

Глава 3

Физическая химия белков

Генетическая инженерия люцифераз светлячков. Взаимосвязь между структурой и термостабильностью ферментов*

Н. Н. Угарова, М. И. Кокшаров

Химический факультет Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова

Аннотация

Люциферазы светлячков находят широкое применение в молекулярной биологии, биотехнологии, биоаналитической химии и других областях. К настоящему времени выделено и изучено несколько десятков ферментов из различных видов светлячков и жуков, которые отличаются как по аминокислотной последовательности, так и по функциональным свойствам (стабильности, активности, спектрам биолюминесценции). Однако применение люцифераз часто лимитируется недостаточной стабильностью или быстрой потерей активности в условиях их практического использования. Генетическая инженерия люцифераз позволила значительно улучшить свойства исходных рекомбинантных люцифераз (WT-люцифераз) и расширить области применения этих ферментов.

* Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты 08-04-00624 и 11-04-00698а).

Данный обзор посвящен рассмотрению современных достижений в получении мутантных люцифераз с улучшенной активностью и стабильностью. Описанные в обзоре различные стратегии генетической инженерии люцифераз, как надеются авторы, могут быть успешно использованы при инженерии ферментов других групп, поскольку они опираются на классические представления о взаимосвязи структуры и функции биокатализаторов.

Ключевые слова: люцифераза светляков, биолюминесценция, белковая инженерия, направленная эволюция, термостабильность.

Введение

Биолюминесценция — эмиссия света живыми организмами — является результатом хемилюминесцентной реакции, которая катализируется специфическими биокатализаторами — люциферазами. Данная реакция представляет собой процесс окисления органического субстрата, люциферина, кислородом воздуха, в результате чего образуется электронно-возбужденный продукт — оксилюциферин [1]. Люциферин и люцифераза — это общепринятые понятия (а не структурно функциональные), которыми обозначаются все ферменты и субстраты, при взаимодействии которых возникает биолюминесценция. Следует отметить, что явление хемилюминесценции довольно часто наблюдается в природе, особенно в реакциях окисления с участием свободных радикалов. Однако в большинстве случаев квантовый выход (отношение числа испускаемых квантов света к количеству молекул образовавшегося продукта реакции) не превышает одной сотой или тысячной доли процента. Отличительной чертой биолюминесцентных систем является высокий квантовый выход биолюминесценции (от 1 до 60 %), который достигается благодаря участию в реакции специфических ферментов — люцифераз. Люциферазы, с одной стороны, действуют как матрица, с которой нековалентно, а в ряде случаев ковалентно, связан излучающий продукт. С другой стороны, люциферазы действуют как биокатализаторы, обеспечивающие образование электронно-возбужденного продукта благодаря их высокой специфичности. Жесткие требования фермента к структуре субстрата являются необходимыми для максимального концентрирования энергии, выделяемой в результате реакции окисления, на продукте. Причем структура продукта должна обеспечивать его переход в возбужденное состояние, т.е. энергия биолюминесцентной реакции должна быть достаточной, чтобы перевести продукт

в электронно-возбужденное состояние, а сам продукт должен иметь достаточно низкий энергетический порог для такого перехода.

Люциферазы были изолированы из большого числа живых организмов (насекомые, бактерии, медузы, простейшие и т. д.) и достаточно подробно изучены [1]. Все известные люциферазы относятся к оксидоредуктазам. В качестве окисляющих агентов они используют кислород или пероксид водорода. Структуры люциферинов весьма разнообразны, но в большинстве случаев они являются гетероциклическими соединениями. Люциферин-люциферазные системы представляют собой уникальные наиболее эффективные системы превращения энергии биохимических реакций в свет, поэтому интерес к изучению механизма трансформации энергии в этих системах и их роли в природе с годами не ослабевает [2, 3].

Интерес к биолюминесцентным системам определяется и их большим практическим применением. Для ряда люцифераз специфическими субстратами и косубстратами являются такие важные метаболиты как флаavin мононуклеотид (FMN) или аденозин трифосфат (АТФ). Высокий квантовый выход биолюминесценции упрощает регистрацию квантов света. Благодаря этому, а также высокой специфичности люциферазы широко используются в высокочувствительном биолюминесцентном анализе. Интенсивность излучаемого света пропорциональна скорости люциферазной реакции, т. е. концентрации субстрата при концентрации его ниже константы Михаэлиса. Предел обнаружения биолюминесцентным методом достигает 10^{-13} – 10^{-18} молей субстрата в измеряемом растворе, что на несколько порядков ниже, чем при использовании многих других методов детекции. Наконец, конструкция люминометров — инструментов для измерения света — гораздо проще, чем других оптических инструментов, что также упрощает практическое применение биолюминесцентных систем [4].

Люцифераза светляков катализирует двухстадийное окисление люциферина светляков в присутствии АТФ, Mg^{2+} и молекулярного кислорода, которое сопровождается эмиссией видимого света [2, 5]. Исторически первой изученной люциферазой была люцифераза из североамериканских светляков *Photinus pyralis*, но та же реакция катализируется и всеми другими люциферазами насекомых. Максимум биолюминесценции люцифераз варьирует от 538 до 623 нм для нативных и мутантных ферментов из светляков различных видов, но наиболее часто наблюдается желто-зеленая биолюминесценция [6]. Квантовый выход реак-

ций, катализируемых люциферазами светляков, составляет 45–60 %, что гораздо выше, чем для других биolumинесцентных систем [7]. Люциферазы светляков демонстрируют яркую биolumинесценцию, низкий фоновый сигнал, высокую каталитическую эффективность, субстратную специфичность и большую чувствительность к АТФ. Это определяет их широкое применение в системах *in vitro* и *in vivo*: от измерения концентрации АТФ до детекции микробных загрязнений и пиросеквенирования [8, 9], от биolumинесцентной томографии *in vivo* до гена-репортера в молекулярной биологии [7, 10, 11]. Этот фермент, как было показано, имеет большие перспективы в системах по изучению белок-белковых взаимодействий и определению различных аналитов [12–14], для мониторинга амплификации полинуклеотидов в режиме реального времени [15] и как метка в иммуноанализе [16].

В последние годы было описано много новых люцифераз с весьма интересными свойствами [17–19]. Некоторые из них были использованы в качестве репортерных белков для *in vivo* биосистем, которые по своим характеристикам даже превосходят обычно используемую *P. pyralis* люциферазу [20]. Однако применение исходных люцифераз (так называемых люцифераз дикого типа (WT)) часто лимитируется недостаточной стабильностью этих ферментов при температурах выше 30 °С. Поэтому часто требуется создание термостабильных форм люцифераз [21, 22]. Например, *P. pyralis* люцифераза теряет половину активности в течение 15 минут инкубации при 37 °С, а многие вновь клонированные люциферазы инактивируются еще быстрее [22]. Термостабильность люцифераз является наиболее критическим фактором: иммуноанализ и пиросеквенирование обычно проводятся при 37 °С [9], а для амплификации полинуклеотидов требуется люцифераза, стабильная, по крайней мере при 50 °С (предпочтительно при температурах выше 60 °С) [15]. Эта проблема менее актуальна для *in vivo* применений, так как в этих условиях полупериод инактивации *P. pyralis* люциферазы составляет приблизительно 3–4 часа при 37 °С в клетках млекопитающих [23], что обычно достаточно для мониторинга экспрессии гена при молекулярном имиджинге. Однако применение более стабильных люцифераз значительно улучшает биolumинесцентный сигнал *in vivo* и повышает чувствительность детекции [22, 24]. Если же внутриклеточные процессы необходимо наблюдать при более высоких температурах, тогда требования к термостабильности возрастают, так как *P. pyralis* люцифераза инактивируется в течение 5–20 минут при

40–45 °С в эукариотических клетках [25, 26]. Высокая термостабильность люцифераз может быть также востребована для повышения других типов стабильности и новых применений люцифераз [27], таких как недавние работы по изменению субстратной специфичности люцифераз [28], или при развитии так называемой «многоцветовой» детекции с использованием нескольких люцифераз с отличающимися спектрами биолюминесценции [29].

Другая проблема, которая часто требует решения, это денатурация или ингибирование люциферазы светляков в ходе отдельно взятого эксперимента. Например, при мониторинге гигиенической чистоты ингибирование люциферазы экстрагентами, используемыми для высвобождения внутриклеточного АТФ, является общей практически важной проблемой [8]. Активность люциферазы в ходе мониторинга *in vivo* биолюминесценции может уменьшаться под действием различных внутриклеточных факторов, включая рН, протеазы, пирофосфат, реактивные формы кислорода и т. д. [30–32]. Последнее может влиять не только на чувствительность детекции, но и на интерпретацию результатов.

Известно большое число работ по получению мутантных люцифераз с улучшенными свойствами, которые имеют более высокую стабильность по отношению к действию температуры и других факторов. Аналогично общим принципам белковой инженерии эти работы основаны на принципах рационального дизайна структуры белков [33] или случайного мутагенеза в сочетании с селективным скринингом [34]. Обе стратегии были успешно использованы во многих случаях для получения стабилизированных форм люцифераз. Случайный мутагенез может быть очень эффективным именно в случае люцифераз, поскольку библиотеку колоний мутантных люцифераз легко скринировать по активности (т. е. по интенсивности биолюминесценции) в присутствии различных инактивирующих факторов, что весьма затруднительно делать для многих других ферментов [34, 35].

Этот обзор посвящен обсуждению литературных результатов и результатов авторов по инженерии стабильных и активных люцифераз светляков. В нем рассмотрены различные типы стабильности, которые необходимы в конкретных системах детекции, сравнены те стратегии, которые могут быть эффективно использованы для достижения желаемого уровня стабильности люциферазы светляков. В таблице (См. Приложение) приведены наиболее эффективные примеры оптимизированных форм люцифераз.

1. Структура и свойства биолюминесцентной системы светляков

Схема реакций, катализируемых люциферазой светляков, показана на *рис. 1*. На первой стадии фермент связывает его субстраты — люциферин (1) и АТФ и катализирует образование смешанного ангидрида карбоксильной и фосфорной кислот, люцифериладенилата (2) и пирофосфата (PP_i). Люцифериладенилат далее через ряд промежуточных стадий быстро окисляется до циклического пероксида, диокситанона (3). Особенностью молекулы диокситанона является то, что одна часть молекулы представляет собой легко окисляемую структуру (люциферил) с низким потенциалом ионизации, а другая часть (пероксид) обладает высоким сродством к электрону. Благодаря внутримолекулярному переносу электрона от фенолятной группы к пероксиду образуется структура с резонансным переносом заряда. Разрыв О—О-связи приводит к декарбоксилированию диокситанона и образованию бирадикала (анион-радикал кетона и катион-радикал фенолята). В результате внутримолекулярной рекомбинации радикалов образуется продукт, оксилюциферин (4), в синглетном электрон-возбужденном состоянии. В зависимости от свойств микроокружения, в частности от микро-рН, оксилюциферин может существовать в форме кетона, енола или енолят-иона либо в виде смеси этих продуктов, о чем свидетельствуют сложные спектры биолюминесценции для люциферазы светляков при различных рН. Существование смеси продуктов оказывается возможным за счет того, что сам фермент может существовать в виде различных конформеров, которые отличаются по микроструктуре активного центра и тем самым могут создавать для оксилюциферина различное микроокружение. Для различных люцифераз и при различных рН максимум спектра биолюминесценции варьирует от 536 до 623 нм [6].

До середины 1980-х годов изучались природные люциферазы, которые выделялись из высушенных хвостиков светляков. Как правило, состав ферментных препаратов был негомогенным, поскольку включал различные формы фермента, которые могли образовываться во время его функционирования. Из-за этого даже аминокислотная последовательность люциферазы оставалась неизвестной. Новый этап начался после выделения в 1985 г. кДНК люциферазы североамериканских светляков *Photinus pyralis* [37], а в 1989 г. были клонированы четыре различные люциферазы из ямайских жуков [38]. В начале 90-х была клонирована люцифераза из восточноевропейских (северокавказских) светляков

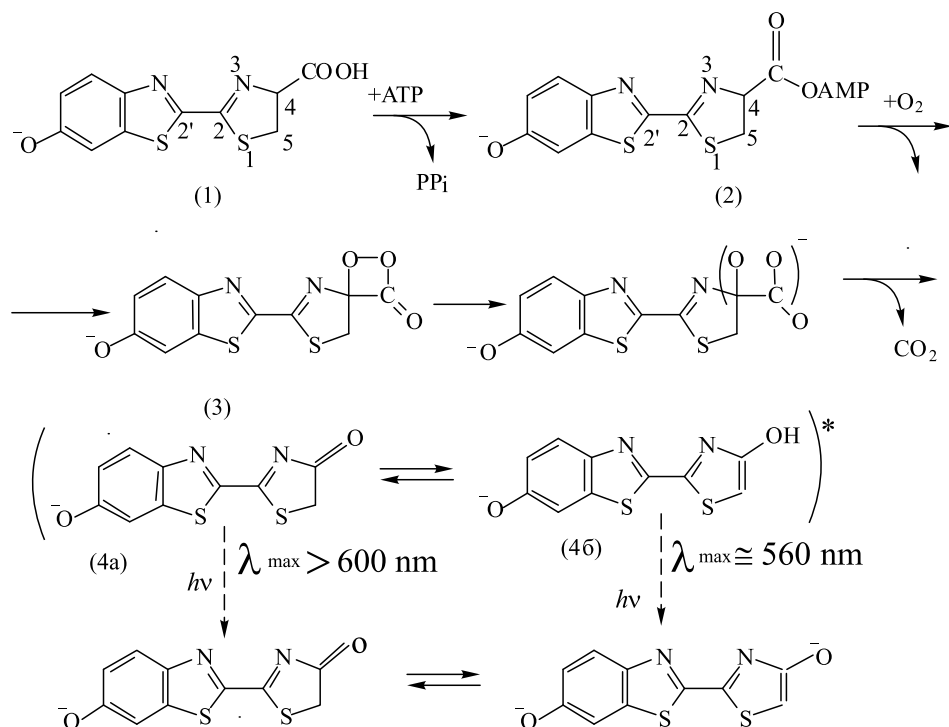


Рис. 1. Схема реакций, катализируемых люциферазой светляков [36]

Luciola mingrelica, и был получен препарат гомогенной рекомбинантной *L. mingrelica* люциферазы [39]. К настоящему времени несколько десятков люцифераз клонировано из различных видов светляков, жуков-щелкунов и других насекомых, которые обитают в США, Японии, России, Южной Америке и др. [6, 18, 36, 40]. Схема реакции и структура эмиттера идентичны для всех люцифераз насекомых. Молекула люциферазы состоит из одной полипептидной цепи (542–552 аминокислотных остатка), не содержит кофакторов, и все люциферазы имеют сходный аминокислотный состав. Более половины аминокислот — неполярные или амбивалентные. Число заряженных остатков близко для всех люцифераз, различие наблюдается в содержании остатков триптофана и цистеина. Гомология аминокислотной последовательности люцифераз коррелирует с филогенетическими соотношениями для соответствующих видов светляков [41]. Например, для люцифераз семейства *Luciolini* (роды *Luciola* и *Hotaria*) гомология близка к 80 %, а после 200-го остатка превышает 90 %. Первичная структура люциферазы *L. mingrelica* имеет гомологию 98 % с люциферазой из японских светляков *Hotaria*

(*Luciola*) *parvula*, несмотря на географическую удаленность среды обитания этих двух видов светляков. Люциферазы *Luciola* имеют меньшую гомологию (67 %) с люциферазами светляков из других суперсемейств, такими как *P. pyralis* или *L. noctiluca*, и очень низкую (43 %) с люциферазами жуков-щелкунов [42]. В то же время гомология между люциферазами из ямайских и бразильских жуков достигает 80 % [18, 43].

