы, полученные из бактерий родов *Vibrio* и *Photobacterium*, различаются как по функциональным, так и по структурным свойствам (Deeva et al., 2016). При этом нет данных о разворачивании люцифераз из бактерий рода *Photobacterium*.

Целью настоящей работы было выявление структурных переходов люциферазы *P. leiognathi* при денатурации мочевины. При этом традиционные методы (стационарная флуоресценция и спектроскопия кругового дихроизма) были дополнены методом время-разрешенной флуоресценции, который, как было показано, является многообещающим для обнаружения промежуточных состояний при разворачивании белков (Nemtseva et al.,

2018). Стационарную флуоресценцию белка характеризовали с помощью таких параметров, как центр тяжести спектра и отношение интенсивностей при длинах волн 325 и 390 нм. По спектрам кругового дихроизма определяли изменение молярной эллиптичности при 222 нм. На основе время-разрешенных спадов флуоресценции люциферазы были получены характерные времена жизни на разных стадиях денатурации. Полученные данные позволили сравнить стабильность люциферазы *P. leiognathi* и *V. harveyi*.

Материал и методика

Реактивы. Лиофилизированная рекомбинантная люцифераза *P. leiognathi* приобретена в Институте биофизики СО РАН (Красноярск). Мочевина (Panreac, Испания), соли для буферного раствора Na₂HPO₄ и K₂HPO₄ (AppliChem, Германия) использовали без дополнительной очистки. Все растворы готовили с использованием фосфатного буфера (0.05 М, pH 6.9). Концентрацию мочевины (0.25—6 М) проверяли с помощью лабораторного рефрактометра ИРФ-454 Б2М (Казанский оптико-механический завод). Спектральные характеристики люциферазы (2 · 10⁻⁶ М) измеряли через 18 ч инкубации с мочевиной при комнатной температуре для достижения равновесных условий. Измерения проводили при 25 °C.

Измерение оптических характеристик. Спектры поглощения измеряли с использованием спектрофотометра Cary 5000 (Agilent Technologies, Австралия). Спектры кругового дихроизма регистрировали с помощью спектрополяриметра Jasco-810 (Jasco, Япония) в ячейке с длиной оптического пути 1 мм (диапазон 190—260 нм, шаг 0.2 нм). Спектры стационарной флуоресценции белка в диапазоне длин волн 305—450 нм измеряли с помощью спектрофлуориметра Fluorolog-3 (Horiba Jobin Yvon, Франция) при длине волны возбуждения 296 нм.

Время-разрешенные спады флуоресценции были получены методом счета одиночных фотонов с временной корреляцией с использованием модуля DeltaHub (Horiba Jobin Yvon, Франция). Для возбуждения применяли импульсный светодиод NanoLED N-295 (Horiba Jobin Yvon, Великобритания) с максимумом испускания 296 нм и длительностью импульса ~1.2 нс. Спады флуоресценции регистрировали в диапазоне 320—410 нм с шагом 5 нм.

Параметры стационарной флуоресценции. Спектральный сдвиг флуоресценции белка описывали центром тяжести спектра (GC) и отношением интенсивностей при длинах волн 325 и 390 нм (I_{325}/I_{390}). Параметр GC рассчитывали по формуле

$$GC = \frac{\sum_{\lambda=305}^{450} I_{\lambda} \lambda}{\sum_{\lambda=305}^{450} I_{\lambda}}, \quad (1)$$

где λ — длина волны, I_{λ} — интенсивность флуоресценции на соответствующей длине волны.

Времена жизни флуоресценции. По спадам флуоресценции белка в диапазоне 320—410 нм методом глобального анализа были определены времена жизни флуоресценции. Для этого спады флуоресценции белка при каждой длине волны регистрации $I(t)$ были описаны

суммой трех экспонент с временами жизни τ_i и амплитудами α_i с использованием метода деконволюции:

$$I(t) = S(t) \cdot \sum_{i=1}^N \alpha_i e^{-t/\tau_i}, \quad (2)$$

где $S(t)$ — функция накачки возбуждения, измеренная с помощью высокорассеивающего раствора Ludox (Aldrich, США). Процедуру деконволюции и глобальный анализ спадов флуоресценции проводили с помощью программного обеспечения DAS6 (Horiba, Франция). Качество описания оценивали по статистическому критерию χ^2 и распределению взвешенных остатков.

