

УДК 577.1;577.15

Исследование взаимосвязи структура–функция–стабильность в дрожжевой оксидазе *D*-аминокислот: гидрофобизация альфа-спиралей

И. В. Голубев^{1,2}, Н. В. Комарова^{2,3}, К. В. Рыженкова^{1,2}, Т. А. Чубарь^{1,2}, С. С. Савин^{2,3},
В. И. Тишков^{1,2,3*}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

²ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», 109559, Москва, ул. Цимлянская, 16, оф. 96

³Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33, корп. 2

*E-mail: vitishkov@gmail.com

Поступила в редакцию 09.04.2014

РЕФЕРАТ Гидрофобизация α -спиралей является одним из общих подходов повышения температурной стабильности ферментов. На основании сравнительного анализа аминокислотных последовательностей оксидаз *D*-аминокислот из различных источников и анализа трехмерной структуры оксидазы *D*-аминокислот из дрожжей *Trigonopsis variabilis* (TvDAAO, [КФ 1.4.3.3]) найдены 11 остатков Ser, расположенных в α -спиралях. По результатам дальнейшего структурного анализа восемь из них отобрали (в положениях 67, 77, 78, 105, 270, 277, 335 и 336) для замены на остатки Ala. Замены Ser78Ala и Ser270Ala привели к сильной дестабилизации фермента – мутантные варианты инактивировались в процессе их выделения из клеток. Остальные шесть мутантных TvDAAO были получены в высокоочищенном состоянии и изучены их свойства. Замены Ser277Ala и Ser336Ala привели к дестабилизации белковой глобулы, мутанты TvDAAO Ser77Ala и TvDAAO Ser335Ala по термостабильности были близки к ферменту дикого типа, в то время как замены Ser67Ala и Ser105Ala повысили температурную стабильность приблизительно в 1.5 и 2 раза. Кроме того, каталитическая эффективность мутантной TvDAAO Ser105Ala с *D*-Asn, *D*-Tyr, *D*-Phe и *D*-Leu была в среднем в 1.2–3 раза выше, чем у фермента дикого типа.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА белковая инженерия, гидрофобизация α -спирали, направленный мутагенез, оксидаза *D*-аминокислот из *Trigonopsis variabilis*, субстратная специфичность, температурная стабильность.

ВВЕДЕНИЕ

Оксидаза *D*-аминокислот (DAAO, [КФ 1.4.3.3]) относится к классу FAD-содержащих оксидоредуктаз и катализирует окислительное дезаминирование *D*-аминокислот в соответствующие α -кетокислоты [1]. DAAO широко распространена в природе, гены этого фермента найдены в клетках моллюсков, рыб, рептилий, амфибий, насекомых, птиц, растений, млекопитающих, а также в микроорганизмах – микроскопических грибах, дрожжах и бактериях, где она выполняет важные физиологические функции [2, 3]. Разработаны процессы синтеза оптически активных соединений, α -кетокислот, 7-аминоцефалоспоровой кислоты с участием DAAO, этот фермент используют также в биосенсорах для определения содержания *D*-аминокислот [2, 4, 5]. Наиболее широкое применение нашли два фермента – из дрожжей *Rhodotorula gracilis* (RgDAAO) и *Trigonop-*

sis variabilis (TvDAAO). Среди известных оксидаз *D*-аминокислот TvDAAO обладает наиболее высокой активностью с цефалоспорином C (CephC) [6] и наилучшей температурной стабильностью [7]. Например, при инкубации в течение 30 мин при 45°C TvDAAO сохраняет 100% активности, в то время как RgDAAO в этих условиях инактивируется полностью. DAAO из *Arthrobacter protophormiae* и *Candida boidinii*, температурная стабильность которых также изучена, очень схожи с RgDAAO – при 50°C они полностью теряют активность за 30 мин [5, 8, 9].

В нашей лаборатории был клонирован ген оксидазы *D*-аминокислот из дрожжей *T. variabilis*, разработана система сверхэкспрессии рекомбинантного фермента в клетках *Escherichia coli* в активной и растворимой форме, изучены его свойства [10]. В нативном состоянии TvDAAO представляет собой гомодимер [11], который имеет ось симметрии второго

порядка такую, что субъединицы расположены друг относительно друга по типу «голова-хвост». Каждая субъединица содержит одну молекулу кофактора FAD в активном центре.

Повышение термостабильности практически важных ферментов является одновременно и фундаментальной, и прикладной задачей. Получаемые в ходе таких экспериментов данные позволяют более полно и глубоко понять взаимосвязи между структурой, функцией и стабильностью исследуемого белка. В то же время решение данной задачи позволяет снизить потери фермента в ходе выделения и упрощает процесс очистки, что, в свою очередь, приводит к снижению стоимости конечного продукта. Например, ранее в нашей лаборатории были получены мутантные формидегидрогеназы из *Pseudomonas* sp. 101 с увеличенной температурной стабильностью, что позволило ввести в процесс очистки рекомбинантного фермента стадию термообработки. Нагревание бесклеточного экстракта при 60°C в течение 20–30 мин приводило к повышению чистоты препарата с 50 до 80–85% без потери ферментативной активности [12].

К настоящему времени опубликовано весьма ограниченное количество данных по увеличению температурной стабильности TvDAAO с помощью белковой инженерии. Всего в двух работах получены мутантные формы TvDAAO с точечными аминокислотными заменами, у которых наблюдалось незначительное увеличение температурной стабильности по сравнению с ферментом дикого типа [13, 14]. Сообщалось также о ковалентном сшивании двух субъединиц TvDAAO дипептидом Lys-Leu [15], в результате чего T_m увеличилась на 2°C, но при этом ухудшились каталитические свойства с большинством субстратов.

В данной работе представлены результаты применения к оксидазе D-аминокислот из дрожжей *T. variabilis* общего подхода повышения температурной стабильности, основанного на гидрофобизации. Гидрофобизация была выполнена за счет замены остатков серина на остатки аланина в α -спиральных участках структуры TvDAAO. Изучено также влияние этих замен на каталитические свойства фермента.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для генно-инженерных экспериментов использовали реактивы марки Molecular Biology Grade. В микробиологических экспериментах применяли бакто-триптон, дрожжевой экстракт и агар (Difco, США), глицерин (99.9%) и хлорид кальция («ultra pure»), гидрофосфат калия, дигидрофосфат натрия («pure for analysis»), лизоцим (Fluka/BioChemika, Швейцария), изопропил- β -D-тиогалактопиранозид (ИПТГ),

2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат) (ABTS), канамицин и хлорамфеникол (Sigma, США), глюкозу и хлорид натрия («ч.д.а.», «Хеликон», Россия). Эндонуклеазы рестрикции, ДНК-лигазу фага T4 и Pfu-ДНК-полимеразу (Thermo Scientific) использовали для клонирования фрагментов ДНК и направленного мутагенеза. Для выделения ДНК из агарозного геля и плазмид из клеток *E. coli* использовали наборы реагентов фирмы Thermo Scientific. Олигонуклеотиды для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенирования были синтезированы фирмой «Синтол» (Россия). В этих экспериментах использовали воду, очищенную на установке MilliQ (Millipore, США).

В работе использовали следующие штаммы бактерий *E. coli*:

E. coli DH5 α : *fhuA2* Δ (*argF-lacZ*)U169 *phoA glnV44* Φ 80 Δ (*lacZ*)M15 *gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*.

E. coli BL21(DE3) pLysS Codon Plus: В F⁻ *ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *dcm*⁺ Tet^r *gal* λ (DE3) *endA* Hte [pLysS *argU ileY leuW Cam*^r].

Все реактивы для электрофореза белков произведены фирмой Bio-Rad (США). Для очистки и изучения свойств фермента применяли Трис (трис(гидроксиметил)аминометан, «ч.д.а.») фирмы Merck (Германия), рацематы аминокислот «Диа-М» (Россия) и Reanal (Венгрия), пероксидазу из корней хрена («Диа-М», Россия).

Проведение реакции направленного мутагенеза

Точечные замены вводили с помощью двустадийной ПЦР как описано ранее [13, 16]. В качестве матрицы использовали плазмиду, полученную на основе pET-33b(+), в которой ген *tvdaao* находится под контролем сильного промотора РНК-полимеразы фага T7. Мутации вводили с использованием прямого (T7_For) и обратного (T7_Rev) праймеров на начало и конец гена соответственно, а также прямого (Mut_For) и обратного (Mut_Rev) праймеров, несущих требуемые замены в гене *tvdaao*. Последовательности праймеров приведены ниже. Полужирным выделены вводимые мутации.

