УДК 577.1 577.15

Белковая инженерия пенициллинацилаз

В. И. Тишков[1,2,3]*, С. С. Савин[2,3], А. С. Ясная [2,4]
[1]Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3
[2]Учреждение Российской академии наук Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33
[3]ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», 109559, Москва, Цимлянская ул., 16, оф. 96
[4]РНЦ «Курчатовский институт», 123182, Москва, пл. Академика Курчатова, 1
*E-mail: vitishkov@gmail.com
Поступила в редакцию 05.09.2010 г.

РЕФЕРАТ Пенициллинацилазы широко используются на практике для получения полусинтетических β-лактамных антибиотиков и хиральных соединений. В данном обзоре рассмотрены последние достижения по получению рекомбинантных ферментов, а также результаты по белковой инженерии пенициллинацилазы G с помощью различных подходов.
КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА пенициллинацилаза, *Escherichia coli*, экспрессия, структура, белковая инженерия.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ПА – пенициллинацилаза, *Ec*ПА – пенициллинацилаза из *Escherichia coli*, *Af*ПА – пенициллинацилаза из *Alcaligenes faecalis*, 6-АПК – 6-аминопенициллановая кислота, ФГА – *D*-фенилглицинамид, ФУК – фенилуксусная кислота, ФГМ – метиловый эфир *D*-фенилглицина, ЦА – цефалоспоринацилаза из *Penicillium diminuta*.

ВВЕДЕНИЕ

Пенициллинацилаза (ПА, КФ 3.5.1.11) была открыта 60 лет назад как катализатор гидролиза амидной связи в антибиотиках пенициллинового ряда [1]. Этот фермент относится к классу гидролаз, подклассу амидогидролаз и является представителем семейства так называемых N-концевых нуклеофильных гидролаз. ПА была найдена в бактериях, дрожжах и низших грибах. Физиологическая роль фермента до конца не ясна. По-видимому, он служит для утилизации гетероциклических соединений в качестве источника углерода.

ПА изучается уже более 50 лет. На практике этот фермент нашел широкое применение в производстве 6-аминопенициллановой кислоты – основного синтона для получения антибиотиков пенициллинового ряда. Также ПА применяется непосредственно для синтеза различных полусинтетических β-лактамных антибиотиков. Такие свойства этого фермента, как широкая субстратная специфичность, высокие регио-, хемо- и стереоселективность обуславливают его применение для получения оптически чистых соединений (они все больше используются в фармацевтической промышленности), а также для защиты гидроксильных и аминогрупп в пептидном и тонком органическом синтезе.

В настоящее время наиболее широко применяется пенициллинацилаза из *Escherichia coli* (*Ec*ПА). Среди других пенициллинацилаз этот фермент изучен лучше всего, однако эффективность катализируемого *Ec*ПА ацильного переноса на β-лактамные ядра недостаточна для того, чтобы полностью вытеснить уже устаревшие методы химического синтеза существующих антибиотиков. В то же время из-за активного распространения патогенов, резистентных к существующим антибиотикам, очень остро стоит проблема поиска новых антибактериальных препаратов с неприродными заместителями, для синтеза которых эффективность ПА дикого типа будет очень низкой. Поэтому задача получения новых мутантных форм фермента с улучшенными синтетическими характеристиками по отношению к неприродным субстратам имеет большое практическое и фундаментальное значение. Другой, не менее важной и актуальной задачей является повышение стереоселективности ПА в реакциях ацилирования аминоспиртов или гидролиза их N-ацильных производных, так как стереоселективность ПА в реакциях получения аминоспиртов на порядок ниже, чем для аминокислот.

Для получения новых форм ферментов с улучшенными свойствами могут быть использованы самые разнообразные подходы, например, различные методы неупорядоченного мутагенеза (направленная эволюция, генная мозаика и т.д.) или направленное введение аминокислотных замен на основе анализа пространственной структуры белковой глобулы (ра-

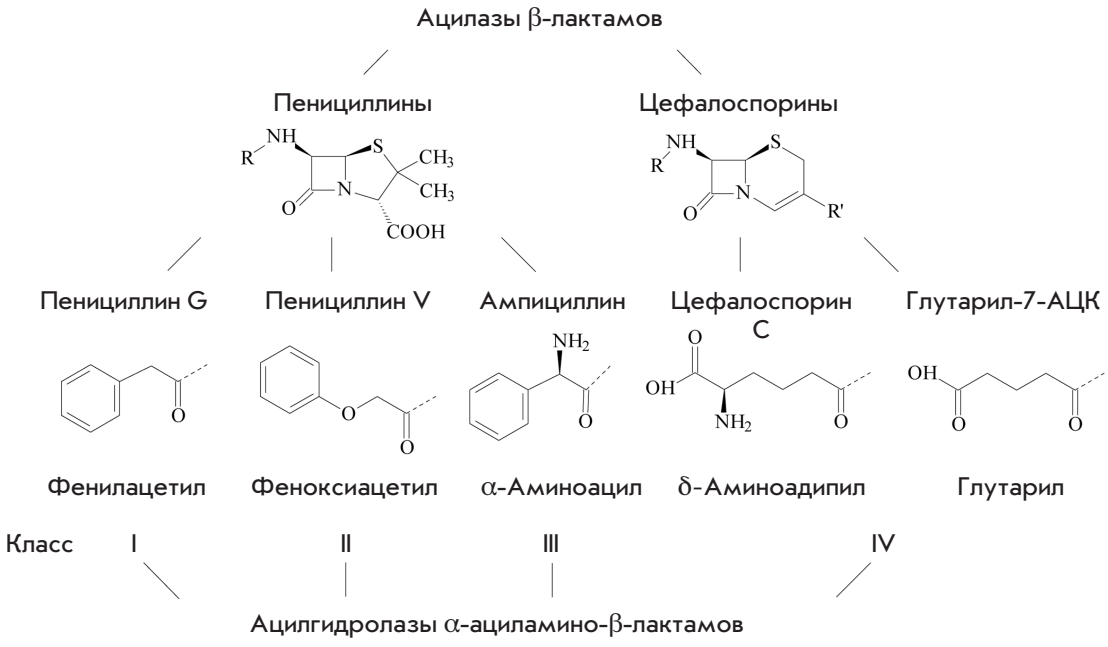


Рис. 1. Современная классификация ацилаз β-лактамов по типу гидролизуемого субстрата [7]. 7-АЦК – 7-аминоцефалоспорановая кислота.

циональный дизайн). В настоящее время все более широко используется последний подход, однако он требует знания трехмерной структуры фермента, которая может быть получена или экспериментально (рентгеноструктурный анализ, ЯМР), или с помощью компьютерного моделирования. В данном обзоре мы рассмотрим последние достижения по получению рекомбинантных пенициллинацилаз с улучшенными свойствами.

КЛАССИФИКАЦИЯ ПЕНИЦИЛЛИНАЦИЛАЗ

Пенициллинацилазы относятся к β-лактамным ацилазам и классифицируются по типу гидролизуемого субстрата: на ферменты, гидролизующие преимущественно пенициллин G, пенициллин V и ампициллин. В 1963 г. была предложена классификация, включающая пенициллинацилазы класса I и класса II [2]. Ферменты, относящиеся к классу I, преимущественно гидролизуют пенициллин V (феноксиметилпенициллин), а ПА класса II – пенициллин G (бензилпенициллин). Позднее к этой классификации был добавлен класс III – ферменты, отвечающие за гидролиз ампициллина (*D*-α-аминобензилпенициллин) [3–6].

Современная классификация ацилаз β-лактамов по предпочитаемому «ядру» и соответствующим природным боковым радикалам [7] приведена на *рис. 1*. Согласно этой классификации, ПА класса II дополнительно подразделяются еще на две подгруппы: класс IIa – ферменты, относящиеся к этой группе, осуществляют предпочтительный гидролиз ароматических амидов, и класс IIb – предпочтительный гидролиз алифатических амидов [7, 8].

ИСТОЧНИКИ И ЛОКАЛИЗАЦИЯ ПЕНИЦИЛЛИНАЦИЛАЗ

Впервые пенициллинацилазная активность была описана японскими учеными в 1950 г. [1]. Авторы обнаружили, что мицелий грибов *Penicillium chrysogenum* и *Aspergillus oryzae* способен превращать бензилпенициллин в фенилуксусную кислоту и некое вещество, названное авторами «пеницин», которое позже было идентифицировано, как 6-аминопенициллановая кислота (6-АПК) [1, 9, 10]. Более детальные и тщательные исследования этого фермента относятся уже к 60-м годам XX века. Именно в это время появляется большое число публикаций, посвященных изучению свойств и способов, а также перспектив применения данного фермента, причем число статей, посвященных пенициллинацилазам, с каждым годом только увеличивается.

Пенициллинацилазная активность была обнаружена в бактериях, дрожжах и низших грибах [11–14]. В настоящее время описаны ПА более чем из 40 различных микроорганизмов. Еще большее количество генов пенициллинацилаз было найдено при аннотировании геномов микроорганизмов.

В зависимости от источника фермент может быть локализован как вне, так и внутри клетки. Для пенициллинацилаз G (класс II) характерна локализация активного фермента в периплазматическом пространстве клетки. Внеклеточная экспрессия встречается у штаммов-продуцентов как пенициллинацилаз V (класс I), так и пенициллинацилаз G (класс II). Физиологическая роль ПА до сих пор не ясна, несмотря на то, что этот фермент изучается уже около 60 лет.

