

НАУЧНЫЙ ОБЗОР

УДК 577.152

ЛЮЦИФЕРАЗА СВЕТЛЯКОВ *LUCIOLA MINGRELICA*. ИСТОРИЧЕСКИЙ АСПЕКТ

Наталья Николаевна Угарова¹, Галина Юрьевна Ломакина^{1,2}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии

² Московский государственный технический университет им. Э.Н. Баумана

Автор, ответственный за переписку: Наталья Николаевна Угарова, nugarova@gmail.com

Аннотация. В обзоре представлена история исследований люциферин-люциферазной системы светляков *Luciola mingrelica* на кафедре химической энзимологии МГУ, которые начались в середине 70-х годов прошлого века по инициативе первого заведующего кафедрой профессора И.В. Березина. На основании изучения кинетики ферментативного окисления люциферина была предложена кинетическая схема реакции, согласно которой в водном растворе люциферазная реакция представляет собой нестационарный ферментативный процесс, оборот фермента очень мал из-за медленной диссоциации комплекса фермент-продукт. Анализ спектров биolumинесценции и флуоресценции оксилюциферина (продукта реакции) и его аналогов показал, что кето-енольные таутомеры фенолятной формы оксилюциферина (кетон, енол и енолят-ион) – наиболее вероятные эмиттеры в люциферин-люциферазной системе светляков. Препараты нативной люциферазы, как было показано, содержат фосфолипиды, удаление которых приводит к снижению активности и стабильности фермента. В начале 90-х годов люцифераза *L. mingrelica* была клонирована. Фермент по первичной последовательности оказался близким к другим люциферазам рода *Luciola*, клонированным в Японии (более 80% гомологии), но отличался от ранее изученной люциферазы из американских светляков *P. pyralis* (67% гомологии). С использованием методов случайного и сайт-специфического мутагенеза создана библиотека мутантных форм люциферазы *L. mingrelica* с измененными спектрами биolumинесценции («зеленые» и «красные» люциферазы). Методом направленной эволюции получены термостабильные мутанты люциферазы, в частности, высокоактивный и термостабильный мутант (4TS), на основе которого разработан АТР-реагент, до сих пор широко используемый в биolumинесцентном анализе многими исследователями в нашей стране. Методами генетической инженерии, компьютерного моделирования и сайт-специфического мутагенеза выяснена роль динамической структуры фермента в сложном, трехстадийном окислении люциферина. Показано, что эмиттер (электронно-возбужденный оксилюциферин) является внутримолекулярной меткой в активном центре фермента. Суперпозиция двух или трех форм эмиттера, фиксируемых в спектрах биolumинесценции, указывает на сосуществование в реакционной среде различных конформационных форм люциферазы, находящихся в динамическом равновесии.

Ключевые слова: биolumинесценция, люцифераза светляков, *Luciola mingrelica*, люциферин, АТР, оксилюциферин, эмиттер, кинетика, термостабильность, мутагенез

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2025-66-1-25-42

Список сокращений: АТФ – аденозин-5'-трифосфат, АМР – аденозин-5'-монофосфат, Лус – люцифераза, LH_2 – люциферин, ЛО – оксилуциферин.

Финансирование. Работа выполнена в рамках госрегистрационной темы МГУ имени М.В. Ломоносова АААА-А21-121011290089-4. Номер ЦИТИС: 121041500039-8.

Для цитирования: Угарова Н.Н., Ломакина Г.Ю. Люцифераза светляков *Luciola mingrelica*. Исторический аспект // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2025. Т. 66. № 1. С. 25–42.

SCIENTIFIC REVIEW

FIREFLY LUCIFERASE *LUCIOLA MINGRELICA*. HISTORICAL ASPECT

Natalya N. Ugarova¹, Galina Yu. Lomakina^{1,2}

¹ Department of Chemical Enzymology, Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University

² Bauman Moscow State Technical University

Corresponding author: Natalya N. Ugarova, nugarova@gmail.com

Abstract. The review presents the history of research on the luciferin-luciferase system of fireflies *Luciola mingrelica* at the Department of Chemical Enzymology of MGU, which began in the mid-70s of the last century on the initiative of the first head of the Department, Professor I.V. Berezin. Based on the study of the kinetics of enzymatic oxidation of luciferin, a kinetic scheme of the reaction was proposed, according to which in an aqueous solution the luciferase reaction is a non-stationary enzymatic process, the turnover of the enzyme is very small due to the slow dissociation of the enzyme-product complex. Analysis of the bioluminescence and fluorescence spectra of the reaction product – oxyluciferin – and its analogues led to the conclusion, that keto-enol tautomers of the phenolate forms of oxyluciferin (ketone, enol and enolate ion) are the most likely emitters in the luciferin-luciferase system of fireflies. Native luciferase preparations have been shown to contain phospholipids, the removal of which leads to a decrease in the activity and stability of the enzyme. At the beginning of the 90s, luciferase *L. mingrelica* was cloned. The enzyme in the primary sequence turned out to be close to other luciferases of the genus *Luciola*, cloned in Japan (more than 80% homology), but differed from the previously studied luciferase from american *P. pyralis* firefly (67% homology). Using methods of random and site-specific mutagenesis, a library of mutant forms of *L. mingrelica* luciferase with altered bioluminescence spectra (“green” and “red” luciferases) was created. Thermostable mutants of luciferase were obtained by the method of directed evolution, in particular, a highly active and thermostable mutant (4TS), on the basis of which an ATP-reagent was developed, which is still widely used in bioluminescent analysis by many researchers in our country. Methods of genetic engineering, computer modeling and site-specific mutagenesis have been used to clarify the role of the dynamic structure of the enzyme in the complex, three-stage oxidation of the luciferin. It has been shown that the emitter (electronically excited oxyluciferin) is an intramolecular label in the enzyme active site. The superposition of two or three emitter forms fixed in the bioluminescence spectra indicates the coexistence of various conformational forms of luciferase in the reaction medium, which are in dynamic equilibrium.

Keywords: bioluminescence, firefly luciferase, *Luciola mingrelica*, luciferin, ATP, oxyluciferin, emitter, kinetics, thermal stability, mutagenesis

List of abbreviations: ATP – adenosine-5'-triphosphate, AMP – adenosine-5'-monophosphate, Luc – luciferase, LH_2 – luciferin, LO – oxyluciferin.

Financial support. The work was carried out within the framework of the state registration topic of Lomonosov Moscow State University AAAA21-121011290089-4. CITIS number: 121041500039-8.

For citation: Ugarova N.N., Lomakina G.Yu. Firefly luciferase *Luciola mingrellica*. Historical Aspect // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Chemistry. 2025. T. 66. № 1. S. 25–42.

Биолюминесценция светляков с античных времен вызывает восхищение людей, но только в конце XIX в. было установлено, что это явление – результат окисления органического соединения (субстрата люциферина) под действием фермента люциферазы [1]. Современный этап изучения люцифераз светляков начался в конце 40-х годов прошлого века, когда молодой американский ученый Д. Мак-Элрой установил, что необходимым косубстратом в этой реакции является АТР, важнейший внутриклеточный метаболит, определяющий энергетический статус организма [2]. Люциферин-люциферазная система светляков легла в основу быстрого, специфичного и высокочувствительного метода определения АТР. Расширились исследования механизма действия люциферазы из американских светляков *Photinus pyralis* [3]. В нашей стране некоторые исследователи получали экстракты из российских светляков и использовали их для измерения концентрации АТР. В середине 70-х годов по инициативе профессора И.В. Березина на кафедре химической энзимологии МГУ стали изучать кинетику и механизм действия люциферазы светляков *Luciola mingrellica*, обитающих в нашей стране, началась разработка на его основе биоаналитических систем для практического использования в биотехнологии, экологии и медицине. Настоящий обзор посвящен рассмотрению основных достижений российских ученых по данному вопросу.

Нативная люцифераза светляков *Luciola mingrellica*. Кинетика и механизм действия

Люцифераза светляков представляет интерес не только как специфический реагент для определения микроколичеств АТР, но и как уникальный биокатализатор высокоэффективной биоконверсии энергии в свет. Люцифераза *L. mingrellica*, как оказалось, по биохимическим и кинетическим свойствам сходна с люциферазой *P. pyralis* [4]. Биолюминесцентное окисление люциферина – сложный многостадийный процесс, который протекает через образование тройного фермент-субстратного комплекса, затем через ряд промежуточных стадий образуется электронно-возбужденный продукт при переходе которого в основное состояние с высоким кван-

товым выходом наблюдается эмиссия видимого света [5] (рис. 1).