Результаты

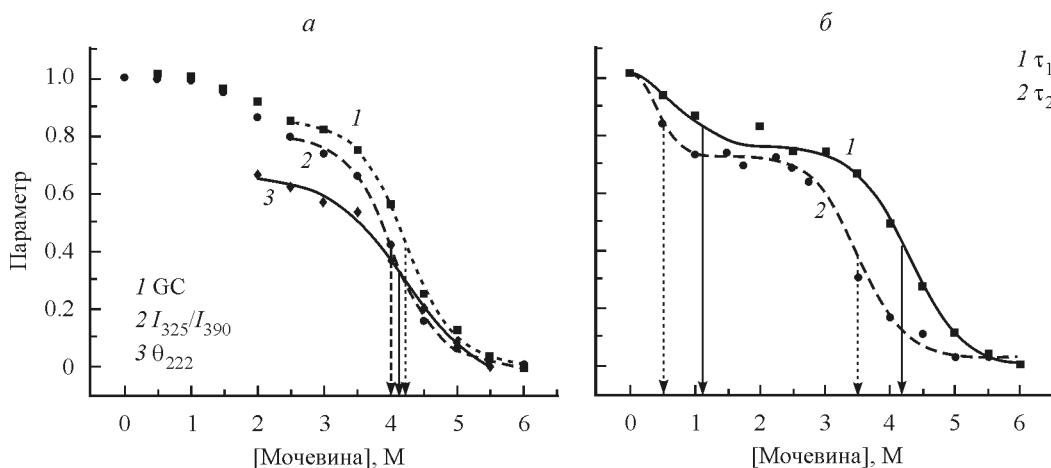
Были проанализированы кривые конформационных переходов люциферазы *P. leiognathi* в ходе денатурации, определяемые по сдвигам стационарных спектров флуоресценции, спектрам кругового дихроизма и временам жизни флуоресценции (см. рисунок). Измерения оптических характеристик проводили после инкубации белка с мочевиной при комнатной температуре в течение не менее 18 ч.

Зависимость параметров стационарной флуоресценции белка (I_{325}/I_{390} и GC) от концентрации мочевины носит сложный характер, особенно в диапазоне 0—2 М. При больших концентрациях выделяется переход с серединой 4.1 ± 0.1 и 4.2 ± 0.1 для I_{325}/I_{390} и GC соответственно. Считается, что сдвиг спектра, лежащий в основе изменения данных характеристик, обусловлен главным образом разрушением третичной структуры белка и чувствительностью триптофановых остатков к полярности микроокружения. Изменение спектров кругового дихроизма при 222 нм, отражающее нарушение вторичной структуры белка, также позволяет построить кривую перехода с серединой при 4.2 ± 0.1 М мочевины (см. рисунок, *a*).

Впервые были проанализированы времена жизни собственной флуоресценции бактериальной люциферазы при денатурации мочевиной (см. рисунок, *b*). Для каждого образца глобальный анализ спадов флуоресценции в диапазоне 320—410 нм выявил три характерных времени жизни. Например, в нативном состоянии флуоресценция люциферазы характеризуется компонентами $\tau_1 = 5.9$, $\tau_2 = 2.0$, $\tau_3 = 0.03$ нс. Поскольку вклад компоненты τ_3 в общую флуоресценцию образца был несущественным ($\leq 10\%$), ее зависимости были исключены из дальнейшего рассмотрения. Показано, что разворачивание белка сходным образом влияет на времена жизни τ_1 и τ_2 (см. рисунок, *b*). Они уменьшаются, демонстрируя два последовательных конформационных перехода в диапазонах концентраций мочевины 0—2.5 и 2.5—6 М. Значения середин переходов для τ_2 (0.5 ± 0.1 и 3.5 ± 0.1 М) оказались сдвинутыми в область меньших концентраций по сравнению с переходами, определяемыми по τ_1 (1.1 ± 0.1 и 4.2 ± 0.1 М).

Обсуждение

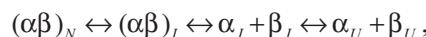
Ранее стадии разворачивания бактериальной люциферазы *V. harveyi* были изучены главным образом по двум информативным параметрам — молярной эллип-



Изменение положения центра тяжести спектра флуоресценции *GC*, отношения I_{325}/I_{390} и молярной эллиптичности при 222 нм (Q_{222}) (а), а также времен жизни флуоресценции τ_1 и τ_2 (б) люциферазы *Photobacterium leiognathi* в зависимости от концентрации мочевины.