В 1996 г. был выполнен рентгеноструктурный анализ люциферазы (без субстратов) из американских светляков *P. pyralis* [44], что открыло новый этап в изучении люцифераз светляков. К сожалению, можно было только предположить возможные центры связывания люциферина и АТР. В 1997 г. была опубликована пространственная структура другого фермента, принадлежащего к суперсемейству аденилирующих белков (аденилаза) в комплексе с его субстратами — АМР и фенилаланином [45]. Этот комплекс является аналогом комплекса люциферазы с продуктом аденилирования. Люциферазы светляков, как известно, принадлежат к суперсемейству аденилаз, которые катализируют образование аденилатов. Можно было предположить, что люциферазы и аденилазы имеют сходную топологию их пространственных структур. Действительно, ферменты обеих групп состоят из двух доменов — большого N-домена, который в свою очередь может быть разделен на два или три субдомена, и малого С-домена. N- и С-домены соединены очень подвижной и неупорядоченной петлей. Каждый домен и даже субдомен аденилазы имеет близкую топологию с соответствующим доменом и субдоменом люциферазы. Однако при сравнении пространственных структур люциферазы и аденилазы была выявлена существенная разница во взаимном расположении N- и С-доменов: в аденилазе домены приближены друг к другу и повернуты на 90° по сравнению с их ориентацией в люциферазе [45]. Мы высказали предположение, что наблюдаемое различие во взаимном расположении доменов является следствием изменения конформации белковой глобулы при связывании субстратов. Тогда трехмерная структура комплекса люцифераза-люциферин-АТР должна быть сходна со структурой комплекса аденилаза-фенилаланин-АМР. Компьютерное моделирование на основании этой гипотезы позволило построить модель фермент-субстратного комплекса для люциферазы *P. pyralis* [46]. Модель структуры люциферазы до и после связывания субстратов показана на *рис. 2*.

Ни АТР, ни люциферин не могут связываться с ферментом без вращения доменов. Каталитически важные остатки из С-домена (Lys529 и Thr527) приближаются к молекулам субстратов только после вращения

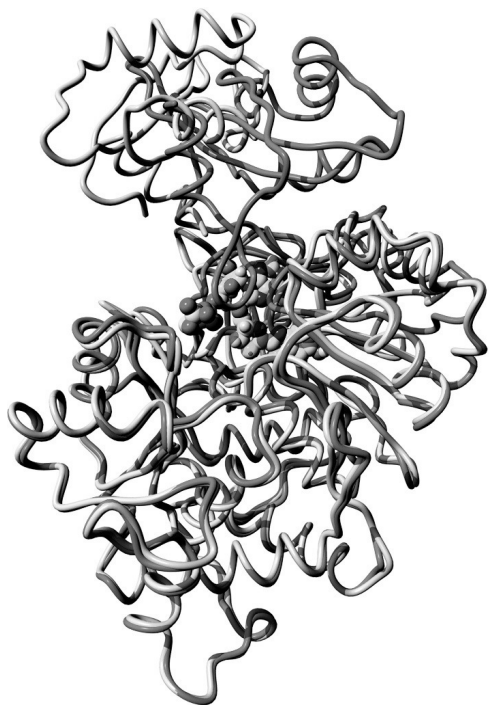


Рис. 2. Суперпозиция пространственных структур люциферазы светлячков без субстратов (серые линии) и люцифераза-люциферин-АТФ комплекса (розовые линии) [46]. Молекулярная графика выполнена с использованием программного обеспечения YASARA (www.yasara.org) и PovRay (www.povray.org). См. цв. вкл., с. 8

доменов. Сходная модельная структура люциферазы *P. pyralis* была получена и в работе [47]. Все остатки, которые находятся в прямом контакте с субстратами, абсолютно консервативны. Эти модели были позже подтверждены методами мутагенеза [48–51]. В 2006 г. были расшифрованы методом рентгеноструктурного анализа три структуры для люциферазы *Luciola cruciata*: в комплексе с Mg-АТФ, в комплексе с аналогом промежуточного продукта на стадии аденилирования, DLSA и в комплексе с продуктом реакции — окислюциферином и AMP [52]. Это дало возможность скорректировать ранее полученные данные по моделированию. Кристаллическая структура люциферазы [44, 52] подтверждает, что фермент состоит из двух доменов: большого N-домена (1–436 аминокислотные остатки) и малого С-домена (остатки 443–544), которые соединены подвижной петлей (остатки 337–442). N-домен в свою очередь состоит из двух субдоменов: А (1–190 остатки) и В (191–436 остатки), взаимодействующие друг с другом через сильный гидрофобный интерфейс (рис. 3).

Когда люцифераза находится в комплексе с DLSA, то С-домен повернут на 90° относительно N-домена по сравнению со свободным ферментом. Это приводит к трансформации из открытой в закрытую кон-

Иллюстрации к Главе 3

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ ЛЮЦИФЕРАЗ СВЕТЛЯКОВ. ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ СТРУКТУРОЙ И ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬЮ ФЕРМЕНТОВ

Н. Н. Угарова, М. И. Кокшаров

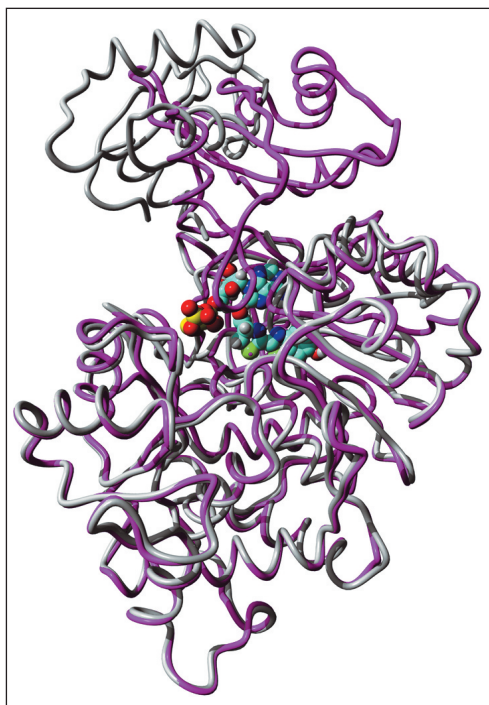


Рис. 2. Суперпозиция пространственных структур люциферазы светлячков без субстратов (серые линии) и люцифераза-люциферин-АТР комплекса (розовые линии) [46]. Молекулярная графика выполнена с использованием программного обеспечения YASARA (www.yasara.org) и PovRay (www.povray.org)

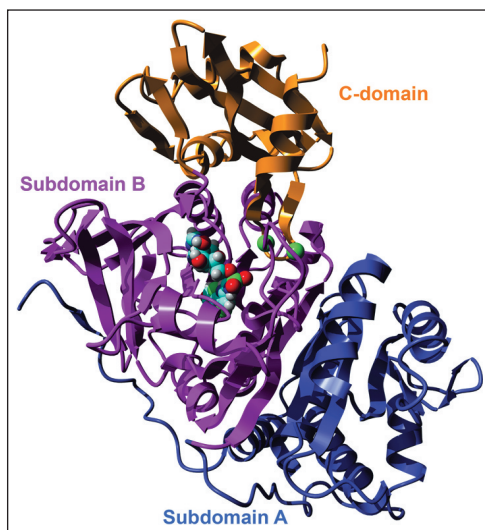
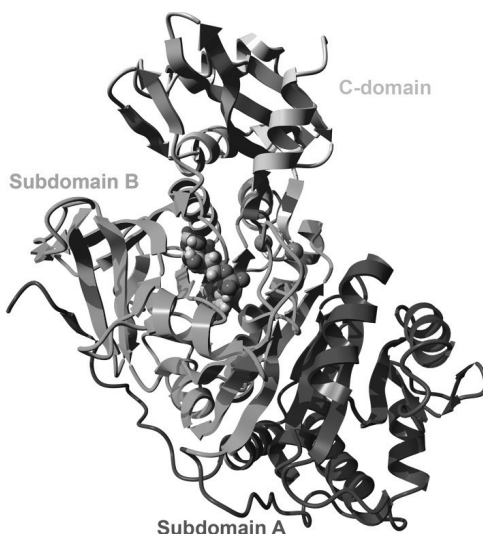


Рис. 3. 3D-структура люциферазы *L. cruciata* в комплексе с DLSA [52]. Субдомены А, В и С показаны синим, розовым и оранжевым, соответственно

Рис. 3. 3D-структура люциферазы *L. cruciata* в комплексе с DLSA [52]. Субдомены А, В и С показаны синим, розовым и оранжевым, соответственно. См. цв. вкл., с. 8



формацию люциферазы, так что оба домена оказываются в близком контакте. Полученные структуры позволили определить структуру активного центра люциферазы, окружение субстратов на стадии аденилирования. Более поздние работы показали, что еще один поворот С-домена (на 140°) требуется на стадии окисления [53], тогда, как предполагается, остаток K445 выполняет роль остатка K531 [51, 54].

2. Стабильность люцифераз светлячков в растворе

Люциферазы светлячков относительно стабильны в растворе при низкой температуре в присутствии стабилизирующих добавок. При низкой концентрации и без стабилизирующих добавок до 99 % активности фермента может быть потеряно за счет его адсорбции на поверхности сосуда, в котором содержится раствор фермента [55], или за счет агрегации в неактивные олигомеры [56, 57]. Небольшие добавки альбумина (0,1 мг/мл) защищают фермент от адсорбции на поверхности в несколько раз. Увеличение стабильности люциферазы *P. pyralis* наблюдалось при повышении ионной силы раствора. Добавки 0,2-мМ Тритона X-100 или 10–50 %-го глицерина предотвращали адсорбцию люциферазы на поверхности [55]. Стабилизирующий эффект солей был отмечен также для люциферазы *L. mingrelica*: в присутствии 0,4-М MgSO_4 и 0,5-М Na_2SO_4 термостабильность люциферазы была в 2 и 10 раз соответственно выше, чем в буферном растворе без добавок солей [58]. Однако даже в присутствии стабилизирующих солей при 10°C *L. mingrelica*

люцифераза теряла около 90 % активности при концентрации 0,1 мг/мл в течение 10–15 дней хранения. Только добавки 10 %-го этиленгликоля и 0,02 %-го антимикробного агента — азида натрия сохраняли активность в течение 100 дней [59]. Значительная стабилизация люциферазы светляков при повышенных температурах достигается в растворе в присутствии осмолитов (глицин, бетаин) [9, 60] и полиолов [61]. Таким образом, оптимизация микроокружения фермента в растворе может увеличить стабильность люцифераз.

Инактивированные люциферазы после охлаждения почти не восстанавливают своей активности и обычно агрегируют [25], но могут эффективно реактивировать в присутствии различных систем шаперонов [62]. Детальный механизм инактивации люцифераз в растворе еще недостаточно изучен и может различаться для ферментов из различных видов светляков. Знание же механизма инактивации и дефолдинга необходимо для правильного выбора мутаций, которые могут увеличить термостабильность фермента. Иначе тот или иной подход к стабилизации фермента может быть не эффективным из-за того, что различные факторы могут влиять на термостабильность данной конкретной люциферазы [33]. Например, гомодимер *L. mingrelica* люциферазы диссоциирует с образованием менее активных мономеров, которые инактивируют и затем агрегируют необратимо [63]. Исследование разворачивания *P. pyralis* люциферазы при химической денатурации с последующим протеолизом денатурированного фермента показало, что средний субдомен «В» (192–435 остатки) намного менее стабилен, чем два других, и он первый разворачивается при денатурации [64, 65]. Можно предположить, что именно низкая стабильность этого субдомена определяет стабильность белковой глобулы в целом.

3. Термостабилизация люцифераз светляков методами случайного и сайт-специфического мутагенеза

Относительное улучшение стабильности люцифераз при 37 °С может быть достигнуто, как показано выше, в присутствии добавок стабилизирующих соединений [9, 60, 61], но такой подход весьма ограничен, поскольку часто раствор с различными добавками не может быть использован в тех условиях, в которых применяется люцифераза. Мутагенез увеличивает собственную стабильность белковой глобулы и позволяет достигать более высоких уровней стабилизации без изменения

условий применения фермента. До того как стала известна пространственная структура люцифераз, случайный мутагенез был единственным методом получения ферментов с увеличенной устойчивостью к действию температуры, pH и т. д. Именно методом случайного мутагенеза в начале 1990-х гг. были получены термостабильные мутанты люциферазы *L. cruciata* и *Luciola lateralis* [66–68]. Три выделенных мутанта *L. cruciata* люциферазы содержали одну и ту же замену Thr217Ile и превосходили WT фермент по термо- и pH-стабильности. Более того, их удельная активность увеличилась на 130 %. Эти найденные позиции затем экстенсивно анализировались методом сайт-направленного мутагенеза, чтобы найти наиболее эффективные остатки для введения в структуру мутанта. Для выяснения эффекта замещения остатка 217 на термостабильность *L. cruciata* люциферазы авторы методом сайт-специфического мутагенеза получили мутанты с заменой этого остатка на все другие аминокислоты и показали, что термостабильность мутантов коррелирует с гидрофобностью вводимого остатка. Так, мутантные люциферазы с заменами Thr217Leu и Thr217Val сохраняли более 75 % активности после 10 минут инкубации при 50 °C [67]. Поскольку люциферазы *L. cruciata* и *L. lateralis* имеют 94 % гомологии, был исследован эффект замещения аминокислотного остатка 217 на более гидрофобный и для *L. lateralis* люциферазы. Полученные мутанты с заменами Ala217Ile, Leu, Val также были более стабильны, чем WT-фермент: люцифераза *L. lateralis* с заменой Ala217Leu сохраняла более 70 % активности после 60 минут инкубации при 50 °C. Полупериод инактивации данного мутанта был в 20 раз больше, чем у WT-люциферазы. Термостабильность люциферазы *L. lateralis* с заменой Ala217Leu была даже выше, чем соответствующего мутанта люциферазы *L. cruciata*.