T7_For	5'-taatacgaactcactataggg-3'
T7_Rev	5'-gctagttattgctcagcgg-3'
Ser67Ala_For	5'-gactacgatgcccgtc cg cttatcctatcttgcgagagctg-3'
Ser67Ala_Rev	5'-cgcaagataggataagc gc agcggcatcgtagtccgc-3'
Ser77Ala_For	5'-tggctcga g ccagccccgaggctggaa-3'
Ser77Ala_Rev	5'-gggct gg ctcgagccagctctcgcaag-3'
Ser78Ala_For	5'-ctcgaagc gc ccccgaggctggaattcg-3'
Ser78Ala_Rev	5'-tcgggg g cgcttcgagccagctctcg-3'
Ser105Ala_For	5'-gaaggtgccat gg cgccatctgtcaacgcaac-3'
Ser105Ala_Rev	5'-gacagatggcc gc catggcacctccagtttagg-3'
Ser270Ala_For	5'-ccgaaccgatcct g ctctcaccatcgaaatcctgt-3'
Ser270Ala_Rev	5'-gatgggtgagag g caggatcgggttcggatgacc-3'

Ser277Ala_For 5'-ccatcgaatcctcggctagagccctcgaccgattc-3'
 Ser277Ala_Rev 5'-cgagggtcttagccaggattcgatgggtgagaga-3'
 Ser335Ala_For 5'-gtgctggttaccaggcctcttacggcatggctgat-3'
 Ser335Ala_Rev 5'-gccgtaagaggcctggtaaccagcaccggc-3'
 Ser336Ala_For 5'-ctggttaccagtcgcttacggcatggctgatgaag-3'
 Ser336Ala_Rev 5'-catgccgtaagcggactggtaaccagcaccg-3'.

Реакционная смесь для проведения ПЦР содержала 2.5 мкл 10-кратного буфера для Pfu-ДНК-полимеразы (200 мМ Трис-НСl (рН 8.8 при 25°C), 100 мМ (NH₄)₂SO₄, 100 мМ KCl, 1 мг/мл БСА, 1% (об/об) Тритон X-100, 20 мМ MgSO₄); 2.5 мкл смеси dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP, концентрация каждого 2.5 мМ); 1 мкл ДНК-матрицы (~10 нг/мкл); по 2 мкл праймеров (10 нмоль/мл); 0.5 мкл ДНК-полимеразы Pfu (2.5 Ед/мкл) и деионизованную воду до общего объема смеси 25 мкл. ПЦР проводили в тонкостенной пластиковой пробирке объемом 0.5 мл (SSI, США) на приборе «Терцик» («ДНК-Технологии», Россия). Для предотвращения испарения реакционной смеси в пробирку перед проведением ПЦР добавляли 30 мкл минерального масла. Пробирку прогревали в течение 5 мин при 95°C, затем реакцию ПЦР инициировали добавлением фермента. Реакцию проводили по следующей программе: первая стадия при 95°C, 30 с; вторая стадия при 54–58°C, 60 с; третья стадия при 72°C, 2 мин, всего 25–35 циклов. После последнего цикла реакционную смесь дополнительно выдерживали в течение 10 мин при 72°C. Температуру на второй стадии выбирали на 3–5°C ниже температуры плавления дуплексов (T_m), образуемых праймерами. Для определения T_m использовали эмпирическую формулу:

$$T_m = 2(nA + nT) + 4(nG + nC),$$

где nX – количество нуклеотидов типа X (X = A, T, C, G) в праймере.

Для получения фрагментов, содержащих требуемую замену, проводили две ПЦР с использованием пар праймеров T7_For/Mut_Rev (фрагмент 1) и Mut_For/T7_Rev (фрагмент 2). Продукты ПЦР, фрагмент 1 и фрагмент 2, очищали электрофорезом в 1% агарозном геле. Затем проводили третью, объединяющую, ПЦР с праймерами T7_For и T7_Rev, где в качестве ДНК-матрицы использовали полученные ранее фрагменты 1 и 2. Продукт третьей ПЦР очищали аналогично в 1% агарозном геле и обрабатывали двумя эндонуклеазами рестрикции: в случае замен в положениях 67, 77, 78 и 105 использовали NcoI и Bsp119I, а для замен в положениях 270, 277, 335 и 336 – Bsp119I и XhoI. Фрагменты ДНК очищали электрофорезом в 1% агарозном геле и лигировали в исходный вектор, обработанный теми же эндонуклеазами рестрикции. Лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* DH5α. Затем

клетки высевали на чашки Петри с агаризованной средой, содержащей канамицин (30 мкг/мл), и выдерживали в течение 16 ч при 37°C. Брали по три колонии каждого мутанта с чашки, и из них выделяли плазмиды. Правильность введения требуемых мутаций контролировали секвенированием плазмидной ДНК в Центре коллективного пользования «Геном» (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН).

Экспрессия мутантных форм TvDAAO в клетках *E. coli*

TvDAAO и ее мутантные формы экспрессировали в клетках *E. coli* BL21(DE3)CodonPlus/pLysS. Для получения штамма-продуцента клетки трансформировали соответствующей плазмидой и высевали на чашки Петри с агаризованной средой, содержащей канамицин (30 мкг/мл). Для приготовления посевного материала с чашки отбирали единичную колонию и культивировали в течение 16 ч при 30°C в 10 мл среды 2YT (бактотриптон 16 г/л, дрожжевой экстракт 10 г/л, хлорид натрия 5 г/л, рН 7.5) в присутствии 30 мкг/мл канамицина и 25 мкг/мл хлорамфеникола. Утром клетки пересевали на свежую среду (разбавление 1 : 100) и культивировали при 30°C до величины поглощения на длине волны 600 нм A₆₀₀ ≈ 0.6–0.8. Посевной материал вносили в колбы для культивирования в количестве 10% от общего объема среды (модифицированная среда LB – дрожжевой экстракт 10 г/л, бактотриптон 5 г/л, глюкоза 5 г/л, дигидрофосфат натрия 1.5 г/л и гидрофосфат калия 1 г/л, рН 7.5), содержащей 30 мкг/мл канамицина. Культивирование проводили в конических колбах с отбойниками объемом 1 л (объем среды составлял не более 10–15% от объема колбы). Температуру культивирования варьировали в диапазоне 18–27°C, скорость оборотов качалки составляла 120–160 об/мин. После достижения A₆₀₀ ≈ 0.6–0.8 экспрессию фермента индуцировали добавлением в среду ИПТГ до конечной концентрации 0.1 мМ. После индукции клетки культивировали в течение 24 ч, а затем осаждали на центрифуге Eppendorf 5403 (5 мин, 5000 об/мин, +4°C). Полученный осадок ресуспендировали в 0.02 М буфере Трис-НСl (рН 8.0 при 25°C) в соотношении 1 : 4 (масс.). Полученную суспензию хранили при –20°C.

Выделение и очистка мутантных ферментов

Для выделения мутантных TvDAAO суспензию клеток в 20 мМ буфере Трис-НСl рН 8.0 дважды замораживали–размораживали, затем клетки разрушали при помощи ультразвукового дезинтегратора Branson Sonifier 250 (Германия) при постоянном охлаждении. Осадок удаляли центрифугировани-

ем на центрифуге Eppendorf 5804 R (11000 об/мин, 30 мин).

Очистка фермента включала ионообменную хроматографию на колонке MonoQ HR 10/10 с использованием прибора FPLC фирмы Pharmacia Biotech (Швеция) и обессоливание на носителе Sephadex G-25 [17]. Чистоту препаратов контролировали с помощью аналитического электрофореза в 12% полиакриламидном геле в присутствии 0.1% додецилсульфата натрия на приборе MiniProtean III (BioRad, Австрия) по протоколам фирмы-производителя.

Измерение активности и каталитических параметров TvDAAO

Активность оксидазы *D*-аминокислот определяли с использованием биферментной системы: DAAO–пероксидаза хрена. В качестве субстрата для первого фермента использовали *D*-метионин, для второго – ABTS. Активность определяли при 30°C по накоплению продукта окисления ABTS (поглощение при 414 нм, $\epsilon_{414} = 36600$ л/моль/см) на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Япония). В кювету спектрофотометра (рабочий объем 1 мл, оптический путь 1 см) добавляли 770 мкл 50 мМ калий-фосфатного буфера (КФБ), pH 8.0, предварительно насыщенного воздухом, 200 мкл 100 мМ раствора *D*-Met в 50 мМ КФБ, 20 мкл раствора ABTS (16 мг/мл) в воде и 10 мкл раствора пероксидазы в 50 мМ КФБ (5 мг/мл). После термостатирования в течение 10 мин при 30°C в кювету добавляли пробу TvDAAO дикого типа или соответствующих мутантов (30 мкл).

При определении максимальной скорости реакции (V_m) и константы Михаэлиса (K_M) концентрацию соответствующей *D*-аминокислоты варьировали в диапазоне от 0.5 до 5 K_M . Приблизительное значение K_M определяли в отдельном опыте, измеряя скорость реакции при концентрации соответствующей *D*-аминокислоты, равной 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 50 мМ. Кинетические параметры V_m и K_M рассчитывали методом нелинейной регрессии с помощью программы OriginPro 8.5 SR1 (OriginLab). Каталитическую константу k_{cat} рассчитывали из значения V_m . Концентрацию активного фермента определяли спектрофотометрически по поглощению на длине волны 455 нм с использованием коэффициента молярного поглощения FAD 10800 м⁻¹см⁻¹ [6].