Кинетика ферментативного окисления люциферина светляков в присутствии люциферазы *L. mingrellica* была изучена в 0,1 М трис-ацетатном буферном растворе в широком временном диапазоне (от миллисекунд до часов) при разных концентрациях люциферина и АТР [6]. В результате была предложена кинетическая схема, которая включает четыре последовательно-параллельные стадии процесса (рис. 2). Интенсивность биолюминесценции характеризует скорость выделения квантов света, она пропорциональна концентрации промежуточного продукта (EP1):

$$I = d[N]/dt = k_3[EP1].$$

В водных растворах кинетические кривые биолюминесценции имеют вид кривых с максимумом. Уравнение Михаэлиса – Ментен формально выполняется только в точке максимума кинетической кривой [7]. Особенность люциферазной реакции состоит в том, что степень превращения субстратов довольно низкая, а спад интенсивности свечения после достижения максимума не объясняется ни расходом субстратов, ни ингибированием фермента продуктом или субстратами реакции. Анализ кинетики биолюминесценции в начальном периоде реакции (0,5–30 мс) методом «остановленной струи», а также анализ интегральных кинетических кривых (вплоть до 99% спада свечения) [6] показал, что кинетическая кривая имеет индукционный период (1,0–3,0 мс), затем следует моноэкспоненциальное возрастание свечения до точки максимума (0,15–0,40 с) и последующий длительный спад интенсивности практически до нуля в течение нескольких часов (рис. 3). Период индукции уменьшается с ростом концентрации субстратов и фермента и, следовательно, обусловлен первой стадией процесса – образованием фермент-субстратного комплекса (рис. 3, а). Вторая стадия (превращение тройного комплекса ES_1S_2 в EP_1 с $k_2 = 20 \text{ с}^{-1}$) лимитирует биолюминесценцию до достижения максимума свечения. Третья стадия (спад биолюминесценции) описывается комбинацией нескольких экспонент (k_3 и k_4), параметры которых были определены

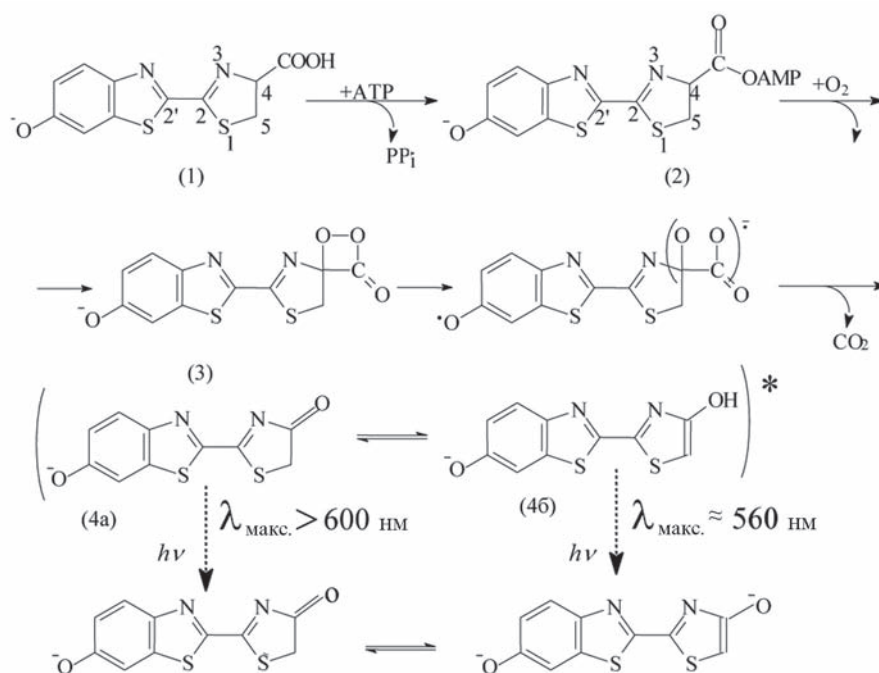


Рис. 1. Схема реакции окисления люциферина

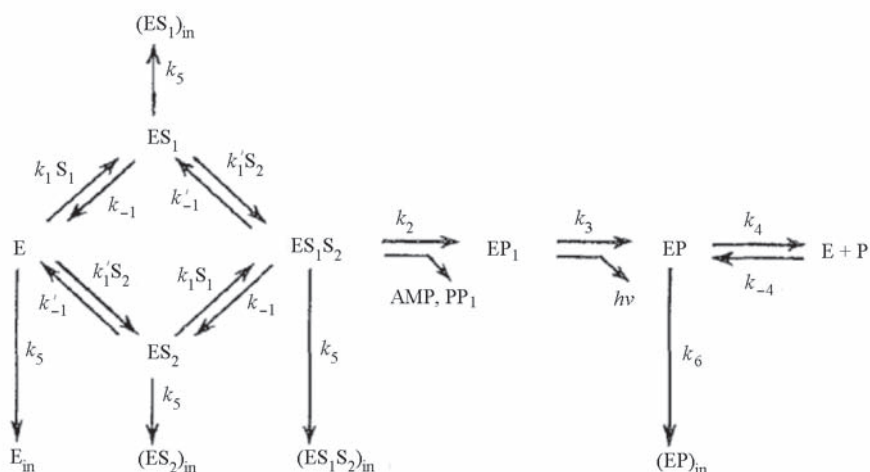


Рис. 2. Кинетическая схема реакций ферментативного окисления люциферина

при численном анализе полных кинетических кривых. Величина k_4 в ~ 10 раз меньше, чем k_r и k_3 , поэтому в последующих циклах ферментативной реакции скорость образования электронно-возбужденного продукта на порядок ниже, так как лимитируется скоростью регенерации активного фермента. Однако из-за параллельно идущей инактивации фермента (рис. 2, реакции 5 и 6) эта скорость не остается постоянной, а постепенно уменьшается.

Приведенный выше механизм показал несостоятельность ранее предложенной гипотезы [8] о существовании у люциферазы светляков двух

каталитических центров (быстрого и медленно-го), которые обеспечивают высокую (в максимуме) и низкую (на спаде) интенсивность свечения. Таким образом, люциферазная реакция служит примером нестационарного ферментативного процесса, где оборот фермента очень мал из-за медленной диссоциации комплекса фермент-продукт и соизмеримой по скорости инактивации фермента и его комплексов с субстратами и продуктом. Выявление лимитирующих стадий процесса биolumинесценции указывает и на практические пути повышения эффективности действия люциферазы. Использование

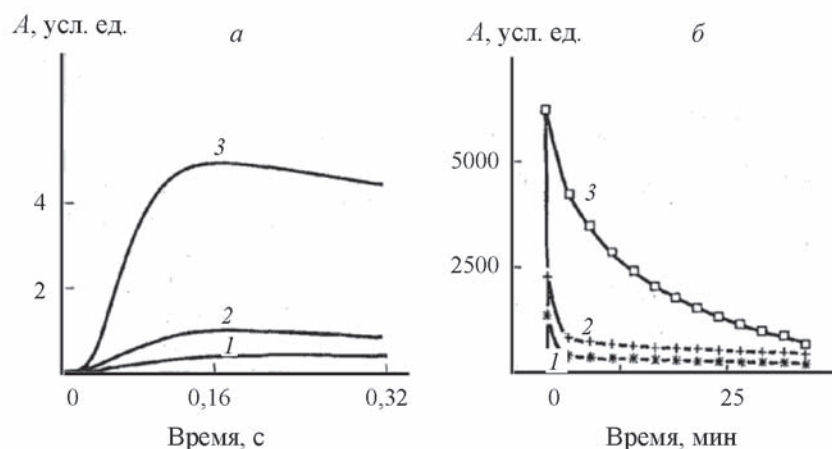


Рис. 3. Кинетические кривые биолюминесценции в люциферин-люциферазной реакции светляков в секундном (а) и минутном (б) интервалах времени. Условия: 0,1 М трис-ацетатный буферный раствор, содержащий 2 мМ ЭДТА; 10 мМ MgSO_4 ; рН 7,8; 1 мМ люциферина. Концентрация АТР, мМ: 1 – 0,05; 2 – 0,1; 3 – 1

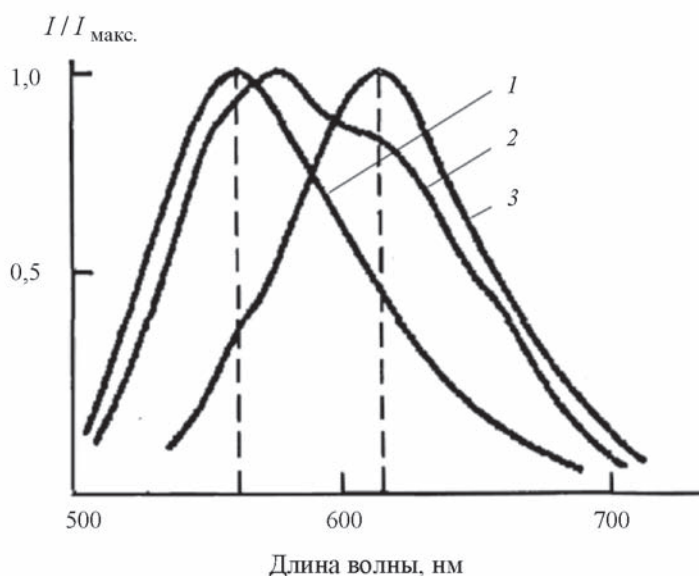


Рис. 4. Спектры биолюминесценции для нативной биолюминесцентной системы светляков *L. mingrelica* при рН 7,0 (1); 6,7 (2); 5,6 (3)

различных стабилизирующих добавок, эффекторов, ускоряющих регенерацию нативного фермента, приводит к существенному увеличению общего выхода электронно-возбужденного продукта, т.е. общего выхода квантов света, и к созданию биолюминесцентных реагентов с постоянным свечением.