Таблица 1. Основные характеристики пенициллинацилаз из различных источников

Класс	Источник	Гидролизуемые субстраты*	Индуцибельность	Локализация в клетке	Ссылка
Класс I ПА-V	*Streptomyces lavendulae*	Пен-V, Пен-K	нет	вне	[3]
	Dermatophytes	Пен-V	да	внутри	[3]
	Penicillium chrysogenum	Пен-V, Пен-K	да	внутри	[3]
	Bacillus sphaericus	Пен-V	н.д.	вне	[16]
	Fusarium sp.	Пен-V	н.д.	вне	[17]
Класс II ПА-G	*E. coli*	Пен-G, Пен-X	да	внутри	[18]
	Bacillus megaterium	Пен-G, цефалексин, цефалоглицин, цефалоридин	н.д.	вне	[19]
	Alcaligenes faecalis	Пен-G	н.д.	внутри	[20]
	Providencia rettgeri	Пен-G	н.д.	внутри	[21]
Класс III Amp-ПА	*Pseudomonas melanogenum*	Амп, цефалоглицин, цефадрин, цефалексин	н.д.	внутри	[22]

* Амп – ампициллин, Пен-G – пенициллин G, Пен-V – пенициллин V, Пен-K – пенициллин K, Пен-X – пенициллин X.

Вероятнее всего, ПА служит для утилизации амидов ароматических соединений в качестве источника углерода [15]. В *табл. 1* приведены основные характеристики для некоторых наиболее хорошо изученных пенициллинацилаз.

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ПЕНИЦИЛЛИНАЦИЛАЗЫ G

Ген ПА-G кодирует фермент в виде неактивного предшественника. Он состоит из 4 структурных элементов: сигнального пептида, α- и β-субъединицы и межсубъединичного спейсера. Зрелый фермент в случае ПА-G представляет собой гетеродимер общей массой 86 кДа. Он состоит из двух субъединиц, α- и β-, массой 23 и 63 кДа соответственно [23, 24]. Также в состав молекулы ПА входит связанный атом кальция, который, согласно некоторым данным, способствует процессингу фермента [18].

Посттрансляционная модификация ПА-G является многостадийным процессом и была довольно хорошо изучена на примере фермента из *E. coli*. На первом этапе с помощью сигнального пептида происходит транспорт неактивного белка-предшественника из цитоплазмы в периплазматическое пространство клетки, затем сигнальный пептид отщепляется. Далее происходит выщепление спейсера с образованием активного гетеродимера [23, 25, 26].

В клетках *E. coli* большинство ферментов переносится через мембрану с помощью Sec-транслоказы. Sec-система распознает сигнальные пептиды, не имеющие совпадений в аминокислотной последовательности, но обладающие похожими физико-химическими свойствами. SecB-шаперон распознает короткую последовательность, включающую ароматический и положительно заряженный аминокислотные остатки, которая затем обрабатывается Sec-транслоказой [27]. SecB – основной компонент, участвующий в транслокации многих секреторных и периплазматических белков. В работе [28] было показано, что белок SecB необходим для образования *Ec*ПА-G в активной форме.

Другой путь секреции белков – Tat-система (twin arginin translocation). Считают, что она позволяет транспортировать через мембрану свернувшиеся белки, содержащие кофакторы. Tat-система, по-видимому, является полностью независимой от Sec-системы. Для транспорта с помощью Tat-системы необходимо наличие в последовательности сигнального пептида мотива SRRXFLK, содержащего два остатка аргинина [29]. Последовательность сигнального пептида в белке-предшественнике *Ec*ПА содержит два остатка аргинина, разделенных остатком аспарагина (*рис. 2*). В литературе есть данные, что такой сигнальный пептид также может обеспечивать процессинг фермента с помощью Tat-системы. Более поздние по сравнению с работой [28] исследования показывают, что сигнальный пептид фермента из *E. coli* обеспечивает транслокацию белка-предшественника



Рис. 2. Сравнение аминокислотных последовательностей пенициллинацилаз G из различных источников. Звездочкой отмечен каталитически важный остаток серина βSer1, а знаком # – остатки оксианионного центра. Последовательности сигнальных пептидов выделены полужирным курсивом с подчеркиванием, а просто подчеркиванием – последовательности межсубъединичных спейсеров.

Таблица 2. Влияние условий культивирования на выходы рекомбинантных ПА

Источник фермента	Штамм-продуцент		Промотор	Антибиотикоустойчивость	Индуктор	T, °C	Среда	Добавки	Выход фермента	Ссылка
	организм	штамм								
E. coli	*E. coli*	JM109	trc		ИПТГ/арабиноза	30	LB		112 Ед/л/A_{600}, 193 Ед/л/A_{600}	[66]
	E. coli	JM109, BL21, HB101	T7	Kn	арабиноза	30	LB	глицерин	330 Ед/л/A_{600}, 820 Ед/л, 440 Ед/л/A_{600}, 690 Ед/л	[63]
	E. coli	GM48 HB101	T7 Trc	Kn	ИПТГ	30	LB		84 Ед/л/A_{600}	[32]
	E. coli	MC1000	lacZ	Kn	ИПТГ	28	M9	ФУК	14–650 Ед/г	[67]
	E. coli	DH5α	tac lacI	CmR	ИПТГ					[68]
	E. coli	x6212	trc		ИПТГ				1000 Ед/л, 700 Ед/г	[69]
	E. coli	JM101, JM103, JM105	lac	Kn	ИПТГ, галактоза		M9	глюкоза, галактоза, глюкоза+ галактоза	20–800 Ед/л	[70]
	E. coli							SecB-шаперон	40–126 Ед/л/A_{600}	[28]
	E. coli			Cm	ИПТГ	28	M9	Ca^{2+}	1 г/л 1700 Ед/г	[31]
	E. coli		trc T7 araB	Kn Cm	ИПТГ, арабиноза			degP-шаперон	ПА: 20-800 Ед/л, ПА: 10450 Ед/л	[65]
	E. coli	BL21 (DE3)	T7							[60, 71]
	E. coli	HB101, JM109, MC4100	araB	Cm Kn Amp				degP-шаперон	14–470 Ед/л, 570 Ед/л/A_{600}	[60]
A. faecalis	*E. coli*			Cm	ИПТГ		M9	Ca^{2+}	2.3 г/л, 14000 Ед/г(*Af*ПА)	[31]
	E. coli	HB101							1000 Ед, 23 мг/л	[20]
	E. coli	JM109	rhaBAD	Amp	рамноза		M9 LB	глюкоза, пролин	4500 Ед/л, 0.96 Ед/мг	[72]
	E. coli	JM109 (DE3)	T7	Kn	ИПТГ		LB		(200–270)×10^3 Ед/л	[21]
K. citrophila	*E. coli*	BL21 (DE3)	T7	Kn	ИПТГ		YE TH M9 MR		13460 Ед/л 1190 Ед/л/A_{600} 28056 Ед/л 1576 Ед/л/A_{600}	[60]

именно за счет Tat-системы [30]. В случае ПА из *Alcaligenes faecalis* для транспорта используется Sec-система [31].

Эксперименты с белком-предшественником, не содержащим сигнальный пептид, свидетельствуют, что межсубъединичный спейсер сначала отщепляется от N-конца β-субъединицы. В результате образуется свободная β-субъединица и полипептид, состоящий из α-субъединицы и спейсера [23]. В процессе созревания белка-предшественника ПА непосредственно в клетке отщепление спейсера также происходит в две стадии [23]. Этими же авторами было показано, что отщепление спейсера от N-конца β-субъединицы возможно только

в периплазме, в то время как отщепление спейсера от С-конца α-субъединицы также возможно и в цитоплазме клетки. В то же время результаты работы [26] свидетельствуют, что первой сворачивается α-субъединица, которая затем выступает в качестве «матрицы» для правильного сворачивания β-субъединицы. Позже было показано, что отщепление межсубъединичного спейсера является автокаталитическим процессом [25]. Критическую роль в правильном сворачивании фермента играют остатки Lys299 и Thr263 (нумерация аминокислотных остатков неактивного предшественника). Аминокислотные замены в этих положениях приводят к существенному снижению выхода активного фермента и преимущественному образованию неактивного предшественника [25, 32].

Суммируя литературные данные, следует отметить, что все стадии процессинга ПА-G играют важную роль в экспрессии фермента в активной и растворимой форме. Введение аминокислотных замен может повлиять на любую из стадий созревания белка-предшественника, поэтому получение новых мутантных ферментов в активной форме потребует тщательного индивидуального подбора условий культивирования.

ЭКСПРЕССИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ПА В *E. coli*

Для клонирования и экспрессии рекомбинантных ферментов в зависимости от задач можно использовать множество различных систем: бактерии [33–36], дрожжи [37–40], растения [41–43], клетки насекомых [44–47] или искусственные бесклеточные системы [48–51]. Поскольку ПА-G встречается только в бактериях, то для ее экспрессии, как правило, выбирают бактериальные системы на основе клеток *E. coli*. Ниже мы рассмотрим различные варианты экспрессии ПА-G в клетках *E. coli*.

