

УДК 577.152.1

СТАБИЛИЗАЦИЯ ЛЮЦИФЕРАЗЫ СВЕТЛЯКОВ *Luciola mingrelica* МЕТОДАМИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Н.Н. Угарова

(кафедра химической энзимологии; e-mail: nugarova@gmail.com)

Дан краткий обзор результатов по стабилизации люциферазы светляков *Luciola mingrelica* методами генетической инженерии. Методом сайт-специфического мутагенеза Cys62,146,164Ser получены мутантные ферменты с повышенной термостабильностью и меньшей зависимостью от добавок дитиотреитола. Получен двойной мутант G216N, A217L, термостабильность и устойчивость к ДМСО которого были в несколько раз выше, чем WT-люциферазы. Случайный мутагенез участка гена, кодирующего остатки 1-225, и скрининг мутантов позволили получить более термостабильный, чем WT-люцифераза, мутант MТ8 и более устойчивые к диметилсульфоксиду мутанты MТ3, MТ4. Методом направленной эволюции участка гена, кодирующего остатки 130-390, после 4 циклов мутагенеза получен мутант 4TS, содержащий 8 замен, удельная активность которого по сравнению с WT-люциферазой возросла в 2 раза, значение K_m по АТФ уменьшилось в 8 раз, а стабильность при 42°C увеличилась в 65 раз. Обсужден механизм стабилизации данного мутанта.

Ключевые слова: люцифераза светляков, *Luciola mingrelica*, сайт-специфический мутагенез, случайный мутагенез, мутант G216N, A217L, устойчивость к ДМСО, термостабильность.

Стабильность и активность ферментов – основные факторы, определяющие их эффективность использования в биотехнологии. Для стабилизации биокатализаторов применяют два основных подхода: 1) оптимизация микроокружения фермента в растворе или в иммобилизованном состоянии; 2) оптимизация молекулярной структуры фермента. Второй подход осуществляется либо методами химической модификации, либо методами генетической инженерии. В первом случае происходят изменения в основном поверхностных аминокислотных остатков, во втором – возможна замена как поверхностных, так и внутри-белковых аминокислотных остатков. Следовательно, генетическая инженерия открывает широкие пути конструирования новых форм ферментов, обладающих повышенной устойчивостью к таким внешним факторам, как температура, органические растворители и различные химические агенты.

В нашей лаборатории изучается люцифераза светляков *Luciola mingrelica*, стабилизация которой была достигнута как изменением микроокружения фермента с помощью различных добавок в растворы [1, 2], так и методами иммобилизации [3]. В данной работе дается краткий обзор результатов по стабилизации люциферазы светляков *Luciola mingrelica* методами генетической инженерии.

Стабилизация люциферазы методом сайт-специфического мутагенеза остатков цистеина. Люциферазы из различных светляков содержат три абсолютно консервативных и от 1 до 10 неконсервативных остатков Cys, причем чем больше число последних, тем менее стабильным является фермент [4]. Консервативные остатки Cys не входят в состав активного центра, и единичные замены консервативных остатков Cys82,260,393 на Ala в люциферазе светляков *L. mingrelica* не повлияли на каталитические свойства и стабильность фермента [5]. Значительные различия в стабильности люцифераз обусловлены количеством неконсервативных остатков Cys, особенно тех, SH-группы которых находятся вблизи или на поверхности белковой глобулы и более доступны для окисления, следствием которого является изменение конформации белковой глобулы и инактивация фермента. Добавки дитиотреитола (ДТТ) замедляют инактивацию фермента, что свидетельствует об участии SH-групп остатков Cys в процессе инактивации, поэтому можно было ожидать, что замена остатков Cys на более устойчивые к окислению аминокислотные остатки приведет к повышению стабильности люциферазы.

Анализ пространственной структуры люциферазы *L. mingrelica* показал, что остатки Cys62, 146 и 164

расположены на поверхности белковой глобулы и имеют гидрофильное микроокружение. SH-группа остатка Cys146 экспонирована в раствор, а SH-группы остатков Cys62 и Cys164 направлены в глубь молекулы, поэтому для замены был выбран близкий к остатку Cys по размеру и устойчивый к окислению остаток Ser, имеющий гидрофильные свойства [6]. Мутантные плазмиды, кодирующие замены Cys62Ser, Cys146Ser и Cys164Ser, получены методом ПЦР на основе плазмиды pLR, несущей ген люциферазы светляков *L. mingrelica*. Удельная активность мутантных ферментов с заменами Cys62Ser и Cys164Ser близка к активности исходного фермента, а активность мутантного фермента с заменой Cys146Ser возросла в 1,5 раза. Мутации не повлияли на сродство фермента к субстратам. Это можно объяснить тем, что данные остатки Cys удалены от активного центра фермента на ~30Å и не оказывают заметного влияния на его конформацию [6, 7].