Все параметры нормированы на диапазон от 0 до 1, где за 0 принимали минимальное значение величины, а за 1 — максимальное значение величины. Стрелка указывает середину соответствующего перехода. Сплошные линии проведены в результате описания сигмоидными функциями.

тичности при 222 нм и интенсивности флуоресценции при 324 нм (Clark et al., 1993; Inlow et al., 2002). Сначала была предложена трехстадийная модель разворачивания (Clark et al., 1993), но позже она была расширена до четырехстадийного процесса, который можно описать следующей схемой (Inlow et al., 2002):



где $(\alpha\beta)_N$ — нативное состояние белка, $(\alpha\beta)_I$ — неактивный димерный интермедиат, α_I , β_I — неактивные отдельные субъединицы, α_U , β_U — денатурированные субъединицы. Такая схема подразумевает образование на первом этапе, до диссоциации субъединиц, неактивного димерного интермедиата люциферазы.

Экспериментальные зависимости I_{324} от концентрации мочевины и их математическое описание, основанное на четырехстадийной модели, позволили авторам (Inlow et al., 2002) определить для люциферазы *V. harveyi* три перехода с серединами при концентрациях мочевины около 1.8, 2.5 и 5 М. При этом индикатором первого перехода являлось увеличение интенсивности флуоресценции при 324 нм. В нашем случае параметр I_{324} люциферазы *P. leiognathi* не испытывал роста в диапазоне 0—2 М мочевины, и первый переход наиболее ярко проявлялся в изменении времен жизни флуоресценции, демонстрируя середины при 0.5—1.1 М мочевины. Второй переход люциферазы *V. harveyi* с серединой около 2.5 М отражался в том числе на спектрах кругового дихроизма (Clark et al., 1993). Для люциферазы *P. leiognathi* он наблюдался в диапазоне около 4.2 М мочевины (см. рисунок, а) и детектировался практически по всем рассчитанным оптическим параметрам. Таким образом, данные кругового дихроизма в дальней УФ-области показывают, что люцифераза *P. leiognathi* теряет свою вторичную структуру при более высокой концентрации мочевины, чем *V. harveyi*.

Можно предложить несколько причин для наблюдаемого различия флуоресцентных характеристик таких двух высокогомологичных белков, как люциферазы разных видов бактерий. Во-первых, важно учитывать, что люцифераза *P. leiognathi* имеет на один триптофановый

остаток меньше по сравнению с *V. harveyi*. У нее нет α -Trp131, расположенного в одной из восьми спиралей α -субъединицы (Deeva et al., 2014). Это может повлиять на экспериментальные результаты, основанные на измерении собственной флуоресценции белка. Так как α -Trp131 расположен глубоко внутри белковой глобулы, он может заметно влиять на флуоресцентные характеристики белка и быть репортером локальных структурных изменений люциферазы *V. harveyi*. Вторая возможная причина наблюдаемых различий между характеристиками двух обсуждаемых люцифераз — разница в микроокружении α -Trp277. Этот остаток в люциферазе *P. leiognathi* частично экспонирован в растворитель, в то время как в люциферазе *V. harveyi* он контактирует только со связанный водой (Deeva et al., 2014). Это означает, что α -Trp277 в люциферазе *P. leiognathi*, вероятно, обладает очень схожими характеристиками в нативном и денатурированном состояниях белка и не может сигнализировать о структурных переходах. Все это может служить причиной «невидимости» некоторых переходов по стационарной флуоресценции люциферазы *P. leiognathi*, но, с другой стороны, не должно влиять на характер изменения спектров кругового дихроизма.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о более стабильной вторичной структуре люциферазы *P. leiognathi* по сравнению с ферментом из *V. harveyi*. Анализ различных оптических характеристик также показал, что времена жизни флуоресценции люциферазы отражают конформационные переходы, сходные с переходами, определяемыми по параметрам стационарной флуоресценции.

Авторы выражают благодарность К. К. Туроверову (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург) за предоставленную возможность измерить спектры кругового дихроизма.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (проекты 6.7734.2017 и 01201351504).