Метод случайного мутагенеза был также успешно использован для получения термостабильной мутантной люциферазы *P. pyralis*. При замещении Glu354Lys термостабильность фермента увеличивалась в 5 раз [69, 70]. Замещение этого остатка на все возможные аминокислотные остатки показало, что наиболее стабильные мутанты содержали в положении 354 остатки Lys или Arg. Таким образом, замещение отрицательно заряженного остатка на положительно заряженный именно в этой части молекулы люциферазы увеличило ее термостабильность.

Большие усилия в дальнейшем были сосредоточены на том, чтобы получить термостабильные мутанты, содержащие множественные замены, найденные ранее при изучении мутантов с точечными заменами. Например, термостабильная *P. pyralis* люцифераза была получена путем

комбинации случайного и сайт-направленного мутагенеза. Для двойного мутанта с заменами Glu354Lys и Ala215Leu (аналогично замене Ala217Leu в *L. lateralis* люциферазе) эффект стабилизации был не такой высокий как для *L. lateralis* люциферазы. При 37 °С мутанты с единичными заменами сохраняли 10–15 % активности после 5 часов, в то время как WT-люцифераза полностью инактивировалась. Двойной мутант в тех же условиях сохранял более 50 % активности. При 42 °С полупериод инактивации двойного мутанта составил 20 минут, а при 50 °С — 4 минуты [69]. Методом случайного мутагенеза были выявлены и другие точечные мутации, которые значительно увеличивали термостабильность *P. pyralis* люциферазы: T214A, I232A и F295L. При соединении этих точечных мутаций с мутацией E354K была получена *P. pyralis* люцифераза, термостабильность которой увеличилась примерно на 7 °С относительно WT фермента благодаря кумулятивному эффекту множественных мутаций [71]. Был сконструирован мутант *P. pyralis* люциферазы, содержащий 5 замен (T214A/A215L/I232A/F295L/E354K), полупериод инактивации которого увеличился в 44 раза при 37 °С, полупериод жизни возрос с 15 минут до 11,5 часа. Эти замены были далее введены в мутанты, генерирующие зеленое и красное свечение, чтобы получить пару термостабильных мутантов для формирования двухцветного изображения анализируемых сложных смесей [21, 29]. Еще более поразительный пример показан в работе [72], где в *P. pyralis* люциферазу были введены все известные к тому времени единичные стабилизирующие замены и была получена люцифераза с 12 точечными заменами. Ее полупериод жизни составил 15 минут при 55 °С, тогда как WT-люцифераза инактивировалась в этих условиях полностью в течение нескольких секунд. Однако этот мутант сохранил всего 15 % его первоначальной активности, что указывает на недостатки такого подхода, поскольку в случае введения многих точечных мутаций может потребоваться дополнительный и трудоемкий анализ с использованием метода сайт-направленного мутагенеза для идентификации тех мутаций, которые сохраняют ферментативную активность при значительном увеличении термостабильности.

4. Рациональный дизайн для получения стабильных и высокоактивных люцифераз

После того как стала известна пространственная структура люциферазы, несколько работ по рациональному дизайну, основанному на анализе структуры люциферазы, было выполнено с целью увеличения

термостабильности фермента. Например, в молекуле *P. pyralis* люциферазы пять неконсервативных объемных гидрофобных остатков, экспонированных в растворитель, которые не участвуют в формировании вторичной структуры белка, были заменены на гидрофильные с соответствующими заряженными группами (F16R, L37Q, V183K, I234K и F465R), или (F14R, L35Q, V182K, I232K, F465R), что значительно улучшило рН-устойчивость и повысило термостабильность люциферазы вплоть до 45 °C без уменьшения активности и каталитической эффективности [73]. Недавно аналогичный подход был успешно использован для *Lampyrus turkestanicus* люциферазы, в которой те же поверхностные остатки были заменены на остатки аргинина [74].

Противоположный подход — гидрофобизация внутренних областей белковой глобулы — также эффективен, поскольку гидрофобность внутренних областей глобулы является главной составляющей стабильности белка [75]. Термостабилизирующие мутации, известные к настоящему времени, подтверждают, что данный метод может быть использован с успехом и для люцифераз светляков. Согласно данному подходу, внутренние неконсервативные полярные остатки заменяются на гидрофобные, а малые внутренние гидрофобные остатки — на объемные гидрофобные, если эти последние могут заполнить имеющиеся внутренние полости в молекуле фермента. Результаты по сайт-направленному мутагенезу [67] и анализ 3D-структуры *L. lateralis* люциферазы показывают, что замены остатка A217 валином, лейцином и изолейцином были наиболее эффективными, поскольку боковые группы этих объемных остатков заполняют внутреннюю полость в молекуле белка и тем самым улучшают гидрофобную упаковку белковой глобулы.

Анализ литературы показывает, что мутации, эффективные для какой-либо одной люциферазы, не всегда приводят к успешному результату, когда они выполнены для другой, даже и высокоомологичной люциферазы. Например, мутация E354R увеличивала термостабильность *P. pyralis* люциферазы, но соответствующая замена E356R в *H. parvula* люциферазе не оказывала влияния на термостабильность. Замещения A217L в *L. lateralis*, *L. cruciata* и *P. pyralis* (A215L) люциферазах приводили к активному и термостабильному ферменту, а аналогичная мутация в *H. parvula* люциферазе уменьшила ее активность до 0,1 % от активности WT-люциферазы, хотя и наблюдалось некоторое увеличение ее термостабильности [76]. Эти результаты имеют особый интерес для *L. mingrelica* люциферазы, поскольку обе люциферазы имеют гомологию 98 % и их можно рассматривать как почти идентичные

белки. Поэтому можно было ожидать, что аналогичный эффект снижения активности при введении замены A217L будет наблюдаться и для *L. mingrelica* люциферазы.

В соответствии с методом белкового дизайна сравнительный анализ микроокружения мутируемого остатка помогает понять, в чем состоит проблема наблюдаемых эффектов у различных, хотя и высокоомологичных люцифераз. Метод рационального белкового дизайна был использован нами для того, чтобы увеличить термостабильность *L. mingrelica* люциферазы и предотвратить разрушительный эффект мутации A217L на активность фермента путем введения дополнительных мутаций вблизи остатка 217. Анализ пространственной структуры *L. mingrelica* люциферазы и сравнение аминокислотной последовательности данной люциферазы и других люцифераз выявили три различия в окружении остатка A217 в *L. mingrelica* и *L. cruciata* и *L. lateralis* люциферазах: G216N, I212L, S398M. Различие I212L не столь существенно, поскольку свойства остатков Leu и Ile очень близки. С другой стороны, соседний остаток G216 и более удаленный остаток S398 характерны для небольшой подгруппы люцифераз, гомология которых близка к гомологии *L. mingrelica* люциферазы (включая *H. parvula* люциферазу). Мы предположили, что устранение этих различий могло бы создать для остатка A217 микроокружение, аналогичное его микроокружению в *L. cruciata* и *L. lateralis* люциферазах, что, возможно, могло бы предотвратить падение активности *L. mingrelica* люциферазы при введении замены A217L. Сначала мы ввели замену остатка 216 и получили двойной мутант G216N/A217L. Так как этот двойной мутант имел еще низкую активность, то мы ввели дополнительную мутацию S398M, что позволило получить в конце концов стабильную и активную *L. mingrelica* люциферазу [77] (табл. 1).

Остатки 216, 217, 398 расположены вблизи одной из стенок люциферин связывающего канала (рис. 4). В большинстве люцифераз светляков позиция 216 обычно занята остатком, имеющим боковую группу, но в *L. mingrelica* и *H. parvula* люциферазах в этой позиции расположен остаток глицина (Gly), который, как известно, сильно дестабилизирует структуру, когда находится внутри α -спирали, поскольку из-за отсутствия боковой группы этот остаток обладает повышенной конформационной свободой [75]. Так как остаток G216 находится в α -спирали (рис. 4), можно было предположить, что он дестабилизирует окружение остатка 217 и делает его более чувствительным к замещениям соседних остатков по сравнению с остатком, имеющим боковую группу. Это может

Таблица 1

Термостабильность люцифераз, имеющих замену остатка 217 (0,05-М Na-фосфатный буферный раствор, содержащий 0,4 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 мМ EDTA, 0,2 мг/мл BSA, pH 7,8)

Фермент	Мутант	Относительная удельная активность, %	Температура инактивации	Полупериод жизни, мин	Ссылка
<i>Luciola cruciata</i>	WT	100	50 °C	~ 4	67
	T217I	130		~ 28	
<i>Luciola lateralis</i>	WT		50 °C	~ 6	66
	A217L			~ 125	
<i>Hotaria parvula</i>	WT	100	45 °C	~ 18	76
	A217L	0,074		~ 60	
<i>Luciola mingrelica</i>	WT	100	45 °C	13 ± 1	77
	G216N/A217L	10		280 ± 28	
	S398M	106		16,1 ± 1,6	
	G216N/A217L/ S398M	60		276 ± 28	

объяснить необычное уменьшение активности для мутанта с заменой A217L у *Hotaria parvula* люциферазы [76]. Двойная мутация G216N/A217L привела к значительному увеличению термостабильности *L. mingrelica* люциферазы, однако этот мутант сохранил лишь 10 % активности по сравнению с исходной люциферазой. Сравнение окружения остатка 217 в структуре *L. cruciata* люциферазы [52] и *L. mingrelica* люциферазы [78] показало, что, по-видимому, в *L. mingrelica* люциферазе существует внутренняя полость вблизи остатков G216 и S398 из-за малых размеров боковых групп этих остатков, поскольку в *L. cruciata* люциферазе в этих положениях находятся остатки, имеющие боковые группы N216 и M398. Эта гипотеза была подтверждена тем, что спектр биолюминесценции мутанта S398M *L. mingrelica* люциферазы оказался более устойчивым к изменению pH и температуры по сравнению с WT-люциферазой, что указывает на более «жесткое» и стабильное микроокружение эмиттера, находящегося в области активного центра [42].

Пониженная локальная конформационная стабильность вблизи остатков G216 и S398 может объяснить, почему мутация A217L в люциферазах *H. parvula* и *L. mingrelica* приводит к снижению активности и сдвигу в красную область максимума биолюминесценции, чего не наблюдалось

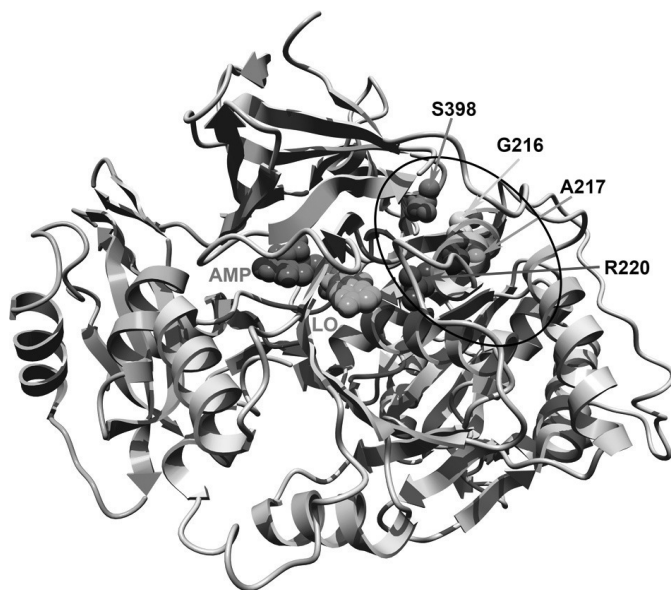


Рис. 4. Структура *L. mingrelica* люциферазы в комплексе с оксильюциферином (LO) и AMP. Остатки G216, A217, R220 и S398 указаны стрелками. Микроокружение остатка A217 в пределах 7 Å обозначено эллипсом [77]. Большой N-концевой и малый C-концевой домены окрашены серым и оранжевым соответственно. См. цв. вкл., с. 9

для *L. cruciata*, *L. lateralis* и *P. pyralis* люцифераз, которые содержат остатки Asn или Thr в положении 216 и Met в положении 398. Как можно видеть на рис. 5, остатки G216, A217, S398 расположены вблизи остатка R220 (остаток R218 в *P. pyralis* люциферазе), который является высококонсервативным и обеспечивает эмиссию желто-зеленого цвета. Мутации остатка R220, как было показано в работе [50], приводят к сдвигу максимума биолюминесценции в красную область, уменьшению активности в 3–15 раз, более длительному спаду интенсивности биолюминесценции и драматическому увеличению константы Михаэлиса. Двойная мутация G216N/A217L в *L. mingrelica* люциферазе вызывала подобный эффект, но менее выраженный. Следовательно, в люциферазах *L. mingrelica* и *H. parvula* правильное расположение остатка R220 может быть нарушено при введении замены A217L и может привести к наблюдаемым отрицательным эффектам. Размещение остатков Asn и Met в положениях 216 и 398 соответственно (как в тройном мутанте G216N/A217L/S398M *L. mingrelica* люциферазы и в нативных люциферазах *L. cruciata* и *L. lateralis*) делает локальное микроокружение

Рис. 4. Структура *L. mingrelica* люциферазы в комплексе с оксилуциерином (LO) и AMP. Остатки G216, A217, R220 и S398 указаны стрелками. Микро-окружение остатка A217 в пределах 7Å обозначено эллипсом [77]. Большой N-концевой и малый С-концевой домены окрашены серым и оранжевым, соответственно