Термоинактивация исходной люциферазы (WT) и ее мутантных форм изучена при 37°C при разных концентрациях фермента (10^{-8} – 10^{-6} М) в присутствии и в отсутствие ДТТ. Кинетические кривые инактивации (рис. 1) описываются двумя экспонентами, соответствующими быстрой и медленной стадиями инактивации. Константы скорости быстрой (k_1) и медленной (k_2) стадии инактивации WT-люциферазы зависят от концентрации фермента – чем выше его концентрация, тем фермент стабильнее. При концентрации фермента 10^{-6} М константы k_1 и k_2 близки для WT и мутантных форм люциферазы. При концентрации 10^{-8} М константы k_1 и k_2 для мутантных форм оказались в 4–5 раз ниже по сравнению с WT-люциферазой, а на медленной стадии период полуинактивации ($\tau_{1/2}$) возрос с 9 мин для WT-люциферазы до 43 мин для мутантных форм фермента. Таким образом, му-

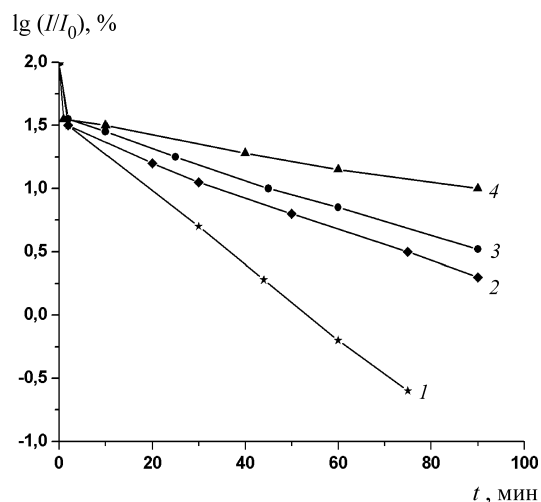


Рис. 1. Кинетические кривые термоинактивации WT-люциферазы *Luciola mingrelica* (1) и ее мутантов с заменами Cys62 (2), 146 (3), 164 (4) на Ser при 37°C. Условия инактивации: 0,05 М Трис-ацетат, 2 мМ ЭДТА, 10 мМ MgSO₄, pH 7,8, 10^{-8} М люцифераза

тации привели к заметному повышению стабильности фермента на обеих стадиях инактивации, но наиболее сильно эффекты стабилизации проявлялись при низких концентрациях фермента.

Кроме того, значительно уменьшилось влияние ДТТ на стабильность мутантных форм по сравнению с WT-люциферазой. Константы инактивации фермента (при концентрации 10^{-7} М) в присутствии и в отсутствие 12 мМ ДТТ (табл. 1) показывают, что добавки ДТТ стабилизируют WT-люциферазу на второй стадии инактивации. По-видимому, константа k_2 является суммой констант инактивации фермента за счет окисления SH-групп и денатурации, а в присутствии ДТТ представляет собой константу денатурации. Для мутантной люциферазы с заменой Cys62Ser присутствие ДТТ привело к снижению константы

Т а б л и ц а 1

Константы скорости термоинактивации WT-люциферазы светляков *L. mingrelica* и ее мутантных форм при 37°C в отсутствие и в присутствии 12 мМ дитиотреитола (условия: 0,05 М Трис-ацетат, 2 мМ ЭДТА, 10 мМ MgSO₄, pH 7, 8, 10^{-7} М люцифераза)

Фермент	В отсутствие ДТТ		В присутствии ДТТ	
	k_1 , мин ⁻¹	k_2 , мин ⁻¹	k_1 , мин ⁻¹	k_2 , мин ⁻¹
WT-люцифераза	0,34±0,02	0,074±0,003	0,33±0,03	0,023±0,006
Мутант Cys62Ser	0,10±0,01	0,016±0,005	0,04±0,02	0,010±0,005
Мутант Cys146Ser	0,06±0,01	0,016±0,004	0,05±0,02	0,015±0,003

инактивации k_1 в 2 раза, но почти не изменило константу k_2 . Для мутантной люциферазы с заменой Cys146Ser присутствие ДТТ не повлияло на обе константы инактивации, k_1 и k_2 . Следовательно, единичные замены остатков Cys на Ser привели к тому, что мутантные ферменты стали менее чувствительными к присутствию ДТТ. Таким образом, мутантные ферменты с заменами Cys62Ser и Cys146Ser как в присутствии, так и в отсутствие ДТТ являются более стабильными по сравнению с WT-люциферазой [6].