Выбор промотора и вектора для экспрессии

В литературе содержится большое количество информации по гетерологической и гомологической экспрессии ПА в *E. coli*. В качестве вектора использовали как низкокопийные, так и высококопийные плазмиды, а для контролируемой экспрессии использовали самые разные типы промоторов: *lac*, *tac*, *trc*, *T7* и *araB*. Гены ПА-G были клонированы из *E. coli* [52, 53], *Actinomyces viscosus* [54], *Providencia rettgeri* [55], *Kluyvera citrophila* [56], *Bacillus megaterium* [35, 57] и *A. faecalis* [20]. Влияние типа промотора на выход ПА из различных источников суммировано в *табл. 2*. Строгой зависимости между типом промотора и выходом активного фермента нет. Как правило, более сильные промоторы (например, промотор РНК-полимеразы фага Т7) приводят к высокому уровню экспрессии, однако зачастую именно это препятствует правильному сворачиванию фермента и приводит к образованию целевого белка преимущественно в нерастворимой форме в виде так называемых телец включения. Использование менее сильных промоторов часто позволяет увеличить долю растворимого фермента. В каждом случае для конкретного фермента отдельно подбирался оптимальный вариант экспрессирующего вектора.

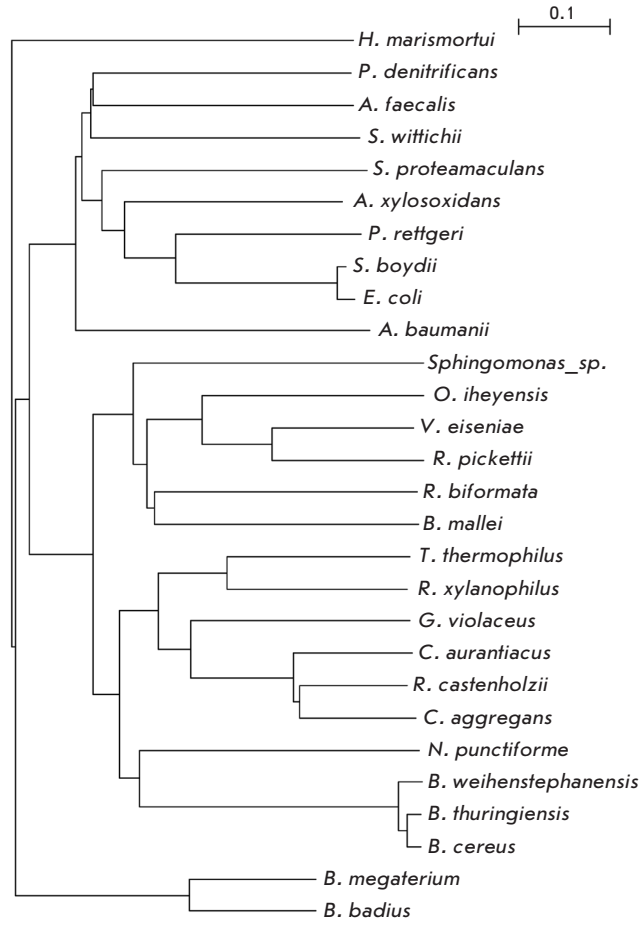


Рис. 3. Филогенетическое дерево пенициллинацилаз G.

Фактором, определяющим уровень экспрессии фермента, может быть как транскрипция, так и трансляция [53]. Лимитирующая стадия определяется выбранным вектором и зависит от природы штамма-хозяина. В любом случае большинство исследователей выбирают сильные промоторы – *tac* и T7, а в качестве индуктора используют изопропил-β-D-тиогалактозид (ИПТГ). Проблему увеличения доли растворимого белка в клетке решают за счет оптимизации параметров культивирования.

Влияние температуры

В работе [58] было показано определяющее влияние температуры культивирования на выход ак-

тивной ПА. Эксперименты по экспрессии проводили при трех температурах: 22, 28 и 37°С. Для всех комбинаций плазмида/штамм-хозяин наибольшие выходы активного фермента наблюдались при 22°С. Такой эффект, вероятнее всего, связан с тем, что при пониженной температуре фермент успевает пройти все стадии посттрансляционной модификации и свернуться в правильную конформацию, за счет этого увеличивается доля растворимого и активного фермента в клетке. При повышении температуры культивирования происходит ускорение синтеза белка, и фермент накапливается в цитоплазме в нерастворимой форме.

Влияние состава среды и различных добавок

Многочисленные исследования показали, что среда для культивирования оказывает большое влияние на уровень экспрессии фермента и на его выход в активной форме. В работе [59] было показано, что наибольшие выходы активной ПА-G достигались при использовании минимальной среды M9 и глюкозы в качестве источника углерода. По сравнению с другими использованными средами доля периплазматического фермента в противовес внутриклеточному возрастала на 2 порядка. В другом случае [60] максимальный выход фермента наоборот был получен при использовании самой богатой среды YE из всех рассмотренных (YE, TH, MR, M9).

Одним из важнейших параметров при культивировании ПА является наличие ионов кальция в среде для культивирования. Ca^{2+} необходим как для роста клеток [61], так и для формирования ПА в активной и растворимой форме, поскольку он входит в структуру молекулы активной ПА [24, 60]. По мнению исследователей, Ca^{2+} необходим для транспорта белка-предшественника через мембрану, а также для корректного сворачивания фермента и созревания белка-предшественника в периплазме [31].

Еще один подход, позволяющий повысить долю растворимой ПА в клетке, – это добавление в богатые среды низкомолекулярных источников углерода. Дополнительный источник углерода позволяет не только увеличить выход биомассы, но и приводит к снижению доли нерастворимого фермента в клетке [62]. В качестве таких источников углерода используют лактозу, глюкозу, арабинозу и глицерин. В работах [62, 63] показано, что добавление глицерина приводит к снижению нерастворимой фракции фермента в периплазматическом пространстве клетки. Как считают некоторые авторы, глицерин может выступать не только в качестве источника углерода, но и как «химический шаперон», облегчая сворачивание и созревание фермента.

Регулирование посттрансляционной модификации

В работе [59] в дополнение к подбору оптимального штамма для экспрессии с одновременной оптимизацией состава среды была модифицирована система транслокации ПА за счет замены сигнального пептида. Как отмечалось выше, сигнальный пептид *Ec*ПА обеспечивает транспорт белка-предшественника с помощью Tat-системы [31], в то же время, согласно литературным данным [64], Sec-зависимый экспорт белков происходит быстрее. Замена системы транслокации позволила существенно увеличить долю растворимого фермента в периплазматической фракции.

Использование шаперонов для правильного фолдинга ПА

Еще один активно развивающийся в последние десятилетия подход – это использование шаперонов при оптимизации экспрессии ферментов. В случае ПА большинство исследователей используют degP-шапероны, или же шапероны Sec-системы, если фермент транспортируется внутри клетки с ее помощью [65]. Использование этого метода позволяет увеличить выходы активного фермента в несколько раз.

Суммируя все вышесказанное, следует отметить, что экспрессия ПА-G зависит от множества факторов. Для создания штамма-суперпродуцента рекомбинантной ПА необходимо иметь детальное представление о лимитирующих стадиях экспрессии

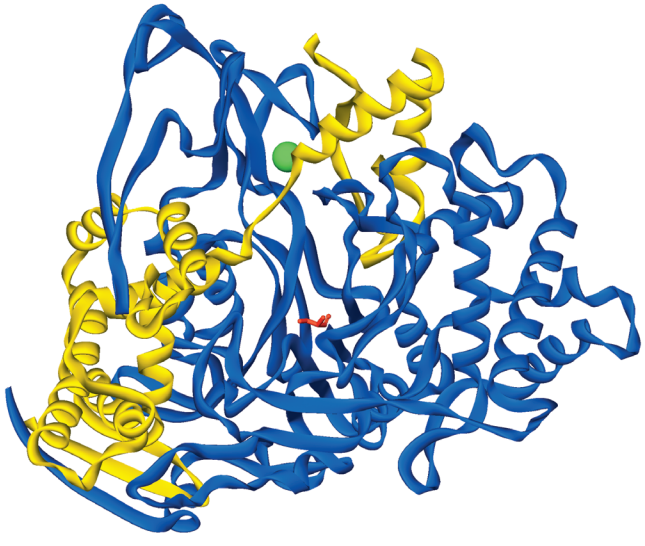


Рис. 4. Структура активного гетеродимера ПА-G из *E. coli* (PDB 1PNK) [24]. Желтым и темно-синим цветом изображены α- и β-субъединицы соответственно. Красным цветом указан каталитический остаток βSer1, зеленым цветом – ион Ca^{2+}.

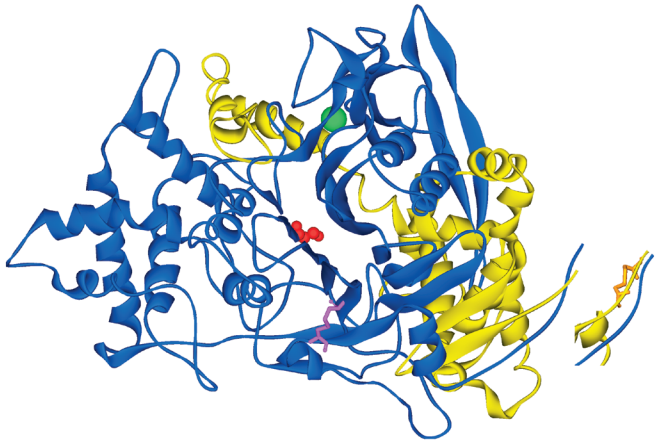


Рис. 5. Структура активного гетеродимера ПА-G из *A. faecalis* (PDB 3K3W). Желтым и темно-синим цветом изображены α- и β-субъединицы соответственно. Красным цветом указан каталитический остаток βSer1, зеленым цветом – ион Ca^{2+}. Малиновым цветом указана дисульфидная связь в β-субъединице между остатками Cys492 и Cys525 в ферменте дикого типа. Вставка справа показывает фиксацию N-конца α-субъединицы и С-конца β-субъединицы за счет дисульфидной связи (выделена оранжевым цветом), полученной в результате парной аминокислотной замены αQ3C / βP751C.

