

УДК 577.158.54

## ПОВЫШЕНИЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ ЛЮЦИФЕРАЗЫ СВЕТЛЯКОВ *Luciola mingrelica* САЙТ-НАПРАВЛЕННЫМ МУТАГЕНЕЗОМ НЕКОНСЕРВАТИВНЫХ ОСТАТКОВ ЦИСТЕИНА 62 и 146

Г.Ю. Ломакина, Ю.А. Модестова, Н.Н. Угарова

(кафедра химической энзимологии; e-mail: lomakina@enz.chem.msu.ru)

Методом сайт-направленного мутагенеза получены мутантные формы люциферазы светляков *L. mingrelica* с единичными заменами Cys62Ser и Cys146Ser. Мутации не повлияли на каталитическую активность фермента и спектры флуоресценции. Определены константы скорости быстрой ( $k_1$ ) и медленной ( $k_2$ ) стадии термоинактивации для исходного и мутантных ферментов при 37°C в отсутствие и в присутствии 12 мМ дитиотреитола (ДТТ). Показано увеличение стабильности мутантных форм люциферазы в несколько раз по сравнению с исходным ферментом – в присутствии ДТТ константа  $k_2$  для исходного фермента снижается в три раза, а для мутантных форм константы  $k_1$  и  $k_2$  практически не изменяются. Сделан вывод о том, что остатки Cys62 и Cys146 играют заметную роль в процессе инактивации люциферазы и их замены на Ser приводят к стабилизации фермента.

Люцифераза светляков – фермент, относящийся к подклассу оксигеназ класса оксидоредуктаз, катализирующий окисление D-люциферина (LH<sub>2</sub>) кислородом воздуха в присутствии АТФ и ионов Mg<sup>2+</sup> [1]. Это один из самых высокоспецифичных биокатализаторов и эффективных преобразователей энергии биохимической реакции в световую энергию, что обуславливает широкое биоаналитическое применение этого фермента [2]. Для люцифераз характерно наличие свободных реакционно-способных SH-групп остатков цистеина. Люциферазы из разных источников содержат от 4 до 13 свободных SH-групп, причем чем их больше, тем менее стабильным является фермент [3, 4]. Например, люцифераза светляков *P. pyralis* содержит 4 SH-группы и является более стабильной, чем люцифераза рода *Luciola*, содержащие 7–8 SH-групп. Еще менее стабильны люциферазы из ямайских жуков-щелкунов семейства *Elateridae*, в состав которых входят 13 SH-групп. Люциферазы содержат 3 абсолютно консервативных остатка Cys, которые не входят в состав активного центра, хотя могут заметно влиять на активность. Так, мутант с заменой всех четырех остатков Cys на Ser в молекуле люциферазы *P. pyralis* сохранил лишь 6% активности, а мутанты с единичными заменами теряли 20–60% активности [5, 6]. В то же время единичные замены консервативных остатков Cys82, Cys260, Cys393 на Ala в люциферазе светляков *L. mingrelica* практически не повлияли на каталитические свойства и стабильность фермента [7]. По-видимому, значительные различия в

стабильности люцифераз обусловлены количеством консервативных остатков Cys, особенно тех, SH-группы которых находятся вблизи или на поверхности белковой глобулы и более доступны для окисления. Титрованием SH-групп показано, что вблизи поверхности молекулы люциферазы светляков *P. pyralis* находится один остаток цистеина [8], а в люциферазе *L. mingrelica* – три [9]. Следует отметить, что добавка дитиотреитола (ДТТ) замедляют инактивацию фермента, что свидетельствует об участии SH-групп остатков Cys в этом процессе. Поэтому можно ожидать, что замена остатков Cys на более устойчивые к окислению аминокислотные остатки приведет к повышению стабильности люциферазы.

Цель данной работы состояла в выяснении возможности повышения термостабильности люциферазы светляков *Luciola mingrelica* путем единичных замен остатков Cys цистеина 62 и 146 методом сайт-направленного мутагенеза.

