

ЛЮЦИФЕРАЗА СВЕТЛЯКОВ КАК ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ МАРКЕР ТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА БАКТЕРИЙ

Ломакина Г.Ю., Корягина В.А., Угарова Н.Н.

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова

Ленинские горы, д. 1, стр. 3, Москва, 119992, РФ; e-mail: lomakinagalina@yahoo.com

Поступила в редакцию: 30.06.2018

Аннотация. Мы показали, что люцифераза светляка, продуцируемая клетками *E.coli*, является чувствительным маркером для изучения температурного воздействия на жизнеспособность живых клеток. Люцифераза экспрессируется в растворимой и активной форме, что позволяет непосредственно в клетках измерять ее ферментативную активность по свечению клеток без их разрушения. При этом интенсивность свечения высокая, свечение длительное - регистрация сигнала возможна в течение нескольких минут без существенного снижения интенсивности. Кинетические и термодинамические параметры термоинактивации люциферазы в клетках *E. coli* оказались сходными с аналогичными параметрами для очищенного фермента в буферной системе; в обоих случаях инактивация фермента подчиняется кинетике первого порядка независимо от микроокружения. Скорость термоинактивации внутриклеточной люциферазы практически такая же, что и скорость снижения жизнеспособности клеток (КОЕ/мл), определенная методом посевов. При этом при воздействии температуры энергетический статус клеток, оцениваемый по содержанию внутриклеточного АТФ меняется по более сложным законам. В частности, показано увеличение содержания АТФ в течение первых 20 мин нагревания клеточной суспензии.

Ключевые слова: люцифераза светлячков, биолюминесценция, термическая инактивация, *E.coli* BL21, жизнеспособность клеток, тепловое напряжение.

Функционирование живого организма – сложный многоступенчатый процесс взаимодействия внутриклеточных компонентов. На любое стрессовое воздействие живая клетка отвечает перераспределением биохимических реакций. Изучение поведения бактерий при повышенных температурах имеет большое научно-практическое значение, в частности, для обеспечения их микробиологической безопасности при оптимизации условий обработки продуктов питания [1]. Традиционные микробиологические методы контроля жизнеспособности микроорганизмов не всегда применимы. Поиск чувствительных, надежных, легко и быстро детектируемых эндогенных индикаторов на внешнее воздействие физической или химической природы на живую клетку представляет собой важную многоцелевую задачу. Считается, что основными механизмами термоинактивации микроорганизмов в жидкой среде являются денатурация внутриклеточных белков и повреждение клеточной мембраны [2]. Для изучения влияния температуры на жизнеспособность клеток в качестве индикаторного белка мы использовали эндогенную термостабильную люциферазу светляков *L.mingrelica* [3], синтезируемую клетками *E.coli* BL21. Люцифераза экспрессируется в растворимой и активной форме, что позволяет прямо в клетках измерять ее ферментативную активность. При этом свечение довольно длительное и позволяет регистрировать сигнал в течение нескольких минут без существенного снижения интенсивности.

Цель данной работы – изучение влияния температуры на активность эндогенной люциферазы светляков и содержание АТФ в клетках *E.coli*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