Спектры биолюминесценции для люциферазной реакции были получены в интервале рН 5,6–8,8 [9]. (рис. 4). Форма спектра в интервале рН 7,0–8,8 не изменяется. При рН < 7,0 максимум спектра сдвигается в длинноволновую область. Активность фермента максимальна при рН 7,8 и

снижается как при уменьшении, так и при увеличении рН, что объясняется кислотно-основными свойствами белка, а также уменьшением квантового выхода биолюминесценции. Сдвиг спектра в длинноволновую область при рН < 7,0 объясняется изменением свойств излучающей частицы при этих значениях рН [9].

Такой излучающей частицей является продукт реакции – оксильюциферин (LO) в синглетном электронно-возбужденном состоянии [10]. Перевод молекулы в электронно-возбужденное состояние может происходить в результате поглощения энергии электромагнитного излучения или

ионизирующей радиации, а также в результате высокоэкзотермических химических или биохимических реакций. В момент возбуждения эти пути в принципе различаются. Но в конденсированной фазе различия снимаются за счет быстрого (в течение пикосекунд) установления термического равновесия, поэтому флуоресценция оксильюциферина в растворе была рассмотрена как модель биолуминесценции в люциферин-люциферазной системе светляков [11–13]. Были исследованы стационарная и субнаносекундная время-разрешенная флуоресценция оксильюциферина (LO) и его структурных аналогов: люциферина (LH_2), 6'-метоксильюциферина (MeOLH_2) и 2-циано-6-гидроксibenзотиазола (BT) в водном (pH 1–10) и этанольном растворах. В литературе имеются данные о флуоресцентных свойствах LO и его аналогов [14–16], однако подробного исследования их флуоресценции в разных средах в широком диапазоне pH не проводилось. Спектры флуоресценции оксильюциферина ранее были получены только в органических средах [17] из-за его нестабильности в водных растворах в присутствии кислорода. Поэтому водные растворы оксильюциферина получали путем смешивания предварительно дегазированного в вакууме буферного раствора с минимальным объемом спиртового раствора LO и проводили все измерения в анаэробных условиях.

Анализ полученных данных привел к следующим выводам. Оксильюциферин может существовать в растворе в шести формах [12] (рис. 5). Фенольные формы (I–III) существуют в неполярных средах или при очень низких значениях pH и флуоресцируют в голубой области спектра ($\lambda_{\text{макс.}} = 450 \text{ нм}$). В спектрах биолу-

минесценции голубая биолуминесценция не наблюдается. В водных растворах для фенолят-ных форм (IV–VI) наблюдается желто-зеленая ($\lambda_{\text{макс.}} = 550\text{--}570 \text{ нм}$) или красная ($\lambda_{\text{макс.}} = 620 \text{ нм}$) флуоресценция. MeOLH_2 и BT, не имеющие кетогруппы, не флуоресцируют в красной области, а 5,5-диметил оксильюциферин, не способный к кето-енольной таутомерии, имеет максимум флуоресценции только в красной области. Следовательно, кетоформа (VI) является красным эмиттером, а енол (V) и дианион енолят (IV) – желто-зеленым. Спектры биолуминесценции зависят от структуры люциферазы [18, 19], белковая глобула которой создает микроокружение хромофора, стабилизируя различные формы оксильюциферина.

Локализация люциферазы светляков в пероксисомах [20, 21] указывает на мембранную активность этого фермента. В связи с этим было детально изучено влияние липидов на люциферазную реакцию. Оказалось, что выделенный из природного сырья высокоочищенный фермент содержит некоторое количество фосфолипидов и нейтральных липидов [22]. Люцифераза самопроизвольно встраивается в мультиламиллярные липосомы фосфатидилхолина, что сопровождается 20-кратным увеличением стабильности фермента [23]. Встраивание люциферазы в бислой липосом [23] или в гексамерные структуры обращенных мицелл [24] приводит к изменению кинетики биолуминесценции: увеличиваются максимальная интенсивность биолуминесценции и длительность постоянного свечения. Следовательно, специфическое взаимодействие люциферазы с мембраноподобными структурами увеличивает выход электронно-возбужденного

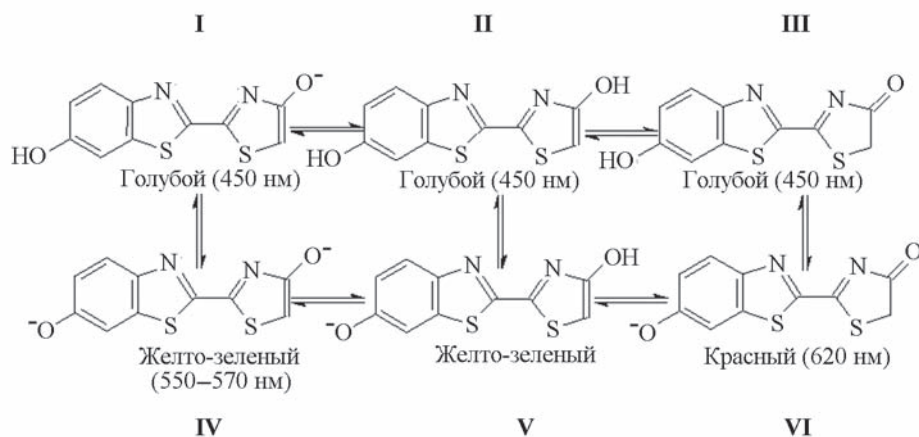


Рис. 5. Различные формы оксильюциферина: (I)–(III) – фенольные, (IV)–(VI) – фенолятные; (I), (IV) – енолятные; (II), (V) – енольные; (III), (VI) – кетонные

продукта. Удаление липидов полностью инактивирует фермент [25]. Добавление фосфатидилхолина в среду делипидизации приводит к реактивации фермента [26] (рис. 6). Реактивирующее действие на делипидизированную люциферазу оказывают только холинсодержащие фосфолипиды (лизофосфатидилхолин, сфингомиелин, фосфатидилхолин) [27].

Иммобилизация нативной люциферазы светляков *L. mingrelica* и применение иммобилизованного фермента

Трудоемкий метод очистки нативного фермента, низкая стабильность в водных растворах осложняли его применение в анализе, поэтому были разработаны методы иммобилизации люциферазы *L. mingrelica* непосредственно из экстракта светлячков на различных порошкообразных и пленочных носителях. Наиболее активные и стабильные препараты иммобилизованной люциферазы были получены с использованием полисахаридных носителей (BrCN-активированной сефарозы) [28] и целлофановых пленок, специально обработанных для повышения величины их поверхности [29, 30].

АТР-метрия является высокочувствительным, быстрым и универсальным методом определения биомассы. АТР содержится во всех живых клетках – в клетках растений, животных, микроорганизмов и человека. Содержание АТР в бактериях

колеблется от 1 до 10 мкг/г сухого веса биомассы в зависимости от вида микроорганизмов и их физиологического состояния. Чувствительность биoluminesцентного метода определения АТР составляет $\sim 10^{-18}$ моль АТР в измеряемой смеси. Предел обнаружения может достигать ~ 500 клеток и даже менее без предварительного обогащения образца. После гибели клеток содержание АТР резко падает в течение нескольких секунд, поэтому измерение АТР позволяет определять содержание именно живых клеток в отличие от методов, основанных на измерении других индикаторных метаболитов. Содержание АТР пропорционально количеству клеток в образце, поэтому метод биoluminesцентной АТР-метрии стал основой так называемой «быстрой микробиологии». Высокоактивный, стабильный препарат «Иммолюм» на основе иммобилизованного экстракта светлячков *L. mingrelica* был использован для определения микробной биомассы [31, 32], концентрации АТР и активности ферментов, синтезирующих или разлагающих АТР [33]. Биoluminesцентный метод определения активности креатинфосфокиназы [34, 35] позволил определять этот диагностически важный для раннего обнаружения инфаркта миокарда фермент с нижней границей $1,0 \pm 0,2$ МЕ/л. Были разработаны методы получения соиммобилизованных трехферментных систем: люцифераза светлячков, пируваткиназа и аденилаткиназа [36]. Их применение

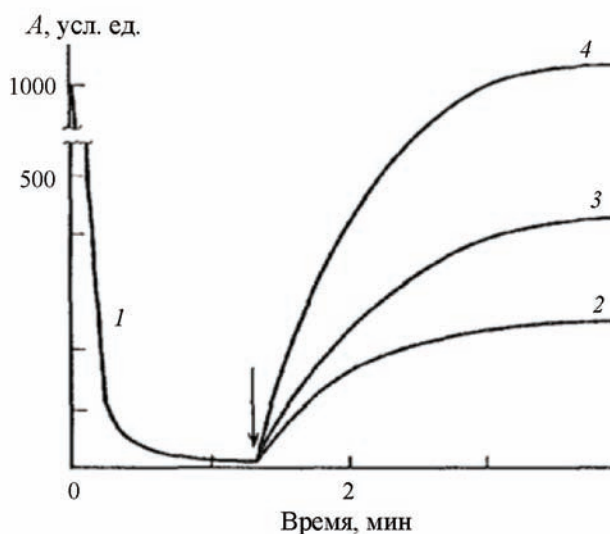


Рис. 6. Инактивация люциферазы светлячков дезоксихолатом натрия (0,5 мг/мл) (1) и реактивации добавками фосфолипидов (1 мг/мл): фосфатидилхолином (2), сфингомиелином (3), лизофосфатидилхолином (4)

позволило измерять внутриклеточное содержание адениновых нуклеотидов, ответственных за энергетическое состояние клетки, и получать ценную информацию о влиянии внешних условий на внутриклеточный метаболизм [37]. Препарат «Иммолюм» применялся также для контроля бактериальной обсемененности сырого молока [38] и мяса [39], а также для определения биозараженности технологических материалов [40], быстрой оценки чувствительности микрофлоры к антибиотикам непосредственно в гнойных ранах пациентов [41] и в септической крови [42].