### Материалы и методы

Использовали аденозин-5'-трифосфат (АТФ), дитиотрейтол (ДТТ) (“ICN”, США), D-люциферин, полученный по методу [10], олигонуклеотиды (ЗАО “Синтол”, Россия), рестриктазы NheI (“Fermentas”, Канада), BamHI (“Boehringer Mannheim”, Германия), T4 DNA лигазу, DNA полимеразы Pfu и Pfu Turbo, смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (“СибЭнзим”, Россия). Для культивирования клеток использовали среду LB с ампициллином. Для выделения плазмид из

клеток *E. coli* и элюции фрагментов ДНК из агарозного геля использовали наборы Qiagen.

**Получение мутантных форм люциферазы *L. mingrelica*.** Сайт-направленный мутагенез проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя плазмиду pLR, несущую ген люциферазы светляков *L. mingrelica*, и следующие олигонуклеотиды: 5'-GATATTACATCTCGTTTAGCTGAGGCC ATG-3' (для получения фермента с заменой Cys62Ser) и 5'-CCACGATTCTATGGAAACTTTTATTAAG-3' (для получения фермента с заменой Cys146Ser). Компетентные клетки *E. coli* штамм LE 392 трансформировали соответствующей плазмидой и использовали для работы и очистки препаративных количеств фермента по методу [7]. Высокоочищенный фермент хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$  в рабочем буфере (0,05 М Трис-ацетат, содержащий 2 мМ ЭДТА, 10 мМ  $\text{MgSO}_4$ , pH 7,8). Степень чистоты ферментов определяли с помощью SDS-электрофореза по Лэмбли в 12%-м полиакриламидном геле с использованием ячейки Miniprotean II ("Bio-Rad", США) с последующим окрашиванием Кумасси R-250. Концентрацию белка определяли по оптической плотности раствора при 280 нм (0,75 ед. опт. пл. соответствует раствору, содержащему 1 мг/мл белка люциферазы).

**Определение активности люциферазы.** Активность фермента определяли по величине максимальной интенсивности биолюминесценции при насыщающих концентрациях субстратов (1 мМ АТФ и 0,3 мМ  $\text{LH}_2$ ) на люминометре "FB 12 Femtomaster" ("Zylyx Corp", США) [7]. Константы Михаэлиса для люциферина и АТФ определяли, варьируя концентрации субстратов в пределах 0,04–0,4 мМ АТФ при 1 мМ  $\text{LH}_2$  и 4–40 мкМ  $\text{LH}_2$  при 4 мМ АТФ при концентрации фермента  $5 \cdot 10^{-8}$  М. Расчет констант  $K_m$  проводили с помощью программы Origin 6.0.

**Изучение термоинактивации люциферазы светляков.** Растворы исходной люциферазы и ее мутантных форм (концентрации  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  и  $10^{-6}$  М) в рабочем буфере помещали в микропробирки (по 30 мкл в каждую) и инкубировали при  $37^{\circ}\text{C}$  в присутствии или в отсутствие 12 мМ ДТТ. Через определенные промежутки времени отдельные микропробирки вынимали из термостата и помещали в лед, где хранили вплоть до измерения активности. По экспериментальным данным строили кинетические кривые зависимости активности люциферазы от длительности инкубирования фермента при  $37^{\circ}\text{C}$ , обработка которых позволила найти константы скорости инактивации фермента.

**Спектры собственной флуоресценции люциферазы** регистрировали на спектрофлуориметре "LS 50B" ("Perkin Elmer", Англия) при концентрации фермента  $10^{-6}$  М в рабочем буфере.

### Результаты и их обсуждение

**Получение мутантных люцифераз и изучение их физико-химических свойств.** Молекула люциферазы светляков *L. mingrelica* содержит восемь остатков Cys, из них три являются консервативными (82, 260, 393) и пять – неконсервативными (62, 86, 146, 164, 284) (рис. 1). Анализ пространственной структуры молекулы показал, что остатки Cys62 и Cys146 расположены на поверхности белковой глобулы и имеют гидрофильное микроокружение, поэтому для замены был выбран устойчивый к окислению серин, имеющий гидрофильные свойства и близкий к остатку Cys по размеру. Мутантные плазмиды, кодирующие замены Cys62Ser и Cys146Ser, были получены методом ПЦР на основе плазмиды pLR, несущей ген люциферазы светляков *L. mingrelica*. Были использованы олигонуклеотиды длиной 27–28 пар оснований с заменой одного нуклеотида TGT на TCT. Штамм *E. coli* LE392 был использован для хранения плазмид и экспрессии люциферазы. Исходный фермент и его мутантные формы были очищены хроматографичес-