Исследование термостабильности ферментов

Температурную стабильность мутантных TvDAAO и фермента дикого типа изучали в 0.1 М калий-фосфатном буфере, pH 8.0. Для каждого опыта готовили серию из пластиковых пробирок объемом 0.5 мл, содержащих 100 мкл раствора фермента. Пробирки помещали в предварительно нагретый до нужной

температуры водный термостат (точность термостатирования $\pm 0.1^\circ\text{C}$). Через определенные промежутки времени отбирали по одной пробирке, быстро охлаждали в течение 1–2 мин во льду и измеряли активность фермента как описано выше. Интервал между отбором проб подбирали таким образом, чтобы за время эксперимента активность фермента уменьшилась до 10–15% от исходной величины. Для определения констант скоростей инактивации строили зависимости остаточной активности фермента от времени в полулогарифмических координатах и обрабатывали их в программе OriginPro 8.5 SR1 (OriginLab) по методике, описанной в [18].

Компьютерное моделирование

Анализ структуры TvDAAO, компьютерное моделирование TvDAAO с аминокислотными заменами и получение изображений белковой глобулы проводили с помощью пакета программ Accelrys Discovery Studio 2.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор положений в структуре TvDAAO для направленного мутагенеза

Рациональный белковый дизайн является мощным методом изучения структурно-функциональных взаимосвязей и направленного изменения свойств ферментов. Для направленного увеличения температурной стабильности ферментов используют сравнение аминокислотных последовательностей исследуемого фермента и ферментов из термофильных организмов, а также анализ трехмерной структуры (если она доступна хотя бы для одного фермента из семейства) с целью выявления аминокислотных остатков, играющих важную роль в стабильности [19]. Однако в случае TvDAAO такой подход не применим, поскольку это наиболее стабильный фермент из изученных на данный момент оксидаз *D*-аминокислот, а аминокислотные последовательности DAAO из термофильных микроорганизмов до сих пор не определены. Поэтому для повышения термостабильности TvDAAO было решено применить один из общих подходов, основанный на гидрофобизации α -спиралей в структуре фермента [19, 20]. Это может быть достигнуто за счет различных замен, например, Ser→Ala (используются наиболее часто), Lys→Arg, Gly→Ala, Ser→Thr, Lys→Ala, Thr→Ala, Lys→Glu, Glu→Arg, Asp→Arg [21]. В случае замены Ser→Ala, как правило, наблюдается наибольший стабилизирующий эффект. Например, гидрофобизацию α -спиралей в результате замены Ser→Ala использовали для повышения температурной стабильности формиатдегидрогеназы из бактерий *Pseudomonas* sp. 101 [22].

Мы проанализировали четвертичную структуру TvDAAO для выявления потенциальных остатков Ser в α -спиралях. При отборе остатков Ser, которые можно заменить на Ala, принимали во внимание следующие моменты: 1) эти остатки должны входить в состав α -спиралей; 2) не быть консервативными и не располагаться в активном центре фермента. В результате анализа структуры TvDAAO в α -спиралях всего найдено 11 остатков Ser (рис. 1). Сравнение аминокислотных последовательностей DAAO из разных источников показывает, что остаток Ser44 является консервативным, располагается в коферментсвязывающем домене TvDAAO, и его боковой радикал, согласно компьютерному анализу, образует две водородные связи с молекулой FAD (рис. 2A). Поэтому этот остаток сразу исключили из списка возможных кандидатов на замену. Остатки Ser157 и Ser161 располагаются в области межсубъединичного контакта, и несмотря на то, что они не принимают участия в образовании межсубъединичных водородных связей, их замена также нежелательна [11]. Таким образом, для замены на остатки Ala были выбраны восемь остатков Ser (в положениях 67, 77, 78, 105, 270, 277, 335 и 336). Остатки Ser67, Ser105, Ser335 и Ser336 располагаются внутри белковой глобулы, а Ser77, Ser78, Ser270 и Ser277 экспонированы в раствор. На рис. 2Б–Е положение выбранных остатков показано более подробно. Ser67 находится в середине, а остатки Ser77 и Ser78 на конце α 3-спирали. Ser105 расположен в короткой α 4-спирали, Ser270 и 277 – в α 9-спирали, в ее начале и середине соответственно. Остатки Ser335 и Ser336 расположены в начале α 13-спирали. Все восемь остатков серина образуют от двух до шести водородных связей. Ser78, Ser105 и Ser270 образуют водородные связи с другими аминокислотными остатками полипептидной цепи только с атомами пептидной связи. Поскольку боковой радикал этих остатков не участвует в образовании водородных связей с другими аминокислотами, то замена этих трех остатков на Ala не должна привести к потере водородных связей. Остатки Ser в положениях 67, 77, 277, 335 и 336 образуют водородные связи как с атомами пептидной связи, так и оксигруппами боковых радикалов других аминокислот (рис. 2). С одной стороны, замена этих пяти остатков серина приведет к потере водородных связей, образованных боковым радикалом, что может внести отрицательный вклад в стабильность фермента, но, с другой стороны, повышение гидрофобности α -спирали может стабилизировать белковую глобулу так, что суммарный эффект окажется положительным. Таким образом, замена этих остатков серина представляет собой теоретический интерес с точки зрения влияния двух указанных факторов на стабильность TvDAAO.

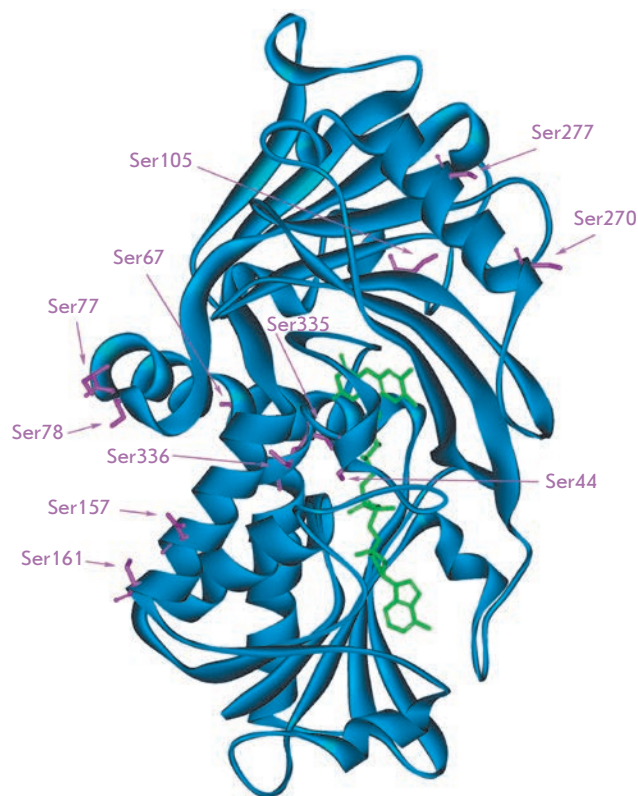


Рис. 1. Общий вид субъединицы TvDAAO с остатками Ser, расположенными в α -спиральных участках

Получение мутантных TvDAAO с заменами Ser/Ala

Нуклеотидные замены в гене *tvdaao*, приводящие к появлению требуемых мутаций, вводили с помощью ПЦР. Секвенировали по три плазмиды для каждого из восьми мутантов гена *tvdaao* и показали, что во всех случаях в гене *tvdaao* были только требуемые мутации, а другие нуклеотидные замены отсутствовали. Плазмиды с генами мутантных TvDAAO трансформировали клетки *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus/pLysS. Полученные рекомбинантные штаммы культивировали по методике, приведенной в разделе «Экспериментальная часть». Все восемь мутантных TvDAAO синтезировались в растворимой форме и обладали ферментативной активностью. Две мутантные TvDAAO с заменами Ser78Ala и Ser270Ala в очищенном виде получить не удалось, так как они быстро инактивировались в ходе разрушения клеток, что свидетельствует о сильной дестабилизации белковой глобулы. Остальные шесть мутантных TvDAAO с заменами Ser67Ala, Ser77Ala, Ser105Ala, Ser277Ala, Ser335Ala и Ser336Ala были выделены и очищены с помощью анионообменной электрофореза, в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия их чистота составила не менее 99% (рис. 3, дорожки 1–6).