Стабилизация двойного мутанта люциферазы *L. mingrelica* с заменами G216N, A217L [8]. По данным литературы [9], замена остатка T217 на L, I, V увеличивает термостабильность люциферазы светляков *L. cruciata* в 7–8 раз при 50°C. Аналогичная замена A217L в люциферазах *L. lateralis* и *P. pyralis* также приводит к значительному повышению термостабильности без уменьшения каталитической активности [10, 11]. Однако удельная активность люциферазы светляков *H. parvula* (98% гомологии с люциферазой *L. mingrelica*) при замене A217L падает до 0,074% от исходной, несмотря на повышение термостабильности в 5 раз [12]. Окружение остатка A217 в люциферазах *L. mingrelica* и *H. parvula* идентично, поэтому и для люциферазы *L. mingrelica* единичная замена A217L привела бы к потере активности. Эти люциферазы в положении 216 имеют остаток Gly, в то время как люциферазы *L. cruciata* и *L. lateralis* – остаток Asp. Это может быть причиной различия в эффектах мутаций. Поэтому методом сайт-специфического мутагенеза был получен двойной мутант люциферазы *L. mingrelica* с заменами G216N, A217L, в котором окружение остатка 217 ближе к таковому в люциферазах *L. cruciata* и *L. lateralis*. Активность двойного мутанта люциферазы *L. mingrelica* понизилась до 15%. Таким образом, дополнительная замена G216N оказалась недостаточной для предотвращения падения активности при замене A217L, однако снижение активности было не столь значительно, как при мутации A217L в люциферазе *H. parvula*. Сравнение кинетики необратимой термоинактивации мутантной и WT-люцифераз при 42°C показало, что двойная замена G216N, A217L привела к заметной стабилизации люциферазы. Термоинактивация мутанта происходила в две стадии: на первой – активность мутанта снижалась на 40% со скоростью, близкой к наблюдаемой для WT-люциферазы, а на второй – константа инактивации ($k_{ин}$) мутанта была в 7,3 раза ниже. Замена G216N, A217L также привела к увеличению устойчивости люцифера-

зы к диметилсульфоксиду (ДМСО): в присутствии 30% ДМСО WT-люцифераза сохраняла ~4% активности, а мутантная – ~9,5%. Таким образом, двойная мутация G216N, A217L привела к более стабильной и активной люциферазе по сравнению с единичной мутацией A217L, описанной в литературе.

Случайный мутагенез участка гена люциферазы, кодирующего 1-225 остатки фермента, и скрининг мутантов [13]. В результате случайного мутагенеза плазмиды pLR3 по методу ПЦР пониженной точности (*error-prone PCR*) [14] была получена библиотека мутантных клонов люциферазы светляков *L. mingrelica* с мутациями на участке с 1 по 225 остатков люциферазы. Был проведен скрининг ~6000 колоний по цвету и яркости биолюминесценции *in vivo* в клетках *E. coli*. Регистрацию биолюминесценции колоний осуществляли фотографически. В ходе скрининга было отобрано около 50 колоний мутантов, которые отличались по цвету биолюминесценции от WT-люциферазы и при этом сохраняли высокую яркость свечения. Пять мутантов были отобраны и подробно изучены: три мутанта с почти pH-нечувствительным спектром биолюминесценции (MT3, MT4, MT6); мутант с промежуточной pH-чувствительностью (MT2); мутант MT8, более термостабильный, чем WT-люцифераза, для которого константа инактивации при 42°C снизилась в два раза по сравнению с WT-люциферазой. Повышение термостабильности мутанта S118C вызвано, вероятно, улучшением внутренней гидрофобной упаковки белка в результате замены гидрофильного остатка на более гидрофобный.