Клонирование люциферазы светляков *L. mingrelica*

Как только появились в середине 80-х годов первые публикации о клонировании люциферазы светляков *P. pyralis*, этой тематикой занялись и в МГУ. Был оптимизирован метод получения мРНК, были наработаны препараты мРНК светляков *L. mingrelica*, высокая активность которых была продемонстрирована на примере ооцитов лягушки и гомогената ретикулоцитов. Инкубация мРНК в этих средах приводила к синтезу активной люциферазы: при прибавлении люциферина наблюдалась яркая биолуминесценция. Рукопись статьи о получении и свойствах мРНК люциферазы *L. mingrelica* была принята к публикации весной 1987 г., но статья вышла из печати уже после кончины нашего соавтора, профессора И.В. Березина [43].

Для дальнейшей работы по клонированию мы приняли предложение наших американских коллег из Техасского аграрного университета, где лаборатория профессора Т. Балдвина активно занималась генетической инженерией бактериальной люциферазы и имела все необходимые приборы и реактивы для генно-инженерных работ. С использованием мРНК люциферазы *L. mingrelica* была получена ее кДНК. Из плазмиды pJGR, продуцирующей бактериальную люциферазу, был вырезан ген этого фермента, а вместо него был вставлен ген люциферазы светляков *L. mingrelica*. При этом в качестве промотора использовалась система промотора бактериальной люциферазы (рис. 7). Таким образом, был создан продуцент рекомбинантной люциферазы светляков *L. mingrelica* с высоким уровнем экспрессии [44].

Молекула люциферазы *L. mingrelica* содержит 548 аминокислотных остатков. Гомология аминокислотной последовательности с люциферазой из американских светляков *P. pyralis* составляет 67%. Сравнение аминокислотных последовательностей люциферазы *L. mingrelica* и люцифераз из японских светляков *L. cruciata* и *L. lateralis* показало, что около 80% остатков этих люцифераз рода *Luciola* строго консервативны.

Позже были сконструированы плазмиды pETL4 и pETL7 на основе серии pET, которые кодируют люциферазу, содержащую 6xHis-tag на N- и C-конце соответственно. Использование

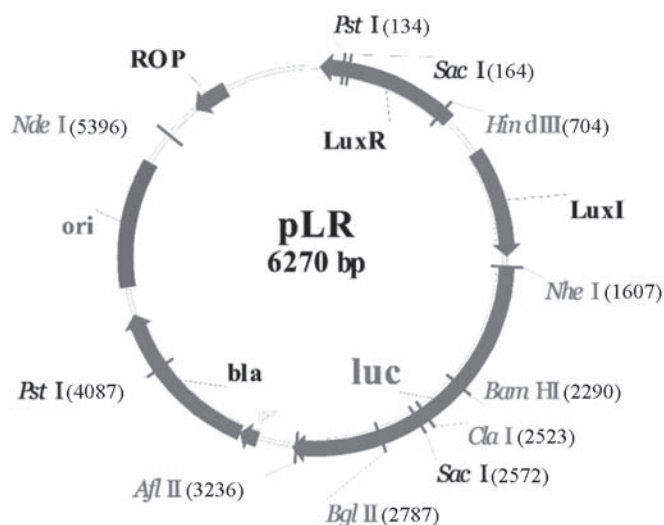


Рис. 7. Плазида на основе системы экспрессии бактериальной люциферазы (luc – ген люциферазы светляков *L. mingrelica* (1615 пар оснований); bla – ген устойчивости к ампициллину)

плазмид рЕТL4 и рЕТL7 вместо ранее применявшейся плазмиды рLR (рис. 7) позволило сократить длительность экспрессии в два раза, а время очистки с 3 суток до 4 ч. При этом удельная активность люциферазы увеличилась в 2 раза, а выход фермента – в 2,5 раза. Сравнение двух полученных форм люциферазы показало, что фермент, содержащий С-концевой 6хHis-tag, обладает более высоким сходством с исходным ферментом по спектральным свойствам и стабильности. Рекомбинантная люцифераза *L. mingrelica* в последующей работе успешно заменила природный фермент и позволила получать методами сайт-специфического и случайного мутагенеза новые рекомбинантные формы люциферазы *L. mingrelica* с заданными свойствами.

Модель пространственной структуры люциферазы и ее комплексов с субстратами

В 1996 г. была опубликована пространственная структура нелигандной формы люциферазы светляков *P. pyralis* [45]. Было показано, что молекула фермента состоит из двух, легко различаемых доменов: большого N-домена (остатки 1–436) и малого С-домена (остатки 440–544). Домены соединены друг с другом подвижной, неупорядоченной полипептидной петлей (остатки 435–441) (рис. 8). Компьютерный анализ показал,

что пространственная структура люциферазы *L. mingrelica* почти не отличается от структуры люциферазы *P. pyralis*. На основании кристаллографического анализа нелигандной люциферазы сложно было сделать выводы о локализации активного центра фермента. Из-за высокой степени гомологии этих люцифераз трудно было выбрать из множества консервативных мотивов те, которые могут участвовать в связывании субстратов.

В 1997 г. были опубликованы результаты кристаллографического исследования аденилирующей субъединицы грамицидин-5-синтетазы (далее коротко: синтетаза) в комплексе с ее субстратами: АМР и L-фенилаланином [46]. Пространственная структура синтетазы оказалась весьма похожей на структуру люциферазы. Этого и следовало ожидать, поскольку оба фермента выполняют одну и ту же функцию – аденилирование карбоксильной группы субстрата с помощью АТР. Их аминокислотные последовательности имеют некоторую, хотя и довольно слабую, гомологию. Используя координаты нелигандной люциферазы [45] и фермент-субстратного комплекса синтетазы [46], мы построили модель комплекса люцифераза-АТР-люциферин [47], предположив, что при связывании субстратов с люциферазой в молекуле белка происходят значительные кон-

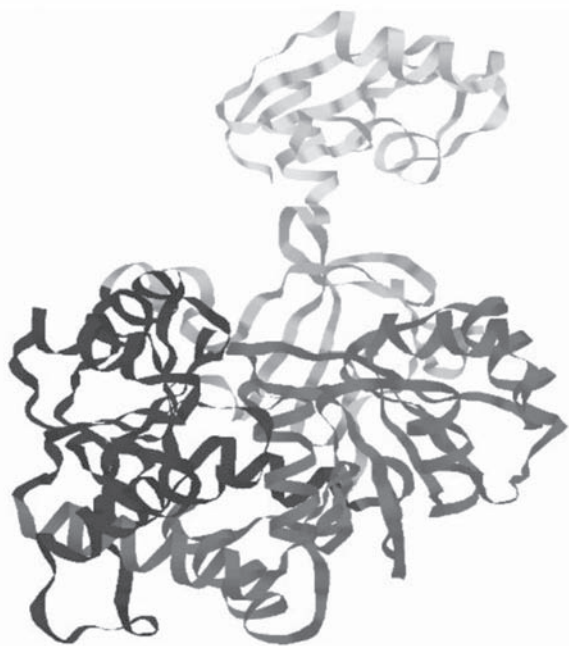


Рис. 8. Пространственная структура нелигандной люциферазы *P. pyralis*

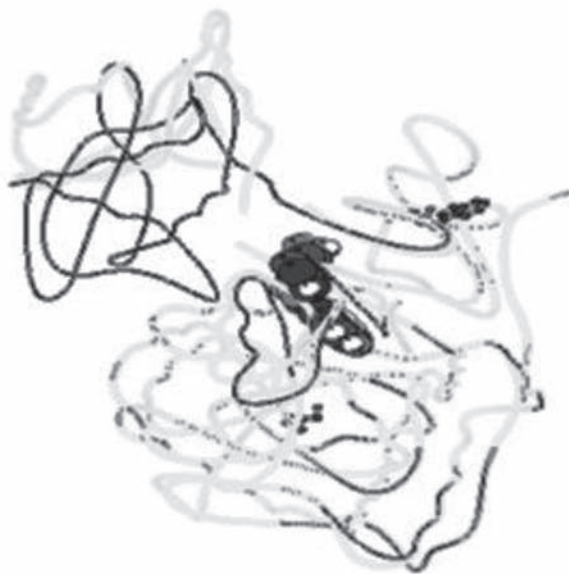


Рис. 9. Модель комплекса люциферазы *L. mingrelica* с субстратами, которые показаны в виде СРК-моделей (не-лигандная люцифераза – серая лента, фермент-субстратный комплекс – черная

формационные изменения, приводящие к ориентации двух доменов люциферазы, аналогичной той, что была найдена в структуре комплекса АМР-фенилаланин-синтетаза (рис. 9). Не только изменяется ориентация доменов, но и увеличивается жесткость тех полипептидных петель, которые непосредственно контактируют с субстратами. Остаток Lys529, который необходим для катализа, оказывается рядом с субстратами только при повороте доменов. Предложенная модель хорошо согласуется с данными о физико-химических свойствах люциферазы и ее комплексов с субстратами. В дальнейшем она была успешно использована при выяснении влияния мутаций на свойства фермента.