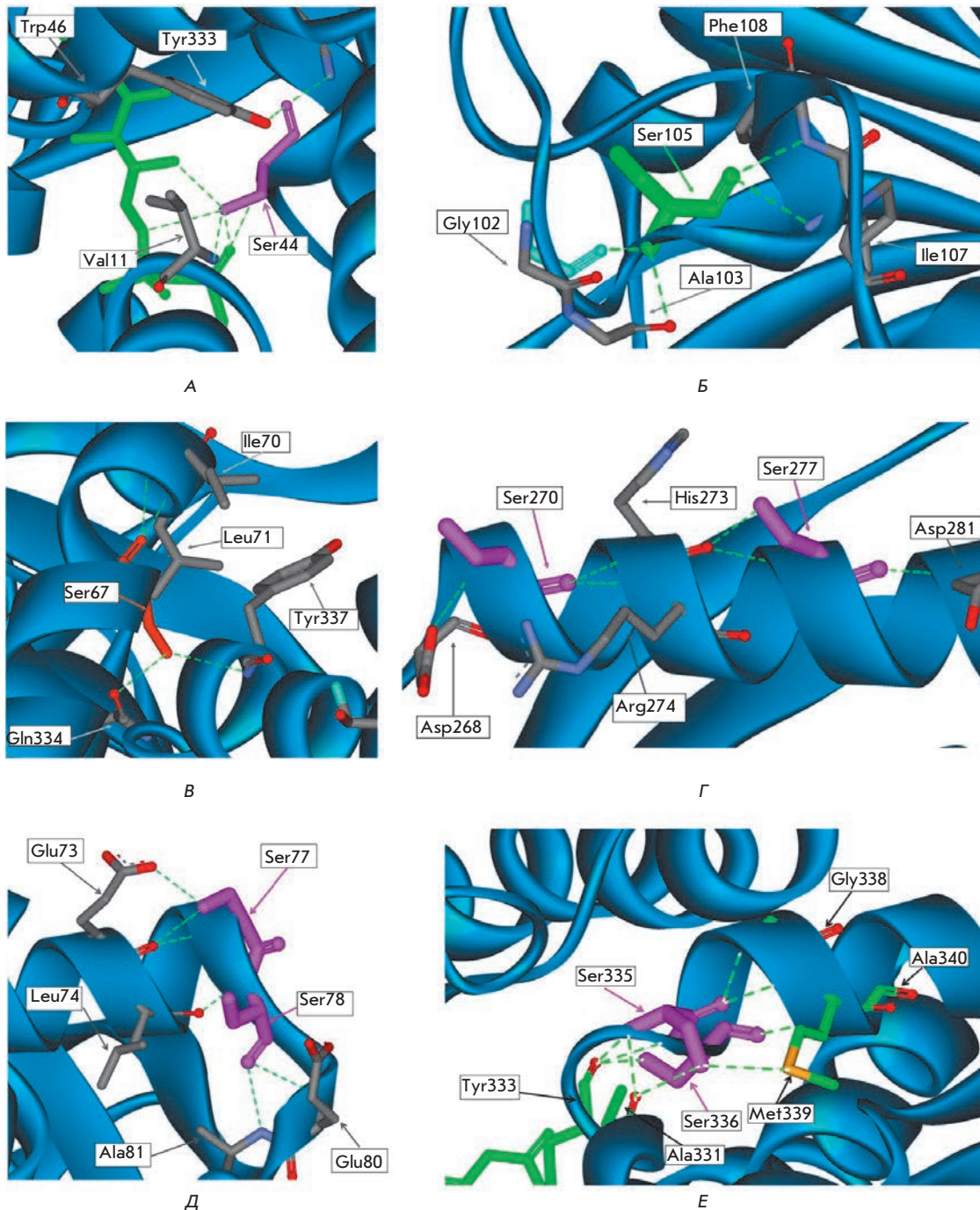


Рис. 2. Расположение и взаимодействие остатков Ser в α -спиралях глобулы TvDAAO. А – Ser44, Б – Ser105, В – Ser67, Г – Ser270 и Ser277, Д – Ser77 и Ser78, Е – Ser335 и Ser336

Каталитические свойства мутантных TvDAAO

Для шести мутантных TvDAAO с заменами Ser67Ala, Ser77Ala, Ser105Ala, Ser277Ala, Ser335Ala и Ser336Ala были определены константы Михаэлиса (K_M) и каталитические константы (k_{cat}) с различными D-аминокислотами. Значения k_{cat} , K_M и каталитической эффективности k_{cat}/K_M новых мутантов TvDAAO и фермента дикого типа с различными D-аминокислотами приведены в табл. 1. Полуэир-

ным шрифтом на сером фоне выделено улучшение кинетического параметра по сравнению с параметром фермента дикого типа. Для наглядности на рис. 4 представлены значения каталитической эффективности ($(k_{cat}/K_M)^{mut}/(k_{cat}/K_M)^{wt} \cdot 100\%$) мутантных TvDAAO относительно значений фермента дикого типа (100%). Из табл. 1 и рис. 4 видно, что введение замен привело к существенному изменению спектра субстратной специфичности. Из всех мутантных

Таблица 1. Кинетические параметры мутантных TvDAAO и фермента дикого типа с различными D-аминокислотами

D-амино-кислота	Форма фермента												
	wt-TvDAAO			TvDAAO Ser67Ala			TvDAAO Ser77Ala			TvDAAO Ser105Ala			
	k_{cat}, c^{-1}	K_M, mM	$k_{cat}/K_M, mM^{-1}c^{-1}$	k_{cat}, c^{-1}	K_M, mM	$k_{cat}/K_M, mM^{-1}c^{-1}$	k_{cat}, c^{-1}	K_M, mM	$k_{cat}/K_M, mM^{-1}c^{-1}$	k_{cat}, c^{-1}	K_M, mM	$k_{cat}/K_M, mM^{-1}c^{-1}$	
D-Met	80.5 ± 0.8	0.46 ± 0.03	175	104 ± 3.0	1.35 ± 0.04	77.4	44.0 ± 2.0	0.85 ± 0.09	52.0	153 ± 2.0	1.38 ± 0.04	110	
D-Ala	108.6 ± 2.0	16.7 ± 0.7	6.5	180 ± 13	31.0 ± 4.0	5.8	33.7 ± 1.0	11.1 ± 0.1	3.1	218 ± 8.0	31.3 ± 2.0	7.0	
D-Ser	20.5 ± 0.9	36.6 ± 3.3	0.56	18.4 ± 0.7	36.0 ± 3.0	0.51	7.9 ± 0.2	18.3 ± 0.8	0.43	10.4 ± 0.4	21.4 ± 1.9	0.49	
D-Val	85.3 ± 2.7	14.4 ± 1.2	5.9	133 ± 6.0	21.4 ± 1.6	6.2	19.1 ± 0.5	12.2 ± 0.8	1.56	154 ± 5.0	24.7 ± 1.3	6.3	
D-Trp	22.5 ± 1.9	0.45 ± 0.06	50.0	34.0 ± 4.0	0.87 ± 0.14	38.9	12.4 ± 0.8	6.5 ± 0.7	1.90	50.0 ± 7.0	0.63 ± 0.12	80.0	
D-Trp	42.4 ± 1.4	0.49 ± 0.04	86.5	35.9 ± 1.3	0.53 ± 0.4	67.7	43.7 ± 0.8	0.68 ± 0.03	64.3	38.6 ± 1.6	0.60 ± 0.05	64.6	
D-Leu	29.1 ± 0.3	0.78 ± 0.02	37.3	31.4 ± 0.5	0.34 ± 0.02	93.1	6.2 ± 0.5	0.20 ± 0.04	31.9	30.4 ± 0.4	0.28 ± 0.02	110	
D-Phe	27.2 ± 0.8	0.37 ± 0.04	73.9	30.4 ± 1.2	0.41 ± 0.04	73.6	23.4 ± 0.5	0.32 ± 0.03	73.1	32.3 ± 0.6	0.26 ± 0.02	124.3	
D-Asn	62.4 ± 2.0	22.6 ± 1.5	2.8	49.7 ± 1.7	25.7 ± 1.5	1.94	17.2 ± 1.0	4.7 ± 0.7	3.7	48.3 ± 1.2	14.5 ± 0.7	3.3	
D-Thr	1.75 ± 0.04	11.1 ± 0.8	0.16	Нет реакции			Нет реакции			Нет реакции			
D-Lys	3.54 ± 0.21	29.3 ± 3.4	0.12	Нет реакции			Нет реакции			<1.2	>50	0.04	Нет реакции