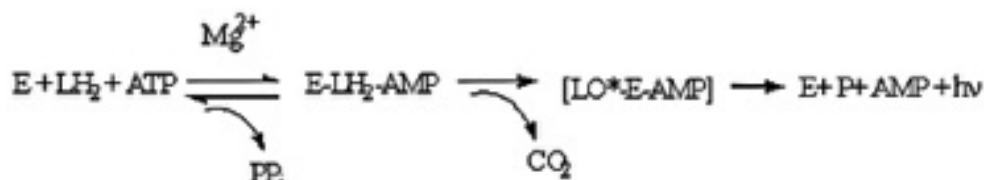
Термостабильную люциферазу светляков *L.mingrelica* экспрессировали в клетках *E. coli* BL21(DE3)CodonPlus (Novagen, США). Штамм-продуцент получали трансформацией плазмидой pETL7, несущей ген люциферазы. Культивирование клеток проводили в среде LB с ампициллином (37 °C, 240 об/мин, 18 ч) до достижения 3,5-3,8 ОЕ ($\lambda = 590$ нм). Клетки осаждали на центрифуге ELM1 CM-6M (5 мин, 1000 об/мин, 25 °C). Полученный осадок дважды ресуспендировали в физрастворе в том же объеме. Измеряли оптическую плотность суспензии при 590 нм. Принимали, что $A_{590} = 1$ ОЕ соответствует концентрации клеточной суспензии $5 \cdot 10^8$ кл/мл. Для измерения люциферазной активности в клетках использовали субстратную смесь, содержащую 0,5 мг/мл люциферина 0,15M NaCl, 20 mM MgSO₄ в 0,05 M цитрат-фосфатном буфере, pH 5,0. Содержание АТФ в клетках *E.coli* и общее содержание АТФ определяли биолюминесцентным методом с использованием набора для определения АТФ в клетках и тканях (Люмтек, Россия). Жизнеспособность клеток *E.coli* определяли методом посевов разведений с использованием агаризованной питательной среды LB. Подсчет колоний проводили через 24 ч после инкубации образцов при 37°C. Термоинактивацию клеток *E.coli* проводили следующим образом: в 10-15 пробирок отбирали по 300 мкл клеточной суспензии с концентрацией $\sim 10^6$ кл/мл, помещали в термостат при выбранной температуре и через определенные промежутки времени отбирали пробирку с клеточной суспензией на анализ люциферазной активности и АТФ. Отобранный образец охлаждали при комнатной температуре 5 мин. Для определения активности люциферазы 20 мкл образца помещали в кювету, добавляли 100 мкл

раствора люциферина и измеряли биолюминесцентный сигнал. Для определения общего содержания АТФ к 20 мкл клеточной суспензии добавляли 180 мкл ДМСО, инкубировали 1 мин. Затем 20 мкл полученного экстракта вносили в микрокювету люминометра, добавляли 100 мкл АТФ-реагента и измеряли биолюминесцентный сигнал. Для расчета точной концентрации АТФ в образце использовали метод контролей с использованием стандартного препарата АТФ ($0,75 \cdot 10^{-3} \text{М}$) в физрастворе, пробоподготовку которого осуществляли аналогично измеряемым образцам. Статистическую обработку данных проводили с использованием программ Origin 6,0 и Excel 2007 (Microsoft Office).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Штамм *E.coli* BL21 является удобной и безопасной моделью для целей экологии, пищевой промышленности, клеточной биологии и геной инженерии, он не является патогенным [4]. Штамм BL21(DE3)CodonPlus использовали для экспрессии люциферазы светляков и изучения влияния температуры на активность эндогенной люциферазы, содержание АТФ и жизнеспособность клеток *E.coli*. Для этого ночную культуру клеток переводили в физраствор для остановки роста клеток и разбавляли физраствором до концентрации $(1,5 \pm 0,4) \cdot 10^6$ кл/мл. В процессе эксперимента (2 ч, 25 °C) численность микроорганизмов не изменялась и клетки практически не разрушались – общее содержание АТФ не изменялось и внесклеточный АТФ отсутствовал.

Люцифераза светляков катализирует окисление люциферина кислородом воздуха при pH 7,8. Эта реакция требует присутствия АТФ и ионов магния:



Для измерения активности эндогенного фермента необходимо обеспечить подходящее значение pH среды и присутствие всех необходимых компонентов реакции внутри клетки в достаточных для протекания реакции концентрациях. Значение pH цитоплазмы (7,1-7,5) подходит для протекания реакции. АТФ и ионы магния всегда присутствуют в живых клетках. В живых метаболически активных клетках *E.coli* содержание АТФ составляет $\sim 2 \cdot 10^{-18}$ моль/клетку. Принимая, что объем единичной клетки *E.coli* имеют около 0,88 мкм³, средняя равновесная концентрация внутриклеточного АТФ составляет 1,5-2 мМ и может меняться в зависимости от возраста клеток, условий содержания и любых внешних воздействий физической и химической природы [5]. Для доставки люциферина внутрь клетки необходима диффузия субстрата через клеточную стенку. Значение рКа карбоксильной группы люциферина составляет 3,5, при нейтральных значениях pH молекулы люциферина приобретают отрицательный заряд и не могут пересечь мембрану [6]. Мы оптимизировали состав субстратной смеси на основе люциферина для переноса субстрата внутрь клетки, взяв за основу цитрат-фосфатный буфер pH 5,0 с добавлением хлорида натрия во избежание осмотического шока бактерий. Концентрации ионов магния и люциферина (0,03-1 мг/мл) подбирали эмпирически. Эффективная константа Михаэлиса по люциферину для эндогенной люциферазы в цитоплазме живых клеток *E.coli* составила $K_m = (0,22 \pm 0,1) \text{ мМ}$ (рис.1). В дальнейших экспериментах использовали субстратную смесь состава 0,05 М цитрат-фосфатный буфер, содержащий 0,15 М NaCl, 2 мМ люциферина, 20 мМ MgCl₂, pH 5,0 для получения стабильного и длительного биолюминесцентного сигнала.