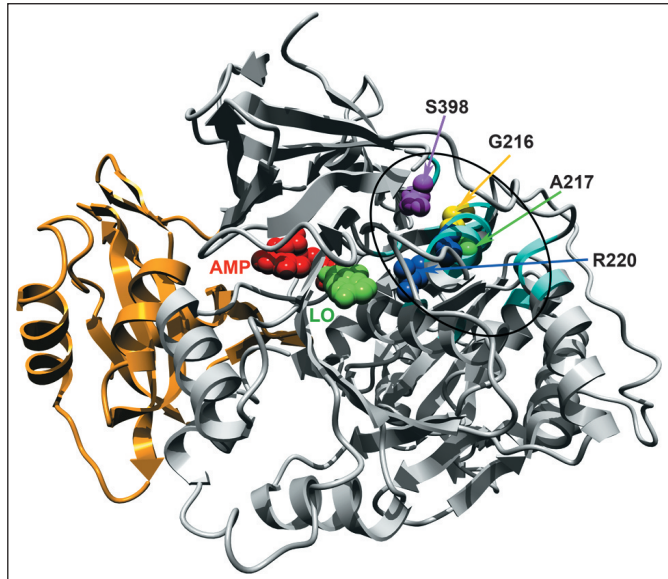
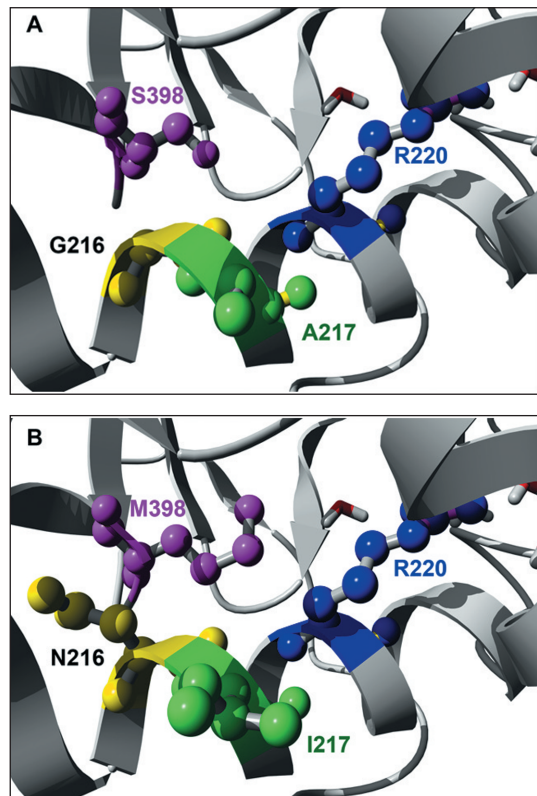


Рис. 5. Остатки 216, 217, 220 и 398 в структурах люцифераз *L. mingrelica* (А) и *L. cruciata* (В) [77]



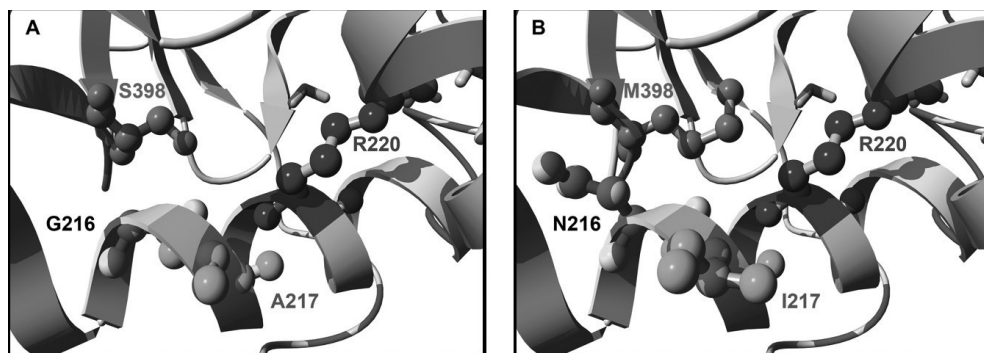


Рис. 5. Остатки 216, 217, 220 и 398 в структурах люцифераз *L. mingrelica* (A) и *L. cruciata* (B) [77]. См. цв. вкл., с. 9

остатка A217 достаточно жестким для сохранения активной конформации фермента с мутацией A217L.

В заключение следует отметить, что рациональный белковый дизайн микроокружения рассматриваемого остатка может быть эффективной стратегией в том случае, когда единичная мутация в одном ферменте не приводит к желаемому эффекту, который был описан для другого гомологичного фермента. В случае *L. mingrelica* люциферазы сконструированный тройной мутант G216N/A217L/S398M имеет высокую термостабильность и активность, а спектр биolumинесценции для него сходен со спектром биolumинесценции WT люциферазы. Благодаря улучшенным характеристикам этот мутант может найти широкое практическое применение.

5. Роль остатков цистеина в функционировании люцифераз светлячков

Среди поверхностных остатков остатки цистеина оказывают отрицательный эффект на стабильность люциферазы при хранении за счет окисления сульфгидрильных групп, образования межмолекулярных сшивок и агрегации. В зависимости от вида светлячков количество остатков Cys в люциферазах варьирует от 4 до 13. Люциферазы содержат по три абсолютно консервативных остатка Cys, которые локализованы внутри белковой глобулы, не входят в активный центр фермента, и их единичные замены мало влияют на активность и стабильность люцифераз [79, 80]. Однако множественные замены остатков цистеина приводят к заметному снижению активности. Например, *P. pyralis* люци-

фераза, в которой все 4 остатка Cys были замещены на Ser, сохранила всего 6,5 % активности, в то время как мутанты с единичными заменами теряли всего 20–60 % активности [80].

Люцифераза *L. mingrelica* содержит восемь остатков цистеина, три из которых соответствуют консервативным остаткам цистеина *P. pyralis* люциферазы — Cys82, 260, 393. Люцифераза обычно хранится в буфере, содержащем восстановительный агент, например, дитиотреитол (ДТТ), иначе фермент постепенно инактивирует, теряя более половины активности в течение нескольких дней даже при 0–4 °C. Ранее были получены мутантные формы *L. mingrelica* люциферазы с единичными заменами консервативных остатков цистеина на аланин. Спектры биолюминесценции и флуоресценции и активность этих мутантов при этом не изменились [79]. Стабильность C393A-мутанта повысилась в 2 раза в интервале температур 5–35 °C, а замены C82A и C260A не оказали влияния на термостабильность. В то же время единичные мутации неконсервативных остатков C62S, C146S [81] and C164S [82] хотя и не оказали влияния на каталитические и спектральные свойства люциферазы, но привели к увеличению термостабильности мутантов. Кроме того, снизилась зависимость констант инактивации мутантов от концентрации фермента и от наличия добавок ДТТ, что наблюдается для WT-фермента. Наиболее ярко эти эффекты проявились для мутанта с заменой C146S. Было показано, что мутация неконсервативного остатка C146S увеличивает термостабильность в 1,3 раза при 42 °C [83], при этом отпадает необходимость в использовании добавок ДТТ в буфере при хранении раствора люциферазы [84].

Другая серия работ по мутагенезу остатков цистеина была выполнена с *L. mingrelica* люциферазой, имеющей His₆-tag на С-конце молекулы фермента. Для мутагенеза были выбраны остатки Cys62, 86, 146 и 164. Наиболее подходящими для замены остатков Cys были остатки Ser (гидрофильная аминокислота) и Val (гидрофобная аминокислота), поскольку размеры боковых групп остатков Cys, Ser и Val близки. Для остатков Cys86 и 146 наиболее подходящей заменой был остаток серина, поскольку боковые группы остатков 86 и 146 контактируют с внешним водным окружением. Остаток C164 локализован в слабогидрофильном окружении, но ранее полученные результаты [82] показали, что в определенных условиях этот остаток становится доступным для растворителя, поэтому и остаток C164 был также замещен на Ser. В случае остатка Cys62 были получены два мутанта: C62S и C62V. Таким образом, методом сайт-специфического мутагенеза были получены му-

тантные формы люциферазы с единичными заменами C62S, C62V, C86S, C146S и C164S, двойными заменами C62/146S, C62/164S, C86/146S и C146/164S и с тройной заменой C62/146/164S. Уровень экспрессии и активность большинства мутантов с единичными и двойными заменами не изменились по сравнению с WT-ферментом. Удельная активность мутанта C146S даже возросла примерно на 15 %. Однако при введении замены C86S уровень экспрессии снизился до 62 %, а активность — до 30 % по сравнению с WT-люциферазой. Свойства люциферазы с двойной заменой C86S/146S изменились аналогично мутанту C86S. Значительное снижение уровня экспрессии и удельной активности было отмечено для двойного мутанта C62S/C164S и для тройного C62S/C146S/C164S.

Термоинактивация исходной His₆-tag люциферазы и полученных мутантных форм была изучена в 0,05-М Трис-ацетате (2 мМ ЭДТА, 10 мМ MgSO₄, pH 7,8) при 37 и 42 °C при различных концентрациях фермента (0,01–1,0 мкМ). Во всех случаях инактивация описывалась кинетикой первого порядка и величины k_{in} не зависели от концентрации люциферазы. Увеличение стабильности наблюдалось только для мутанта с заменой C146S: величина k_{in} уменьшилась в 2 раза при 37 °C и на 30 % — при 42 °C. Этот эффект объясняется тем, что боковая группа остатка C146 локализована на поверхности белковой глобулы, имеет большую площадь, доступную растворителю и в то же время практически не контактирует с другими аминокислотными остатками фермента. Замена C146S повышает гидрофильность в локальной области поверхности фермента, что, как известно, способствует стабилизации белковой глобулы.

При 37 °C величины k_{in} для мутантов C62V, C164S и C146S/C164S не отличались от k_{in} исходного фермента, а при 42 °C k_{in} мутантов были даже выше, чем у WT-фермента. Остальные мутанты были менее стабильны, чем WT-люцифераза. Мутация C86S оказала значительный дестабилизирующий эффект: величина k_{in} увеличилась в 2 раза при 37 и 42 °C. Двойной мутант C62S/C164S и тройной C62S/C146S/C164S были наименее стабильны из всех полученных мутантов. Эти эффекты можно объяснить особенностями локализации данных остатков в молекуле люциферазы. Остаток C86 расположен на неструктурированном участке белковой цепи (рис. 6). На данном участке аминокислотная последовательность образует петлю, фиксируемую за счет образования водородной связи между SH-группой остатка C86 и атомом кислорода OE1 в составе E88. Известно, что SH-группа остатка цистеина имеет

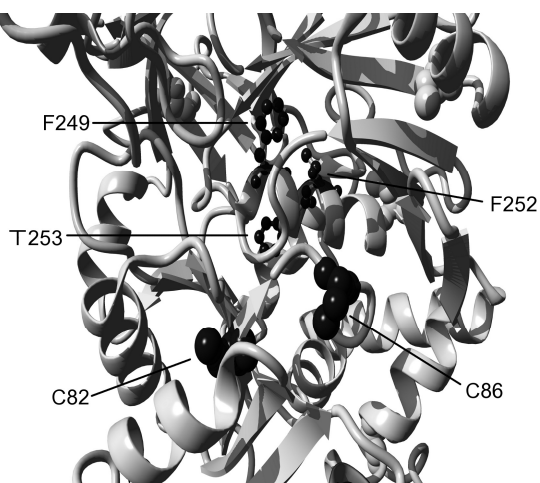


Рис. 6. Фрагмент 3D-структуры *Luciola mingrelica* люциферазы, включающий остатки C82 и C86 [83]

тенденцию к образованию нелинейных водородных связей вследствие того, что деформация валентного угла происходит с относительно малыми затратами энергии [85]. ОН-группа остатка серина такой тенденции не имеет, поэтому можно предположить, что в мутанте C86S водородная связь между остатками S86 и E88 не образуется. Это приводит к увеличению подвижности участка цепи, содержащего указанные остатки. Важно также учесть, что остаток C86 расположен в абсолютно консервативной для люцифераз рода *Luciola* области, недалеко от активного центра фермента, примерно в 15 Å от остатков T253, F249, F252, которые участвуют в связывании субстратов люциферазы. Известно, что мутагенез этих остатков приводит к резкому ухудшению каталитических свойств фермента и в ряде случаев к нарушению процесса экспрессии фермента [51]. Исходя из экспериментальных данных, можно сделать вывод о том, что нарушение структуры белковой последовательности («расплетание» петли) в области остатка 86 нарушает нативную структуру люциферазы в области активного центра, ухудшая активность и стабильность люциферазы.

Анализ свойств мутантов, содержащих множественные аминокислотные замены, указывает на то, что в большинстве случаев эффект множественных замен является аддитивным. Так, мутант C86,146S обладает свойствами, характерными для люциферазы с заменой C86S, поскольку именно эта замена наиболее значительно влияет на свойства фермента. Замены C62, 146S и C146, 164S также обладают свойствами,

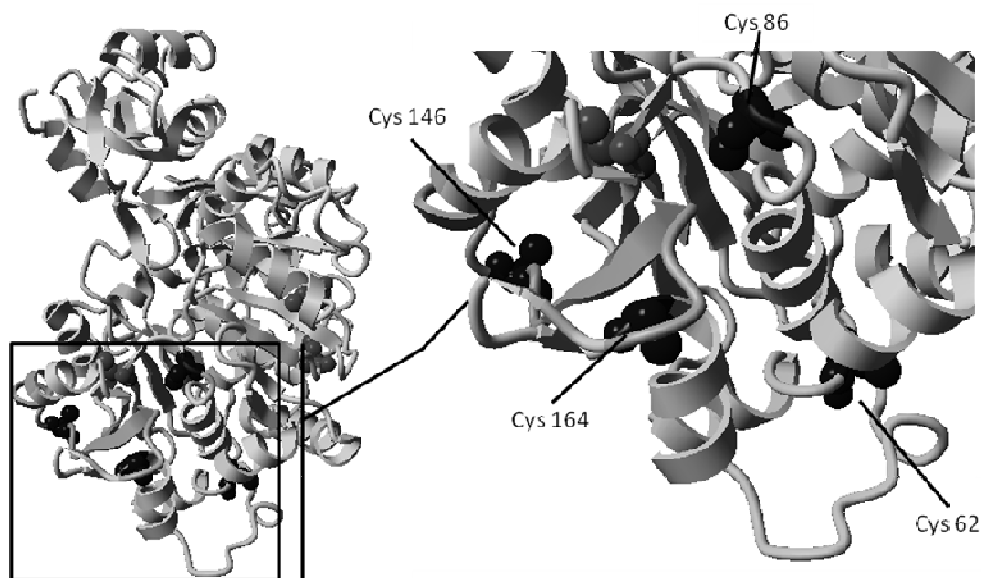


Рис. 7. Фрагмент 3D-структуры *Luciola mingrelica* люциферазы, включающей остатки C62 и C164

характерными для люцифераз с соответствующими единичными заменами. Однако комбинация C62, 164S привела к резкому падению уровня экспрессии фермента, уменьшению его удельной активности и стабильности, увеличению K_m^{ATP} по сравнению с параметрами, характерными для ферментов с единичными заменами C62S и C164S. Все это свидетельствует о неаддитивном эффекте данных замен. Анализ трехмерной структуры люциферазы светлячков показывает, что остатки C62 и C164 входят в состав двух близко расположенных α -спиралей (рис. 7). Таким образом, в то время как единичные мутации в области расположения данных остатков не оказывают существенного эффекта на свойства фермента, что, вероятно, связано с возможностью фермента «компенсировать» введение данных замен, наличие двойной замены оказывает влияние на взаимное расположение и взаимодействие двух α -спиралей, в состав которых входят данные остатки.