D-амино-кислота	Форма фермента											
	TvDAAO Ser277Ala			TvDAAO Ser335Ala			TvDAAO Ser336Ala			TvDAAO Ser336Ala		
	k_{cat}, c^{-1}	K_M, mM	$k_{cat}/K_M, mM^{-1}c^{-1}$	k_{cat}, c^{-1}	K_M, mM	$k_{cat}/K_M, mM^{-1}c^{-1}$	k_{cat}, c^{-1}	K_M, mM	$k_{cat}/K_M, mM^{-1}c^{-1}$	k_{cat}, c^{-1}	K_M, mM	$k_{cat}/K_M, mM^{-1}c^{-1}$
D-Met	48.0 ± 1.0	0.73 ± 0.04	65.8	45.9 ± 1.1	4.6 ± 0.2	9.9	56.8 ± 1.5	2.69 ± 0.13	21.1	2.69 ± 0.13	24.2 ± 1.9	4.2
D-Ala	81.0 ± 3.0	20.4 ± 1.4	4.0	8.2 ± 0.4	10.1 ± 1.2	0.82	101 ± 5.0	24.2 ± 1.9	4.2	Нет реакции		
D-Ser	Нет реакции			34.1 ± 1.7	43.0 ± 5.0	0.79	Нет реакции			Нет реакции		
D-Val	71.0 ± 3.0	34.0 ± 3.0	2.1	20.1 ± 1.3	25.0 ± 3.0	0.82	50.0 ± 2.0	8.2 ± 0.9	6.1	8.2 ± 0.9	24.2 ± 1.9	4.2
D-Trp	0.45 ± 0.06	0.70 ± 0.14	0.65	5.5 ± 0.9	0.58 ± 0.13	9.5	15.8 ± 0.7	0.36 ± 0.03	44.2	0.36 ± 0.03	24.2 ± 1.9	4.2
D-Trp	0.49 ± 0.04	0.26 ± 0.02	1.9	79.0 ± 5.0	1.23 ± 0.11	64.1	57.0 ± 1.0	0.69 ± 0.04	82.0	0.69 ± 0.04	24.2 ± 1.9	4.2
D-Leu	12.0 ± 2.0	0.15 ± 0.02	80.0	5.9 ± 0.1	0.21 ± 0.01	27.5	5.0 ± 0.1	0.07 ± 0.01	76.4	0.07 ± 0.01	24.2 ± 1.9	4.2
D-Phe	15.1 ± 0.4	0.18 ± 0.03	83.9	8.3 ± 0.2	0.38 ± 0.03	21.9	11.8 ± 0.3	0.24 ± 0.02	49.4	0.24 ± 0.02	24.2 ± 1.9	4.2
D-Asn	11.8 ± 1.2	8.0 ± 1.5	1.48	46.0 ± 4.0	26.0 ± 3.0	1.78	32.0 ± 2.0	16.0 ± 3.0	2.0	16.0 ± 3.0	24.2 ± 1.9	4.2
D-Thr	Нет реакции			1.8 ± 0.1	14.0 ± 2.0	0.13	Нет реакции			Нет реакции		
D-Lys	Нет реакции			Нет реакции			Нет реакции			Нет реакции		

Примечание. Серым фоном выделены кинетические параметры мутантных TvDAAO, лучшие по сравнению с таковыми для wt-TvDAAO.

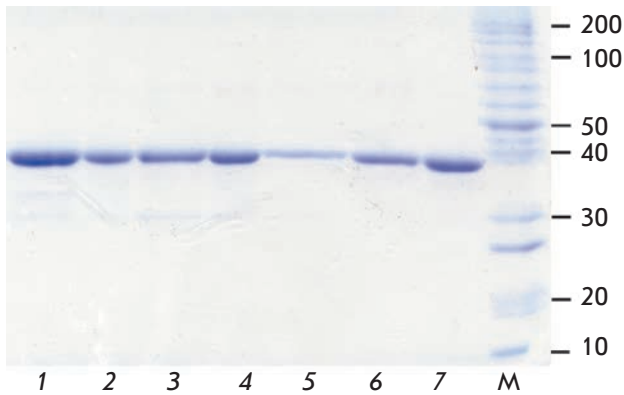


Рис. 3. Аналитический электрофорез в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях препаратов мутантных TvDAAO с заменами Ser67Ala, Ser77Ala, Ser105Ala, Ser277Ala, Ser335Ala, Ser336Ala (дорожки 1 – 6 соответственно) и фермента дикого типа (дорожка 7). М – маркер молекулярной массы белков

ферментов активность с *D*-лизином сохранил только TvDAAO Ser77Ala, с *D*-треонином – только TvDAAO Ser335Ala. Кроме того, стоит отметить повышение каталитической эффективности к *D*-лейцину практически при всех заменах.

Среди отдельных мутантов следует обратить внимание на следующие моменты:

1. TvDAAO Ser67Ala по свойствам близок к ферменту дикого типа со многими субстратами, заметное увеличение каталитической эффективности – в 2.5 раза – наблюдается только с *D*-Leu. С *D*-Thr и *D*-Lys фермент неактивен.

2. TvDAAO Ser77Ala проявляет более высокую каталитическую эффективность только с одним субстратом – *D*-Asn, с *D*-Thr фермент неактивен, существенно снизилась активность с *D*-Tyr, а также с *D*-Met и *D*-Val. Из всех мутантов только этот сохранил активность с *D*-Lys.

3. TvDAAO Ser105Ala обладает наилучшими каталитическими параметрами среди всех мутантных форм, за исключением отсутствия активности с *D*-Thr и *D*-Lys. Каталитическая эффективность снизилась с *D*-Trp в 1.3 и с *D*-Met в 1.6 раза, но возросла с *D*-Tyr, *D*-Phe и *D*-Leu в 1.6, 1.7 и 3.0 раза соответственно.

4. TvDAAO Ser335Ala имеет более высокую каталитическую активность по отношению к *D*-Ser, чем фермент дикого типа. Кроме того, только этот мутантный фермент сохранил активность с *D*-Thr.

Мутантные формы TvDAAO Ser277Ala и Ser336Ala выделяются на общем фоне, поскольку полностью потеряли активность с *D*-Ser, но сохранили активность

с *D*-Ala, что можно использовать для селективного определения *D*-Ala в биологических образцах в присутствии *D*-Ser. Эти ферменты неактивны также с *D*-Thr и *D*-Lys, но имеют более высокую каталитическую эффективность с *D*-Leu.

ТЕМПЕРАТУРНАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ МУТАНТНЫХ TvDAAO

Стабильность TvDAAO Ser78Ala и Ser270Ala

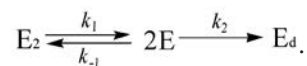
Как отмечено выше, замены Ser78Ala и Ser270Ala привели к сильной дестабилизации белковой глобулы, так что ферменты инактивировались в процессе их выделения из клеток. Компьютерное моделирование показало, что Ser78 и Ser270 не образуют водородные связи своими боковыми радикалами с соседними остатками. Однако в непосредственной близости от них располагаются остатки Glu80 и Asp268 соответственно, с которыми возможно образование водородных связей в растворе как непосредственно, так и через молекулу воды, поскольку в обоих случаях расстояние между оксигруппой серина и карбоксильной группой составляет около 4 Å. Так как Ser78 и Ser270 располагаются на изгибах на конце α3-спирали и в начале α9-спирали соответственно, то, по-видимому, играют важную роль в поддержании стабильности элементов вторичной структуры TvDAAO, о чем говорит сильная дестабилизация при их замене на остатки аланина.

Стабильность TvDAAO Ser67Ala, Ser77Ala, Ser105Ala, Ser277Ala, Ser335Ala, Ser336Ala

На рис. 5А,Б представлены зависимости остаточной активности мутантов TvDAAO от времени при одинаковой концентрации. Как видно из рис. 5А, замены Ser77Ala и Ser335Ala незначительно снижают стабильность. Замена Ser67Ala на стабильность фермента не влияет, а замена Ser105Ala приводит к заметной стабилизации. Наибольшая дестабилизация белковой глобулы наблюдается в случае замен Ser277Ala и Ser336Ala (рис. 5Б). Для получения кривых инактивации, сопоставимых с кривыми для других мутантов TvDAAO, температуру инкубации пришлось снизить с 56 до 52°C.