Список литературы

- Campbell Z. T., Weichsel A., Montfort W. R., Baldwin T. O. 2009. Crystal structure of the bacterial luciferase/flavin complex provides insight into the function of the β subunit. *Biochemistry*. 48 : 6085—6094.
- Clark A. C., Sinclair J. F., Baldwin T. O. 1993. Folding of bacterial luciferase involves a non-native heterodimeric intermediate in equilibrium with the native enzyme and the unfolded subunits. *J. Biol. Chem.* 268 : 10 773—10 779.
- Deeva A. A., Nemtseva E. V., Kratasyuk V. A. 2014. Structural properties of tryptophan microenvironment in bacterial luciferase. *Luminescence. J. Biol. Chem. Luminescence*. 29 (S1) : 72—73.
- Deeva A. A., Temlyakova E. A., Sorokin A. A., Nemtseva E. V., Kratasyuk V. A. 2016. Structural distinctions of fast and slow bacterial luciferases revealed by phylogenetic analysis. *Bioinformatics*. 32 : 3053—3057.
- Esimbekova E., Kratasyuk V., Shimomura O. 2014. Application of enzyme bioluminescence in ecology. *Adv. Biochemistry. Eng. Biotechnol.* 144 : 67—109.
- Inlow J. K., Baldwin T. O. 2002. Mutational analysis of the subunit interface of *Vibrio harveyi* bacterial luciferase. *Biochemistry*. 41 : 3906—3915.
- Lee J. 2017. Perspectives on bioluminescence mechanisms. *Photochem. Photobiol.* 93 : 389—404.
- Nemtseva E. V., Kudryasheva N. S. 2007. The mechanism of electronic excitation in the bacterial bioluminescent reaction. *Russ. Chem. Rev.* 76 : 91—100.
- Nemtseva E. V., Lashchuk O. O., Gerasimova M. A., Melnik T. N., Nagibina G. S., Melnik B. S. 2018. Fluorescence lifetime components reveal kinetic intermediate states upon equilibrium denaturation of carbonic anhydrase II. *Meth. Appl. Fluoresc.* 6 : 015006.
- Roda A., Pasini P., Mirasoli M., Michelini E., Guardigli M. 2004. Biotechnological applications of bioluminescence and chemiluminescence. *Trends Biotechnol.* 22 : 295—303.

Поступила 24 V 2018

STRUCTURAL TRANSITIONS OF *PHOTOBACTERIUM LEIOGNATHI*
LUCIFERASE DETERMINED BY VARIOUS OPTICAL TECHNIQUES
UNDER UREA-INDUCED EQUILIBRIUM DENATURATION

D. V. Gulnov,^{1,*} E. V. Nemtseva,^{1,2} M. A. Gerasimova,¹ V. A. Kratasyuk^{1,2}

¹ Siberian Federal University, Krasnoyarsk, 660041, and

² Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk, 660036;

* e-mail: dgulnov@sfu-kras.ru

The study was aimed to identification of conformational transitions of *Photobacterium leiognathi* luciferase during equilibrium denaturation with urea using several optical techniques, including circular dichroism, stationary and time-resolved fluorescence. Gravity center and intensity ratio I_{325}/I_{390} for the fluorescence spectra, molar ellipticity at 222 nm and fluorescence lifetimes of the protein were analyzed. Investigated parameters revealed two possible transitions for *P. leiognathi* luciferase with the midpoints at 0.5—1.1 and 3.5—4.2 M of urea. Changes in the values of two lifetime components, characterizing the luciferase fluorescence reflect both transitions, while steady-state fluorescence parameters (gravity center of spectrum and I_{325}/I_{390} ratio) reveal only the second one. Far-UV circular dichroism spectra displayed transitions at 4.2 M of urea for *P. leiognathi* luciferase. Conformational transitions characteristics of *P. leiognathi* luciferase and previously studied *Vibrio harveyi* luciferase (Inlow et al., 2002) were compared. Since, according to the published data for *V. harveyi*, midpoint of the second conformational transition is at about 2.5 M of urea, the results indicate more stable secondary structure for the *P. leiognathi* luciferase under study. The possible reasons for observed differences in fluorescent characteristics of two types of luciferases during denaturation can be connected to the microenvironment variation of the tryptophan residues in their tertiary structure, namely in position 131 and 277 in α -subunit.

К e y w o r d s: bacterial luciferase, denaturation, protein intermediate states, protein fluorescence lifetime, circular dichroism