Получение мутантов с повышенной устойчивостью к ДМСО [8]. На основе подходов, описанных в литературе [15], была разработана и оптимизирована методика скрининга библиотек мутантных клонов люциферазы по устойчивости к ДМСО, которая позволила эффективно проводить скрининг ~2000 колоний на чашке Петри (90 мм). Отобранные колонии выращивали на чашке Петри и сравнивали яркость биолюминесценции *in vivo* мутантных форм и WT-люциферазы. Для мутантов, колонии которых сохраняли заметную яркость, получали лизат клеток и определяли активность люциферазы при 30% ДМСО. При отборе мутантов учитывали два фактора: 1) яркость свечения колоний как характеристику активности; 2) остаточную активность люциферазы в лизате в присутствии 30% ДМСО как меру устойчивости мутанта к ДМСО. Скрининг по устойчивости к ДМСО ~8000 колоний мутантов, полученных случайным му-

тагенезом 1–225 остатков фермента, позволил идентифицировать 17 мутантов, более устойчивых к ДМСО. По устойчивости и активности для дальнейшего изучения были выбраны 3 мутанта (МТ3, МТ4, МТ8), свойства которых показаны в табл. 2.

Яркость их колоний была выше, а остаточная активность при 30% ДМСО в 2 раза выше по сравнению с WT-люциферазой. Таким образом, более устойчивыми к ДМСО оказались мутанты с более «жесткой» конформацией активного центра (МТ3, МТ4) [13], которая обеспечивала рН-нечувствительность спектров биолюминесценции этих мутантов, а также более термостабильный мутант МТ8.

Повышение термостабильности люциферазы методом направленной эволюции [16]. Одним из наиболее эффективных способов повышения термостабильности ферментов является метод направленной эволюции, если возможен достаточно простой скрининг больших библиотек мутантов по требуемому свойству. Особенности биолюминесцентной системы люциферазы светляков позволили проводить эффективный отбор термостабильных мутантов с помощью простой и быстрой методики. Клетки *E. coli* могут сохранять жизнеспособность после инкубации при температурах до 55°C в течение 1–2 ч. Люцифераза светляков довольно быстро теряет активность уже при 37°C, поэтому инкубация клеток при повышенных температурах приводит к инактивации в них недостаточно стабильных форм люциферазы без гибели клеточных колоний. Таким образом, инкубация колоний мутантов при 37–55°C с последующим скринингом по интенсивности биолюминесценции *in vivo* позволила проводить простой и быстрый нелетальный скрининг библиотек мутантов *in vivo* по термостабильности

без необходимости получения реплик библиотеки колоний. Термостабильный мутант МТ8 (S118C) в плазмиде pLR3 был использован в качестве исходной формы при случайном мутагенезе участка гена люциферазы, кодирующего 130–390 остатков фермента. В табл. 3 приведены основные результаты каждого цикла. Наиболее стабильный мутант, полученный в каждом цикле (мутанты 1ТМ1, 2ТМ1 и 3ТМ1 соответственно), использовали в качестве исходной формы в следующем цикле.

Мутант 4ТS помимо замены S118C содержит 7 новых замен: после первого цикла мутагенеза появились замены T213S, S364C; после второго – K156R, A217V; после третьего – C146S, E356K; после четвертого – R211L. Каталитические свойства мутанта 4ТS значительно улучшились по сравнению с WT-люциферазой: удельная активность мутанта 4ТS возросла в 2 раза, значение константы Михаэлиса (K_m) по АТФ* уменьшилось в восемь раз. Стабильность мутанта при 42°C возросла в 65 раз. При 37°C мутант 4ТS через двое суток сохранял 70% активности (рис. 2).

На основании данных о порядке добавления полученных замен и расположения остатков в структуре фермента можно заключить, что за увеличение термостабильности ответственны преимущественно четыре замены: S364C, A217V, E356K и R211L. Выше было показано, что мутация A217L увеличивает термостабильность люциферазы *L. mingrelica*. Известно также, что мутации A217V [9] и E356K [17] значительно увеличивают термостабильность люцифераз светляков. Увеличение термостабильности в случае замен S364C, S364A и R211L происходит, по-видимому, за счет замены погруженной в белковую глобулу полярной группы на гидрофоб-

Таблица 2

Свойства мутантов люциферазы *L. mingrelica* с повышенной устойчивостью к ДМСО [8]

Мутант	Мутации	Яркость колоний	$A_{уд}$, %	Остаточная активность при 30% ДМСО
WT	–	+++	100	4,4 %
МТ3	Y35N	++++	70	9,3 %
МТ4	Y35H, K191R	++++	60	9,3 %
МТ8	S118C	++++	130	9,8 %

*Аденозин-5'-трифосфат.