МЕХАНИЗМ ИНАКТИВАЦИИ МУТАНТНЫХ TvDAAO

Ранее нами было показано [11, 13, 16], что при повышенных температурах инактивация TvDAAO дикого типа и ее различных мутантных форм протекает в соответствии с диссоциативным механизмом:



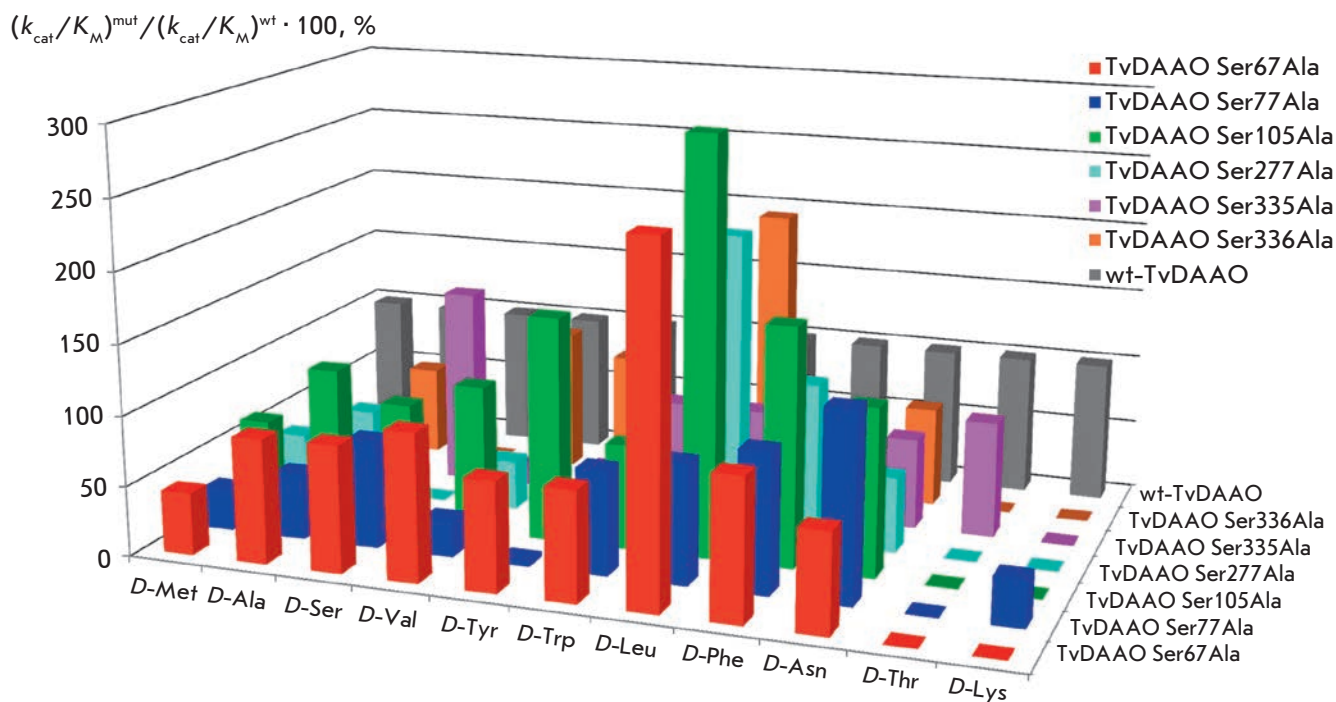


Рис. 4. Относительные значения каталитической эффективности $(k_{cat}/K_M)^{mut} / (k_{cat}/K_M)^{wt}$ TvDAAO с заменами Ser67Ala, Ser77Ala, Ser105Ala, Ser277Ala, Ser335Ala, Ser336Ala. Каталитическая эффективность TvDAAO дикого типа принята за 100%

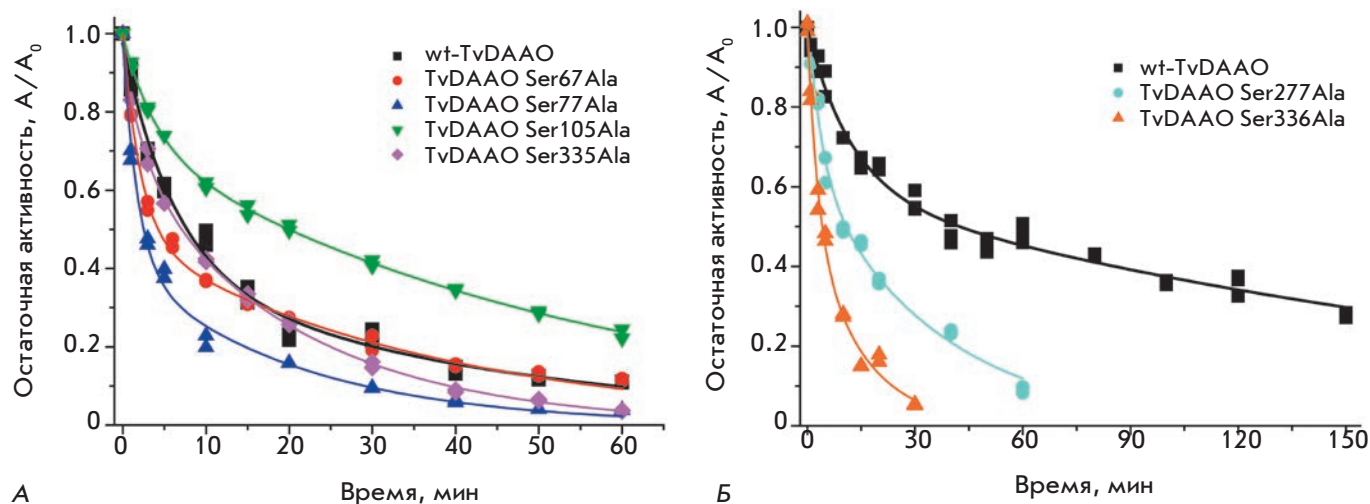
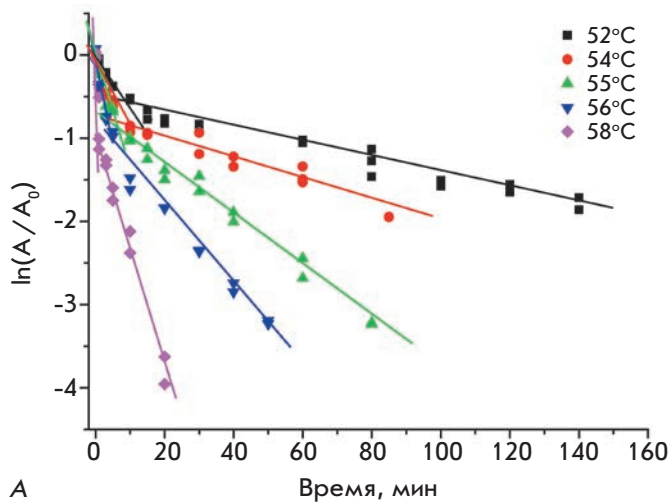


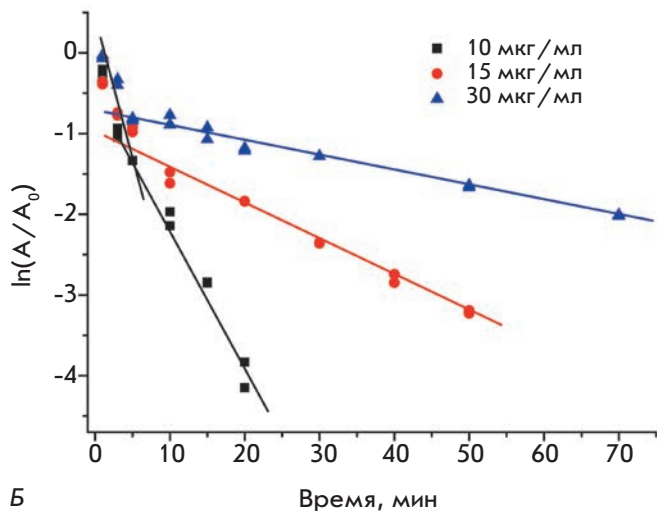
Рис. 5. Зависимость остаточной активности мутантных TvDAAO с заменами Ser67Ala, Ser77Ala, Ser105Ala, Ser335Ala и TvDAAO дикого типа от времени при 56°C. 0.1 М КФБ, pH 8.0, концентрация ферментов – 10 мкг/мл (А), и зависимость остаточной активности мутантных TvDAAO с заменами Ser277Ala, Ser336Ala и TvDAAO дикого типа от времени при 52°C. 0.1 М КФБ, pH 8.0, концентрация ферментов – 10 мкг/мл (Б)

Согласно этому механизму на первой стадии активный димер E_2 обратимо диссоциирует с образованием двух неактивных мономеров E . Далее происходит необратимый переход формы E в денатурированный мономер E_d . Этот механизм был подробно

проанализирован О.И. Полтораком и соавт. в 1998 г. [18]. Зависимость остаточной активности фермента от времени в таком механизме описывается суммой двух экспонент, и скорость инактивации фермента зависит от его концентрации [11, 13, 16]. Диссоциа-