Создание библиотеки мутантных люцифераз *L. mingrelica* с измененными спектрами биолюминесценции

Как было сказано выше, для люцифераз светляков характерна сильная зависимость спектра биолюминесценции от pH (рис. 4). В результате случайного мутагенеза первых 225 остатков люциферазы *L. mingrelica* был обнаружен 31 мутант, обладающий измененным цветом биолюминесценции и сохраняющий заметную активность. Семь мутантов были секвенированы [48]. Показано, что замены Phe16Leu или Ala40Ser приводят к значительному снижению pH-чувствительности спектра биолюминесценции люциферазы свет-

ляков *L. mingrelica*. Впервые была обнаружена единичная замена (Tyr35Asn или Tyr35His), в результате которой спектр биолюминесценции люциферазы светляков практически не изменяется в диапазоне pH 6–8 (рис. 10).

Формирование микроокружения оксильюциферина в активном центре и реализация зеленой (или красной) биолюминесценции определяются структурой белкового окружения эмиттеров, степенью его поляризуемости, ориентацией и подвижностью ключевых аминокислотных групп, т.е. балансом взаимодействий многих аминокислотных остатков в обширной области фермента. В литературе описано множество удаленных друг от друга мутаций, которые прямо или опосредованно нарушают необходимые взаимодействия и приводят к возрастанию доли красной биолюминесценции [49–51], а также мутаций, стабилизирующих структуру активного центра и понижающих зависимость спектра биолюминесценции от внешних условий [52, 53].

Анализ кристаллических структур комплексов исходной и мутантной люцифераз светляков (с заменой Ser286Asn, приводящей к красной биолюминесценции) с (DLSA) – аналогом промежуточного продукта люциферазной реакции (комплексы E''DLSA и mE''DLSA) [54] показал, что в комплексе E''DLSA активный центр находится в «закрытой» конформации. Это приводит к жесткому микроокружению оксильюциферина и формированию зеленого излучателя. В комплексе

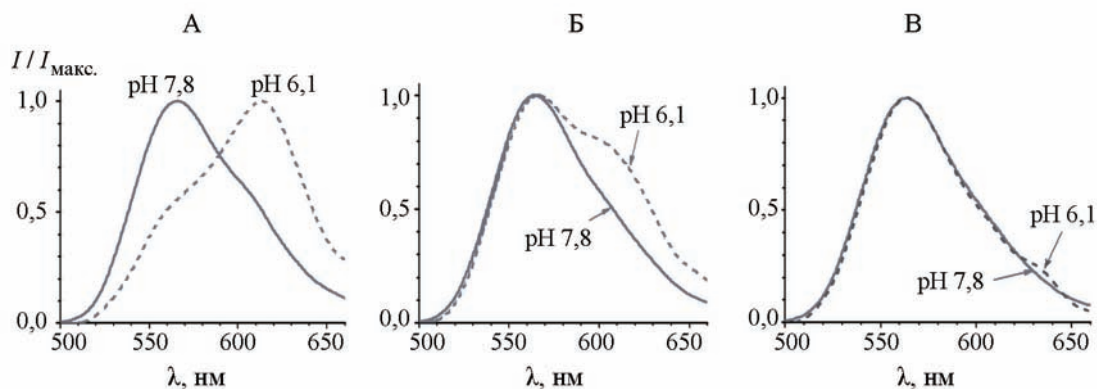


Рис. 10. Спектры биолуминесценции исходной люциферазы (А), мутантов Phe16Leu и Ala40Ser (Б), мутантов Tyr35Asn и Tyr35His (В) при разных значениях pH

mE''DLSA наблюдается «открытая» конформация активного центра с менее «жестким» окружением электронно-возбужденного продукта, при переходе которого в основное состояние наблюдается красная биолуминесценция [54].

Остаток Tyr35 консервативен во всех люциферазах светлячков. Он граничит с петлей 233–237, положение которой важно для поддержания «закрытой» конформации активного центра люциферазы, необходимой для реализации зеленой биолуминесценции. Вполне возможно, что понижение pH приводит к менее жесткой («открытой») конформации активного центра фермента, что и вызывает смещение спектра биолуминесценции в красную область. При замене объемного ароматического остатка Tyr35 на меньшие по размеру остатки Asn или His плотная упаковка вблизи остатков 35 и 225 становится более устойчивой, петля 233–237 сохраняет свое положение и при понижении pH, поэтому «закрытая» конформация не нарушается [48].

Создание библиотеки мутантных люцифераз *L. mingrelica* с повышенной термостабильностью

С использованием мутагенеза пониженной точности был проведен поиск мутантов люциферазы *L. mingrelica* с повышенной термостабиль-

ностью [55, 56]. Согласно литературным данным [57], второй субдомен фермента XhoI-BglII (395–1180 bp) значительно лабильнее двух других субдоменов в большом N-доме люциферазы, что является основным фактором недостаточной стабильности люциферазы в целом. Поэтому именно этот участок гена был выбран для мутагенеза. Были разработаны методики скрининга библиотек мутантов люциферазы в колониях *E. coli*, позволяющие быстро и эффективно отбирать мутанты с повышенной термостабильностью. Продукт лигирования, полученный после случайного мутагенеза, трансформировали в клетки *E. coli* XL1blue. Клетки выращивали в течение ночи при 37 °C на чашках со средой LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина. Для отбора более термостабильных мутантов проводили инкубацию клеток при повышенной температуре, что приводило к инаktivации недостаточно стабильных мутантов люциферазы, затем регистрировали биолуминесценцию колоний *in vivo*. В первом цикле скрининг проводили непосредственно после роста клеток при 37 °C, во втором и третьем – после инкубации в течение 40 мин при 50 °C, в четвертом – после 40 мин при 55 °C. После 4-го цикла был получен мутант 4TS, колонии которого сохраняли заметное свечение даже после 20 мин инкубации при 60 °C (рис. 11).

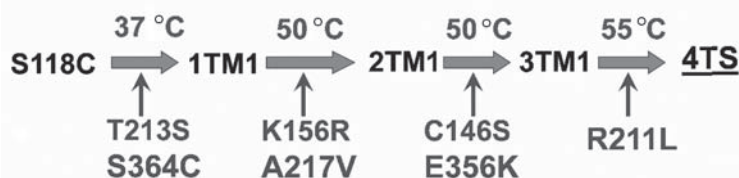


Рис. 11. Схема получения термостабильного мутанта люциферазы *L. mingrelica* методом направленной эволюции

Таким образом, в результате четырех последовательных циклов случайного мутагенеза получен мутант люциферазы светляков *L. mingrelica* с восемью заменами, стабильность которого возросла в 66 раз при 42 °С. Повышение термостабильности мутантного фермента обусловлено в основном заменами R211L, A217V, E356K и S364C (рис. 12).

Сравнение свойств WT-люциферазы и мутанта 4TS (оба фермента с C-His6) показывает, что каталитические свойства мутанта значительно улучшились по сравнению с WT-люциферазой: удельная активность мутанта возросла в 2 раза, значение K_m по АТР уменьшилось в восемь раз. Кинетика необратимой термоинактивации WT-люциферазы и мутанта 4TS была изучена в интервале 37–55 °С при pH 7,8 в трис-ацетатном буферном растворе (близок по составу к буферу, применяемому на практике для определения АТР) (рис. 13), а также в фосфатном буфере (близок по составу к растворам, использовавшимся в ряде работ по мутагенезу люцифераз). При 45 °С термостабильность мутанта 4TS люциферазы *L. mingrelica* в фосфатном буфере возросла в 155 раз по сравнению с WT-люциферазой. Во всем изученном диапазоне температур мутант 4TS был значительно стабильнее WT-люциферазы.

Таким образом, мутант 4TS по термостабильности и каталитическим характеристикам значительно превосходит как фермент дикого типа, так и другие известные мутанты люцифе-

раз светляков. В случае применения в качестве реагентов для определения АТР и генов-маркеров экспрессии *in vivo* люциферазы используются в диапазоне температур от комнатной до 37 °С. При 37 °С мутант 4TS через двое суток сохраняет 70% активности, т.е. его стабильность достаточна для большинства практических целей. Применение высокоэффективной системы экспрессии pET и термостабильного мутанта люциферазы светляков *L. mingrelica* позволило получить продуцент люциферазы (cloning vector pETL7, GenBank: HQ007050.1), у которого выход по белку был в 3,5–4,0 раза выше, а удельная активность в 4,4 раза выше по сравнению с люциферазой, получаемой по стандартному методу на основе плазмиды pLR. Использование металло-хелатной хроматографии значительно сократило время очистки фермента, причем препарат люциферазы получали в высококонцентрированной форме [58]. Благодаря высоким значениям выхода активности и термостабильности получаемого препарата этот продуцент люциферазы был использован для практического применения, в том числе для получения АТР-реагента. Практические аспекты применения АТР-реагента в биoluminesцентной АТР-метрии детально описаны в недавно вышедшей монографии [59], где представлены многочисленные примеры применения этого реагента, который на сегодняшний день коммерциализован. Биoluminesцентная