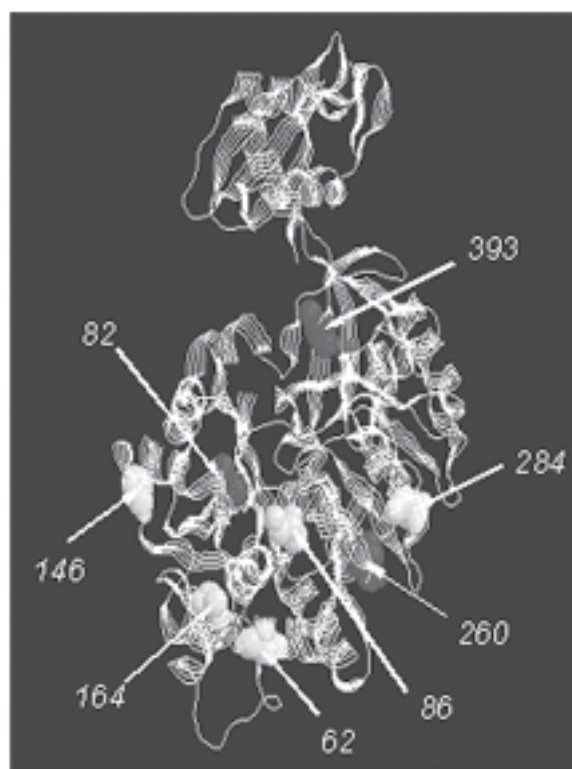


Рис. 1. Пространственная структура люциферазы светляков *Luciola mingrelica*

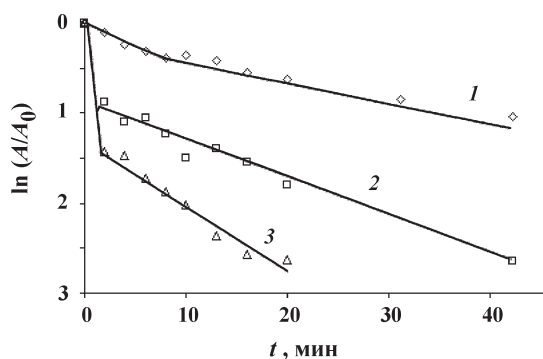


Рис. 2. Кинетические кривые термоинактивации исходной люциферазы светляков *L. mingrelica* при 37°C в отсутствие дитиотреитола. Концентрация фермента, М: 1 –  $10^{-6}$ , 2 –  $10^{-7}$ , 3 –  $10^{-8}$  (другие условия те же, что в табл. 1)

ки. Выход активного фермента во всех случаях составил 45–60 мг в расчете на 1 л питательной среды. Чистота препаратов по данным белкового электрофореза составляла 90–95%. Было показано, что удельная активность мутантного фермента с заменой Cys62Ser равна активности исходного фермента, а активность мутантного фермента с заменой Cys146Ser оказалась в 1,5 раза выше. Константы Михаэлиса по обоим субстратам для исходной и мутантных люцифераз совпали в пределах погрешности:  $K_{m,LH2} = 20 \pm 3$  мкМ и  $K_{m,ATP} = 0,18 \pm 0,04$  мМ. Таким образом, данные мутации не повлияли на сродство фермента к субстратам. Это можно объяснить тем, что остатки Cys62 и Cys146 удалены от активного центра фермента более чем на 30 и не оказывают заметного влияния на его конформацию. Спектры собственной флуоресценции ( $\lambda_{\text{макс}} = 340$  нм) исходной люциферазы и ее мутантных форм также практически не отличались друг от друга. Следовательно, мутации остатков Cys62 и Cys146 не привели к изменению микроокружения остатка Trp419, расположенного вблизи активного центра.

