

УДК 577.158.54

## КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И СПЕКТРЫ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ РЕКОМБИНАНТНОЙ ЛЮЦИФЕРАЗЫ СВЕТЛЯКОВ *LUCIOLA MINGRELICA* С ТОЧЕЧНЫМИ МУТАЦИЯМИ ВНЕ АКТИВНОГО ЦЕНТРА

Л.Г. Малошенко, И.В. Упоров, Н.Н. Угарова

(Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии; e-mail: mlg@enz.chem.msu.ru)

Методом сайт-направленного мутагенеза получены мутантные формы рекомбинантной люциферазы светляков *Luciola mingrelica* с точечными заменами His433Asn и His433Ser. Исследованы физико-химические свойства исходной рекомбинантной люциферазы светляков и ее мутантов. Показано, что для люциферазы светляков *Luciola mingrelica* и ее мутантных форм величины  $K_{m,LH_2}$  совпали. Замена His433Asn привела к увеличению  $K_{m,ATP}$  на 20% и снижению удельной активности на 20%, а замена His433Ser привела к увеличению  $K_{m,ATP}$  на 50% и снизила удельную активность в 200 раз. Предложена модель влияния замен остатка His433 на активный центр люциферазы светляков *Luciola mingrelica*.

Анализ литературных данных по мутагенезу люцифераз светляков [1] показал, что мутации в активном центре фермента приводят не только к изменениям в спектрах биолюминесценции, но и значительно снижают каталитическую активность люциферазы. В то же

время природные мутанты люцифераз, различающиеся по спектрам биолюминесценции, сохраняют высокую каталитическую активность. Это может быть следствием того, что данные мутации не затрагивают активного центра, но влияют на физико-химические свойства

микроокружения эмиттера [1]. Мутация His433Tyr в люциферазах светляков *Luciola cruciata* и *Hotaria parvula* привела к сдвигу максимума биолюминесценции от 570 до 610 нм [2, 3]. Это означает, что консервативный остаток His433, расположенный в люциферазе вне активного центра, играет важную роль в функционировании фермента. Целью данной работы было получение мутантов His433Asn и His433Ser для люциферазы светляков *Luciola mingrellica*, имеющую высокую гомологию с люциферазами, указанными выше, а также изучение каталитических свойств мутантных форм фермента, их спектров биолюминесценции и выявление изменений в белке с мутациями остатка His433.

### Материалы и методы

Использовали рестриктазы (NheI, KpnI, AatII), T4DNA-лигазу и Pwo DNA-полимеразу (“New England Biolabs”, USA). Рекombинантную люциферазу светляков *L. mingrellica* и ее мутантные формы выделяли из клеток *E. coli* (штамм LE 392), несущих плазмиду-суперпродукцент pLR с геном люциферазы, либо плазмиды mpLR с заменами His433Asn и His433Ser, а затем очищали по методике [4]. Люциферин был синтезирован в лаборатории органического синтеза кафедры химической энзимологии по методу [5]. Другие химические вещества имели степень чистоты “ос.ч.” Растворы готовили на дистиллированной деионизованной воде, полученной на установке “Milli-Q” (“Millipore”, Франция).

**Получение мутантных форм люциферазы светляков *L. mingrellica*.** Сайт-направленный мутагенез проводили, используя метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) на амплификаторе “Techne PHC-2”. Для мутагенеза использовали плазмиду pLR (6270 пар оснований), содержащую ген люциферазы светляков *L. mingrellica*, выделенную из клеток *E. coli* (штамм LE 392) с помощью набора реактивов фирмы “Qiagen”. Синтезированные на первом этапе два фрагмента ДНК с перекрывающимися концами далее использовали в реакции сшивки. Продукт сшивки амплифицировали с помощью ПЦР. Для получения липких концов амплифицированный фрагмент, содержащий мутантный ген люциферазы светляков, и плазмиду pLR обрабатывали рестриктазами. Немутантный ген люциферазы вырезали из фрагмента ДНК, полученного из плазмиды pLR на предыдущей стадии. Оба фрагмента ДНК очищали и лигировали для получения плазмидного вектора, содержащего мутантный ген люциферазы. Компетентные клетки *E. coli* трансформировали мутантными плазмидами, выращивали на чашках со средой LB с ампициллином, обрабатывали раствором люциферина (рН 5,0) и визуально определяли интенсивность биолюминесценции. Для мутантов His433Asn и His433Ser были получены 30 и 7 светящихся колоний соответственно. Для каждого мутанта отбирали по две наиболее яркие колонии, которые далее помещали в 5 мл среды LB и

выращивали при 28° в течение 20 ч до  $A_{590} = 2,0$ . Отбирали по 0,8 мл суспензии выросшей культуры, добавляли по 0,2 мл глицерина и помещали на хранение при температуре –70°. Мутантные плазмиды выделяли из клеток *E. coli* и сиквенировали. Сиквенс генов в плазмиде показал наличие соответствующих замен для мутаций His433Asn и His433Ser. Мутантные белки выращивали в среде LB с ампициллином, выделяли и очищали до гомогенного состояния, как описано в работе [4]. Степень чистоты мутантных белков составила более 97%.