А

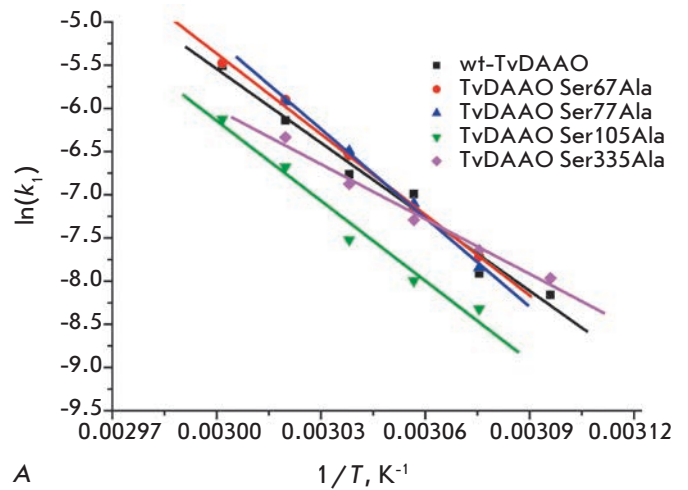


Б

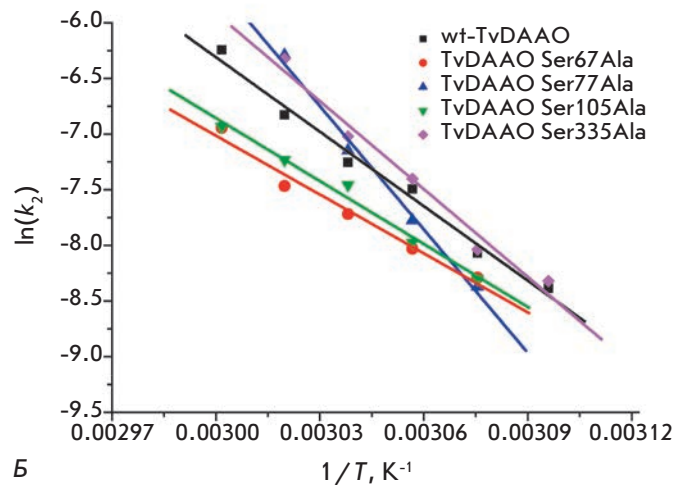
Рис. 6. Зависимости остаточной активности мутантной TvDAAO Ser77Ala от времени в полулогарифмических координатах. А – инактивация при различных температурах и концентрации фермента 15 мкг /мл. Б – инактивация при различных начальных концентрациях фермента при температуре 56°C. 0.1 М калий-фосфатный буфер, рН 8.0

тивный механизм термоинактивации TvDAAO дикого типа наблюдается только в диапазоне температур 50–60°C, когда значения констант скоростей k_1 и k_2 сопоставимы друг с другом. Поскольку константа скорости k_1 с ростом температуры увеличивается гораздо быстрее, чем константа скорости k_2 , то при температурах ниже 50 и выше 60°C лимитирующими становятся соответственно первая и вторая стадии, а кинетика инактивации в этих условиях описывается одной экспонентой, как для мономолекулярных реакций.

Анализ зависимостей остаточной активности от времени свидетельствует, что у мутантных



А



Б

Рис. 7. Зависимость констант скоростей первой (А) и второй (Б) стадий термоинактивации мутантных TvDAAO с заменами Ser67Ala, Ser77Ala, Ser105Ala, Ser335Ala и TvDAAO дикого типа в 0.1 М КФБ, рН 8.0 от температуры в полулогарифмических координатах $\ln(k_{in}) - 1/T$

TvDAAO с заменами Ser67Ala, Ser77Ala, Ser105Ala, Ser335Ala (рис. 5А) и Ser277Ala и Ser336Ala (рис. 5Б) механизм термоинактивации также не отличается от механизма инактивации фермента дикого типа. На рис. 6А,Б в качестве примера в полулогарифмических координатах приведены зависимости остаточной активности мутанта TvDAAO Ser77Ala от времени инкубации при различных температурах и концентрациях. Аналогичные зависимости получены и для всех остальных мутантных ферментов. Наличие точек излома на кривых термоинактивации в полулогарифмических координатах при различных температурах и увеличение тангенса угла на-

Таблица 2. Кинетические параметры диссоциативной термоинактивации мутантных TvDAAO и дикого типа

Мутантная форма	Параметр, с ⁻¹	Температура, °C							
		46	48	50	52	54	56	58	60
TvDAAO Ser67Ala	$k_1 \cdot 10^4$	-	-	-	4.45	7.8	14.4	27.4	41.8
	$k_2 \cdot 10^4$	-	-	-	2.51	3.25	4.44	5.7	9.6
TvDAAO Ser77Ala	$k_1 \cdot 10^4$	-	-	-	3.92	8.3	15.1	26.7	-
	$k_2 \cdot 10^4$	-	-	-	2.31	4.20	7.9	18.5	-
TvDAAO Ser105Ala	$k_1 \cdot 10^4$	-	-	-	2.43	3.37	5.4	12.6	21.9
	$k_2 \cdot 10^4$	-	-	-	2.48	3.44	5.8	7.2	9.7
TvDAAO Ser277Ala	$k_1 \cdot 10^4$	3.02	5.4	10.2	14.4	25.9	-	-	-
	$k_2 \cdot 10^4$	0.93	1.41	3.25	3.91	7.6	-	-	-
TvDAAO Ser335Ala	$k_1 \cdot 10^4$	-	-	3.47	4.80	6.8	10.3	17.7	-
	$k_2 \cdot 10^4$	-	-	2.43	3.23	6.1	8.9	17.9	-
TvDAAO Ser336Ala	$k_1 \cdot 10^4$	2.88	6.8	13.8	28.4	-	-	-	-
	$k_2 \cdot 10^4$	0.90	3.67	9.3	18.5	-	-	-	-
wt-TvDAAO	$k_1 \cdot 10^4$	-	-	2.86	3.67	9.2	11.6	21.5	40.5
	$k_2 \cdot 10^4$	-	-	2.28	3.13	5.6	7.1	10.8	19.4

Примечание. Уменьшение констант скорости у мутантов по сравнению с константами фермента дикого типа выделено зеленым фоном, а ухудшение – бордовым. Разными оттенками показаны эффекты различной степени – большему эффекту соответствует более темный оттенок.

клона второго линейного участка при уменьшении начальной концентрации фермента подтверждает то, что процесс термоинактивации протекает по диссоциативному механизму [18]. Из экспериментальных зависимостей остаточной активности фермента от времени инкубации мы рассчитали константы скорости термоинактивации мутантных форм TvDAAO Ser67Ala, Ser77Ala, Ser105Ala, Ser277Ala, Ser335Ala и Ser336Ala для обеих стадий процесса (табл. 2).

В случае TvDAAO с мутациями Ser277Ala и Ser336Ala температурный диапазон, в котором реализуется диссоциативный механизм, сместился на 4 °C в сторону низких температур по сравнению с диапазоном фермента дикого типа, причем TvDAAO Ser336Ala был наименее стабильным из всех полученных в очищенном виде мутантов (рис. 5Б, табл. 2). При температуре 52 °C (кинетические кривые для которой приведены на рис. 5Б) замены Ser277Ala и Ser336Ala привели к увеличению константы скорости инактивации первой стадии в 3.9 и 7.7 раза, а второй стадии – в 1.2 и 5.9 раза соответственно (табл. 2). Таким образом, в случае замены Ser336Ala эффект дестабилизации связан как с первой стадией инактивации – диссоциацией фермента на мономе-

ры, так и со второй стадией – денатурацией белковой глобулы. Замена Ser277Ala приводит главным образом к увеличению скорости инактивации на первой стадии, однако эффект не столь значительный, как при замене Ser336Ala. Причиной большего эффекта дестабилизации фермента с заменой Ser336Ala может быть то, что остаток Ser336 находится на конце $\alpha 13$ -спирали и образует водородную связь с пептидной связью остатка Tyr333, который, в свою очередь, располагается в близком контакте с Si-стороной изоаллоксазинового цикла FAD и консервативным остатком Ser44 (рис. 2E). Кроме того, Ser336 и Tyr333 встречаются в соответствующих положениях у оксидаз D-аминокислот, наиболее гомологичных TvDAAO и, по-видимому, играют важную роль в поддержании конформации, требуемой для связывания кофактора. Остаток Ser277 находится в середине $\alpha 9$ -спирали на поверхности фермента (рис. 2Г) и образует одну водородную связь с карбонильным атомом кислорода пептидной связи остатка His273, потеря которой, возможно, отрицательным образом сказывается на температурной стабильности TvDAAO.

Температурный диапазон, в котором инактивация ферментов с заменой четырех остатков Ser (67, 77,

105 и 335) происходит по диссоциативному механизму, остался прежним, однако значения констант скоростей термоинактивации изменились по сравнению с ферментом дикого типа (табл. 2).

Как уже отмечалось, константы скоростей первой и второй стадий по-разному зависят от температуры. На рис. 7А,Б представлены зависимости величины $\ln(k)$ от $1/T$ для констант скоростей первой и второй стадии соответственно.