**Инактивация люциферазы светляков при 37°C.** Термоинактивация исходной люциферазы и ее мутантных форм была изучена при 37°C при разных концентрациях фермента ( $10^{-6}$ – $10^{-8}$  М) в присутствии и в отсутствие ДТТ. Кинетические кривые инактивации описываются двумя экспонентами, соответствующими быстрой и медленной стадиям инактивации (рис. 2, 3). Такой вид кинетических кривых и наличие на них точки излома в полулогарифмических координатах характерны для олигомерных ферментов, к которым относится люцифераза светляков [11–13]. Рассчитанные из экспериментальных данных константы

скорости быстрой ( $k_1$ ) и медленной ( $k_2$ ) стадии инактивации исходного фермента (табл. 1) зависят от концентрации фермента – чем выше его концентрация, тем фермент стабильнее. При высокой концентрации фермента ( $10^{-6}$  М) излом на кинетической кривой менее выражен, что объясняется, по-видимому, существованием в этих условиях более стабильных олигомерных форм фермента. При этом константы  $k_1$  и  $k_2$  близки и для исходной и для мутантных форм люциферазы. При снижении концентрации фермента до  $10^{-7}$  М и ниже значения констант  $k_1$  и  $k_2$  увеличиваются как для исходной, так и для мутантных люцифераз. Глубина инактивации фермента на быстрой стадии тем больше, чем ниже его исходная концентрация. Обычно это связывается с диссоциацией олигомерного фермента на субъединицы, имеющие более

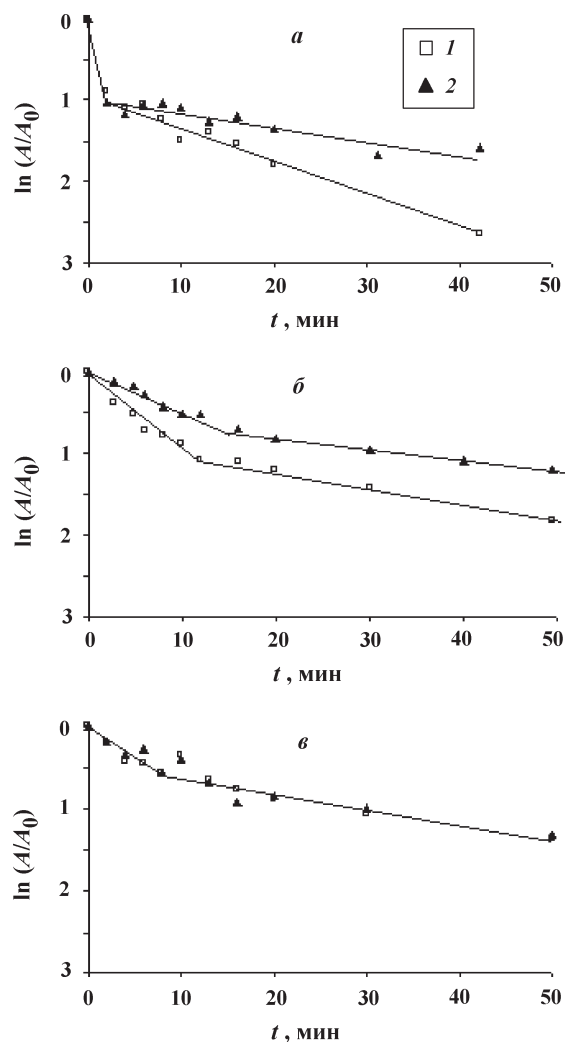


Рис. 3. Кинетические кривые термоинактивации при 37°C исходной люциферазы светляков *L. mingrelica* (а) и ее мутантных форм с заменами Cys62Ser (б) и Cys146Ser (в) в отсутствие (1) и в присутствии 12 мМ дитиотреитола (2). Концентрация фермента  $10^{-7}$  М (другие условия те же, что в табл. 1)

Т а б л и ц а 1

Константы скорости термоинактивации исходной люциферазы светляков *L. mingrelica* и ее мутантных форм при 37°C в отсутствие ДТТ при различных концентрациях фермента (условия: 0,05 М Трис-ацетатный буферный раствор, содержащий 2 мМ ЭДТА, 10 мМ MgSO<sub>4</sub>, pH 7,8)