для каждого конкретного организма и экспрессионной системы. Выходы активного фермента также могут быть увеличены за счет использования штаммов, дефектных по протеиназам, и изменения системы транслокации фермента.

СТРУКТУРА ПЕНИЦИЛЛИНАЦИЛАЗ G

Первичная структура ПА-G

В настоящее время в базах данных (GeneBank) имеются полные нуклеотидные и аминокислотные последовательности ПА-G из 40 различных источников. На *рис. 2* представлено выравнивание аминокислотных последовательностей ПА-G из некоторых источников. Для сравнения были отобраны ферменты, наиболее отличающиеся друг от друга. Полностью на рисунке приведена последовательность ПА из *E. coli*, для остальных ферментов для наглядности указаны только отличающиеся остатки. Темно-серым цветом выделены строго консервативные остатки, а светло-серым – подобные.

Как видно из рисунка, в области сигнальных пептидов не наблюдается никаких консервативных остатков или консенсусных последовательностей. Все они отличаются не только по последовательности аминокислотных остатков, но и по их количеству. Межсубъединичные спейсеры также существенно отличаются и не имеют консервативных аминокислотных остатков в своей последовательности.

В приведенных последовательностях ПА-G можно выделить два основных консервативных мотива: AQ(D/E)RXXQ(M/L)(E/D) в α-субъединице и NXXYADXXGNI(G/A)Y в β-субъединице. Кроме этих двух участков встречаются еще несколько высококонсервативных остатков, в частности первый и второй аминокислотные остатки в β-субъединице – каталитически важный остаток серина и следующий за ним остаток аспарагина. Общее число высококонсервативных аминокислотных остатков в последовательностях ПА-G не превышает 7%.

На *рис. 3* представлено филогенетическое дерево пенициллинацилаз G. Как видно из рисунка, наибольшее число этих ферментов встречается в протеобактериях.

Четвертичная структура ПА-G

Первая трехмерная структура пенициллинацилазы-G была определена в 1995 г. для ПА из *E. coli* с разрешением в 1.9 Å (PDB 1PNK) [24]. Она представлена на *рис. 4*. Активный фермент – это гетеродимер массой 86 кДа, состоящий из двух субъединиц: α – меньшего размера (24 кДа) и β – большего размера (62 кДа). На N-конце β-субъединицы расположен каталитический остаток серина (на *рис. 4* выделен красным цветом). Гетеродимер имеет усредненные размеры 70 x 50 x 55 Å. Полипептидные цепи двух субъединиц формируют пирамидальную структуру с глубокой чашеобразной выемкой в центре, на дне которой находится активный центр.

Как и все Ntn-гидролазы, ПА-G содержит типичный мотив укладки *αββα* [73]. ПА содержит один *αββα*-домен, состоящий из α- и β-субъединиц [24], который является одним из самых больших *αββα*-доменов среди всех известных Ntn-гидролаз [73].

Со структурной точки зрения, вся белковая глобула разделяется на три региона – A, B и C. Регион C включает 8 высококонсервативных для всего семейства Ntn-гидролаз элементов вторичной структуры. Эти 8 элементов образуют три слоя из 4-слойных *αββα*-мотивов, и все они антипараллельны. Регионы A и B объединяют похожие элементы вторичной структуры, пространственное расположение которых совпадает для всех Ntn-гидролаз, а положение этих элементов в полипептидной цепи различно для разных представителей семейства. Для ПА-G регионы A, B и C в полипептидной цепи чередуются в порядке C-B-A.

В конце 2009 г. в базе трехмерных структур белков PDB была выложена структура ПА рекомбинантной пенициллинацилазы из *A. faecalis* (*Af*ПА), экспрессированной в клетках *E. coli* (PDB 3K3W) (*рис. 5*),

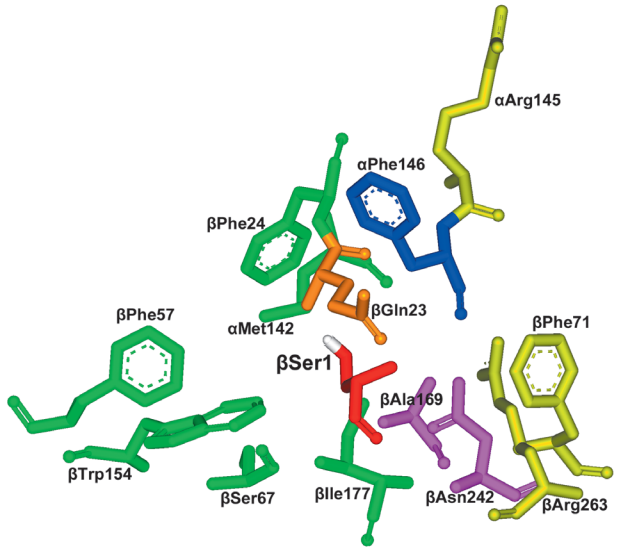


Рис. 6. Ключевые остатки активного центра ПА из *E. coli* (структура PDB 1AI4). Красным и оранжевым соответственно указаны каталитический остаток βSer1 и остаток βGln23, регулирующий нуклеофильность каталитического остатка. Остатки оксианионного центра выделены малиновым. Зеленым выделены остатки субдомена S1 (связывание ацильной части субстрата), желтым – остатки субдомена S2 (связывание нуклеофильной части субстрата), синим цветом указан остаток αPhe146, который входит в оба субдомена.

хотя впервые этот фермент был выделен и охарактеризован еще в начале 90-х годов прошлого века. В мае 2010 г. в PDB была депонирована вторая структура *Af*ПА, полученная из орторомбического кристалла (PDB 3ML0). Особый интерес к *Af*ПА связан с тем, что ее термостабильность одна из самых высоких среди известных пенициллинацилаз G. Анализ структуры этого фермента свидетельствует, что повышенная температурная стабильность связана с наличием в β-субъединице дисульфидной связи между остатками Cys492 и Cys525 (на *рис. 5* выделены малиновым цветом), которой нет в *Ec*ПА. Структура *Af*ПА демонстрирует высокую пространственную гомологию с таковой для *Ec*ПА. Компьютерное наложение структур этих ферментов показывает, что молекула *Af*ПА обладает такой же пространственной организацией полипептидной цепи, особенно в области активного центра. Небольшие отклонения в укладке полипептидной цепи обнаруживаются только на «периферии» во внешней оболочке фермента. Следует отметить, что обе структуры *Af*ПА имеют низкое по современным меркам разрешение – 3.3 и 3.5 Å для PDB3K3W.ENT и PDB3ML0.ENT соответственно. Такое разрешение не позволяет судить о положении и взаимодействии отдельных остатков в области активного центра, что особенно важно при обсуждении их роли в катализе.

СТРУКТУРА АКТИВНОГО ЦЕНТРА *Ec*ПА

Строение каталитического домена

В ранних работах по изучению ПА было показано, что ключевую роль в катализе играет остаток серина. Ковалентная модификация этого остатка при помощи фенилметилсульфонилфторида (ФМСФ) приводит к полной потере ферментом каталитической активности [74]. Данные рентгеноструктурного анализа ковалентного комплекса ПА с ФМСФ (PDB 1PNM) [18] уточнили, что этим ключевым остатком является N-концевой остаток серина β-цепи. Вблизи остатка βSer1 нет имидазольных и карбоксильных групп, которые обычно присутствуют в активном центре сериновых протеиназ и принимают участие в каталитических актах ацилирования и деацилирования посредством переноса протона. Поэтому ПА отнесли к классу так называемых гидролаз с N-концевым нуклеофилом или Ntn-классу (N-terminal nucleophile) [75].

На основании данных по структуре *Ec*ПА в 1995 г. была предложена модель каталитического механизма Ntn-гидролаз [24]. N-Концевой остаток серина βSer1 выступает в роли нуклеофила (на *рис. 6* показан красным). В ходе реакции ковалентный интермедиат формируется через образование переходного состояния, которое стабилизируется так называемым оксианионным центром. Рядом с нуклеофилом βSer1 расположен остаток βGln23 (*рис. 6*, показан оранжевым). Этот остаток повышает нуклеофильность каталитического серина. Оксианионный центр образуют остатки βAsn242 и βAla69 (на *рис. 6* выделены малиновым).

Сравнение аминокислотных последовательностей ПА-G из различных источников (*рис. 3*) свидетельствует, что остаток βAsn242 строго консервативен для всех представленных ферментов, в то время как остаток βAla69 встречается только в половине последовательностей, а в остальных четырех случаях на этом месте располагается остаток аспарагина.