Замена Ser105Ala приводит к увеличению стабильности фермента во всем температурном диапазоне – от 52 до 60°C (табл. 2, рис. 5А), причем зависимости констант скоростей термоинактивации для обеих стадий очень близки к значениям у фермента дикого типа, но при этом в диапазоне от 52 до 60°C располагаются на соответствующих графиках ниже (рис. 7А,Б). Замена Ser105Ala привела к повышению термоустойчивости TvDAAO в среднем в 2 раза по сравнению с ферментом дикого типа на первой стадии термоинактивации и в 1.5 – на второй, что ощутимо для этого фермента. Сходный эффект стабилизации наблюдается на второй стадии инактивации мутантной формы TvDAAO Ser67Ala – приблизительно в 1.6 раза, причем температурная зависимость константы скорости инактивации также близка к зависимости у фермента дикого типа, но по параметрам первой стадии термоинактивации TvDAAO Ser67Ala немного уступает исходному ферменту во всем температурном диапазоне – стабильность упала в среднем на 20%. Тем не менее эта замена также вызывает суммарную стабилизацию фермента, хоть и меньшую, чем замена Ser105Ala. Остатки Ser67 и Ser105 находятся внутри белковой глобулы в середине α 3-спирали и в короткой α 4-спирали. Оксигруппа остатка Ser105 не образует водородных связей с соседними остатками и находится рядом с гидрофобными остатками Leu100, Ala103 и Ile107, в то время как оксигруппа Ser67 образует две водородные связи с атомами полипептидной цепи остатков Gln334 и Tyr337, но при этом также находится в непосредственной близости к гидрофобным остаткам Trp51, Leu70, Leu71 и бензольному кольцу остатка Tyr337. При замене Ser105Ala возможно усиление гидрофобных взаимодействий внутри белковой глобулы без нарушения каких-либо водородных связей, что, вероятно, и приводит к увеличению температурной стабильности TvDAAO. Кроме того, в трехмерной структуре фермента могут, по-видимому, возникать некоторые конформационные изменения, приводящие к стабилизации димера и улучшению его каталитических свойств. В случае же замены Ser67Ala пропадают две водородные связи с остатками Tyr337 и Gln334, которые находятся в пространственно-сближенной α 13-спирали, но при этом могут усиливаться гидро-

фобные взаимодействия, что способствует стабилизации белковой глобулы, о чем говорят результаты экспериментов.

Особенностью мутантов TvDAAO Ser77Ala и TvDAAO Ser335Ala является то, что они отличаются от остальных мутантных форм температурными зависимостями констант скоростей первой и второй стадий инактивации (рис. 7А,Б). У мутанта с заменой Ser77Ala константы скорости первой и второй стадий растут с температурой быстрее, чем у фермента дикого типа, причем для k_2 зависимость более существенная (рис. 7Б), что суммарно выражается в более низкой стабильности TvDAAO Ser77Ala при температуре выше 54°C, тогда как при более низких температурах этот мутант более стабилен, чем фермент дикого типа. У TvDAAO Ser335Ala температурные зависимости констант скорости инактивации k_1 и k_2 разнонаправленно отличаются от зависимостей фермента дикого типа – k_1 в меньшей степени растет при увеличении температуры, в то время как k_2 сильнее зависит от температуры. В результате TvDAAO Ser335Ala оказывается более стабильным, чем фермент дикого типа на первой стадии инактивации при температуре > 54°C, а на второй стадии при температуре < 50°C. Таким образом, ввиду сложной температурной зависимости констант обеих стадий инактивации, стабильность TvDAAO Ser335Ala при каждой температуре определяется соотношением констант каждой стадии инактивации, но тем не менее суммарно несущественно отличается от стабильности фермента дикого типа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данной работы изучено влияние гидрофобизации α -спиралей в структуре оксидазы D-аминокислот из дрожжей *T. variabilis* путем замены восьми остатков серина на остатки аланина. С точки зрения взаимосвязи структуры и стабильности TvDAAO интересен тот факт, что замены остатков Ser на поверхности в положениях 77, 78, 270 и 277 дестабилизируют фермент, в то время как замены Ser 67, 105, 335 и 336 внутри белковой глобулы приводят к снижению стабильности только в одном случае из четырех. Также следует отметить, что замены остатков серина, расположенных на концах α -спиралей, также негативно влияют на температурную стабильность фермента. Эти данные прямо противоположны результатам, полученным для формиатдегидрогеназы из бактерий *Pseudomonas* sp. 101 [22]. Наибольший эффект стабилизации этого фермента (1.6 раза) наблюдался при замене Ser131, расположенного на поверхности белковой глобулы, на остаток Ala. Кроме того, эффект стабилизации обнаружен и при замене Ser184, расположенного на самом конце спирали α 6 [22]. Та-

ким образом, можно сделать вывод, что, несмотря на универсальность подхода по стабилизации белков за счет гидрофобизации α -спиралей, величина и эффект изменения стабильности непосредственно зависят от особенностей структуры конкретного белка или фермента.

В заключение хочется упомянуть, что в практике белковой инженерии встречаются случаи, когда введение одной аминокислотной замены приводило к существенной стабилизации фермента [23, 24]. Однако, как правило, задача повышения температурной стабильности может быть решена путем объединения нескольких успешных точечных мутаций,

каждая из которых в отдельности имеет умеренный эффект стабилизации, в то время как температурная стабильность многоточечного мутантного фермента становится значительной [12]. Таким образом, метод гидрофобизации α -спиралей может рассматриваться не как основной, но как дополнительный подход к увеличению стабильности ферментов в силу небольших эффектов стабилизации при введении точечных аминокислотных замен. ●

*Работа поддержана РФФИ
(грант № 14-04-00859-а).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tishkov V.I., Khoronenkova S. V. // *Biochemistry (Moscow)*. 2005. V. 70. № 1. P. 40–54.
2. Khoronenkova S.V., Tishkov V.I. // *Biochemistry (Moscow)*. 2008. V. 73. № 13. P. 1511–1518.
3. Pollegioni L., Piubelli L., Sacchi S., Pilone M.S., Molla G. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2007. V. 64. № 11. P. 1373–1394.
4. Pollegioni L., Molla G. // *Trends Biotechnol.* 2011. V. 29. № 6. P. 276–283.
5. Pollegioni L., Molla G., Sacchi S., Rosini E., Verga R., Pilone M.S. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008. V. 78. № 1. P. 1–16.
6. Pollegioni L., Caldinelli L., Molla G., Sacchi S., Pilone M.S. // *Biotechnol. Prog.* 2004. V. 20. № 2. P. 467–473.
7. Gabler M., Hensel M., Fischer L. // *Enzyme Microb. Technol.* 2000. V. 27. № 8. P. 605–611.
8. Yurimoto H., Hasegawa T., Sakai Y., Kato N. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2001. V. 65. P. 627–633.
9. Geueke B., Weckbecker A., Hummel W. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007. V. 74. № 6. P. 1240–1247.
10. Savin S.S., Chernyshev I.V., Tishkov V.I., Khoronenkova S.V. // *Moscow Univ. Chem. Bul.* 2006. V. 61. № 1. P. 13–19.
11. Cherskova N., Khoronenkova S., Tishkov V. // *Rus. Chem. Bull.* 2010. V. 59. № 1. P. 1–7.
12. Tishkov V.I., Popov V.O. // *Biomol. Eng.* 2006. V. 23. № 2–3. P. 89–110.
13. Komarova N.V., Golubev I.V., Khoronenkova S.V., Tishkov V.I. // *Rus. Chem. Bull.* 2012. V. 61. № 7. P. 1489–1496.
14. Wong K.-S., Fong W.-P., Tsang P.W.-K. // *Nat. Biotechnol.* 2010. V. 27. № 1. P. 78–84.
15. Wang S.-J., Yu C.-Y., Lee C.-K., Chern M.-K., Kuan I.-C. // *Biotechnol. Lett.* 2008. V. 30. № 8. P. 1415–1422.
16. Komarova N.V., Golubev I.V., Khoronenkova S.V., Chubar T.A., Tishkov V.I. // *Biochemistry (Moscow)*. 2012. V. 77. № 10. P. 1181–1189.
17. Khoronenkova S.V., Tishkov V.I. // *Anal. Biochem.* 2008. V. 374. № 2. P. 405–410.
18. Poltorak O.M., Chukhray E.S., Torshin I.Y. // *Biochemistry (Moscow)*. 1998. V. 63. № 3. P. 303–311.
19. Munoz V., Serrano L. // *Nat. Struct. Biol.* 1994. V. 1. P. 399–409.
20. Munoz V., Serrano L. // *J. Mol. Biol.* 1995. V. 245. P. 275–296.
21. Rose G., Geselowitz A., Lesser G. // *Science*. 1985. V. 229. № 7. P. 834–838.
22. Rojkova A., Galkin A., Kulakova L., Serov A., Savitsky P., Fedorchuk V., Tishkov V. // *FEBS Lett.* 1999. V. 445. № 1. P. 183–188.
23. Alekseeva A.A., Serenko A.A., Kargov I.S., Savin S.S., Kleimenov S.Y., Tishkov V.I. // *Protein Eng. Des. Sel.* 2012. V. 25. № 11. P. 781–788.
24. Alekseeva A.A., Savin S.S., Kleimenov S.Y., Uporov I.V., Pometun E.V., Tishkov V.I. // *Biochemistry (Moscow)*. 2012. V. 77. P. 1199–1209.