Концентрация фермента, М	Исходный фермент		Мутантные формы люциферазы с заменами:			
			Cys62Ser		Cys146Ser	
	$k_1$ , мин <sup>-1</sup>	$k_2$ , мин <sup>-1</sup>	$k_1$ , мин <sup>-1</sup>	$k_2$ , мин <sup>-1</sup>	$k_1$ , мин <sup>-1</sup>	$k_2$ , мин <sup>-1</sup>
10 <sup>-6</sup>	0,05±0,01	0,016±0,005	0,06±0,02	0,020±0,006	0,04±0,01	0,012±0,003
10 <sup>-7</sup>	0,34±0,02	0,074±0,003	0,10±0,01	0,016±0,005	0,06±0,01	0,016±0,004
10 <sup>-8</sup>	0,39±0,04	0,070±0,009	0,16±0,03	0,034±0,009	0,07±0,02	0,015±0,003

Т а б л и ц а 2

Константы скорости термоинактивации исходной люциферазы светляков *L. mingrelica* и ее мутантных форм при 37°C в отсутствие и в присутствии 12 мМ дитиотрептола (концентрация фермента 10<sup>-7</sup> М, другие условия те же, что в табл. 1)

Фермент	В отсутствие ДТТ		В присутствии ДТТ	
	$k_1$ , мин <sup>-1</sup>	$k_2$ , мин <sup>-1</sup>	$k_1$ , мин <sup>-1</sup>	$k_2$ , мин <sup>-1</sup>
Исходный	0,34±0,02	0,074±0,003	0,33±0,03	0,023±0,006
Cys 62Ser	0,10±0,01	0,016±0,005	0,04±0,02	0,010±0,005
Cys146Ser	0,06±0,01	0,016±0,004	0,05±0,02	0,015±0,003

низкую ферментативную активность [13]. При этом при низких концентрациях люциферазы константы  $k_1$  и  $k_2$  для мутантных форм оказались в 4–5 раз меньше по сравнению с исходным ферментом, а период полупревращения активного фермента ( $\tau_{1/2}$ ) на медленной стадии инактивации возрос с 9 мин для исходного фермента до 43 мин для мутантных форм фермента. Таким образом, мутации Cys62Ser и Cys146Ser привели к заметному повышению стабильности фермента на обеих стадиях инактивации.

Как известно, ДТТ защищает SH-группы в молекулах ферментов от окисления и тем самым предотвращает инактивацию, обусловленную окислением SH-групп. Чтобы сравнить влияние ДТТ на стабильность исходной и мутантных люцифераз, были получены кинетические кривые инактивации при концентрации фермента 10<sup>-7</sup> М в присутствии и в отсутствие 12 мМ ДТТ (рис. 3). Рассчитанные константы инак-

тивации на быстрой и медленной стадиях представлены в табл. 2. Для исходного фермента в присутствии ДТТ константа инактивации  $k_1$  не изменяется, а константа  $k_2$  снижается в три раза (рис. 3, а и табл. 2). Следовательно, добавки ДТТ стабилизируют исходную люциферазу только на второй стадии инактивации. По-видимому, в отсутствие ДТТ константа  $k_2$  представляет собой сумму констант денатурации и инактивации фермента за счет окисления SH-групп остатков Cys, а в присутствии ДТТ – константу денатурации. Таким образом, окисление SH-групп остатков Cys вносит ощутимый вклад в инактивацию люциферазы на медленной стадии. Для мутантной люциферазы с заменой Cys62Ser присутствие ДТТ привело к снижению константы инактивации  $k_1$  в 2 раза, но почти не изменило константу  $k_2$  (рис. 3, б и табл. 2). Для мутантной люциферазы с заменой Cys146Ser присутствие ДТТ не повлияло на обе константы инак-