Следует отметить, что это значение K_m соответствует концентрации экзогенного люциферина, K_m для субстрата внутри клетки должна сильно отличаться. Расчет концентрации незаряженной формы люциферина во внесклеточном пространстве, способной диффундировать через клеточную мембрану при pH 5,0 проводили по уравнению Хендерсона-Хассельбалха: $\text{pH} = \text{pKa} + \lg \frac{\alpha}{1-\alpha}$, где α – доля незаряженной формы люциферина. При pH 7,8 только 0,005 % люциферина находится в незаряженной форме. При снижении pH до 5,0 значение α составило 97 %, следовательно, уже 3% люциферина находится в незаряженной форме, способной проникать в клетку. Кроме того, необходимо учитывать и скорость диффузии субстрата через клеточную мембрану внутрь клетки. Полученное значение K_m составило $(0,22 \pm 0,1) \text{ мМ}$, что почти в 100 раз превышает данные для фермента *in vitro* ($7,5 \pm 0,5$) мкМ. Однако, если учесть, что в клетку способно проникать только 3 % субстрата, то K_m будет равно $(6,6 \pm 0,4) \text{ мкМ}$, что согласуется с данными для *in vitro*.

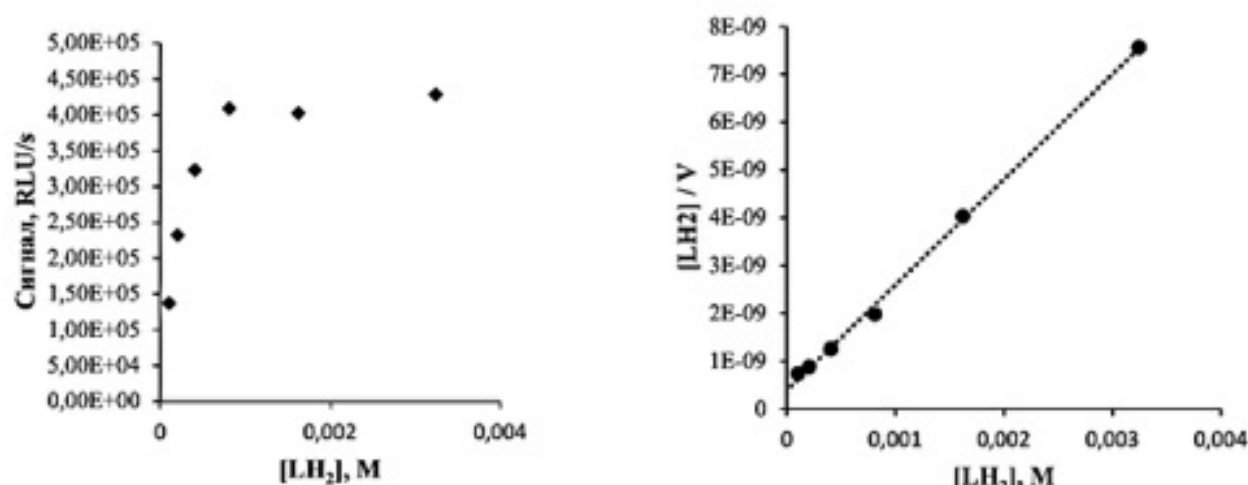


Рисунок 1. Зависимость биолуминесцентного сигнала от концентрации люциферина (слева) и линейная анаморфоза в координатах Вульфа-Хейнса (справа)