Таким образом, каждый остаток цистеина в молекуле люциферазы выполняет различную, специфическую роль в поддержании активной и стабильной структуры фермента. Это определяется его локализацией в глобуле, близостью или удаленностью от активного центра и природой микроокружения.

6. Стабилизация люцифераз введением дисульфидных мостиков методом сайт-направленного мутагенеза

Люциферазы светлячков относятся к пероксисомальным ферментам и не содержат дисульфидных мостиков [86]. При экспрессии в *E. coli* люциферазы также не могут образовывать дисульфидных связей благодаря восстановительному микроокружению цитоплазмы. С другой стороны, введение дисульфидных связей является одним из эффективных методов повышения термостабильности ферментов [33]. Недавно попытка введения дисульфидных связей была предпринята для *P. pyralis* люциферазы с использованием метода сайт-направленного мутагенеза [87, 88]. *P. pyralis* люцифераза содержит четыре цистеиновых остатка (81, 216, 258 и 391). Компьютерный анализ 3D-структуры люциферазы выявил 150 пар аминокислотных остатков, которые в принципе могут быть использованы для замены на остатки цистеина и последующего образования дисульфидных мостиков. Но были выбраны только две пары остатков, по размеру сходные с остатком цистеина: A103 и S121, удаленные от активного центра, и A296 и A326, расположенные вблизи активного центра. Затем были получены два различных мутанта, каждый содержал лишь одну дисульфидную связь: A103C/S121C и A296C/A326C. Удельная активность мутанта A296C/A326C увеличилась в 7,25 раза, а мутант A103C/S121C имел лишь 80 % активности по сравнению с WT-ферментом. Оба мутанта были более стабильны: при 40 °C после 5 минут инкубации мутанты A296C/A326C и A103C/S121C сохраняли примерно 88 % и 22 % активности соответственно, в то время как WT-фермент полностью инактивировал. С использованием методов циркулярного дихроизма и флуоресценции были выявлены конформационные изменения в структуре мутантной люциферазы: более «жесткое» окружение ароматических остатков, повышенная компактность третичной структуры и заметное увеличение содержания α -спиралей. Введение дисульфидной связи в мутант A296C/A326C не оказало дестабилизирующего влияния на фермент, но привело к заметным изменениям как во вторичной, так и в третичной структуре белка и отразилось на свойствах активного центра люциферазы. Повышенная устойчивость к действию pH и температуры наблюдалась в отсутствие каких-либо стабилизаторов в растворе. Для мутанта A103C/S121C повышение термостабильности было вызвано также изменениями третичной структуры. Степень стабилизации варьировалась от небольшой до нескольких раз подобно

тому, что было достигнуто ранее при введении единичных мутаций, таких как A217L [66, 67] или E354K [69]. Дисульфидные связи A103C–S121C и L306C–L309C приводили к наиболее заметной стабилизации, но в то же время активность падала на 20 % или даже на 95 %, соответственно. С другой стороны, при введении дисульфидных связей C81–A105C и A296C/A326C активность возрастала в 2 и 7 раз соответственно.

7. Направленная эволюция люцифераз светляков

Как было упомянуто выше, использование сайт-направленного мутагенеза может потребовать экстенсивного и трудоемкого анализа предполагаемых для мутации позиций в белковой глобуле, к тому же результаты, полученные для одной люциферазы, не всегда могут быть перенесены на другую. В связи с этим большого внимания заслуживает метод направленной эволюции, который был успешно использован для улучшения различных свойств ферментов: термостабильности, энантиоселективности, субстратной специфичности, активности в неприродном окружении [89, 90]. С другой стороны, люциферазы светляков имеют явное преимущество перед многими другими ферментами, поскольку скрининг их мутантов можно осуществлять без выделения фермента из клеток *E. coli*, а лишь определяя люциферазную активность по свечению колоний клеток, т. е. в условиях *in vivo*. Это делает стратегию направленной эволюции наиболее предпочтительной для улучшения различных свойств люцифераз. Именно эта стратегия многочисленных последовательных циклов случайного мутагенеза и скрининга используется для значительного улучшения целевого свойства фермента. Этот подход особенно эффективен, если доступна простая процедура скрининга, как это имеет место в случае люцифераз. В таком случае направленная эволюция может быть эффективнее, чем рациональный белковый дизайн. В противном случае процедура скрининга может быть очень дорогостоящей и трудоемкой [34, 35]. Однако до наших работ был известен только один пример использования направленной эволюции для увеличения стабильности люциферазы светляков. Наиболее стабильная из известных к настоящему времени люцифераз светляков, мутантная *Photuris pennsylvanica* люцифераза, была получена методом направленной эволюции. Так называемая «Ultraglow люцифераза» содержит 28 замен аминокислотных остатков и имеет полупериод жизни 27 часов при 65 °C [91, 92]. В этом случае сложная автоматическая роботизированная система была использована для скри-

нинга мутантов, которая позволяла одновременный мониторинг нескольких кинетических параметров и термостабильности. Возможно, сложность и высокая стоимость этой роботизированной системы не способствовала более широкому распространению метода направленной эволюции для люцифераз. Другим недостатком полученного мутанта было то, что этот суперстабильный мутант имел низкую активность — всего 4 % по сравнению с WT *P. pyralis* люциферазой [72]. Мы использовали гораздо более простую, но эффективную стратегию *in vivo* скрининга, чтобы получить термостабильную форму *L. mingrelica* люциферазы с сохранением ее каталитической активности [84].

Исходная рекомбинантная *L. mingrelica* люцифераза недостаточно стабильна: полупериод ее инактивации при 37 °C составляет 50 минут, и последовательные циклы случайного мутагенеза были использованы, чтобы увеличить термостабильность *L. mingrelica* люциферазы без уменьшения ее активности. Известно, что клетки *E. coli* устойчивы при температурах вплоть до 55 °C [93], и возможность измерения биолуминесцентной активности *in vivo* позволила идентифицировать термостабильные мутанты простым, нелетальным *in vivo* скринингом колоний *E. coli*, содержащих мутантные люциферазы. При инкубации колоний *E. coli* при повышенной температуре инактивировали менее стабильные мутанты люциферазы, а более термостабильные проявляли остаточную биолуминесцентную активность, и их мы легко детектировали, фотографируя *in vivo* биолуминесценцию колоний. При этом клетки *E. coli* сохраняли жизнеспособность после инкубации при повышенных температурах и последующей детекции *in vivo* биолуминесценции. Так как для идентификации термостабильных мутантов использовали процедуру скрининга, не требовавшую разрушения клеток колоний *E. coli*, то это избавляло от необходимости получать реплики колоний, что заметно упрощало и ускоряло процесс отбора [84, 94].

Для случайного мутагенеза методом ПЦР пониженной точности была использована плаزمида pLR3 (Генбанк No. HQ007051) [78], содержащая ген *L. mingrelica* люциферазы. При случайном мутагенезе желательно, чтобы на мутируемом участке в среднем была замена одной аминокислоты (2–3 замены нуклеотидов), что обычно соответствует 30–40 % активных клонов в получаемой библиотеке. Случайный мутагенез проводили на участке гена, кодирующем 130–391 из 548 аминокислотных остатков люциферазы, поскольку описанные в литературе мутанты с повышенной термостабильностью имеют мутации именно в этой части молекулы. Скрининг 1000 колоний, как известно, позволяет

Таблица 3

Мутанты *Luciola mingrelica* люциферазы, полученные
в четырех циклах направленной эволюции

Цикл	Исходная форма фермента	Число скринированных клонов	Активные клоны, ratio, %	Температура инкубации колоний перед скринингом	Мутантные ферменты*	Замены по отношению к исходной форме фермента
1	S118C	800	53 %	37 °C	1T1	T213S S364C
					1T2 1T3	S364A
2	1T1	900	53 %	50 °C	2T1	K156R A217V
					2T2	E356V
3	2T1	600	65 %	50 °C	3T1 3T2	C146S E356K
					3T3	E356V
4	3T1	1400		55 °C	4TS	R211L

* Мутант с наивысшей термостабильностью для каждого цикла показан жирным шрифтом и подчеркнут. Этот мутант использовался в качестве исходной формы в следующем цикле.

обнаружить несколько пар различных термостабильных мутантов. На чашке Петри диаметром 90 мм можно было проанализировать до 2000–3000 колоний мутантов. В качестве исходной формы для мутагенеза был взят ранее полученный нами мутант S118C, немного более стабильный, чем исходная люцифераза [78]. Наиболее стабильный мутант, идентифицированный в каждом цикле, использовался в качестве исходной формы в следующем цикле мутагенеза (табл. 3).

В первом цикле мутагенеза скрининг колоний проводили сразу после их роста при 37 °C. WT-люцифераза недостаточно стабильна в этих условиях, так что *in vivo* биолюминесценция ее колоний была очень слабая. Но три колонии были отобраны по их яркой биолюминесценции благодаря их повышенной термостабильности (табл. 3). В ходе второго и третьего циклов мутагенез и дополнительная инкубация при 50 °C в течение 40 минут позволили обнаружить мутанты с более высокой стабильностью. Три мутанта, полученных в третьем цикле, светились одинаково ярко после инкубации при 50 °C, но инкубация при 55 °C показала, что мутанты 3T1, 3T2 более стабильны, чем мутант 3T3. После четвертого цикла мутагенеза был идентифицирован мутант 4TS, который

продемонстрировал наивысшую *in vivo* термостабильность среди всех изученных в данной работе мутантов. Он сохранял заметную яркость биолюминесценции после 40 минут инкубации его колоний при 55 °C, в то время как все другие мутанты полностью инактивировали. Более того, мутант 4TS демонстрировал пониженную, но заметную *in vivo* биолюминесценцию после прогревания его колоний в течение 20 минут при 60 °C, в то время как клетки *E. coli* полностью теряют жизне-способность уже через 2 минуты. Возможна и дальнейшая селекция мутантов, но она требует получения реплик колоний.

Сравнение термостабильности мутанта 4TS и WT люциферазы *L. mingrelica* показало, что при 42 °C в TsB1-буфере (50 мМ Трис-ацетат, 20 мМ MgSO₄, 2 мМ ЭДТА, 0.2 мг/мл BSA, pH 7,8) полупериод инактивации мутанта 4TS увеличился в 65 раз (от 9,1 до 592 минут). Чтобы сравнить наши данные с литературными [66, 69, 76,] мы сравнили термостабильность мутанта 4TS и WT-люциферазы в TsB2-буфере (50 мМ Na-фосфат, 410 мМ (NH₄)₂SO₄, 2 мМ ЭДТА, 0,2 мг/мл BSA, pH 7,8) и показали, что буфер TsB2 значительно стабилизирует как мутант 4TS, так и WT-люциферазу. При 45 °C в буфере TsB2 мутант 4TS в 155 раз стабильнее WT люциферазы (рис. 8). Также было отмечено увеличение активности мутанта в 1,9 раза, улучшение K_m по АТФ в 6,7 раза и увеличение активности люциферазы при повышенной температуре [44]. Мутант сохранял 70 % активности в условиях *in vitro* после двух дней инкубации при 37 °C, чего вполне достаточно для большинства применений люциферазы. Мутант 4TS является одним из самых стабильных из известных мутантов люцифераз светляков. Более высокой стабильностью характеризуются лишь термостабильный мутант *L. lateralis* люциферазы [66], мутант с 12 заменами PpI люциферазы [72] и мутант *P. pennsylvanica* люциферазы с 28 заменами [92]. Следует отметить, что активность термостабильного мутанта *L. lateralis* люциферазы немного ниже, чем WT-фермента [93] а два другие имеют гораздо более низкую активность, чем соответствующие WT-люциферазы [72]. Примененная нами стратегия скрининга является наиболее простой из описанных в литературе и потенциально может быть использована для эффективно-го увеличения стабильности других люцифераз светляков и жуков. Так как биолюминесценция детектируется до и после стадии нагревания, это делает маловероятным уменьшение активности для всех отобран-ных мутантов.

Сравнение структуры мутанта 4TS и исходной люциферазы показало, что он содержит 8 мутаций по сравнению с исходной формой фермент:

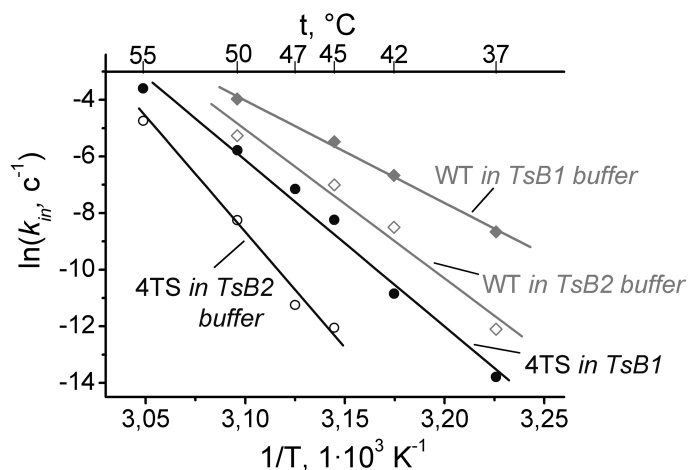


Рис. 8. Зависимости констант скорости инактивации исходной люциферазы и мутанта 4TS от температуры в координатах Аррениуса в буфере TsB1 (закрытые символы) и TsB2 (открытые символы) при концентрации фермента 13 нг/мл [84]

S118C, T213S, K156R, R211L, A217V, C146S, E356K, и S364C. Все замещения относятся к неконсервативным для люцифераз аминокислотным остаткам. Если принять во внимание очередность появления стабилизирующих замен в ходе четырех последовательных циклов мутагенеза (табл. 3), литературные данные по термостабильным мутантам, полученным для других люцифераз, и локализацию мутированных остатков в 3D-структуре люциферазы (рис. 9), то можно с большой вероятностью сказать, что ключевыми мутациями, обеспечившими наблюдаемую высокую термостабильность мутанта 4TS, являются четыре: R211L, A217V, E356K и S364C. Согласно литературным данным, мутации остатка A217 [67] и остатка E356 [69] значительно увеличивали термостабильность люцифераз светляков *Luciola lateralis* и *P. pyralis* соответственно. Стабилизирующий эффект мутации остатков R211 и S364 впервые показан в этой работе. Замены неконсервативных, гидрофильных остатков R211L, A217V, S364C и S364A, расположенных внутри белковой глобулы, на гидрофобные, по-видимому, создают более компактную упаковку внутренней области белка. Это, как известно [75], повышает стабильность белков. Например, введение более объемной боковой группы остатка Val при мутации A217V приводит к заполнению внутрибелковой полости, которая в исходной люциферазе занята молекулой воды [44]. Мутация поверхностного остатка C146S, как известно, повышает устойчивость люциферазы по отношению к окис-