**Определение концентрации белка.** Концентрацию белка определяли по поглощению раствора при 280 нм (1 мг на 1 мл белка соответствует 0,75 ед. опт. плотности) на спектрофотометре “Shimadzu UV 1202”.

**Регистрация активности.** Активность люциферазы измеряли по величине максимальной интенсивности света, излучаемого в процессе ферментативной реакции при насыщающих концентрациях субстратов (1,2 мМ АТФ, 0,3 мМ люциферин (LH2)). В кювету помещали 0,4 мл 0,05 М Трис-ацетатного буфера (2 мМ ЭДТА, 10 мМ MgSO<sub>4</sub>, рН 7,8), 0,3 мл раствора АТФ и 10 мкл люциферазы. Быстро вводили 0,3 мл люциферина и регистрировали на люминометре “LKB-Wallac 1250” (Швеция) максимальную интенсивность биолюминесценции ( $I_{\text{макс}}$ ), пропорциональную скорости ферментативной реакции. Активность люциферазы выражали в условных единицах: 1 усл.ед. = 1 мВ =  $1 \cdot 10^9$  квант/с.

**Измерение кинетических параметров реакции, катализируемой рекомбинантной люциферазой светляков и ее мутантными формами.** Снимали зависимости  $I_{\text{макс}}$  от концентрации люциферина ( $5 \cdot 10^{-7}$ – $5 \cdot 10^{-4}$  М) при постоянной концентрации АТФ (1,2 мМ) и  $I_{\text{макс}}$  от концентрации АТФ ( $1 \cdot 10^{-6}$ – $5 \cdot 10^{-3}$  М) при постоянной концентрации люциферина (0,3 мМ). Значение  $K_m$  для люциферина и АТФ определяли с помощью программы Origin 6.0 по методу нелинейной регрессии с использованием уравнения Михаэлиса–Ментен.

**Регистрация спектров биолюминесценции.** В кювету флуориметра помещали 2 мл 0,05 М Трис-ацетатного буфера (2 мМ ЭДТА, 10 мМ MgSO<sub>4</sub>, рН 5,6–8,5), содержащего 1 мМ АТФ и 0,25 мМ люциферина, добавляли 0,1 мл концентрированного раствора фермента и регистрировали спектр биолюминесценции на спектрофлуориметре LS 50B (“Perkin Elmer”, Англия) в интервале 500–650 нм. Спектр исправляли на чувствительность ФЭУ с помощью специальной программы.

### Результаты и их обсуждение

Полученные данные о каталитических свойствах и максимумах спектров биолюминесценции рекомбинантной люциферазы светляков и мутантов His433Asn, His433Ser приведены в таблице. Данные таблицы показывают, что мутации привели к изменению удельной активности люциферазы: при замене His433Asn она

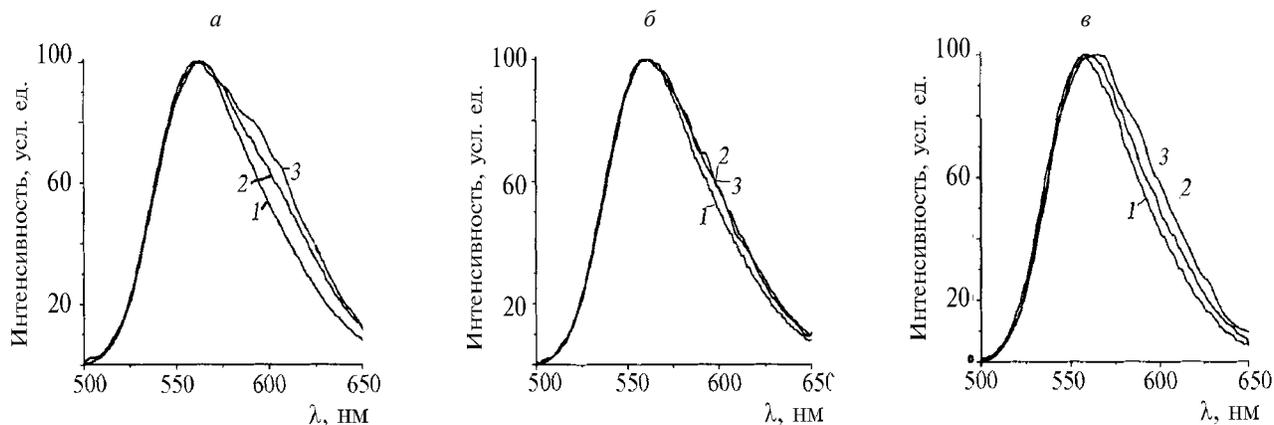


Рис. 1. Спектры биолюминесценции люциферазы светляков *L. mingrelica* и ее мутантных форм при разных значениях pH: а – 6,9; б – 7,8; в – 8,5 (1 – His433, 2 – His433Asn, 3 – His433Ser)