Строение субстратсвязывающего домена

Субстратсвязывающий домен активного центра состоит из двух поддоменов – S1 и S2. Наиболее высокую специфичность проявляет субдомен S1, он отвечает за связывание ацильной части субстрата и состоит в основном из гидрофобных остатков. Закрытая структура этого домена и его гидрофобность делают фермент очень селективным по отношению к бензольному кольцу с небольшими заместителями у C_α-атома или ароматического кольца. Основными

остатками, которые формируют закрытую структуру домена S1, являются следующие: αMet142, αPhe146, βPhe24, βPhe57, βTrp154, βIle177 и βSer67 (на *рис. 6* выделены зеленым). Их дополняют остатки βPro22, βGln23, βVal56, βThr68, βPhe71, βLeu253 и βPhe256 [24, 73] (на *рис. 6* не показаны). Как видно из перечисленного списка, только два остатка принадлежат α-субъединице, а большинство гидрофобных остатков, играющих основную роль в связывании ацильной части субстрата, находятся в β-цепи. Стерически ограниченная гидрофобная полость в свободном состоянии имеет термодинамически невыгодный контакт с окружающей средой. В результате гидрофобного взаимодействия субстрата с ферментом имеет место двойной выигрыш в энергии. Во-первых, за счет энергии переноса гидрофобного субстрата из воды в гидрофобную полость фермента и, во-вторых, за счет вытеснения воды из активного центра.

Предполагаемые π-π-взаимодействия существуют между бензольными кольцами фенилуксусной кислоты (ФУК) и βPhe24, которые располагаются параллельно друг другу. Остаток αPhe146 находится на противоположной стороне гидрофобного кармана. Он также взаимодействует с ФУК и при этом экранирует активный центр от растворителя. Еще один остаток фенилаланина, βPhe57, локализован на дне полости. Наименьшее расстояние между ним и ингибитором составляет 4.7 Å, что слишком много для прямого взаимодействия. Однако этот остаток может быть важен для поддержания структуры сайта связывания, поскольку находится на расстоянии 3.5 и 3.9 Å от остатков βPro22 и βPhe24 соответственно, которые непосредственно участвуют в связывании субстрата.

Второй важный субдомен субстратсвязывающего участка активного центра – поддомен S2, отвечающий за связывание нуклеофильной части. Он представляет собой дно чашеобразной выемки в центре структуры и обеспечивает довольно широкую специфичность фермента к нуклеофильной части. Кроме того, этот субдомен энантиоселективен и дает возможность использовать фермент для разделения оптических изомеров аминов. Домен S2 составляют остатки αArg145, αPhe146, βPhe71 и βArg263 (*рис. 6*, выделены желтым) [76–80].

Как показывает анализ структуры комплекса неактивного мутанта *Ec*ПА βAsn241Ala с пенициллином [79], антибиотик на первом этапе связывается в открытой конформации, что позволяет объемной амидной части субстрата войти в активный центр фермента. В открытой конфомации фенильное кольцо остатка βPhe71 оказывается в плоскости, параллельной β-лактамному кольцу субстрата. Более того, в результате сорбции субстрата возникают ван-дерваальсовы взаимодействия между метильной группой пенициллина и $C^{\delta 1}$-атомом αPhe146, что также усиливает связывание.

Комплекс нативного фермента с «медленным» субстратом сульфоксидом пенициллина G (PDB 1PNM) дает представление о структуре фермента перед актом катализа [78]. Позиции остатков αArg145 и αPhe146 в данном случае соответствуют закрытой конформации, а амидная группа βAsn241 образует водородную связь с карбонильным кислородом субстрата.

Мутационный анализ остатков αArg145 и βArg263 показывает, что оба остатка существенны для катализа, а βArg263 необходим также для автокаталитического созревания [77]. Полученные структурные и кинетические данные также указывают на то, что остаток βArg263 принимает участие в стабилизации переходного состояния, положительный заряд которого увеличивает полярность оксианионного центра. Следует отметить, что остатки как βArg263, так и αArg145 консервативны и присутствуют в пенициллинацилазах G почти из всех известных источников (см. *рис. 2*).

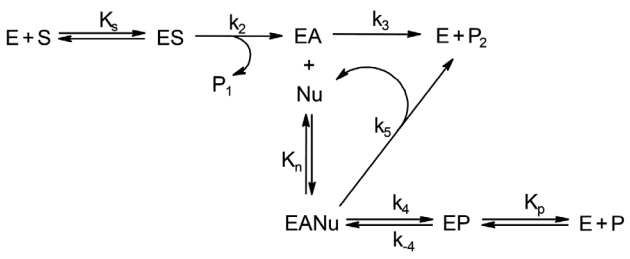
Еще одной особенностью каталитического механизма ПА является существование активного центра в открытой и закрытой конформации, что было показано в работе [80], в которой были определены структуры *Ec*ПА в комплексе с различными лигандами. Открытая конформация необходима для связывания субстрата, а для катализа необходимо экранирование активного центра от растворителя, что достигается в закрытой конформации.

БЕЛКОВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ ПА-G

Раньше основным подходом для увеличения эффективности промышленно значимых процессов была оптимизация условий биокаталитического процесса. Такая оптимизация проводилась на основании кинетических параметров ферментативной реакции и физико-химических свойств компонентов реакционной среды. Такой подход вполне оправдывает себя и дает возможность получить очень хорошие результаты. Однако в настоящее время этот подход практически полностью реализовал свой потенциал и уходит на второй план, уступая место дизайну самих ферментов.

Рентгеноструктурный анализ ПА, ее мутантов и комплексов с различными субстратами открыл совершенно новые возможности как для понимания структурно-функциональных взаимосвязей, так и для рационального дизайна активного центра фермента. Цель такого дизайна улучшение свойств фермента, в первую очередь тех, которые могли бы увеличить эффективность ПА в реакциях синтеза антибиотиков и разделения энантиомеров.

В силу термодинамических причин для синтеза антибиотиков используется не прямая конденсация, а реакция нуклеофильного замещения. Минимальная схема приведена ниже:



Минимальная схема получения полусинтетических β-лактамных антибиотиков с помощью реакции нуклеофильного замещения. E, S и ES – фермент, субстрат (донор ацильной части) и фермент-субстратный комплекс соответственно, EA, Nu и EANu – ацилфермент, нуклеофил и двойной комплекс ацилфермент-нуклеофил соответственно. K_s, K_n и K_p – константы связывания субстрата, нуклеофила и продукта синтеза со свободным ферментом E, ацилферментом EA и свободным ферментом E соответственно.

В работах [81, 82] приведен подробный анализ этой схемы, а также различных ее модификаций. Основным результатом проведенного анализа является вывод о том, что для описания эффективности процесса нельзя использовать «привычные» энзимологам параметры, такие, как величины каталитической константы, константы Михаэлиса и констант ингибирования продуктами реакции. Вместо них используют параметры α, β и γ. Параметр $\alpha = (k_{-4}/K_p)/(k_2/K_s)$ характеризует специфичность фермента по отношению к продукту и исходному ацильному донору, параметр $\beta = k_4/(k_3 \cdot K_n)$ – максимальную нуклеофильную активность акцептора, а $\gamma = k_э/k_4$ – способность тройного комплекса EANu превращаться по гидролитическому или синтетическому пути (соотношение скоростей синтеза и гидролиза S/H при превращении комплекса EANu). В связи с вышесказанным, именно эти параметры и будут нами использованы для оценки эффективности экспериментов по белковой инженерии ПА при исследовании мутантных ферментов в синтезе антибиотиков.

Получение химерных ПА с помощью генной мозаики

В настоящее время для получения мутантных ферментов с улучшенными свойствами широко используются самые различные подходы, основанные как на упорядоченном, так и на неупорядоченном введении аминокислотных замен и даже целых фрагментов полипептидной цепи. Одним из таких методов, который стал популярен в последние годы и который успешно используется для улучшения свойств ферментов, вовлеченных в технологические процессы, является генная мозаика (DNA shuffling). Этот метод основан на рекомбинации генов гомологичных ферментов из различных организмов, в результате чего получаются химерные белки с самым разнообразным набором отдельных фрагментов из исходных ферментов.

Таблица 3. Синтетические свойства родительских и гибридных ПА (15 мМ D-ФГА, 25 мМ 6-АПК, pH 7.0)

Фермент	α	β, $мМ^{-1}$	γ	P_{max}, мМ	v_{Ps}, %
ПА *E. coli*	7.8	78	0.14	2.2	100
ПА *K. cryocrescens*	12.7	98	0.19	2.1	110
ПА *P. rettgeri*	5.8	32	0.30	1.9	59
ПА 6G8	11.1	130	0.12	2.6	149
ПА 73C4	11.6	120	0.12	2.4	95
ПА 6B11	6.4	115	0.13	2.5	115

Методика генной мозаики была применена для пенициллинацилаз из *E. coli*, *K. cryocrescens* и *P. rettgeri* [83]. Степень идентичности между генами этих ферментов составляет 77% (*E. coli* – *K. cryocrescens*), 61% (*E. coli* – *P. rettgeri*) и 61% (*K. cryocrescens* – *P. rettgeri*). Анализ 81 трансформанта выявил 3 гибридных фермента как с более высокой каталитической активностью (v_{Ps}), так и с улучшенными синтетическими свойствами (*табл. 3*).

Интересно отметить, что для гибрида 6B11 избирательно улучшаются все параметры, при этом уменьшение α, что было показано в независимом эксперименте, вызвано двукратным увеличением K_P для продукта синтеза – ампициллина, а для гибрида 73C4 увеличение α вызвано двукратным увеличением K_S для D-ФГА.