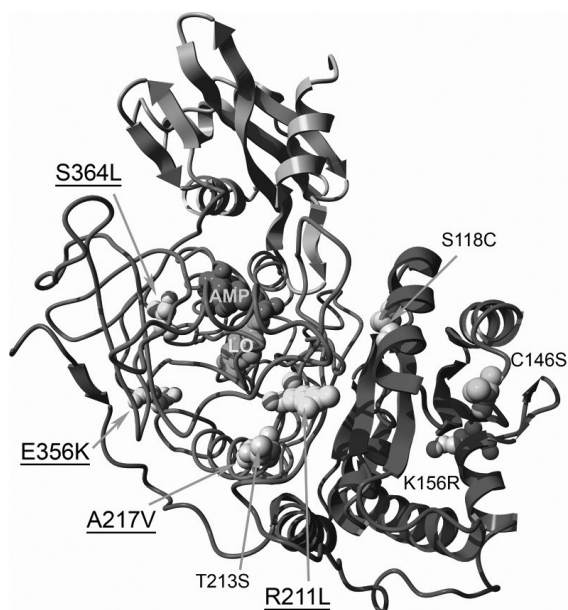


Рис. 9. Гомологичная модель *L. mingrelica* люциферазы, в которой показана локализация замененных остатков в мутанте 4TS. Четыре ключевые мутации, повлиявшие на термостабильность фермента, подчеркнуты. LO и AMP — люциферильная и аденилатная группы аналога продукта реакции, DLSA, (5'-O-[N-(дегидролюциферил)-сульфоил] аденозин). Субдомены A, B и C показаны синим, розовым и оранжевым соответственно. См. цв. вкл., с. 10

лительной инактивации [81]. Именно этот факт может объяснить увеличение стабильности мутанта 4TS по сравнению с WT-люциферазой при хранении в отсутствие DTT. В отсутствие DTT WT-фермент теряет 70 % активности за две недели хранения, в то время как мутант 4TS в течение месяца сохраняют 100 % активности [84]. Мутанты T213S/S364C и S364A имели одни и те же свойства в условиях *in vivo*. Поэтому можно сделать вывод, что замена T213S вряд ли влияет на термостабильность люциферазы. При мутации K156R поверхностный остаток лизина заменяется на сходный по свойствам остаток аргинина, и маловероятно, что эта замена приводит к увеличению стабильности люциферазы. Мутант S118C при 42 °C имел стабильность только в 1,5 раза более высокую, чем исходная рекомбинантная люцифераза. После проведения четырех циклов мутагенеза как исходной люциферазы, так и мутанта S118C была получена мутантная люцифераза, термостабильность которой при 60 °C в условиях *in vivo* была одинакова. Следовательно, наличие мутации S118C в мутанте 4TS не повлияло на его термостабильность.

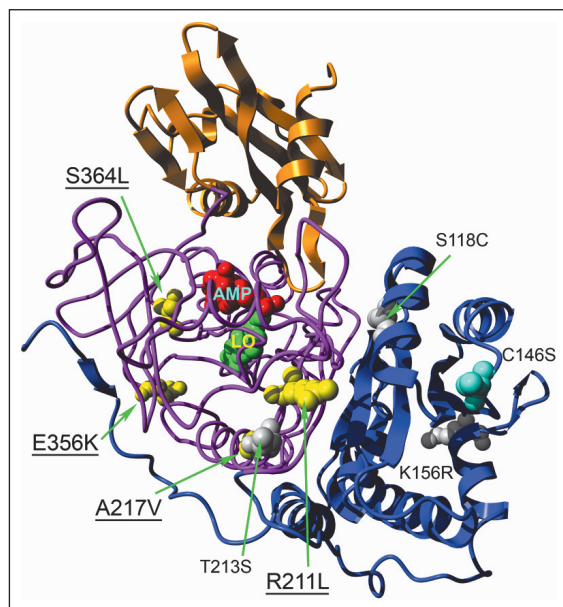


Рис. 9. Гомологичная модель *L. mingrelica* люциферазы, в которой показана локализация замененных остатков в мутанте 4TS. Четыре ключевых мутации, повлиявшие на термостабильность фермента, подчеркнуты. LO и AMP — люциферильная и аденилатная группы аналога продукта реакции, DLSA, (5'-O-[N-(дегидролюциферил)-сульфоил] аденозин). Субдомены А, В и С показаны синим, розовым и оранжевым соответственно

ПЕРЕНОС ЭЛЕКТРОНА В БЕЛКОВЫХ СИСТЕМАХ

А. И. Котельников, Э.С. Медведев, Н.С. Горячев

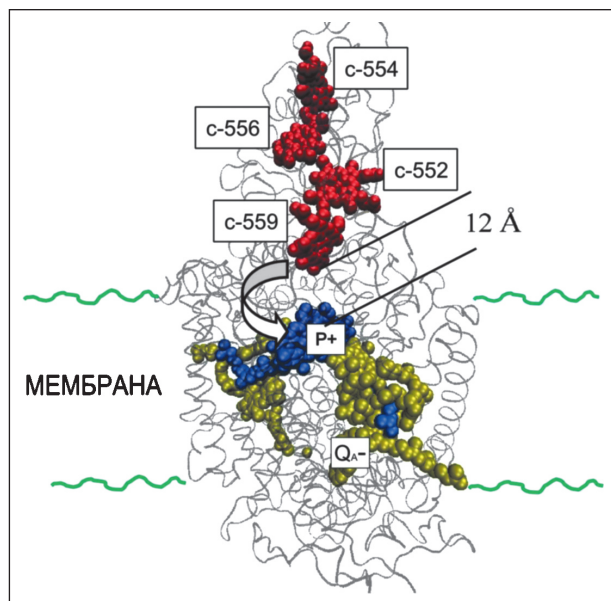


Рис. 1. Структура белкового комплекса реакционного центра с цитохромом из фотосинтезирующих бактерий *Rhodospseudomonas viridis*. Пояснения даны в тексте

Все четыре ключевых остатка, повышающих термостабильность мутанта 4TS (R211L, A217V, E356K и S364C), локализованы во втором субдомене люциферазы. Согласно литературным данным, фрагменты фермента, включающие остатки 1–190 и 422–544, обладают высокой внутренней стабильностью. Эти фрагменты соответствуют субдоменам А и С люциферазы (рис. 9). Средний субдомен (остатки 192–435) обладает меньшей стабильностью и первым разворачивается в денатурирующих условиях [64]. Следовательно, стабильность этого субдомена определяет стабильность и всей глобулы люциферазы. И поэтому неудивительно, что большинство стабилизирующих мутаций, описанных в литературе, локализованы именно во втором субдомене или на границе с первым и третьим доменом. Это было подтверждено и нашими результатами [94]: структурно дестабилизирующая мутация E457K в С-домене не повлияла на термостабильность WT-люциферазы, но в три раза снизила стабильность высокостабильного мутанта 4TS [84], стабилизированного четырьмя мутациями в среднем субдомене. Следовательно, отрицательный эффект на термостабильность люциферазы мутации E457K в третьем субдомене заметен только в том случае, когда второй домен достаточно стабилизирован. Сходная картина наблюдалась для термолизин-подобной протеазы, инактивация которой определялась разворачиванием N-концевой области [33].

8. Инженерия дестабилизированных люцифераз

Высокая стабильность люцифераз светлячков обычно необходима для биоаналитического применения фермента в условиях *in vitro*, а также для условий *in vivo*, когда ген люциферазы используется как репортерный ген. Однако в некоторых случаях желательно иметь люциферазу с коротким периодом жизни в условиях *in vivo* либо просто нестабильную люциферазу. Полупериод жизни WT-люциферазы *P.pyralis* составляет 3–4 часа в животных клетках, что затрудняет детекцию кратковременных изменений в экспрессии гена, когда накапливается ранее синтезированная люцифераза [23]. Введение протеолитического PEST-сайта от орнитин декарбоксилазы мыши в последовательность *P.pyralis* люциферазы уменьшило полупериод жизни фермента до 0,84 часа [23]. Однако даже при введении подобной дестабилизирующей последовательности в ген термостабильной люциферазы могут оставаться некоторые проблемы. Например, более термостабильные *P.pyralis* люциферазы показали небольшой, но заметный сдвиг по фазе

по сравнению с WT-люциферазой при мониторинге циркадных осцилляций экспрессии гена, хотя в оба фермента был введен PEST-сигнал [95]. Недавно была описана система мониторинга коротких процессов экспрессии (быстрые всплески в транскрипции генов животных), в которой была использована короткоживущая м-РНК, кодирующая короткоживущую PEST-содержащую люциферазу светляков [96].

В отличие от использования протеолитического сигнала, который не влияет на внутреннюю стабильность люциферазы, недавно разработана группа структурно дестабилизированных мутантов люциферазы светляков [97]. Такая дестабилизация была достигнута путем введения мутаций R188Q и R261Q вне субстрат связывающего центра, что привело к разрыву двух водородных связей, которые важны для взаимодействия второго и первого субдоменов люциферазы (рис. 3). Эти дестабилизированные мутанты требуют присутствия шаперонов для эффективного сворачивания и поддержания активного состояния и могут служить в качестве репортеров протеостатической способности клеток. Они были успешно использованы как сенсоры внутримолекулярного протеомного стресса при температурах 20–37 °C, в частности в клетках *Caenorhabditis elegans*, растущей при 20 °C [97].

9. Инженерия устойчивости люцифераз по отношению к различным денатурирующим и ингибирующим факторам

Структурные основы стабильности ферментов к другим факторам помимо температуры менее ясны, поэтому случайный мутагенез является наиболее эффективным подходом для получения стабилизированных форм ферментов [34, 35]. И в этом случае фотографическая детекция биолюминесцентной активности является наиболее пригодной для скрининга библиотеки колоний аналогично тому, как это описано выше. Оптимизированная схема анализа [98–100] включает лизис колоний на мембране фильтра, последующую обработку в течение заданного времени лизированных колоний буферным раствором, который содержит исследуемый денатурирующий или ингибирующий фактор, и, наконец, фотографическая детекция биолюминесценции.

Инактивация люциферазы денатурирующими или ингибирующими факторами и соединениями часто лимитирует применение фермента, особенно в случае детекции АТФ в условиях *in vitro*. Однако тип требуемой стабильности обычно весьма специфический и зависит от условий

используемой аналитической системы, в этом случае мутанты имеют более узкое применение, чем термостабильные люциферазы. Например, уровень внутриклеточного АТФ отражает жизнеспособность клеток, и детекция АТФ может быть использована для оценки цитотоксичности промышленных химических соединений [8]. Но сами эти соединения обычно ингибируют люциферазную реакцию и тем самым снижают чувствительность анализа. Случайный мутагенез был использован для идентификации мутантов *P. pyralis* люциферазы, устойчивых к низким концентрациям хлороформа [101]. Схема скрининга на первом этапе включала селекцию колоний мутантов *in vivo*, на нитроцеллюлозной мембране, а на втором — скрининг мутантов в условиях *in vitro*. После двух циклов был получен мутант S239T/D357Y/A532T, активность которого в присутствии 0,5 %-го хлороформа была в 3 раза выше, чем WT люциферазы. Мутант имел также повышенную стабильность в присутствии других органических соединений: этанола, гексана, толуола и др. [101]. Этот же мутант был также более активен в присутствии детергентов, таких как Тритон X-100 и SDS [102].

При мониторинге гигиенической чистоты и определении биомассы биолюминесцентным методом необходима экстракция внутриклеточного АТФ в раствор и точное измерение концентрации АТФ. Важной стадией анализа является быстрая экстракция АТФ, которая должна предохранить высвобождаемую АТФ от разложения [8]. Такие соединения, как бензалконий хлорид (ВАС), диметилсульфоксид — наиболее эффективные экстрагенты внутриклеточного АТФ, но все они сильно уменьшают активность люциферазы. С использованием случайного мутагенеза с последующим скринингом *in vitro* около тысячи активных мутантов по их устойчивости к 0,1 % ВАС был идентифицирован мутант E490K, устойчивость которого к ВАС была на 8–14 % выше, чем WT-люциферазы [93]. Следовательно, получение мутантов люциферазы, устойчивых к различным экстрагентам и органическим ингибиторам, — это весьма актуальная проблема, решение которой может значительно улучшить характеристики люциферазной детекции АТФ.

Другое многообещающее направление исследований, которое еще недостаточно освещено в литературе, — это создание мутантов люциферазы, устойчивых к действию внутриклеточных инактивирующих факторов. Например, изменение внутриклеточного pH и других факторов могут драматически изменить активность люциферазы *in vivo* и тем самым интерпретацию экспериментальных данных [30, 31]. Недавно был разработан биосенсор на основе *P. pyralis* люциферазы для мони-

торинга внутриклеточной концентрации H_2O_2 [103]. Однако в другой работе было показано, что *P. pyralis* люцифераза чувствительна к действию реактивных соединений кислорода (ROS) (включая H_2O_2) и что ее активность *in vivo* в тех системах, где уровень ROS сильно повышается в ходе эксперимента, сильно падает, и это может привести к ошибочным выводам [32].

Одним из факторов, который снижает время жизни люцифераз в условиях *in vivo*, является чувствительность люцифераз к действию протеаз. Правильно сформированные белки относительно устойчивы к действию протеаз, но при повышенных температурах происходит частичное разворачивание белковой глобулы, что открывает в структуре фермента сайты, чувствительные к действию протеаз. Как правило, устойчивость к протеолизу увеличивается с увеличением общей или локальной конформационной стабильности белка [64]. Другой подход состоит в том, чтобы убрать из структуры фермента сайты, распознаваемые протеазами, хотя в люциферазах некоторые из этих сайтов локализованы в активном центре [104]. Однако была сделана успешная попытка в этом направлении: в пять раз увеличился полупериод жизни в условиях триптического протеолиза мутантов *P. pyralis* люциферазы с заменами R213M и R337Q [105]. Такие мутантные люциферазы могут быть привлекательными для экспериментов *in vivo* как ген-репортеры.