Бактериальные клетки при воздействии на них повышенных температур теряют способность к делению и в конечном итоге гибнут. Функциональное состояние клеток при воздействии высоких температур оценивали по следующим параметрам: жизнеспособность клеток определяли методом посевов (КОЕ/мл), метаболический статус клеток – по содержанию АТФ (внутриклеточного и внеклеточного), ферментативную активность эндогенной люциферазы по интенсивности биолуминесценции клеток после добавления субстратной смеси. Можно ожидать, что ферментативная активность эндогенной люциферазы в цитоплазме живых клеток будет являться чувствительным и быстрым маркером на изменение температуры в системе. Кинетические кривые инактивации эндогенной люциферазы были получены в диапазоне температур 45-60 °С. Как видно из рисунка 2, зависимости остаточной активности люциферазы от времени являются моноэкспоненциальными и спрямляются в полулогарифмических координатах. Отсутствие изломов на графике подтверждает, что термоинактивация протекает по первому порядку независимо от выбранной температуры.

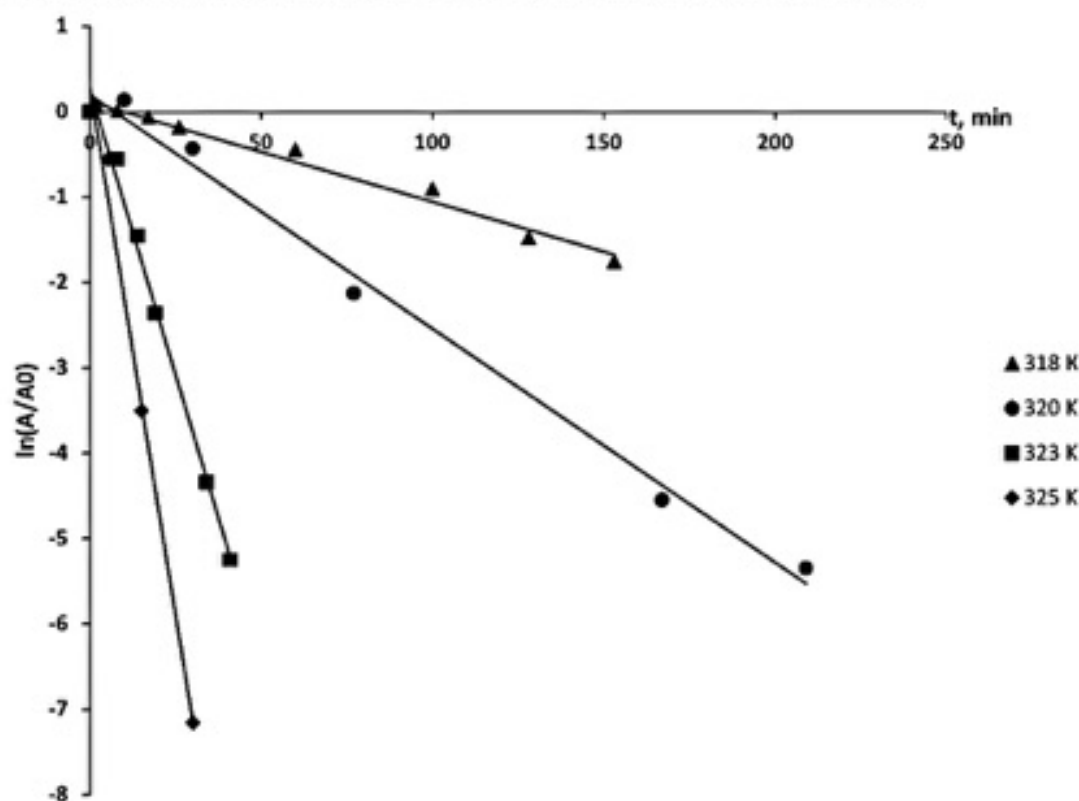


Рисунок 2. Кривые инактивации эндогенной люциферазы в интервале температур 45-52 °С в полулогарифмических координатах. Коэффициент корреляции $R > 0,978$

Таблица 1. Значения констант термоинактивации и периодов полупревращения термостабильной люциферазы светляков

в клетках <i>E.coli</i>			в буферном растворе	
t, °C	k _{in} , мин ⁻¹	τ _{1/2} , мин	k _{in} , мин ⁻¹	τ _{1/2} , мин
45	0,012±0,001	57,76	0,016±0,001	43,78
47	0,028±0,002	24,76	0,047±0,003	14,7
50	0,133±0,006	5,21	0,19±0,01	3,75
52	0,25±0,02	2,77	-	-
55	-	-	1,7±0,1	0,42

Значения k_{in} эндогенной люциферазы в живых клетках *E.coli* при различных температурах сравнили с данными для инактивации фермента, очищенного до гомогенного состояния (степень чистоты свыше 99 %) в буфере состава 0,05 мМ Трис-ацетат, 20 мМ MgSO₄, 2 мМ ЭДТА, 0,2 мг/мл БСА, pH 7,8 [7]. Значения констант термоинактивации люциферазы в клетках и в буферном растворе представлены в таблице 1.