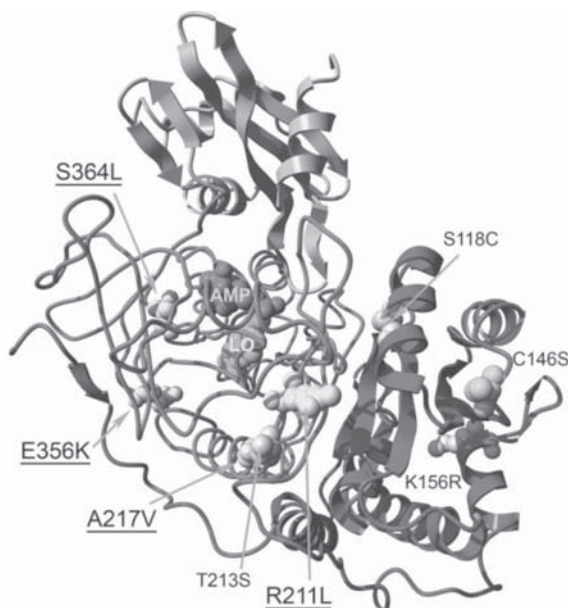


Рис. 12. Локализация мутаций в термостабильной люциферазе *L. mingrelica* (4TS)

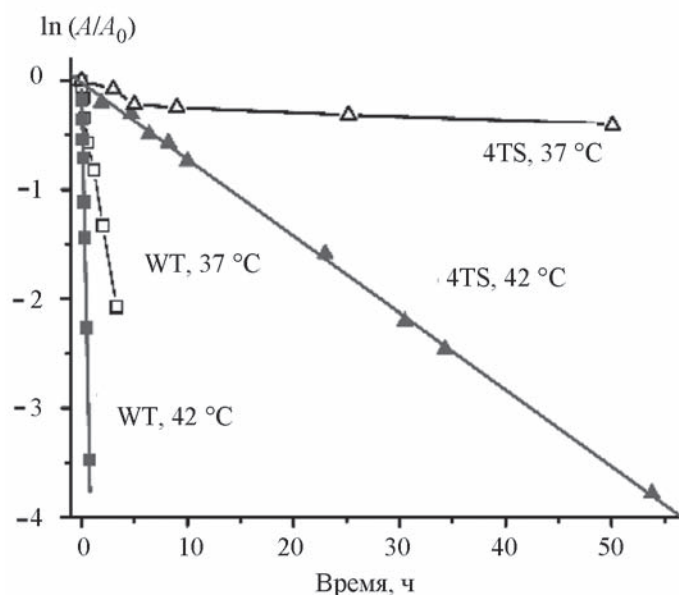


Рис. 13. Кинетические кривые термоинактивации исходной (WT) и термостабильной (4TS) люциферазы светляков *L. mingrelica* в трис-ацетатном буферном растворе

АТР-метрия успешно используется в санитарии, биомедицине, токсикологии, в решении экологических задач, разработке и использовании природоохранных технологий, антимикробных препаратов и пищевых продуктов, химико-биологических средств защиты и противокоррозионных агентов, новых и эффективных биокатализаторов и биотехнологических процессов [59].

Эмиттер как внутримолекулярная метка в активном центре люциферазы светляков

Особенностями биолюминесценции в люциферин-люциферазной системе светляков явля-

ются сложные изменения формы спектров и $\lambda_{\text{макс.}}$ биолюминесценции при варьировании pH, температуры и структуры фермента. Как было сказано выше и как было подтверждено независимыми современными спектральными исследованиями [60], это объясняется кето-енольной таутомерией молекулы оксильюциферина (рис. 5). Но в активном центре фермента образуется только одна молекула электронно-возбужденного продукта. Таким образом, молекула эмиттера представляет внутримолекулярную биолюминесцентную метку, характеризующую свойства микроокружения эмиттера

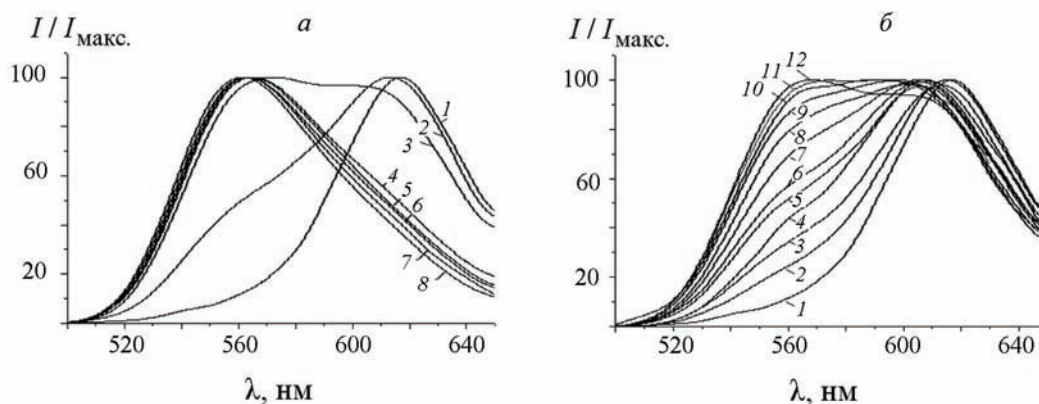
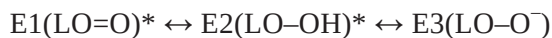


Рис. 14. Спектры биолюминесценции для нативной (а) и мутантной (б) люцифераз светляков *L. mingrelica* при разных значениях pH: а – pH 5,6; 6,4; 6,8; 7,0; 7,6; 7,8; 8,0; 8,5 (1–8 соответственно); б – pH 5,6; 6,1; 6,4; 7,2; 7,6; 7,8; 8,0; 8,6; 8,9; 9,2; 9,6; 10,2 (1–12 соответственно). Интенсивность в максимуме каждого спектра нормирована

в момент эмиссии света [61, 62]. Суперпозиция двух или трех форм эмиттера, фиксируемых в спектрах билюминесценции, указывает на сосуществование в реакционной среде различных конформационных форм люциферазы, находящихся в динамическом равновесии:



Каждый из конформеров люциферазы может содержать только одну из трех форм эмиттера (кетон, енол или енолят):



Кетон

Енол

Енолят

Анализ спектров билюминесценции позволяет идентифицировать качественно и количественно различные конформеры фермента и изменение их концентрации при варьировании внешних условий и структуры люциферазы. Мономодальные спектры билюминесценции соответствуют одному конформеру фермента, что определяется как структурой фермента, так и значениями pH или температуры. Если наблюдаются не мономодальные, а более сложные (би- и даже трехмодальные) спектры билюминесценции, значит в данных условиях в реакционной среде присутствуют различные конформеры фермента, в которых реализуется та или иная форма эмиттера. На ряде примеров было показано, как анализ спектров билюминесценции позволил сделать выводы об изменениях в составе конформеров люциферазы при изменении в результате мутаций или внешних условий (pH и температуры).

Мутация His433Tyr в люциферазе *L. mingrelica* привела к сдвигу $\lambda_{\text{макс.эм.}}$ билюминесценции с 566 до 606 нм при pH 7,8 (pH-оптимум активности) [50], что и объяснялось изменением соотношения разных форм оксильюциферина (рис. 14).

Использование метода Гаусса для разложения спектров билюминесценции позволило установить, что наблюдаемые спектры являются суперпозицией спектров трех форм электронно-возбужденного оксильюциферина: енолята ($LO-O^-$, $\lambda_{\text{макс.эм.}} = 556$ нм), енола ($LO-OH$, $\lambda_{\text{макс.эм.}} = 587$ нм) и кетона ($LO=O$, $\lambda_{\text{макс.эм.}} = 618$ нм). Изменение относительного содержания различных форм эмиттера с варьированием pH привело к сдвигу положения максимума, а также к изменению формы спектра билюминесценции. Было определено относительное содержание каждой из форм комплексов фермент-эмиттер при разных значениях pH. Для WT-люциферазы при $pH \geq 7,0$ преобладали конформеры люциферазы, содержащие

енольную и енолятную формы эмиттера, и только при pH 5,6 преобладали конформеры, содержащие кетонную форму эмиттера. Мутантная люцифераза при $pH \leq 6,1$ была в форме конформера, содержащего кетонную форму оксильюциферина. С увеличением pH появлялись конформеры, содержащие енол и енолят, но только при $pH \sim 10,2$ их доля становилась достаточно заметной.

Из рентгеноструктурных данных для люцифераз светляков известно, что остаток His433 расположен в подвижной петле, образованной остатками Tyr427–Phe435, которая соединяет N- и C-домены люциферазы [45, 46]. Эту петлю можно рассматривать как «шарнир», соединяющий два домена люциферазы. Имидазольный цикл остатка His433 образует водородную связь с карбоксильной группой остатка Asp431, что повышает жесткость шарнира и уменьшает амплитуду тепловых флуктуаций N- и C-доменов относительно друг друга. Это обеспечивает достаточно жесткую фиксацию аминокислотных остатков Thr529 и Lys531 из C-домена, входящих в ближайшее окружение тиазольной группы оксильюциферина. При замене His433Tyr водородная связь становится невозможной, вследствие чего уменьшается жесткость шарнира Tyr427–Phe435 и увеличивается амплитуда тепловых колебаний доменов относительно друг друга. Микроокружение эмиттера становится более «рыхлым», что затрудняет кето-енольную таутомеризацию. В результате наблюдается сдвиг равновесия в сторону конформера, содержащего кетонную форму эмиттера.