Заключение

Анализ литературы показывает значительные достижения в инженерии стабильности люцифераз светляков. Несколько высокотермостабильных мутантов люцифераз стали доступными для практического использования, которые соответствуют требованиям биолуминесцентных систем детекции. Много специфических позиций идентифицированы в структуре люцифераз, которые в принципе могут быть использованы для получения новых перспективных мутантных люцифераз. Гидрофилизация неконсервативных поверхностных гидрофобных остатков и гидрофобизация неконсервативных полярных остатков, локализованных во внутренних областях белковой глобулы, по-видимому, является эффективным рациональным подходом увеличения термостабильности люцифераз. Легкость и эффективность скрининга люцифераз в условиях *in vivo* способствует тому, что наиболее эффективной стратегией является направленная эволюция, которая позволяет быстро идентифицировать термостабильные мутанты, сохраняющие высокую

ферментативную активность. Именно метод направленной эволюции следует использовать в первую очередь, если стоит задача повышения стабильности любой люциферазы светляков. После того как наиболее высокая термостабильность мутанта достигнута с помощью направленной эволюции, можно продолжить оптимизацию свойств люциферазы. Например, найти наиболее эффективные замены для идентифицированных позиций, добавить другие известные термостабилизирующие мутации и элиминировать те мутации, которые оказывают нежелательный эффект на свойства люциферазы, такие, например, как сдвиг максимума в спектре биолуминесценции [29]. Разработка люцифераз, устойчивых к действию инактивирующих агентов в условиях специфических аналитических систем *in vitro* или *in vivo*, еще остается не до конца решенной задачей и весьма перспективной в генетической инженерии люцифераз, что могло бы значительно увеличить чувствительность биолуминесцентных методов детекции и расширило бы области применения люцифераз светляков.

Список литературы

1. Wilson T. & Hastings J. Bioluminescence // Annual Review of Cell and Developmental Biology. 1998. Vol. 14. 1. P. 197–230.
2. Fraga H. Firefly luminescence: A historical perspective and recent developments // Photochem Photobiol Sci. 2008. Vol. 7. P. 146–158.
3. Seliger H., McElroy W. Spectral emission and quantum yield of firefly bioluminescence // Arch. Biochem. Biophys. 1960. Vol. 88(1. P. 136–141
4. Ugarova N. Structure and functions of firefly luciferase // Chemical and Biological Kinetics / S. D. Varfolomeev & E. B. Burlakova (Eds.). Leiden, The Netherlands: Koninklijke, 2005. Vol. 2. P. 205–233.
5. Hosseinkhani S. Molecular enigma of multicolor bioluminescence of firefly luciferase // Cell Mol Life Sci. 2011. Vol. 68. P. 1167–1182.
6. Viviani V. R. The origin, diversity, and structure function relationships of insect luciferases // Cell Mol Life Sci. 2002. Vol. 59. P. 1833–1850
7. Keyaerts M., Caveliers V., Lahoutte T Bioluminescence imaging: looking beyond the light // Trends Mol Med. 2012. Vol. 18. P. 164–172.
8. Lundin A. Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites // Methods Enzymol. 2000. Vol 305. P. 346–370.
9. Eriksson J., Nordstrom T., Nyren P. Method enabling firefly luciferase-based bioluminometric assays at elevated temperatures // Anal Biochem. 2003. Vol. 314. P. 158–161.
10. Badr C. E., Tannous B. A. Bioluminescence imaging: progress and applications // Trends Biotechnol. 2011. Vol. 29. P. 624–633.
11. Prescher J. A., Contag C. H. Guided by the light: visualizing biomolecular processes in living animals with bioluminescence // Curr Opin Chem Biol. 2010. Vol. 14. P. 80–89.
12. Awais M., Ozawa T. Illuminating intracellular signaling and molecules for single cell analysis // Mol Bio Syst. 2011. Vol. 7. P. 1376–1387.

13. *Stains C. I., Furman J. L., Porter J. R. et al.* A General Approach for Receptor and Antibody-Targeted Detection of Native Proteins Utilizing Split-Luciferase Reassembly // *ACS Chem Biol.* 2010. Vol. 5. P. 943–952.
14. *Binkowski B., Fan F., Wood K.* Engineered luciferases for molecular sensing in living cells // *Curr Opin Biotechnol.* 2009. Vol. 20. P. 14–18.
15. *Gandelman O. A., Church V. L., Moore C. A. et al.* Novel bioluminescent quantitative detection of nucleic acid amplification in real-time // *PLoS.* 2010. One 5. e14155.
16. *Minekawa T., Ohkuma H., Abe K. et al.* Practical application of bioluminescence enzyme immunoassay using enhancer for firefly luciferin–luciferase bioluminescence // *Luminescence.* 2011. Vol. 26. P. 167–171.
17. *Viviani V. R., Amaral D., Prado R. et al.* A new blue-shifted luciferase from the Brazilian *Amydetes fanestratus* (Coleoptera: Lampyridae) firefly: molecular evolution and structural/functional properties // *Photochem Photobiol Sci.* 2011. Vol. 10. P. 1879–1886.
18. *Oba Y., Mori N., Yoshida M. et al.* Identification and characterization of a luciferase isotype in the Japanese firefly, *Luciola cruciata*, involving in the dim glow of firefly eggs // *Biochemistry.* 2010. Vol. 49. P. 10788–10795.
19. *Amaral D. T., Prado R. A., Viviani V. R.* Luciferase from *Fulgeochlizus bruchi* (Coleoptera: Elateridae), a Brazilian click-beetle with a single abdominal lantern: molecular evolution, biological function and comparison with other click-beetle luciferases // *Photochem Photobiol Sci.* 2012. Vol. 11. P. 1259–1267.
20. *Noguchi T., Ikeda M., Ohmiya Y. et al.* A dual-color luciferase assay system reveals circadian resetting of cultured fibroblasts by co-cultured adrenal glands // *PLoS.* 2012. One 7. e37093.
21. *Branchini B. R., Ablamsky D. M., Murtiashaw M. H. et al.* Thermostable red and green light-producing firefly luciferase mutants for bioluminescent reporter applications // *Anal Biochem.* 2007. Vol. 361. P. 253–262.
22. *Li X., Nakajima Y., Niwa K. et al.* Enhanced red-emitting railroad worm luciferase for bioassays and bioimaging // *Protein Sci.* 2010. Vol. 19. P. 26–33.
23. *Leclerc G. M., Boockfor F. R., Faught W. J. et al.* Development of a destabilized firefly luciferase enzyme for measurement of gene expression // *BioTechniques.* 2000. Vol. 29. P. 590–601.
24. *Baggett B., Roy R., Momen S. et al.* Thermostability of firefly luciferases affects efficiency of detection by in vivo bioluminescence // *Mol Imaging.* 2004. Vol. 3. P. 324–332.
25. *Souren J. E. M., Wiegant F. A. C., Hof P. V. et al.* The effect of temperature and protein synthesis on the renaturation of firefly luciferase in intact H9c2 cells // *Cell Mol Life Sci.* 1999. Vol. 55. P. 1473–1481.
26. *Forreiter C., Kirschner M., Nover L.* Stable transformation of an *Arabidopsis* cell suspension culture with firefly luciferase providing a cellular system for analysis of chaperone activity in vivo // *Plant Cell.* 1997. Vol. 9. P. 2171–2181.
27. *Bloom J. D., Labthavikul S. T., Otey C. R. et al.* Protein stability promotes evolvability // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006. Vol. 103. P. 5869–5874.
28. *Harwood K. R., Mofford D. M., Reddy G. R. et al.* Identification of mutant firefly luciferases that efficiently utilize aminoluciferins // *Chem Biol.* 2011. Vol. 18. P. 1649–1657.
29. *Branchini B. R., Ablamsky D. M., Davis A. L. et al.* Red-emitting luciferases for bioluminescence reporter and imaging applications // *Anal Biochem.* 2010. Vol. 396. P. 290–297.
30. *Koop A., Cobbold P. H.* Continuous bioluminescent monitoring of cytoplasmic ATP in single isolated rat hepatocytes during metabolic poisoning. *Biochem J.* 1993. Vol. 295. P. 165–170.

31. Gandelman O., Allue I., Bowers K. et al. Cytoplasmic factors that affect the intensity and stability of bioluminescence from firefly luciferase in living mammalian cells // J Biolumin Chemilumin. 1994. Vol. 9. P. 363–371.
32. Czupryna J., Tsourkas A. Firefly luciferase and Rluc8 exhibit differential sensitivity to oxidative stress in apoptotic cells // PLoS. 2011. One 6. e20073.
33. Eijssink V. G., Bjork A., Gaseidnes S. et al. Rational engineering of enzyme stability // J Biotechnol. 2004. Vol. 113. P. 105–120.
34. Eijssink V. G., Gaseidnes S., Borchert T. V. et al. Directed evolution of enzyme stability // Biomol Eng. 2005. Vol. 22. P. 21–30.
35. Kuchner O., Arnold F. H. Directed evolution of enzyme catalysts // Trends Biotechnol. 1997. Vol. 15. P. 523–530.
36. Ugarova N., Brovko L., Kutuzova G. Bioluminescence and bioluminescent analysis: recent development in the field // Biochemistry (Moscow). 1993. Vol. 58. № 9. P. 976–992.
37. De Wet J., Wood K., Helinski D. et al. Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in Escherichia coli // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. Vol. 82. № 23. P. 7870–7873.
38. Wood K., Lam Y., Seliger H. et al. Complementary DNA coding click beetle luciferases can elicit bioluminescence of different colors // Science. 1989. Vol. 244. № 4905. P. 700–702.
39. Devine J., Kutuzova G., Green V. et al. Luciferase from the East European firefly *Luciola mingrelica*: cloning and nucleotide sequence of the cDNA, overexpression in Escherichia coli and purification of the enzyme // Biochim Biophys Acta, Gene Structure and Expression. 1993. Vol. 1173. № 2. P. 121–132.
40. Arnoldi F., Neto A., & Viviani V. Molecular insights on the evolution of the lateral and head lantern luciferases and bioluminescence colors in Mastinocerini railroadworms (Coleoptera: Phengodidae) // Photochem Photobiol Sc. 2010. Vol. 9. № 1. P. 87–92.
41. Li X., Yang S., & Liang X. Phylogenetic relationship of the firefly, *Diaphanes pectinealis* (Insecta, Coleoptera, Lampyridae), based on DNA sequence and gene structure of luciferase // Zool Res. 2006. Vol. 27. № 4. P. 367–374.
42. Ugarova N., Brovko L. Protein structure and bioluminescent spectra for firefly bioluminescence // Luminescence. 2002. Vol. 17. № 5. P. 321–330.
43. Oba Y., Kumazaki M., Inouye S. Characterization of luciferases and its paralogue in the Panamanian luminous click beetle *Pyrophorus angustus*: A click beetle luciferase lacks the fatty acyl-CoA synthetic activity // Gene. 2010. Vol. 452. № 1. P. 1–6.
44. Conti E., Franks N., Brick P. Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes // Structure. 1996. Vol. 4. № 3. P. 287–298.
45. Conti E., Stachelhaus T., Marahiel M. et al. Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S // EMBO J. 1997. Vol. 16. P. 4174–4183.
46. Sandalova T., Ugarova N. Model of the active site of firefly luciferase // Biochemistry (Moscow). 1999. Vol. 64. № 8. P. 962–96.
47. Branchini B., Magyar R., Murtiashaw M. et al. Site-directed mutagenesis of histidine 245 in firefly luciferase: a proposed model of the active site // Biochemistry. 1998. Vol. 37. № 44. P. 15311–15319.
48. Branchini B., Magyar R., Murtiashaw M. et al. Site-directed mutagenesis of firefly luciferase active site amino acids: a proposed model for bioluminescence color // Biochemistry. 1999. Vol. 38. № 40. P. 13223–13230.

49. Branchini B., Murtiashaw M., Magyar R. *et al.* The role of lysine 529, a conserved residue of the acyl-adenylate-forming enzyme superfamily, in firefly luciferase // *Biochemistry*. 2000. Vol. 39. № 18. P. 5433–5440.
50. Branchini B., Magyar R., Murtiashaw M. *et al.* The role of active site residue arginine 218 in firefly luciferase bioluminescence // *Biochemistry*. 2001. Vol. 40. № 8. P. 2410–2418.
51. Branchini B., Southworth T., Murtiashaw M. *et al.* A mutagenesis study of the putative luciferin binding site residues of firefly luciferase // *Biochemistry*. 2003. Vol. 42. № 35. P. 10429–10436.
52. Nakatsu T., Ichiyama S., Hiratake J. *et al.* Structural basis for the spectral difference in luciferase bioluminescence // *Nature*. 2006. Vol. 440. № 7082. P. 372–376.
53. Branchini B., Southworth T., Murtiashaw M. *et al.* Mutagenesis evidence that the partial reactions of firefly bioluminescence are catalyzed by different conformations of the luciferase C-terminal domain // *Biochemistry*. 2005. Vol. 44. № 5. P. 1385–1393.
54. Branchini B., Rosenberg J., Fontaine D. *et al.* Bioluminescence Is Produced from a Trapped Firefly Luciferase Conformation Predicted by the Domain Alternation Mechanism // *J Amer Chem Soc*. 2011. Vol. 133. № 29. P. 11088–11091.
55. Suelter C. H., DeLuca M. How to prevent losses of protein by adsorption to glass and plastic // *Anal Biochem*. 1983. Vol. 135. P. 112–119.
56. Hall M., Leach F. Stability of firefly luciferase in Tricine buffer and in a commercial enzyme stabilizer // *J. Biolum. Chemilum.* 1988. Vol. 2. № 1. P. 41–44.
57. Herbst R., Gast K., Seckler R. Folding of Firefly *Photinus pyralis* Luciferase: Aggregation and Reactivation of Unfolding Intermediates // *Biochemistry*. 1998. Vol. 37. № 18. P. 6586–6597.
58. Brovko L., Belyaeva E., Ugarova N. Subunit interactions in luciferase from the firefly *Luciola mingrelica*. Their role in the manifestation of enzyme activity and the process of thermal inactivation // *Biochemistry (Moscow)*. 1982. Vol. 47. № 5. P. 760–766.
59. Dement'eva E., Kutuzova G., Ugarova N. Biochemical properties and stability of homogeneous luciferase of *Luciola mingrelica* fireflies // *Mosc Univer Chem Bull*. 1989. Vol. 44. № 6. P. 601–606.
60. Mehrabi M., Hosseinkhani S., Ghobadi S. Stabilization of firefly luciferase against thermal stress by osmolytes. *Int J Biol Macromol*. 2008. Vol. 43. P. 187–191.
61. Moroz N., Gurskii D., Ugarova N. Stabilization of ATP reagents containing firefly *L. mingrelica* luciferase by polyols. *Moscow Univ Chem Bull* // 2008. Vol. 63. P. 67–70.
62. Nimmesgern E., Hartl F. U. ATP-dependent protein refolding activity in reticulocyte lysate : Evidence for the participation of different chaperone components // *FEBS Lett*. 1993. Vol. 331. P. 25–30.
63. Lundovskikh I. A., Leontieva O. V., Dementieva E. I. *et al.* Recombinant *Luciola mingrelica* firefly luciferase. Folding in vivo, purification and properties // *Bioluminescence and chemiluminescence: Perspectives for the 21st century* / Roda A, Pazzagli, M., Kricka, L. J., and Stanley, P. E., eds. Chichester: John Wiley & Sons, 1998. P. 420–424.
64. Frydman J., Erdjument-Bromage H., Tempst P. *et al.* Co-translational domain folding as the structural basis for the rapid de novo folding of firefly luciferase // *Nat Struct Mol Biol*. 1999. Vol. 6. P. 697–705.
65. Wang W.-Q., Xu Q., Shan Y.-F. *et al.* Probing local conformational changes during equilibrium unfolding of firefly luciferase: fluorescence and circular dichroism studies of single tryptophan mutants // *Biochem Biophys Res Commun*. 2001. Vol. 282. P. 28–33.
66. Kajiyama N., Nakano E. Enhancement of thermostability of firefly luciferase from *Luciola lateralis* by a single amino acid substitution // *Biosci Biotechnol Biochem*. 1994. Vol. 58. P. 1170–1171.