Как видно, наблюдается незначительная стабилизация фермента в клетках *E.coli*. В состав цитоплазмы, входят, в основном, белки и соли. По-видимому, буферный раствор, используемый *in vitro*, близок по ионной силе и соотношению высоко- и низкомолекулярных компонентов к составу цитоплазмы. Значения pH цитоплазмы и буферного раствора также близки.

Расчет термодинамических параметров реакции термоинактивации фермента проводили в рамках теории активированного комплекса согласно уравнению $k_{in} = \frac{k_B T}{h} \exp\left(-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}\right) = \frac{k_B T}{h} \exp\left(\frac{\Delta S^\ddagger}{R}\right) \exp\left(-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}\right)$ или $\ln\left(\frac{k_{in}}{T}\right) = \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT}$, где k_{in} – константа инактивации, определяли ΔH и ΔS из зависимости $\ln\left(\frac{k_{in}}{T}\right) - \frac{1}{T}$, которая описывается уравнением вида $y = -ax + b$, где $a = \Delta H^\ddagger/R$, а $b = \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R}$. Значения вычисленных значений активационных параметров представлены в таблице 2.

Из таблицы видно полное соответствие термодинамических параметров термоинактивации термостабильной люциферазы в клетках и в буферном растворе, следовательно, отклик фермента на температурное воздействие не зависит от наличия компонентов клетки различной природы и АТФ. Таким образом, эндогенная термостабильная мутантная люцифераза светляков, функционирующая в цитоплазме живых клеток *E.coli*, является чувствительным индикатором на внешнее воздействие, в данном случае температуры, и не зависит от микроокружения фермента.

Традиционно прямым тестом для изучения жизнеспособности клеток является метод посевов разведений на агаризованной питательной среде, который мы использовали в качестве контроля. Подсчет колоний осуществляли через 20-28 ч после инкубации при 37 °C. Параллельно изучали зависимости изменения жизнеспособности клеток методом посевов (КОЕ/мл) и по свечению (активностью эндогенной люциферазы, RLU/s) в процессе их инкубации при различных температурах и показали высокую корреляцию люциферазной активности с методом посевов, что демонстрирует преимущество использования люциферазы светляков как удобного и быстрого маркера для изучения температурного стресса бактерий. Так, константа инактивации k_{in} клеток *E.coli* при 50 °C равна (0,123±0,005) мин⁻¹, а константа инактивации эндогенной люциферазы равна (0,133±0,006) мин⁻¹.

АТФ является высокочувствительным индикатором метаболической активности живых клеток, поскольку отвечает за энергетическое обеспечение всех внутриклеточных процессов. На любые стрессовые воздействия живая клетка отвечает изменением содержания АТФ. Мы определили, что удельное содержание АТФ в свежеполученных метаболически активных клетках *E.coli* BL21 в расчете на клетку составило 2·10⁻¹⁸ моль. Концентрация общего и внутриклеточного АТФ была равной, что свидетельствует об отсутствии повреждения клеточной мембраны в процессе хранения.

Таблица 2. Сравнение значений термодинамических параметров термоинактивации термостабильной люциферазы светляков в клетках *E.coli* и в буферном растворе

	ΔH [‡] , кДж/моль	ΔS [‡] , Дж/моль·К	ΔG [‡] , кДж/моль
в клетках <i>E.coli</i>	380±23	914±140	108±68
в буферном растворе	397±24	968±143	108±67

Известно, что в результате гибели или разрушения клеток синтез АТФ прекращается, оставшийся АТФ гидролизуются внутриклеточными АТРазами, которые продолжают функционировать некоторое время. Действительно, как видно из рисунка 3, в результате температурного воздействия уровень АТФ закономерно снижается. Однако снижение уровня АТФ происходит в несколько раз медленнее, чем снижение уровня люциферазной активности и жизнеспособности. Это означает, что энергетический статус бактерий под воздействием при клеточном стрессе меняется по более сложным законам. Возможно, при нагревании происходит термоденатурация внутриклеточных белков, в том числе и АТРаза, необходимых для гидролиза АТФ после клеточной гибели. В любом случае, наблюдается дисбаланс между синтезом АТФ и его гидролизом.