К увеличению амплитуды тепловых колебаний доменов относительно друг друга может приводить и повышение температуры раствора. При этом микроокружение эмиттера становится также более «рыхлым», т.е. повышается концентрация конформера люциферазы, генерирующего «красное» свечение. Особенно четко это было показано при анализе температурных зависимостей спектров билюминесценции, полученных при 10, 25 и 42 °C для люциферазы *L. mingrelica* и ряда ее единичных мутантов по остатку Glu457 (Glu457Asp/Gln/Lys) [63]. Для всех люцифераз суммарные спектры билюминесценции были представлены как суперпозиции спектров конформера люциферазы с «зеленым» ($\lambda_{\text{макс.эм.}} = 554 \pm 3$ нм) и «красным» ($\lambda_{\text{макс.эм.}} = 595 \pm 5$ нм) эмиттерами. WT-люцифераза и мутант Glu457Asp имеют сходные зависимости спектров билюминесценции от температуры. Для мутантов Glu457Gln «зеленый» конформер составляет всего ~20% при

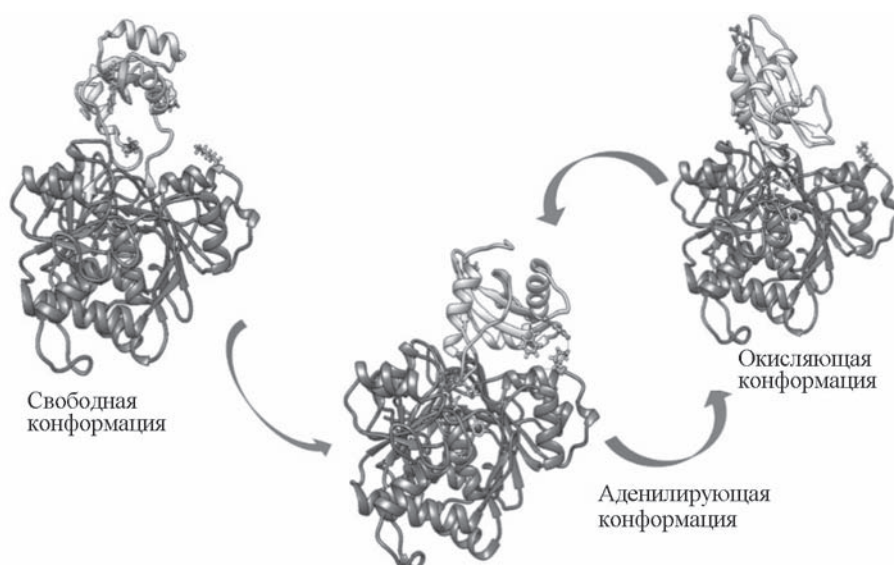


Рис. 15. Динамическая структура люциферазы светляков. Последовательность ротаций С-домена в ходе каталитической реакции люциферазы *L. mingrelica*

10 °С и ~10% – при 25 °С. Люцифераза с мутацией Glu457Lys имеет мономодальный спектр с максимумом при 600 нм во всем изученном интервале температур. При 42 °С для большинства мутантов исчезает «зеленое» свечение, поскольку с повышением температуры содержание «зеленых» конформеров люциферазы, генерирующих еноляты, становится очень низким. При 42 °С доля «красного» эмиттера увеличивается до 90% для WT-люциферазы, а для мутантов – до 100%. Анализ спектров показывает, что для всех мутантов $\lambda_{\text{макс.эм.}}$ «зеленого» и «красного» компонентов совпадают с величинами $\lambda_{\text{макс.эм.}}$ для WT-люциферазы, а с изменением температуры меняется лишь соотношение между их концентрациями. Следовательно, структура эмиттера не зависит от температуры, однако меняется соотношение между различными конформерами белка при изменении температуры. Разрыхление структуры белка при нагревании приводит к смещению спектров биolumинесценции в сторону «красного» конформера.

Роль динамической структуры белка в катализе люциферазой светляков

Способность люциферазы катализировать три последовательные реакции (рис. 1) обусловлена особой динамической структурой фермента, благодаря которой N- и С-домены могут принимать различные конфигурации относительно друг друга. На каждой стадии реализуется структура активного центра фермента, наиболее эффектив-

ная для катализа данной стадии процесса. Еще в 1999 г. была предложена модель [47], согласно которой при связывании субстратов свободная конформация трансформируется в аденилирующую за счет поворота N- и С-доменов на 90 град. относительно друг друга. Позже это было доказано методом рентгеноструктурного анализа комплекса люциферазы с аналогом аденилатлюциферина [54], который образуется на первой стадии ферментативного процесса. Затем под действием кислорода воздуха люцифериладенилат окисляется, образуя электронно-возбужденный оксилуциферин. В работе Бранчини с соавторами [64], было показано, что при окислении реализуется окисляющая конформация, в которой оба домена люциферазы повернуты относительно друг друга на 140 град. По мнению авторов, эта конформация сохраняется и в момент эмиссии света [65]. Чтобы выяснить, какую конформацию действительно имеет глобула фермента в момент эмиссии света, мы использовали метод случайного мутагенеза для поиска таких мутаций С-домена, которые специфически влияли бы на биolumинесцентные свойства системы, но не нарушали бы каталитический процесс и не вносили заметных изменений в структуру фермента. Такие мутации С-домена были найдены, и их изучение позволило пролить свет на роль С-домена в модуляции цвета и раскрыть новые аспекты механизма чередования доменов.

Мы показали, что единичные мутации Phe467Ser, Glu490Val и Glu490Lys в С-домене

люциферазы *L. mingrelica* практически не повлияли на стабильность, специфическую активность и pH-оптимум активности фермента, но резко изменили pH-чувствительность спектров биолюминесценции [66]. Поскольку спектры отражают структуру эмиттера, мы предположили, что эти остатки влияют на микроокружение эмиттера в активном центре. Были построены модельные структуры фермента в трех известных конформациях (открытая, аденилированная и окислительная) (рис. 15).

Структурный анализ и экспериментальные данные не позволили получить доказательства того, что эти остатки могут влиять на активный центр в открытой или окислительной конформации. Локализация остатков Phe467 и Glu490 относительно N-домена резко меняется в ходе реакции. В свободной конформации боковые цепи этих остатков локализованы на поверхности C-домена, экспонированы в растворитель и

не участвуют в структурообразующих взаимодействиях. В аденилирующей конформации они оказываются в междоменном пространстве и непосредственно взаимодействуют с N-доменом, содержащим большую часть групп активного центра. В окислительной конформации вращение C-домена выводит эти остатки на внешнюю поверхность фермента, максимально удаляя их от N-домена (рис. 15). Таким образом, окислительная конформация необходима лишь для инициации окисления аденилатлюциферина, а в момент эмиссии света фермент возвращается в аденилирующую конформацию. Следовательно, только в аденилирующей конформации остатки Phe467 и Glu490 участвуют во взаимодействиях с N-доменом и могут изменять микроокружение активного центра во время эмиссии света, которая и происходит из аденилирующей конформации люциферазы [66].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Dubois R. // C.r. Soc.Biol. 1887. Vol. 39. P. 564.
- McElroy W. D. // Proc. Nat. Acad. USA. 1947. Vol. 33. N 11. P. 342.
- Lundin A. // Methods Enzymol. 2000. Vol. 305. P. 346.
- Filippova N.Yu., Ugarova N.N. // Biochemistry (Moscow). 1979. Vol. 44. N 10. P. 1508.
- McElroy W.D., De Luca M. / Chemilum. Biolum. N.Y., 1974. P. 285.
- Brovko L.Yu., Gandelman O.A., Polenova T.E., Ugarova N.N. // Biochemistry (Moscow). 1994. Vol. 59. N. 2. P. 195.
- Березин И.В., Бровко Л.Ю., Угарова Н.Н. // Биоорг. химия, 1977. Т. 3. № 12. С. 1589.
- De Luca M., McElroy W.D. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1984. Vol. 123. N 2. P. 764.
- Dementieva E.I., Brovko L.Yu., Druzhinina E.N., Gandelman O.A., Ugarova N.N. // Biochemistry (Moscow). 1986. Vol. 51. N 1. P. 111.
- Suzuki N., Goto T. // Tetrahedron Lett. 1971. Vol. 12. N 22. P. 2021.
- Gandelman O.A., Brovko L.Yu., Ugarova N.N., Shchegolev A.A. // Biochemistry (Moscow). 1990. Vol. 55. N 6. P. 785.
- Gandelman O.A., Brovko L.Yu., Ugarova N.N., Chikishev A.Yu., Shkurimov A.P. // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 1993. Vol. 19. P. 187.
- Gandelman O.A., Brovko L.Yu., Chikishev A.Yu., Shkurimov A.P., Ugarova N.N. // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 1994. Vol. 22. P. 203.
- White E.H., Rapaport E., Hopkins T.A., Seliger H.H. // J. Amer. Chem. Soc. 1969. Vol. 91. P. 2178.
- White E.H., Rapaport E., Seliger H.H., Hopkins T.A. // Bioorg. Chem. 1971. Vol.1. P. 92.
- Morton R.A., Hopkins T.A., Seliger H.H. // Biochemistry. 1969. Vol. 8. P. 1598.
- Suzuki N., Sato M., Nishikawa K., Goto T. // Tetrahedron Lett. 1969. Vol. 10. N. 53. P. 4683.
- Seliger H.H., Lall A.B., Lloyd J.E., Biggley W.H. // Photochem. Photobiol. 1982. Vol. 36. P. 681.
- Wood K.V., Lam Y.A., McElroy W.D. // J. Biolum. Chemilum. 1989. Vol. 4. P. 289.
- DeWet J.R., Wood K.V., DeLuca M., Helinski D.R., Subramani S. // Mol. Cell. Biology. 1987. Vol. 7. P. 725.
- Keller G.A., Gould S.J., DeLuca M., Subramani S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. Vol. 84. P. 3264.
- Dukhovich A.F., Ugarova N.N., Berezin I.V. // Dokl. Akad. Nauk SSSR. Biochemistry. 1986. Vol. 289. N 1-6. P. 233.
- Ugarova N.N., Dukhovich A.F., Berezin I.V. // Dokl. Akad. Nauk SSSR. Biochemistry. 1984. Vol. 278. N 1-6. P. 316.
- Beliaeva E.I., Brovko L.Yu., Ugarova N.N., Kliachko N.L., Levashov A.V., Martinek K., Berezin I.V. // Dokl. Akad. Nauk SSSR. 1983. Vol. 273. N 2. P. 494.
- Dukhovich A.F., Ugarova N.N., Shvets S.V., Filippova N.Yu., Berezin I.V. // Biochemistry (Moscow). 1987. Vol. 52. N 8. P. 1176.
- Ugarova N.N., Dukhovich A.F., Shvets S.V., Filippova N.Yu., Berezin I.V. // Biochim. Biophys. Acta. 1987. Vol. 921. P. 465.
- Dukhovich A.F., Filippova N.Yu., Efimov A.I., Ugarova N.N., Berezin I.V. // Dokl. Akad. Nauk SSSR. Biochemistry, 1988. Vol. 298. N 1-6. P. 38.
- Угарова Н.Н., Бровко Л.Ю., Беляева Е.И., Березин И.В. // А.с.1041568 СССР. Б.И. 1983. № 14.