Секвенирование показало, что гибридные мутанты 6B11 и 73C4 получены за счет включения в ген ПА из *E. coli* участков гена ПА из *K. cryocrescens*. Также были найдены случайные мутации, не относящиеся ни к одному из родительских генов, большинство из которых находилось далеко от активного центра. Однако даже такие мутации могут быть достаточно эффективны. Так, мутация остатка βGly385Ser, находящегося на расстоянии 13.5 Å от активного центра и найденная в гибриде 6G8, может влиять на доступность активного центра в целом. Для изучения вклада этой мутации в синтетические свойства гибрида 6G8

Таблица 4. Каталитическая эффективность мутантных *Ec*ПА в реакциях синтеза антибиотиков [84]

Фермент	Донор ацильной части	Ампициллин			Цефалексин		
		α	β, $мМ^{-1}$	1/γ	α	β, $мМ^{-1}$	1/γ
PAS2	ФГА	13.2	0.5	6	7.3	0.5	59
	ФГМ	16.4	0.5	6	9.1	0.5	59
αR160K αF161L βF24M	ФГА	218	6.3	364	58.8	18.4	69
	ФГМ	8.8	6.3	364	2.4	18.4	69
βF24A	ФГА	209	10.2	286	88.8	21.5	154
	ФГМ	11.6	10.2	286	4.9	21.5	154
αR160P αF161A βF24A	ФГА	200	4.9	167	57.2	21.1	58
	ФГМ	7.6	4.9	167	2.2	21.1	58

авторы сделали соответствующую одиночную замену в ПА *E. coli*. Полученные результаты впечатляют своей непредсказуемостью: максимальный выход продукта увеличился на 22%, а соотношение S/H на 80% по сравнению с ферментом дикого типа в идентичных условиях, при этом также не наблюдалось увеличения параметра α. Аналогично была обнаружена случайная мутация αAsp148Gly, которая для вновь созданного одиночного мутанта дает увеличение выхода в синтезе ампициллина на 20% при увеличении S/H на 80%. В отличие от предыдущего случая, этот эффект можно объяснить тем, что остаток αAsp148 расположен в основании каталитической α-петли, ответственной за конформационные переходы в активном центре, и, как было показано на примере мутагенеза остатков αArg145 и αPhe146, любые изменения в этой петле могут привести к изменению как субстратной специфичности, так и каталитической активности.

Таким образом, метод генной мозаики можно использовать не только как инструмент получения гибридных мутантов ПА с улучшенными свойствами, но и как многообещающий инструмент поиска новых мишеней для сайт-направленного мутагенеза, которые невозможно было бы предсказать на основании изучения трехмерной структуры фермента.

Комбинационный насыщающий мутагенез

В работе [84] для трех аминокислотных остатков, расположенных вблизи от активного центра фермента, αR160, αF161 и βF24, был использован подход, сочетающий насыщающий мутагенез каждого остатка с комбинированием введенных мутаций (т.е. получали как одинарные, так и двойные, и тройные мутанты). С помощью вырожденных праймеров был проведен неупорядоченный мутагенез этих остатков и получена библиотека, содержащая более 700 различных клонов. Скрининг проводился с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии по способности полученных мутантов к синтезу ампициллина. В результате были отобраны три мутанта с повышенными каталитическими характеристиками в реакции синтеза ампициллина (*табл. 4*). Причем один из мутантов – βF24A, также проявляет повышенные каталитические характеристики в реакции синтеза цефалексина.

Однако метод неупорядоченного мутагенеза в случае ПА не нашел широкого применения из-за отсутствия простой системы скрининга полученных мутантов. Наиболее широкое распространение получил метод направленного мутагенеза.

РАЦИОНАЛЬНЫЙ ДИЗАЙН

Участок связывания ацильной части

Для эффективного гидролиза природных антибиотиков с целью получения β-лактамных ядер желательна низкая специфичность к побочному продукту гидролиза бензилпенициллина – фенилуксусной кислоте, конкурентному ингибитору ПА. Для эффективного синтеза полусинтетических неприродных антибиотиков важна высокая специфичность к C_α-замещенным производным ФУК (*D*-фенилглицин, миндальная кислота, C_α-метил-ФУК), при этом достигается более полное насыщение по ацильному донору. Для природных ПА значения константы Михаэлиса для C_α-замещенных производных ФУК составляют величину порядка 10–100 мМ, что в 100–1000 раз выше, чем для ФУК [85]. В связи с этим получение мутантов с низкими значениями константы Михаэлиса для C_α-замещенных ФУК и высокими константами ингибирования для ФУК представляет большой практический интерес.

В работе [86] были получены точечные βPhe24Ala и αPhe146Tyr и двойной βPhe24Ala/αPhe146Tyr мутанты, отвечающие этим требованиям. Напри-

мер, в случае мутанта *Ec*ПА βPhe24Ala ингибирование ФУК по сравнению с ферментом дикого типа было снижено в 18 раз (K_p = 1.1 и 0.06 мМ соответственно), а сродство к C_α-замещенным производным ФУК было увеличено в 5 раз. При конструировании мутантов авторы предположили, что замена гидрофобных остатков, составляющих основу центра связывания ацильной части, может существенно изменить специфичность фермента по отношению как к C_α-замещенным ФУК, так и к самому природному субстрату.

Рентгеноструктурные данные, полученные для этих мутантов в комплексе с различными производными ФУК, объясняют наблюдаемые эффекты. Так, удаление ароматического кольца в мутанте βF24A приводит к структурным перестройкам в активном центре, в результате чего в этом мутанте ФУК связывается в открытой конформации в отличие от фермента дикого типа, где ФУК связывается в закрытой конформации. В результате такого связывания исчезают водородные связи между карбонильным кислородом ФУК и остатками βAla69 и βAsn241, образующими оксианионный центр, что объясняет многократное увеличение константы ингибирования.

В отличие от ФУК C_α-метил-ФУК в мутанте βF24A связывается в закрытой конформации. При этом C_α-CH_3 занимает место удаленной фенильной группы, что приводит к десятикратному улучшению связывания.

Интересно также заметить, что мутация по остатку βPhe24 оказывает сильное влияние на стереоспецифичность фермента по отношению к (*R*)-изомерам C_α-замещенных производных ФУК и может рассматриваться как потенциальная мишень для изменения энантиоизбирательности фермента с целью получения оптически чистых C_α-замещенных производных ФУК.

Замена фенилаланина на тирозин в мутанте αF146Y не приводит к конформационным перестройкам в активном центре, что объясняет связывание ФУК, сравнимое с *Ec*ПА дикого типа. Однако при связывании C_α-замещенных ФУК образующиеся ван-дер-ваальсовы контакты между C_α-заместителем и αTyr146:OH делают связывание более продуктивным.

В работе [87] была изменена природная пенициллиновая специфичность ПА *E. coli* на цефалоспориновую, что открыло возможность использования ПА для получения 7-аминоцефалоспорановой кислоты. Для установления соответствия остатков, ответственных за связывание ароматической гидрофобной ацильной части пенициллина в ПА и линейной гидрофильной (глутарильной) ацильной части цефалоспорина в цефалоспоринацилазе из *P. diminuta* (ЦА), было проведено выравнивание аминокислотных последовательностей *Ec*ПА и ЦА. На основании проведенного сравнения семь остатков гидрофобного кармана *Ec*ПА заменили на соответствующие семь остатков из ЦА. Полученный таким образом многоточечный мутант характеризовался восьмикратным улучшением специфичности по отношению к цефалоспорину С. К сожалению, эти результаты пока представляют собой не более чем научную ценность, так как величина удельной активности полученного мутанта была намного ниже активности природного цефалоспоринового фермента.

Таблица 5. Кинетические параметры синтеза ампициллина для *Ec*ПА дикого типа и мутантов по αArg145 (15 мМ D-ФГА, 25 мМ 6-АПК, pH 7.0)

Фермент	α	β, $мМ^{-1}$	γ	P_{max}, мМ
*Ec*ПА дикий тип	7.7	80	0.14	2.2
*Ec*ПА αArg145Gly	29	420	0.04	3.6
*Ec*ПА αArg145Ser	14	350	0.05	3.3
*Ec*ПА αArg145Leu	15	280	0.06	2.8

Направленный мутагенез на участке связывания нуклеофила

Одного лишь улучшения связывания ацильной части субстрата недостаточно для повышения синтетических способностей фермента. Как было показано в работе [88] для мутанта βPhe24Ala, улучшение связывания *D*-фенилглицинамида приводит также к увеличению связывания продукта синтеза – ампициллина и, как следствие, к увеличению параметра α. Однако интересным оказался тот факт, что мутации по остаткам βPhe24 и αPhe146, отвечающим за связывание ацильной части, приводят также к улучшению нуклеофильности 6-АПК более чем в 2 раза.

С одной стороны, это не противоречит базовым принципам структурной организации белковой молекулы в том, что изменение или удаление одного из звеньев белковой цепи может привести к структурным перестройкам в близлежащих областях. Мутации на участке связывания ацильной части могут, в принципе, привести к изменениям на участке связывания нуклеофила, при том что остатки βPhe24 и αPhe146 находятся на пограничной области, образуя горлышко гидрофобного кармана (*рис. 6*).