вазии,  $k_1$  и  $k_2$  (рис. 3, в и табл. 2). Следовательно, единичные замены остатков Cys на Ser привели к тому, что оба мутантных фермента оказались нечувствительными к присутствию ДТТ. При этом константы  $k_2$  для исходного фермента в присутствии ДТТ стали близки к константам  $k_2$  мутантных форм люциферазы. Таким образом, мутантные ферменты с заменами Cys62Ser и Cys146Ser как в присутствии, так и в отсутствие ДТТ являются более стабильными по сравнению с исходным ферментом. Полученные результаты свидетельствуют об участии остатков Cys62 и Cys146 в окислительной инактивации люциферазы. По-видимому, эти остатки важны для поддержания активной конформации люциферазы, и окисление SH-групп этих остатков приводит к ее нарушению. Замена остатков Cys на Ser привела к стабилизации локальной конформации молекулы, тем самым

обеспечив сохранение ферментативной активности при 37°C. Элиминирование поверхностных остатков Cys, SH-группы которых экспонированы в растворитель, привело к снятию эффекта окислительной инактивации фермента на второй, медленной, стадии. Кроме того, замена слабо гидрофобных остатков Cys62 и Cys146, расположенных в гидрофильном микроокружении, на гидрофильный остаток Ser, по-видимому, способствовала образованию более компактной и стабильной конформации молекулы, которая является более стабильной и на первой стадии инактивации фермента.

Таким образом, остатки цистеина 62 и 146 играют заметную роль в инактивации люциферазы как на первой, так и на второй стадии инактивации фермента, и их замены на серин привели к стабилизации фермента в несколько раз.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. De Luca M. // Adv. Enzymol. 1976. **44**. P. 37.
2. Угарова Н.Н., Бровка Л.Ю., Кутузова Г.Д. // Биохимия. 1993. **58**. С. 1351.
3. Devine T.N., Kutuzova G.D., Green V.A. et al. // Biochim. Biophys. Acta. 1993. **1173**. P. 121.
4. Branchini B.R., Southworth T.L., Murtiashaw M.H. et al. // Biochemistry. 2004. **43**. P. 7255.
5. Ohmiya Y., Tsuji F.I. // FEBS Lett. 1997. **404**. P. 115.
6. Kumita J.R., Jain L., Safroneeva E., Woolley G.A. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000. **267**. P. 394.
7. Дементьева Е.И., Кутузова Г.Д., Железнова Е.Е., Лундовских И.А., Угарова Н.Н. // Биохимия. 1996. **61**. С. 152.
8. Alter S.C., DeLuca M. // Biochemistry. 1986. **25**. P. 1599.
9. Бровка Л.Ю., Угарова Н.Н. // Биохимия. 1980. **45**. С. 794.
10. Талебаровская И.К., Каткова В.А., Рыжова В.В., Щеголев А.А., Березин И.В. // Авт. св. № 1192324. 1983.
11. Бровка Л.Ю., Беляева Е.И., Угарова Н.Н. // Биохимия. 1982. **47**. С. 760.
12. Лундовских И.А., Дементьева Е.И., Угарова Н.Н. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2000. **41**. С. 362.
13. Полторак О. М., Чухрай Е. С., Торшин И. Ю. // Биохимия. 1998. **63**. С. 360.

Поступила в редакцию 23.11.07

## THE THERMOSTABILITY ENHANCEMENT OF FIREFLY LUCIFERASE *Luciola mingrelica* BY SITE-DIRECTED MUTAGENESIS OF NON-CONSERVATIVE RESIDUES Cys62 AND Cys146

G.Yu.Lomakina, Yu.A.Modestova, N.N.Ugarova

(Division of Chemical Enzymology)

**Mutant forms of *L.mingrelica* firefly luciferase with point mutations Cys62Ser and Cys146Ser were prepared by site-directed mutagenesis. Mutations were not influenced the catalytic and spectral properties of the enzyme. Fast ( $k_1$ ) and slow ( $k_2$ ) inactivation rate constants at 37°C for wild type enzyme and its mutants with or without DTT were determined. Several times increase of mutant forms thermostability on both stages of the inactivation was shown. For wild type enzyme three-fold decrease of  $k_2$  value in the presence of DTT was shown while  $k_1$  and  $k_2$  values for mutant forms were not changed. Thus it was concluded the significance of Cys62 and Cys146 residues in the *L.mingrelica* firefly luciferase inactivation process and their replacements to Ser resulted in the enzyme stabilization.**