29. Belyaeva E.I., Brovko L.Yu., Ugarova N.N. // *Appl. Biochem. Microbiol. (Moscow)*. 1983. Vol. 19. N 2-3. P. 168.
30. Ugarova N.N., Brovko L.Yu., Beliaeva E.I. // *Enzyme Microb. Technol.* 1983. Vol. 5 N 1. P. 60.
31. Ugarova N.N., Brovko L.Yu., Trdatyan I.Yu., Rainina E.I. // *Appl. Biochem. Microbiol. (Moscow)*. 1987. Vol. 23. N 1. P. 11.
32. Brovko L.Yu., Trdatyan I.Yu., Ugarova N.N. // *Appl. Biochem. Microbiol. (Moscow)*. 1991. Vol. 27. N. 1. P. 108.
33. Brovko L.Yu., Ugarova N.N., Vasilieva T.E., Dombrovsky V.A., Berezin I.V. // *Biochemistry (Moscow)*. 1978. Vol. 43. N 5. P. 633.
34. Ugarova N.N., Brovko L.Yu., Ivanova L.V., Shekhotsova T.N., Dolmanova I.F. // *Anal. Biochem.* 1986. Vol. 158. N 1. P. 1.
35. Ivanova L.V., Brovko L.Yu., Shekhovsova T.N., Ugarova N.N., Dolmanova I.F. // *J. Anal. Chem. USSR*. 1986. Vol. 41. N 4. Part 2. P. 593.
36. Romanova N.A., Brovko L.Yu., Sepulveda-Besserrera M.A., Ugarova N.N. // *Biochemistry (Moscow)*. 1993. Vol. 58. N 3. P. 230.
37. Brovko L.Yu., Romanova N.A., Ugarova N.N. // *Anal. Biochem.* 1994. Vol. 220. P. 410.
38. Brovko L.Yu., Froundjian V.G., Babunova V.S., Ugarova N.N. // *J. Dairy Res.* 1999. Vol. 66. P. 627. 631.
39. Froundjian V.G., Babunova V.S., Ugarova N.N. // *Moscow Univer. Chem. Bull.* 2002. Vol. 57. N 6. P. 59.
40. Ugarova N.N. // *Appl. Biochem. Microbiol. (Moscow)* 1993. Vol. 29. N 2. P. 135.
41. Титов А.И., Романова Н.А., Данилова Л.Ю., Бровко Л.Ю., Угарова Н.Н., Толстых П.И. // *Лабораторное дело*. 1990. № 10. С. 61.
42. Froundjian V.G., Brovko L.Yu., Karabasova M.A., Ugarova N.N. // *Appl. Biochem. Microbiol. (Moscow)* 1997. Vol. 33. N 4. P. 406.
43. Kutuzova G.D., Skripkin E.A., Tarasova N.I., Ugarova N.N., Bogdanov A.A., Berezin I.V. // *Dokl. Akad. Nauk SSSR. Biochemistry*. 1987. Vol. 297. N 1-6. P. 398.
44. Devine J.H., Kutuzova G.D., Green V.A., Ugarova N.N., Baldwin T.O. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1993. Vol. 1173. P. 121.
45. Conti E., Franks N.P., Brick P. // *Structure*. 1996. Vol. 4. N 3. P. 2878.
46. Conti E., Stachelhaus T., Marahiel M.A., Brick P. // *EMBO J.* 1997. Vol. 16. N 14. P. 4174 (<https://doi.org/10.1093/emboj/16.14.4174>).
47. Sandalova T.P., Ugarova N.N. // *Biochemistry (Moscow)* 1999. Vol. 64. N 8. P. 962.
48. Koksharov M.I., Ugarova N.N. // *Biochemistry (Moscow)* 2008. Vol. 73. N 8. P. 862.
49. Ugarova N.N., Brovko L.Yu. // *Luminescence*. 2002. Vol. 17. P. 321.
50. Ugarova N.N., Maloshenok L.G., Uporov I.V., Koksharov M.I. // *Biochemistry (Moscow)*. 2005. Vol. 70. P. 1262.
51. Law G.H., Gandelman O.A., Tisi L.C., Lowe C.R., Murray J.A. // *Biochem. J.* 2006. Vol. 397. N 2/ P. 305 (<https://doi.org/10.1042/BJ20051847>).
52. Viviani V.R., Oehlmeyer T.L., Arnoldi F.G., Brochetto Braga, M.R. // *Photochem. Photobiol.* 2005. Vol. 81. N 4. P. 843.
53. Kajiyama N., Nakano E. // *Protein Eng.* 1991. Vol. 4. P. 691.
54. Nakatsu T., Ichiyama S., Hiratake J., Saldanha A., Kobashi N., Sakata K., Kato H. // *Nature*. 2006. Vol. 440. P. 372 (DOI: 10.1038 nature04542).
55. Koksharov M.I., Ugarova N.N. // *Moscow Univer. Chem. Bull.* 2009. Vol. 64. N 1. P. 18.
56. Koksharov M.I., Ugarova N.N. // *Prot. Engin. Des. Sel.* 2011. Vol. 24. N 11. P. 835 (<https://doi.org/10.1093/protein/gzr044>).
57. Frydman J., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Hartl F.U. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 1999. Vol. 6. P. 697.
58. Ugarova N.N., Koksharov M.I., Lomakina G. Yu. // 2009. Reagent for determination of adenosine 5'-triphosphate, RF Patent 2420594.
59. Ефременко Е.Н., Угарова Н.Н., Ломакина Г.Ю., Сенько О.В., Степанов Н.А., Маслова О.В., Асланлы А.Г., Лягин И.В. / *Биолюминесцентная АТФ-метрия: практические аспекты*. 2022. Изд. Научная библиотека. Москва, 376 с. (ISBN 978-5-907497-77-1).
60. Snellenburg J.J., Laptenok S.P., DeSa R.J., Naumov P., Solntsev K.M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2016. Vol. 138. N 50. P. 16252 (<https://doi.org/10.1021/jacs.6b05078>).
61. Ugarova N.N. // *Proc. 15th Intern. Symp. Biolum. Chemilum. Light Emission: Biology and Scientific Applications* / Ed. Xun Shen et al. Singapore. 2009. P. 75.
62. Ugarova N.N., Lomakina G.Yu. // *Moscow Univer. Chem. Bull.* 2020. Vol. 75. N 1. P. 15 (DOI: 10.3103/S0027131420010113).
63. Modestova Y., Koksharov M.I., Ugarova N.N. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2014. Vol. 1844. P. 1463 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.04.021>).
64. Sundlov J.A., Fontaine D.M., Southworth T.L., Branchini B.R., Gulick A.M. // *Biochemistry*. 2012. Vol. 51. N 33. P. 6493 (<https://doi.org/10.1021/ja2041496>).
65. Branchini B.R., Rosenberg J.C., Fontaine D.M., Southworth T.L., Behney C.E., Uzasci L. // *J. Am. Chem. Soc.* 2011. Vol. 133. N 29. P. 11088 (<https://doi.org/10.1021/ja2041496>).
66. Modestova Y., Ugarova N.N. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2016. Vol. 1864. P. 1818. (doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.09.007).

Информация об авторах

Наталья Николаевна Угарова – гл. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, докт. хим. наук (nugarova@gmail.com);

Галина Юрьевна Ломакина – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, сотр. МГТУ им. Н.Э. Баумана, канд. хим. наук (lomakinagalina@yahoo.com).

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических стандартов

В данной работе отсутствуют исследования человека и животных.

Статья поступила в редакцию 16.09.2024;
одобрена после рецензирования 19.09.2024;
принята к публикации 25.09.2024.