С другой стороны, нельзя точно определить какой из факторов – улучшение связывания нуклеофила (K_n) или уменьшение реакционной способности воды (k_3, k_5), играет решающую роль. Так, замена βPhe24Ala могла спровоцировать изменение поло-

жения соседнего остатка, βGlu23, координирующего деацилирующую молекулу воды и, таким образом, уменьшить скорость гидролиза. Однако на основании имеющихся данных совершенно точно установлено, что улучшение специфичности фермента по отношению к нуклеофилу приводит к увеличению β, поэтому эффекты от мутаций на участке связывания нуклеофила являются наиболее предсказуемыми. В работе [89] авторы добились значительного увеличения параметра β за счет мутаций по остатку αArg145, который по данным рентгеноструктурного анализа взаимодействует с карбоксильной группой пенициллина в закрытой конформации и может также влиять на эффективность связывания 6-АПК. Для изучения всех возможных эффектов от замены αArg145 был проведен насыщающий мутагенез. Предварительные исследования реакций ферментативного синтеза ампициллина в разбавленных растворах показали, что у всех 19 мутантов возрастает способность к переносу ацильной группы на 6-АПК. Далее были отобраны три наиболее перспективных мутанта *Ec*ПА – αArg145Leu, αArg145Gly, αArg145Ser, и проведено детальное изучение их кинетических параметров (*табл. 5*).

Полученные данные свидетельствуют о том, что удаление положительного заряда в позиции α145 приводит к значительному увеличению нуклеофильной способности 6-АПК. Почти синхронное увеличение α наводит на мысль о том, что улучшение связывания нуклеофила (K_n, см. схему выше), выраженное в увеличении β, неизбежно ведет к улучшению связывания продукта синтеза (K_p, см. схему выше) и невозможно улучшить оба параметра сразу. Однако негативное влияние α можно в какой-то степени нивелировать, если выводить ампициллин из реакционной среды.

С целью уточнения влияния эффекта от замены остатка αPhe146, который, по данным рентгеноструктурного анализа, взаимодействует с метильной группой пенициллина при его связывании в открытой конформации и, в принципе, может оказывать влияние на связывание β-лактамного кольца 6-АПК, был произведен аналогичный мутационный анализ. Предварительные исследования реакций синтеза ампициллина показали, что практически у всех 19 мутантов возрастает способность к переносу ацильной группы на 6-АПК, однако каталитическая активность падает по крайней мере на порядок, что не позволяет авторам более детально исследовать их синтетические способности.

Ярким примером эффективности использования рационального дизайна для улучшения каталитических свойств *Ec*ПА является работа [90]. Авторами были проведены анализ структуры и компьютерное моделирование связывания в активном центре *Ec*ПА ряда лигандов. Результаты моделирования показали, что мутация по остатку βPhe71 изменяет ориентацию субстрата и усиливает взаимодействие субстратов с оксианионным центром, поэтому следовало ожидать, что мутация по этому остатку может увеличить каталитическую активность пенициллинацилазы и изменить стереоселективность, так же как и специфичность фермента по отношению к уходящей группе. Было получено четыре мутанта – βPhe71Lys, βPhe71Glu, βPhe71Leu и βPhe71Arg. Три мутанта показали более высокие каталитические характеристики при синтезе антибиотиков, а два мутанта – более высокую стереоселективность при разделении энантиомеров, однако эффект введения определенной аминокислоты для вышеописанных процессов был противоположный. Например, мутант с заменой βPhe71Leu имел наиболее высокие каталитические характеристики в синтезе антибиотиков, в то время как его энантиоселективность была почти на порядок хуже, чем у фермента дикого типа. Самый большой эффект увеличения энантиоселективности наблюдался для мутанта βPhe71Lys, однако его эффективность в синтезе антибиотиков была намного ниже по сравнению с мутантом βPhe71Leu. На основании полученных данных был сделан вывод, что одновременное улучшение всех основных каталитических свойств фермента для использования в биокатализе вряд ли представляется возможным, и для решения конкретной задачи в зависимости от структуры субстрата необходимо проводить тонкую индивидуальную настройку фермента.

Получение пермутированного фермента

Еще один подход к изменению свойств фермента – это получение так называемых пермутированных ферментов. Как видно из *рис. 4* и *5* в ПА из *E. coli* и *A. faecalis* N-конец α-субъединицы сближен с С-концом β-субъединицы, что позволяет получить пермутированный одноцепочечный фермент за счет соединения этих концов гибким спейсером. Создание такого одноцепочечного фермента позволит получать рекомбинантный фермент прямо в цитоплазме, в этом случае будут исключены стадии транспортировки белка-предшественника в периплазму и выщепления межсубъединичного спейсера, которые, как было показано выше, являются основными причинами низкого выхода фермента в существующих системах экспрессии ПА-G. В настоящее время для ПА-G известна всего одна работа по получению пермутированного фермента [91]. В качестве сшивки была выбрана последовательность из четырех случайных аминокислотных остатков. Была создана библиотека мутантных клонов с геном пермутированного фермента. В результате скрининга этой библиотеки было найдено 20 клонов, продуцирующих

активный фермент, однако по величине специфической активности все полученные варианты значительно уступали ферменту дикого типа.

Стабилизация *Af*ПА за счет образования дисульфидных связей

Как уже отмечалось выше, ПА из *A. faecalis* является одной из самых термостабильных среди известных пенициллинацилаз [20], и это свойство обусловлено наличием в структуре *Af*ПА дисульфидной связи внутри β-субъединицы (*рис. 5*). Для дальнейшей стабилизации фермента было решено ввести дополнительную дисульфидную связь [92]. Поскольку на момент проведения экспериментов (2006 г.) структура фермента еще не была определена, то авторы построили модельную структуру методом гомологичного моделирования на основе известной структуры *Ec*ПА. Для поиска возможных положений введения дисульфидной связи авторы использовали программу MODIP. В результате компьютерного анализа модельной структуры программой было предложено 32 варианта введения дисульфидной связи, из которых после дополнительного анализа авторы выбрали только два варианта – парные аминокислотные замены αQ3C/βP561C и αT52C/αY64C. В случае первой пары замен должна была образоваться ковалентная связь между N-концом α-субъединицы и C-концом β-субъединицы (*рис. 5*, вставка), который практически не структурирован (*рис. 5*). В случае второй пары замен образующаяся дисульфидная связь должна была стабилизировать петлю, соединяющую две α-спирали. Анализ свойств полученных мутантов показал, что введение точечных замен αGlu3Cys и βPro561Cys не влияло на скорость термоинактивации, в то время как в случае двойной замены температура, при которой фермент терял 50% активности, за 20 мин возросла на 3°C – с 50 до 53°C. В случае второй пары замен термостабильность фермента не изменилась. Отсутствие эффекта стабилизации для второй пары замен позволяет предположить, что стабильность двух α-спиралей не является критической для общей стабильности белковой глобулы. Это предположение согласуется с последними данными рентгеноструктурного анализа, согласно которым эти α-спирали имеют дополнительные контакты со структурными элементами β-субъединицы.

ВЫВОДЫ

Несмотря на большое количество работ по белковой инженерии пенициллинацилаз, проблема направленного изменения каталитических свойств и стабильности ПА еще очень далека от решения. Как видно из приведенных данных, на катализ влияют остатки в радиусе 15–20 Å вокруг каталитического центра фермента. Поэтому задача детального изучения роли аминокислотных остатков в области активного центра в катализе и субстратной специфичности и получение информации об их влиянии на конкретные каталитические характеристики с теми или иными субстратами являются очень актуальными как с точки зрения практической биотехнологии, так и с позиций фундаментальной науки. Можно надеяться, что выделение и изучение свойств пенициллинацилаз из других источников также позволит выявить основные закономерности во взаимосвязи структура–функция этого фермента. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 10-04-01334-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sakaguchi K., Murao S. // J. Agr. Chem. Soc. Japan. 1950. V. 23. P. 1–3.
2. Claridge C.A., Luttinger J.R., Lein J. // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1963. V. 113. P. 1008–1012.
3. Hamilton-Miller J.M. // Bacteriol. Rev. 1966. V. 30. P. 761–771.
4. Valle F., Balbas P., Merino E., et al. // Trends Biochem. Sci. 1991. V. 16. P. 36–40.
5. Arroyo M., de la Mata I., Acebal C., et al. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003. V. 60. P. 507–514.
6. Rajendhran J., Gunasekaran P. // J. Biosci. Bioeng. 2004. V. 97. P. 1–13.
7. Polderman-Tijmes J.J. Biochemical characterization of alpha-amino acid ester hydrolases. Ph.D. Thesis. Groningen: University of Groningen, 2004.
8. Deshpande B.S., Ambedkar S.S., Sudhakaran V.K., et al. // World J. Microbiol. Biotechnol. 1994. V. 10. P. 129–138.
9. Murao S. // J. Agr. Chem. Soc. Japan. 1955. V. 29. P. 404–407.
10. Batchelor F.R., Doyle F.P., Nayler J.H.C., et al. // Nature. 1959. V. 183. P. 257–259.
11. Vanderhaeghe H. // Methods Enzymol. 1975. V. 43. P. 721–728.
12. Shewale J.G., Deshpande B.S., Sudhakaran V.K., et al. // Process Biochem. Int. 1990. V. 25. P. 97–103.
13. Shewale J.G., Sudhakaran V.K. // Enzyme Microb. Technol. 1997. V. 20. P. 402–410.
14. Bruggink A., Roos E.C., De Vroom E. // Org. Process. Res. Dev. 1998. V. 2. P. 128–133.
15. Швядас В.К., Клесов А.А., Ныс П.С. / // Антибиотики. 1976. Т. 21. С. 698–704
16. Pundle A., SivaRaman H. // Curr. Microbiol. 1997. V. 34. P. 144–148.
17. Sudhakaran V.K., Shewale J.G. // Hindustan Antibiot. Bull. 1995. V. 37. P. 9–15.
18. Hewitt L., Kasche V., Lummer K., et al. // J. Mol. Biol. 2000. V. 302. P. 887–898.
19. Savidge T.A., Cole M. // Methods Enzymol. 1975. V. 43. P. 705–721.
20. Verhaert R.M., Riemens A.M., van der Laan J.M. // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63. P. 3412–3418.
21. Cheng T., Chen M., Zheng H. // Protein. Expr. Purif. 2006. V. 46. P. 107–113.
22. Kim D.J., Byun S.M. // Biochim. Biophys. Acta. 1990. V. 1040. P. 12–18.