снизилась на 20%, при замене His433Ser в 200 раз. Полагая, что удельная активность отражает каталитическую активность фермента, можно заключить, что мутация His433Ser привела к сильному снижению каталитической активности фермента. Это интересный факт влияния отдаленной мутации на каталитические свойства фермента. Константы Михаэлиса, рассчитанные из зависимости  $I_{\text{макс}}$  от концентрации одного субстрата при постоянной насыщающей концентрации другого субстрата, представляют собой сложные комбинации констант скоростей различных стадий процесса окисления люциферина [4]. Для исходной люциферазы светляков *L. mingrelica* и мутантов His433Asn, His433Ser величина констант Михаэлиса по люциферину ( $K_{m,LH2}$ ) совпали. Величина  $K_{m,ATP}$  увеличилась на 20% для мутанта His433Asn и на 50% для мутанта His433Ser. Следовательно, мутации повлияли на сродство фермента к ATP.

Для нативной люциферазы и двух мутантных форм (таблица, рис. 1) максимумы биолюминесценции совпадают и равны 562–564 нм. При pH 7,8 (pH-оптимум активности люциферазы) формы спектров биолюминесценции для всех трех белков близки. Для мутантов полуширина спектров увеличилась лишь на 8%. Более

сильные различия в полуширине спектров наблюдаются вне pH-оптимума. При замене His433Asn полуширина спектра увеличивается на 10%, а при замене His433Ser – на 20%. Интересно, что для всех белков коротковолновая часть спектра совпадает, и уширение наблюдается в длинноволновой области. Уширение спектров может свидетельствовать о большей подвижности групп в микроокружении эмиттера, что может являться следствием определенных изменений в структуре фермента.

Чтобы выявить возможные структурные изменения в мутантных формах люциферазы, нами было проведено компьютерное моделирование изменения пространственной структуры люциферазы при заменах остатка His433Asn и His433Ser. Для этих целей использовали программный комплекс *InsightII* (Accelrys Inc., San Diego, CA, USA). В качестве исходной была выбрана структура люциферазы, предложенная в работе [6]. Замена остатка His433Asn и His433Ser были произведены с помощью стандартных функций, реализованных в *InsightII*. Затем структуры люциферазы, как нативная, так и мутированные, подверглись энергетической минимизации. Минимизацию, состоящую из 500 шагов, проводили с привлечением силового поля AMBER [7, 8]. Применение к обеим структурам такой щадящей процедуры релаксации было вызвано желанием сохранить основные черты структуры люциферазы, предложенные в работе [6]. На рис. 2 для участка фермента между активным центром и остатком His433 показаны аминокислотные остатки в радиусе 5 Å от His433 и от аденинового цикла ATP. Все указанные аминокислотные остатки консервативны для всех известных люцифераз, что доказывает важность этой области белка для формирования структуры активного центра. Остаток His433 консервативен для всех люцифераз и находится на расстоянии 12 Å от аденинового цикла ATP. В непосредственной близости от него находятся отрицательно заряженные остатки Asp429, Asp431 и

**Кинетические параметры и максимумы спектров биолюминесценции люциферазы светляков *L. mingrelica* и ее мутантных форм**

Фермент	Исходная люцифераза	Мутантные формы люциферазы	
		His433Asn	His433Ser
Максимум биолюминесценции, нм	562 ± 5	562 ± 5	564 ± 5
Удельная активность, усл. ед./мг	(9,2 ± 0,4)·10 <sup>9</sup>	(7,5 ± 0,2)·10 <sup>9</sup>	(4,6 ± 0,5)·10 <sup>7</sup>
$K_{m,LH2}$ , мкМ	20 ± 3,9	20 ± 3,7	20 ± 3,8
$K_{m,ATP}$ , мМ	0,19 ± 0,03	0,23 ± 0,02	0,29 ± 0,04