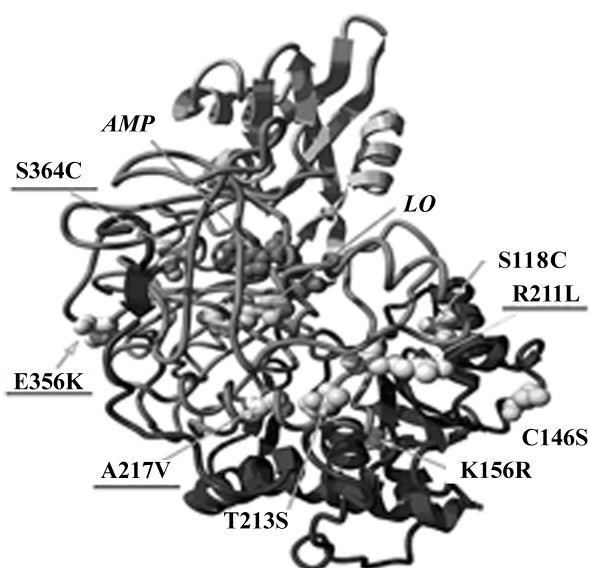


Рис. 2. Расположение аминокислотных замен в структуре мутанта 4TS (наиболее существенные мутации подчеркнуты; LO и AMP – люциферильная и аденилатная группы субстратов)

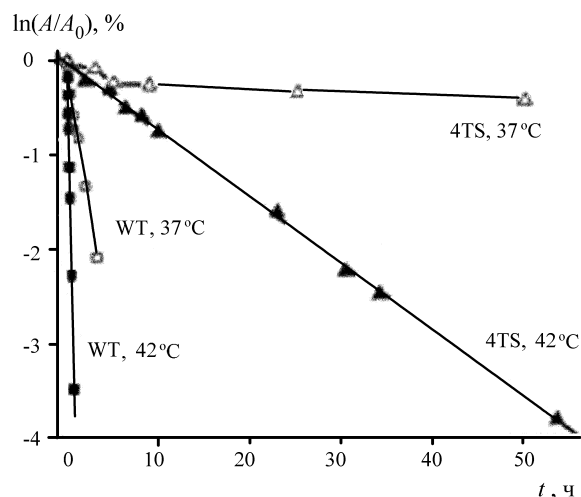


Рис. 3. Кинетические кривые термоинактивации WT-люциферазы *Luciola mingrelica* и термостабильного мутанта 4TS при 37 и 42°C (условия инактивации: 0,05 М Трис-ацетат, 2 мМ ЭДТА, 20 мМ MgSO₄, 0,2 мг/мл БСА, pH 7,8, 0,01 мг/мл люцифераза)

Таблица 3

Результаты по направленной эволюции 130-390 остатков люциферазы и отбор термостабильных мутантов [16]

Номер цикла	Число колоний	Доля активных клонов, %	Температура инкубации при скрининге, °С	Обозначения мутантов	Введенные мутации
1	800	54	37	1TM1	S118C, T213S, S364C
				1TM2	S118C, S364A
				1TM3	S118C, S364A
2	900	52	50	2TM1	S118C, T213S, S364C, K156R, A217V
				2TM2	S118C, T213S, S364C, E356V
3	600	65	50	3TM1	S118C, T213S, S364C, K156R, A217V, C146S, E356K
				3TM2	S118C, T213S, S364C, K156R, A217V, C146S, E356K
				3TM3	S118C, T213S, S364C, K156R, A217V, E356V
4	1400	65	55	4TS	S118C, T213S, S364C, K156R, A217V, C146S, E356K, R211L

ную. Выше было отмечено, что замена поверхностной группы C146S заметно уменьшает окислительную инактивацию люциферазы [6]. Поэтому замена C146S также может давать вклад в стабилизацию мутанта 4TS, в частности объясняет высокую стабильность его растворов при хранении в отсутствие дитиотреи-

тола. При мутациях K156R и T213S происходит замена остатка на близкий по свойствам, и, по-видимому, эти мутации не дают значимого вклада в повышение стабильности люциферазы. На рис. 3 показано расположение замен в пространственной структуре мутанта 4TS люциферазы. Четыре ключевые мутации на-

ходятся во втором субдомене фермента, который, согласно литературным данным [18], значительно лабильнее двух других субдоменов, что является основной причиной недостаточной стабильности люциферазы светляков в целом.