67. *Kajiyama N., Nakano E.* Thermostabilization of firefly luciferase by a single amino acid substitution at position 217 // *Biochemistry*. 1993. Vol. 32. P. 13795–13799.
68. *Kajiyama N., Masuda T., Tatsumi H. et al.* Purification and characterization of luciferases from fireflies, *Luciola cruciata* and *Luciola lateralis* // *Biochim Biophys Acta*. 1992. Vol. 1120. № 2. P. 228–232.
69. *White P. J., Squirrell D. J., Arnaud P. et al.* Improved thermostability of the North American firefly luciferase: saturation mutagenesis at position 354 // *Biochem J*. 1996. Vol. 319. Pt 2. P. 343–350.
70. *Price R., Squirrell D., Murphy M. et al.* Genetic engineering of firefly luciferase towards its use as a label in gene probe assays and immunoassays // *Proceedings of the 9th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence*. Woods Hole, Massachusetts, 1996. P. 220–223.
71. *Tisi L. C., White P. J., Squirrell D. J. et al.* Development of a thermostable firefly luciferase // *Anal Chim Acta*. 2002. Vol. 457. P. 115–123.
72. *Jathoul A., Law E., Gandelman O. et al.* Development of a pH-tolerant thermostable *Photinus pyralis* luciferase for brighter in vivo imaging // *Bioluminescence — Recent Advances in Oceanic Measurements and Laboratory Applications* / D. Lapota, ed. Rijeka, Croatia: InTech, 2012. P. 119–135.
73. *Law G. H., Gandelman O. A., Tisi L. C. et al.* Mutagenesis of solvent-exposed amino acids in *Photinus pyralis* luciferase improves thermostability and pH tolerance // *Biochem J*. 2006. Vol. 397. P. 305–312.
74. *Mortazavi M., Hosseinkhani S.* Design of thermostable luciferases through arginine saturation in solvent-exposed loops // *Protein Eng Des Sel*. 2011. Vol. 24. P. 893–903.
75. *Fersht A. R., Serrano L.* Principles of protein stability derived from protein engineering experiments // *Curr Op Struct Biol*. 1993. Vol. 3. P. 75–83.
76. *Kitayama A., Yoshizaki H., Ohmiya Y. et al.* Creation of a thermostable firefly luciferase with pH-insensitive luminescent color // *Photochem Photobiol*. 2003. Vol. 77. P. 333–338.
77. *Koksharov M. I., Ugarova N. N.* Triple substitution G216N/A217L/S398M leads to the active and thermostable *Luciola mingrelica* firefly luciferase // *Photochem Photobiol Sci*. 2011. Vol. 10. P. 931–938.
78. *Koksharov M., Ugarova N.* Random mutagenesis of *Luciola mingrelica* firefly luciferase. Mutant enzymes whose bioluminescence spectra show low pH-sensitivity // *Biochemistry (Moscow)*. 2008. Vol. 73. № 8. P. 862–869.
79. *Dement'eva E., Zheleznova E., Kutuzova G. et al.* Physicochemical properties of recombinant *Luciola mingrelica* luciferase and its mutant forms // *Biochemistry (Moscow)*. 1996. Vol. 61. № 1. P. 115–119.
80. *Kumita J., Jain L., Safroneeva E. et al.* G. cysteine-free firefly luciferase retains luminescence activity // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2000. Vol. A 267. № 4. P. 394–397.
81. *Lomakina G., Modestova Y., Ugarova N.* Enhancement of thermostability of the east european firefly (*Luciola mingrelica*) luciferase by site-directed mutagenesis of nonconservative cysteine residues Cys62 and Cys146 // *Mosc Univ Chem Bull*. 2008. Vol. 63. № 2. P. 63–66.
82. *Modestova Y., Lomakina G., Ugarova N.* Temperature dependence of thermal inactivation of *L.mingrelica* firefly luciferase and its mutant forms with C62S, C146S and C164S single point mutations // *Luminescence*. 2010. Vol. 25. № 2. P. 184–185.
83. *Modestova Y., Lomakina G., Ugarova N.* Site-directed mutagenesis of cysteine residues of *Luciola mingrelica* firefly luciferase. *Biochemistry (Moscow)*. 2011. Vol. 76. P. 1147–1154.

84. Koksharov M. I., Ugarova N. N. Thermostabilization of firefly luciferase by in vivo directed evolution // *Protein Eng Des Sel*. 2011. Vol. 24. P. 835–844.
85. Raso S., Clark P., Haase-Pettingell C. *et al.* Distinct cysteine sulfhydryl environments detected by analysis of Raman S-hh markers of Cys→Ser mutant proteins // *J Mol Biol*. 2001. Vol. 307. № 3. P. 899–911.
86. Ohmiya Y. & Tsuji F. Mutagenesis of firefly luciferase shows that cysteine residues are not required for bioluminescence activity // *FEBS Letters*. 1997. Vol. 404. № 2. P. 115–117.
87. Imani M., Hosseinkhani S., Ahmadian S. *et al.* Design and introduction of a disulfide bridge in firefly luciferase: increase of thermostability and decrease of pH sensitivity // *Photochem Photobiol Sci*. 2010. Vol. 9. P. 1167–1177.
88. Nazari M., Hosseinkhani S. Design of disulfide bridge as an alternative mechanism for color shift in firefly luciferase and development of secreted luciferase // *Photochem Photobiol Sci*. 2011. Vol. 10. P. 1203–1215.
89. Jäckel C., Kast P., Hilvert D. Protein Design by Directed Evolution // *An Rev Biophys*. 2008. Vol. 37. № 1. P. 153–173.
90. Turner N. Directed evolution drives the next generation of biocatalysts // *Nature Chem Biol*. 2009. Vol. 5. № 8. P. 567–573.
91. Hall M. P., Gruber M. G., Hannah R. *et al.* Stabilization of firefly luciferase using directed evolution // *ABioluminescence and chemiluminescence: Perspectives for the 21st century* / M. P. Roda, L. J. Kricka and P. E. Stanley, eds. Chichester: John Wiley & Sons, 1998. P. 392–395.
92. Wood K. V., Hall M. P. Thermostable luciferases and methods of production // *PCT Patent Appl*. 1999. WO 1999/014336.
93. Hattori N., Kajiyama N., Maeda M. *et al.* Mutant luciferase enzymes from fireflies with increased resistance to benzalkonium chloride // *Biosci Biotechnol Biochem*. 2002. Vol. 66. P. 2587–2593.
94. Koksharov M. I., Ugarova N. N. Combined effect of mutations stabilizing green and red emitters on bioluminescence of firefly luciferase // *Luminescence*. 2012. Vol. 27. P. 127–128.
95. Nakajima Y., Yamazaki T., Nishii S. *et al.* Enhanced beetle luciferase for high-resolution bioluminescence imaging // *PLoS*. 2010. One 5. e10011.
96. Suter D. M., Molina N., Gatfield D. *et al.* Mammalian genes are transcribed with widely different bursting kinetics // *Science*. 2011. Vol. 332. P. 472–474.
97. Gupta R., Kasturi P., Bracher A. *et al.* Firefly luciferase mutants as sensors of proteome stress // *Nat Methods*. 2011. Vol. 8. P. 879–884.
98. Allen S. J., Holbrook J. J. Production of an activated form of *Bacillus stearothermophilus* L-2-hydroxyacid dehydrogenase by directed evolution // *Protein Eng*. 2000. Vol. 13. P. 5–7.
99. Song J. K., Rhee J. S. Enhancement of stability and activity of phospholipase A(1) in organic solvents by directed evolution // *Biochim Biophys Acta*. 2001. Vol. 1547. P. 370–378.
100. Dahlroth S.-L., Nordlund P., Cornvik T. Colony filtration blotting for screening soluble expression in *Escherichia coli* // *Nat Protoc*. 2006. Vol. 1. P. 253–258.
101. Kim-Choi E., Danilo C., Kelly J. *et al.* Creating a mutant luciferase resistant to HPV chemical inhibition by random mutagenesis and colony-level screening // *Luminescence*. 2006. Vol. 21. P. 135–142.
102. Kim-Choi E., Danilo C., Kelly J. *et al.* Kinetic characterization and in vitro toxicity evaluation of a luciferase less susceptible to HPV chemical inhibition // *Toxicol in Vitro*. 2006. Vol. 20. P. 1537–1547.

103. *Van de Bittner G. C., Dubikovskaya E. A., Bertozzi C. R. et al.* In vivo imaging of hydrogen peroxide production in a murine tumor model with a chemoselective bioluminescent reporter // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010. Vol. 107. P. 21316–21321.
104. *Thompson J. F., Geoghegan K. F., Lloyd D. B. et al.* Mutation of a protease-sensitive region in firefly luciferase alters light emission properties // *J Biol Chem*. 1997. Vol. 272. P. 18766–18771.
105. *Riahi-Madvar A., Hosseinkhani S.* Design and characterization of novel trypsin-resistant firefly luciferases by site-directed mutagenesis // *Protein Eng Des Sel*. 2009. Vol. 22. P. 655–663.

Приложение

Основные описанные мутанты люцифераз светляков

Люцифераза	Свойства мутанта	Метод мутагенеза	Ссылка
<i>Photuris pennsylvanica</i>	Термостабильный мутант (28 замен): полупериод жизни: 27 ч при 65 °C; 4 % активности по сравнению с WT <i>P. pyralis</i> люциферазой [72]	Направленная эволюция	[91, 92]
<i>Photinus pyralis</i>	Группа мутантов с единичными заменами и улучшенной термостабильностью: A215L, T214A, I232A, F295L, E354K	Случайный мутагенез	[69, 71]
	Термостабильный мутант с 4-точечными заменами: T214A/I232A/F295L/E354K: увеличение стабильности в 1,9–5,6 раз при 35–40°C; 56 % активности по сравнению с активностью WT люциферазы	Сайт-направленный мутагенез	[71]
	Термостабильный мутант с 5 точечными заменами: T214A/A215L/ I232A/F295L/E354K: увеличение времени полужизни в 44 раза при 37 °C: от 15 мин до 11,5 ч, сохранение 90 % активности по сравнению с активностью WT люциферазы		[21, 29]
	Термостабильный мутант с 12 точечными заменами: время полужизни 15 мин при 37 °C; 15 % активности по сравнению с активностью WT люциферазы		[72]
	Термостабильный мутант с 5 точечными заменами: F14R/L35Q/V182K/I232K/F465R: увеличение времени полужизни в 6 раз при 43 °C: от 5 до 33 мин; сохранение 82 % активности по сравнению с активностью WT люциферазы	Рациональный дизайн, сайт-направленный мутагенез	[73]

Продолжение таблицы

Люцифe- раза	Свойства мутанта	Метод мутагенеза	Ссыл- ка
	Группа мутантов, содержащих введенные генноинженерным путем дисульфидные связи: умеренное увеличение термостабильности или значительное увеличение активности некоторых мутантов	Рациональ- ный дизайн	[87, 88]
	Мутанты с пониженной чувствительностью к протеазам: R213M и R337Q		[105]
	Структурно дестабилизированные мутанты для мониторинга фолдинга и протеомного стресса в условиях <i>in vivo</i> : R188Q, R261Q и R188Q/R261Q		[97]
	Мутант с 3 заменами S239T/D357Y/A532T с увеличенной устойчивостью к хлороформу и другим органическим растворителям	Случайный мутагенез	[101, 102]
<i>Lampyris turkestanicus</i>	Термостабильный мутант с 5 точечными заменами F14R/L35Q/V182K/I232K/F465R или Q35R/I182R/I232R/E354Q/введение R356: увеличение времени полужизни в 7,6 раза при 35 °C: от 2,6 до 19,2 мин.	Рациональ- ный дизайн, сайт-направ- ленный мута- генез	[74]
<i>Luciola cruciata</i>	Термостабильные мутанты с точечными заменами T217L, T217I, T217V: увеличение времени полужизни в 7,4 раза при 50 °C: от 3,8 до 28 мин	Случайный мутагенез	[67]
<i>Luciola lateralis</i>	Термостабильный мутант с точечной заменой A217L: увеличение времени полужизни в 19 раз при 50 °C: от 6,5 до 125 мин; сохранение 70 % активности по сравнению с WT люциферазой [63]	Сайт-направ- ленный мута- генез	[66]
	Мутант E490K с увеличенной устойчивостью к бензалконий хлориду	Случайный мутагенез	[93]
<i>Luciola (Hotaria) parvula</i>	Мутант с заменой A217L: 0,074 % активности от WT люциферазы; Мутант с заменой E356R: нет влияния на термостабильность; Мутант с заменами E356R/V368A: увеличение времени полужизни в 12 раз при 50 °C: от 18 до 210 мин.	Сайт-направ- ленный мута- генез	[76]
<i>Luciola mingrelica</i>	Термостабильный мутант (4TS) с 7 точечными заменами: увеличение времени полужизни: в 155 раз при 50 °C: от 50 мин до 129 ч; в 158 раз при 45 °C: от 13 мин до 33,4 ч; в 20 раз при 50 °C: от 2,2 до 44 мин; 190 % активности по сравнению с WT люциферазой	Направленная эволюция	[84]

Окончание таблицы

Люцифераза	Свойства мутанта	Метод мутагенеза	Ссылка
	Термостабильный мутант с 3 точечными заменами G216N/A217L/S398M: увеличение времени полу-жизни: в 12 раз при 45°C: от 13 до 280 мин; 70 % активности по сравнению с WT люциферазой	Рациональный дизайн	[77]
	Мутант с заменой C146S: увеличение в 1,3 раза термостабильности при 42°C и устойчивости к окислению	Рациональный дизайн	[81, 83]
<i>Phrixothrix hirtus</i>	Мутанты с заменами I212L/N351K, I212L, I212L/S463R: увеличение термостабильности в экстрактах клеток и в клетках при 37 °C	Сайт-направленный мутагенез SD	[22]