23. Schumacher G., Sizmann D., Haug H., et al. // Nucleic. Acids Res. 1986. V. 14. P. 5713–5727.
24. Duggleby H.J., Tolley S.P., Hill C.P., et al. // Nature. 1995. V. 373. P. 264–268.
25. Kasche V., Lummer K., Nurk A., et al. // Biochim. Biophys. Acta. 1999. V. 1433. P. 76–86.
26. Lindsay C.D., Pain R.H. // Eur. J. Biochem. 1990. V. 192. № 1. P. 133–141.
27. Economou A. // FEBS Lett. 2000. V. 476. P. 18–21.
28. Chou C.P., Tseng J.H., Kuo B.Y., et al. // Biotechnol. Prog. 1999. V. 15. P. 439–445.
29. Berks B.C. // Mol. Microbiol. 1996. V. 22. P. 393–404.
30. Ignatova Z., Hornle C., Nurk A., et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002. V. 291. P. 146–149.
31. Kasche V., Ignatova Z., Markl H., et al. // Biotechnol. Prog. 2005. V. 21. P. 432–438.
32. Chou C.P., Yu C.C., Tseng J.H., et al. // Biotechnol. Bioeng. 1999. V. 63. P. 263–272.
33. Cai G., Zhu S., Yang S., et al. // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. P. 2764–2770.
34. Zhang L.F., Li Z.W., Zhang Q.J. // Chin. J. Biotechnol. 1991. V. 7. P. 63–72.
35. Martin L., Prieto M.A., Cortes E., et al. // FEMS Microbiol. Lett. 1995. V. 125. P. 287–292.
36. Polderman-Tijmes J.J., Jekel P.A., de Vries E.J., et al. // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. P. 211–218.
37. Kang H.K., Park J.Y., Ahn J.S., et al. // J. Microbiol. Biotechnol. 2009. V. 19. P. 172–177.
38. Lu Y., Chi X., Yang Q., et al. // Extremophiles. 2009. V. 13. P. 875–884.
39. Lu Y., Zhao H., Zhang C., et. al. // Biotechnol. Lett. 2009. V. 31. P. 1525–1530.
40. Madhavan A., Tamalampudi S., Ushida K., et al. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009. V. 82. P. 1067–1078.
41. Karimi M., De Meyer B., Hilson P. // Trends. Plant. Sci. 2005. V. 10. P. 103–105.
42. Karimi M., Depicker A., Hilson P. // Plant. Physiol. 2007. V. 145. P. 1144–1154.
43. Sando T., Takeno S., Watanabe N. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2008. V. 72. P. 2903–2917.
44. Cao Y., Lu Z., Sun P., et al. // Wei Sheng Wu Xue Bao. 2008. V. 48. P. 312–316.
45. Khodabandehloo M., Shamsi Shahrabadi M., Keyvani H. // Iran Biomed. J. 2009. V. 13. P. 9–18.
46. Liu Z., Yang G., Li B. // Mol. Biotechnol. 2003. V. 24. P. 21–26.
47. Liu Z., Yang G.Z., Chi C.W., et al. // Protein. Pept. Lett. 2002. V. 9. P. 419–426.
48. Farrokhi N., Hrmova M., Burton R.A., et al. // Methods Mol. Biol. 2009. V. 513. P. 175–198.
49. Schwarz D., Dotsch V., Bernhard F. // Proteomics. 2008. V. 8. P. 3933–3946.
50. Schwarz D., Junge F., Durst F., et al. // Nat. Protoc. 2007. V. 2. P. 2945–2957.
51. Спирин А.С. // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. С. 1394–1402.
52. Oh S.J., Kim Y.C., Park Y.W., et al. // Gene. 1987. V. 56. P. 87–97.
53. Chou C.P., Kuo B.Y., Lin W.J. // J. Biosci. Bioeng. 1999. V. 88. P. 160–167.
54. Ohashi H., Katsuta Y., Nagashima M., et al. // Appl. Environ. Microbiol. 1989. V. 55. P. 1351–1356.
55. Daumy G.O., Williams J.A., McColl A.S., et al. // J. Bacteriol. 1986. V. 168. P. 431–433.
56. Barbero J.L., Buesa J.M., Gonzalez de Buitrago G., et al. // Gene. 1986. V. 49. P. 69–80.
57. Meevootisom V., Somsuk P., Prachaktam R., et al. // Appl. Environ. Microbiol. 1983. V. 46. P. 1227–1229.
58. Dai M., Zhu Y., Yang Y., et al. // Eur. J. Biochem. 2001. V. 268. P. 1298–1303
59. Ignatova Z., Mahsunah A., Georgieva M., et al. // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. P. 1237–1245.
60. Jiang Y.M., Tong W.Y., Wei D.Z. // Biotechnol. Prog. 2007. V. 23. P. 1031–1037.
61. Norris V., Grant S., Freestone P., et al. // J. Bacteriol. 1996. V. 178. P. 3677–3682.
62. Scherrer S., Robas N., Zouheiry H., et al. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1994. V. 42. P. 85–91.
63. Xu Y., Rosenkranz S., Weng C.L., et al. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 72. P. 529–536.
64. Berks B.C., Sargent F., Palmer T. // Mol. Microbiol. 2000. V. 35. P. 260–274.
65. Narayanan N., Xu Y., Chou C.P. // Biotechnol. Prog. 2006. V. 22. P. 1518–1523.
66. Xu Y., Weng C.L., Narayanan N., et al. // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. P. 6247–6253.
67. Maresova H., Stepanek V., Kyslik P. // Biotechnol. Bioeng. 2001. V. 75. P. 46–52.
68. Sriubolmas N., Panbangred W., Sriurairatana S., et al. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1997. V. 47. P. 373–378.
69. Vohra P.K., Sharma R., Kashyap D.R., et al. // Biotechnol. Lett. 2001. V. 23. P. 531–535.
70. De Leon A., Breceda G.B., Barba de la Rosa A.P., et al. // Biotechnol. Lett. 2003. V. 25. P. 1397–1402.
71. Huang S.W., Lin Y.H., Chin H.L., et al. // Biotechnol. Prog. 2002. V. 18. P. 668–671.
72. Deak P.M., Lutz-Wahl S., Bothe H., et al. // Biotechnol. Lett. 2003. V. 25. P. 397–400.
73. Oinonen C., Rouvinen J. // Protein. Sci. 2000. V. 9. P. 2329–2337.
74. Швядас В.К., Марголин А.Л., Шерстюк С.Ф. и др. // Биоорган. химия. 1977. Т. 3. С. 546–554.
75. Brannigan J.A., Dodson G., Duggleby H.J. // Nature. 1995. V. 378. P. 416–419.
76. Alkema W.B., Hensgens C.M., Snijder H.J., et al. // Protein. Eng. Des. Sel. 2004. V. 17. P. 473–480.
77. Alkema W.B., Prins A.K., de Vries E., et al. // Biochem. J. 2002. V. 365. P. 303–309.
78. McVey C.E., Walsh M.A., Dodson G.G., et al. // J. Mol. Biol. 2001. V. 313. P. 139–150.
79. Alkema W.B., Hensgens C.M., Kroezinga E.H., et al. // Protein. Eng. 2000. V. 13. P. 857–863.
80. Done S.H., Brannigan J.A., Moody P.C., et al. // J. Mol. Biol. 1998. V. 284. P. 463–475.
81. Gololobov M.Yu., Borisov I.L., Švedas V.K. // J. Theor. Biol. 1989. V. 140. P. 193–204.
82. Youshko M.I., Bukhanov A.L., Švedas V.K. // Biochemistry (Moscow). 2003. V. 68. № 3. P. 334–338.
83. Jager S.A.W., Jekel P.A., Janssen D.B. // Enzyme Microb. Technol. 2007. V. 40. P. 1335–1344.
84. Gabor E.M., Janssen D.B. // Protein Eng. Des. Sel. 2004. V. 17. P. 571–579.
85. Margolin A.L., Svedas V.K., Berezin I.V., et al. // Biochim. Biophys. Acta. 1980. V. 616. P. 283–289.
86. Guranda D.T., van Langen L.M., van Rantwijk F., et al. // Tetrahedron. Asym. 2001. V. 12. P. 1645–1650.
87. Oh B., Kim K., Park J., et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004. V. 319. P. 486–492.
88. Alkema W.B., Dijkhuis A.J., De Vries E., et al. // Eur. J. Biochem. 2002. V. 269. P. 2093–2100.
89. Jager S.A., Shapovalova I.V., Jekel P.A., et al. // J. Biotechnol. 2008. V. 133. P. 18–26.
90. Шаповалова И.В., Алкема В.Б.Л., Ямскова О.В. и др. // Acta Naturae. 2009. Т. 1. С. 102–109.
91. Flores G., Soberon X., Osuna J. // Protein Sci. 2004. V. 13. P. 1677–1683.
92. Wang T., Zhu H., Ma X., et al. // Protein. Pept. Lett. 2006. V. 13. P. 177–183.