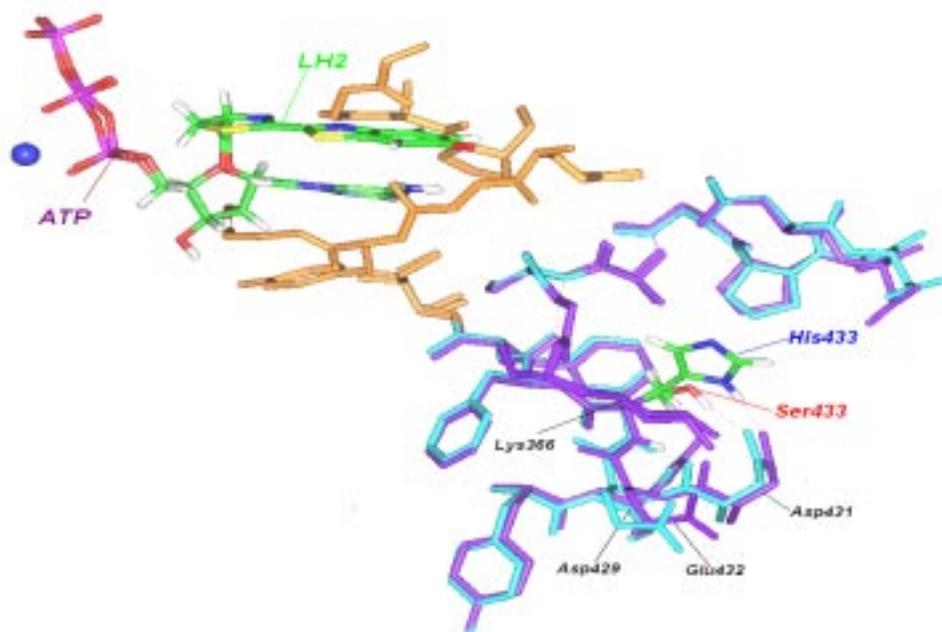


Рис. 2. Структура фермент-субстратного комплекса между активным центром фермента и остатком His433 для рекомбинантной люциферазы светлячков *L. mingrelica* (черная линия) и для мутанта His433Ser (серая линия)

Glu432, а также положительно заряженный остаток Lys366. При замене His433Asn остаток Asn, как и остаток His, может нести положительный заряд, поэтому изменения в указанном участке незначительны и могут быть связаны в основном со структурными различиями остатков His и Asn. При замене His433Ser удаление положительного заряда остатка His и появление частично отрицательного заряда остатка Ser ( $-0,55$ ) дестабилизирует кластер, и отрицательные боковые цепи окружающих его остатков несколько отдаляются друг от друга. На расстоянии около 12 Å от боковой цепи His433 находится место связывания аденинового цикла АТФ. На рис. 2 показано, что происходят некоторые изменения в конфигурации фосфатных групп АТФ, что может являться причиной столь сильного уменьшения каталитической актив-

ности и увеличения  $K_{m,ATP}$  для мутанта His433Ser. Таким образом, несмотря на то что остаток His433 локализован достаточно далеко от активного центра фермента, замена его на Ser приводит к значительным изменениям каталитических свойств фермента. Люцифераза светлячков характеризуется исключительно высокой специфичностью по отношению к субстратам, что, по-видимому, необходимо для высокоэффективного преобразования энергии биохимической реакции в световую. Этот вывод еще раз подтверждается результатами данной работы. Отдаленная мутация His433Ser, которая приводит, на первый взгляд, к незначительным изменениям в структуре как фермента, так и ее субстрата (АТФ), драматически изменяет каталитическую активность фермента, уменьшая ее в 200 раз.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 02-04-48-961) и INTAS (проект 2000-0562).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бровка Л.Ю., Угарова Н.Н. // Изв. АН, сер.хим. 2001. **10**. С. 1670.
2. Kajiyama N.K., Nakano E. // Protein Eng. 1991. **4**. P. 691.
3. Ohmiya Y., Hirano N., Ohashi M. // FEBS Let. 1996. **384**. P. 83.
4. Lundovskich I.A., Leontieva O.V., Dementieva E.I., Ugarova N.N. // Bioluminescence and Chemiluminescence. Perspectives for 21st Century. Chichester, Wiley. 1999. P. 420.
5. Талбаровская И.К., Каткова В.А., Рыжова В.В., Щеголев А.А. и др. // Авт. св. № 1192324. 1983.
6. Сандалова Т.П., Угарова Н.Н. // Биохимия. 1999. **64**. С. 962.
7. Weiner S. J., Kollman P. A., Case D. A., Singh U. C. et al. // J. Am. Chem. Soc. 1984. **106**. P. 765.
8. Weiner S. J., Kollman P. A., Nguyen D. T., Case D. A. // J. Comp. Chem. 1986. **7**. P. 230.

Поступила в редакцию 25.10.02