Обнаружен интересный эффект увеличения уровня АТФ в первые 15 мин нагревания клеток - скорость синтеза АТФ значительно превосходит скорость его гидролиза. Через 10 мин его уровень возрастает в полтора раза и проходит через максимум и затем начинает снижаться.

Таким образом, мы показали, что удобным маркером для изучения температурного воздействия на живые клетки *E.coli* является эндогенная термостабильная люцифераза светлячков и скорость ее терминнактивации в клетках сопоставима со скоростью снижения жизнеспособности клеток. При этом метаболический статус клеток при воздействии температуры меняется по более сложным законам.

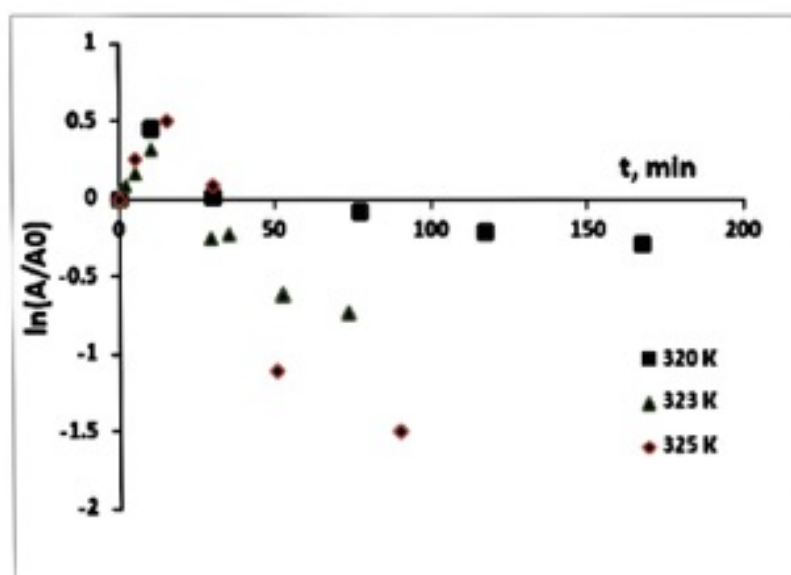


Рисунок 3. Изменение содержания АТФ в клетках *E.coli*, содержащих люциферазу светлячков, в процессе терминнактивации

Список литературы / References:

1. Smelt J. P. P. M., Brul S. Thermal Inactivation of Microorganisms. Critical Reviews. *Food Science and Nutrition*, 2014, vol. 54, pp. 1371–1385.
2. Li H., Gänzle M., Some Like It Hot: Heat Resistance of *Escherichia coli* in Food. *Front. Microbiol.*, 2016, vol. 7, pp. 1763–1769.
3. Ugarova N.N. Luciferase of *Luciola mingrelica* fireflies. Kinetics and regulation mechanism. *J. Biolumin. Chemilumin.*, 1989, vol. 4, pp. 406–418.
4. Chart H., Smith H.R., La Ragione R.M. and Woodward M.J. An investigation into the pathogenic properties of *Escherichia coli* strains BLR, BL21, DH5a and EQ1. *J. Applied Microbiol.*, 2000, vol. 89, pp. 1048–1058.
5. Lomakina G.Yu., Modestova Yu.A., Ugarova N.N. Bioluminescence Assay for Cell Viability. *Biochemistry*, vol. 80, no. 6, pp. 701–713.
6. Dement'eva E.I., Ugarova N.N., Cobbold P.H., Assay of ATP in intact *Escherichia coli* expressing recombinant firefly luciferase. *Biochemistry*, vol. 61, pp. 915–920.
7. Koksharov M.I., Ugarova N.N., Thermostability enhancement of *Luciola mingrelica* firefly luciferase by in vivo directed evolution. *Luminescence*, 2010, vol.25, pp.135–136.