В случае близкой по гомологии и термостабильности люциферазы *H. parvula* замена E356R/V368A увеличивала стабильность в этих же условиях только в 12 раз [12].

Таким образом, мутант 4TS по термостабильности и каталитическим характеристикам значительно превосходит как фермент дикого типа, так и другие известные мутантные формы люциферазы *L. mingrelica*. Активность и стабильность мутанта 4TS люциферазы светляков *L. mingrelica* достаточна для большинства практических целей, например для применения в качестве реагентов для определения АТФ и генов-маркеров экспрессии *in vivo*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дементьева Е.И., Кутузова Г.Д., Угарова Н.Н. // Вестн. Моск. ун-та. Сер.2. Химия. 1989. **30**. С. 601.
2. Мороз Н.А., Гурский Д.Я., Угарова Н.Н. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2008. **49**. С. 86.
3. Ugarova N.N., Brovko L.Yu., Kost N.V. // Enzyme Microb. Technol. 1982. **4**. P. 224.
4. Devine T.N., Kutuzova G.D., Green V.A. et al. // Biochim. Biophys. Acta. 1993. **1173**. P.121.
5. Дементьева Е.И., Железнова Е.Е., Кутузова Г.Д., Лундовских И.А., Угарова Н.Н. // Биохимия. 1996. **61**. С. 152.
6. Ломакина Г.Ю., Модестова Ю.А., Угарова Н.Н. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2008. **49**. С. 81.
7. Modestova Yu..A., Lomakina G.Yu., Ugarova N.N. // Abstracts Intern.Conference "Biocatalysis-2009". 2009. P. 78.
8. Кокиаров М.И. // Дис. ... канд. хим. наук. М., 2009.
9. Kajiyama N., Nakano E. // Biochemistry. 1993. **32**. P. 13795.
10. Kajiyama N., Nakano E. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 1994. **58**. P. 1170.
11. Price R., Squirrell D., Murphy M., White P. // Proceedings of the 9th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence / Eds. J.W. Hastings L.J.K., P.E. Stanley. Chichester, 1996. P. 200.
12. Kitayama A., Yoshizaki H., Ohmiya Y., Ueda H., Nagamune T. // Photochem. Photobiol. 2003. **77**. P. 333.
13. Кокиаров М.И., Угарова Н.Н. // Биохимия. 2008. **73**. С. 1071.
14. Cirino P.C., Mayer K.M., Umeno D. // Methods Mol. Biol. 2003. **231**. P. 3.
15. Song J.K., Rhee J.S. // Biochim. Biophys. Acta. 2001. **1547**. P. 370.
16. Кокиаров М.И., Угарова Н.Н. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2009. **50**. С. 23.
17. White P., Squirrell D., Arnaud P., Lowe C.R., Murray J.A. // Biochem J. 1996. **319**. P. 343.
18. Frydman J., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Hartl F.U. // Nat. Struct. Mol. Biol. 1999. **6**. P. 697.

Поступила в редакцию 20.01.10

STABILIZATION OF FIREFLY LUCIFERASE *Luciola mingrelica* BY GENETIC ENGINEERING METHODS

N. N. Ugarova

(Division of Chemical Enzymology)

The results of firefly luciferase *Luciola mingrelica* stabilization using genetic engineering methods are reviewed. Mutants Cys62,146,164Ser were obtained by site-specific mutagenesis, which posses higher thermostability and lower dependence on dithiothreitol additives, than WT-luciferase. Dual mutant G216N, A217L demonstrates increased thermostability and higher resistance to dimethylsulfoxide (DMSO) than WT-luciferase. Random mutagenesis of the luciferase 1–225 residues and screening of mutants allowed us to get thermostable mutant MT8 and DMSO-resistant mutants, MT3, MT4. Mutant 4TS was obtained by the method of directed evolution (four cycles of random mutagenesis) of 130–390 residues of luciferase, which contains 8 mutations. Its specific activity is two times and stability 65 times higher, than that of WT-luciferase, whereas the K_m to ATP is eight times lower. The mechanism of mutant 4TS stabilization is discussed.

Key words: firefly luciferase, *Luciola mingrelica*, site-specific mutagenesis, random mutagenesis, mutant G216N, A217L, resistance to DMSO, thermostability.

Сведения об авторе: Угарова Наталья Николаевна – глав. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, докт. хим. наук (nugarova@gmail.com).