На правах рукописи

СТЕПАШКИНА
Анастасия Владимировна

БАКТЕРИАЛЬНАЯ ПЕНИЦИЛЛИНАЦИЛАЗА: ВЗАИМОСВЯЗЬ СТРУКТУРА – ФУНКЦИЯ И ПОЛУЧЕНИЕ ОДНОЦЕПОЧЕЧНОЙ ФОРМЫ ФЕРМЕНТА

03.01.04 – биохимия

03.01.06 – биотехнология
(в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2017

Работа выполнена в лаборатории молекулярной инженерии Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» и на кафедре химической энзимологии химического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Научный руководитель: **Тишков Владимир Иванович,**
доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Яненко Александр Степанович,**
доктор биологических наук, профессор,
Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение "Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра "Курчатовский институт", и.о. директора института, заведующий лабораторией

Петренко Александр Георгиевич,
доктор химических наук,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, руководитель лаборатории клеточной биологии рецепторов

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук

Защита диссертации состоится «___» декабря 2017 года в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 002.247.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы Российской академии наук по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 1 и на сайте http://fbras.ru/.

Автореферат разослан «___» _____ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук А.Ф. Орловский.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Пенициллинацилаза (ПА; КФ 3.5.1.11) широко применяется в промышленности при получении полусинтетических β-лактамных антибиотиков, в тонком органическом синтезе для разделения смеси рацематов и получения оптически чистых энантиомеров, а также для защиты амино- и гидроксильных групп в пептидном синтезе. В промышленности применяется иммобилизованный препарат фермента дикого типа либо его мутантной формы. Мутантные формы ПА с улучшенными свойствами, специально разработанные для конкретного процесса, позволяют получать антибиотики с высоким количественным выходом или стереоизомеры с высоким энантиомерным избытком. Различные ПА были клонированы и изучены из ряда бактерий и грибов. Наиболее изучена ПА из бактерий *Escherichia coli* (EcПА). Однако у этого фермента есть ряд существенных недостатков (например, довольно узкий pH-оптимум активности), что ограничивает его применение на практике. Поэтому в настоящее время ведется активный поиск альтернативных источников ПА. Объектом исследования данной диссертационной работы является более перспективный фермент ПА из грамотрицательной бактерии *Alcaligenes faecalis* VKM B-1518 (DSM) (AfПА), у которого по сравнению с ферментом из *E.coli* более высокая термостабильность и более широкий pH-оптимум активности, смещенный в щелочную область. Кодирующий ПА *pac*-ген транслируется в виде полипептида-предшественника, который содержит сигнальный пептид, α-субъединицу, спейсер и β-субъединицу, на N-конце которой находится каталитический остаток серина βSer1. Экспрессия *pac*-гена и биосинтез полипептида-предшественника протекают в цитоплазме клетки *E.coli*, в то время как процесс созревания до активного гетеродимера локализован в периплазме клетки *E.coli*. Созревание ПА в бактериальном штамме-продуценте заключается в посттрансляционной модификации, которая включает транспортировку полипептида-предшественника из цитоплазмы в периплазму с отщеплением сигнального пептида и последующее выщепление спейсера с образованием активного гетеродимерного фермента. Указанные процессы представляют скорость-лимитирующие стадии созревания ПА. На примере EcПА было показано, что введение аминокислотных замен даже внутри субъединиц влияет на эффективность и скорость процессинга и, следовательно, на количество синтезируемого фермента. В настоящей диссертационной работе было предложено создать новую генно-инженерную конструкцию, кодирующую одноцепочечную (пермутированную) ПА, которая не подвергается процессингу, а сразу приводит к образованию активного фермента в цитоплазме клетки *E.coli*. Такая работа представляет большой фундаментальный научный интерес. С позиции фундаментальной науки, получение одноцепочечной формы ПА позволяет установить новые структурно-функциональные закономерности. С точки зрения практической значимости, создание новой генетической конструкции, обеспечивающей отсутствие процессинга, позволяет

исключает длительный этап оптимизации условий культивирования для каждой мутантной формы и позволяет стандартизовать эти условия.

Одноцепочечная ПА также представляет собой перспективный биокатализатор с экономической точки зрения. Основные требования, предъявляемые к биокатализатору для промышленного применения, включают в том числе высокий уровень биосинтеза белка при культивировании рекомбинантного штамма-продуцента и высокую степень чистоты препарата фермента. Таким образом, наибольший вклад в стоимость препарата биокатализатора вносят стадии культивирования и очистки. В связи с этим получение генетической конструкции, кодирующей одноцепочечную ПА, позволит снизить себестоимость получения фермента за счет снижения длительности культивирования.

Цели и задачи исследования. Данная диссертационная работа состоит из двух частей. Цель первой части заключается в изучении влияния случайных мутаций на уровень экспрессии, каталитические свойства и температурную стабильность мутантных форм, полученных при клонировании гена ПА с геномной ДНК бактерий *Alcaligenes faecalis* VKM B-1518 (DSM). Задачи первой части исследования включали анализ нуклеотидных последовательностей гена AfПА на наличие мутаций, возникших при клонировании методом ПЦР; отбор плазмид с мутациями; культивирование рекомбинантных штаммов *E.coli*, трансформированных отобранными плазмидами; сравнительная характеристика свойств AfПА со случайными мутациями. В рамках первой части также была поставлена задача провести детальную характеристику рекомбинантной AfПА дикого типа. Цель второй части работы состоит в получении и изучении свойств одноцепочечной (пермутированной) формы фермента. Задачи работы включали компьютерное моделирование двух вариантов одноцепочечной ПА, отличающихся типом сшивки, а именно отсутствием остатка пролина в 551-м положении на С-конце β-субъединицы (βPro551) во втором варианте; получение генетических конструкций, кодирующих два варианта одноцепочечной ПА, с помощью ПЦР; секвенирование генов для подтверждения нужной последовательности; оптимизация условий культивирования и получение высокоочищенных препаратов одноцепочечных ПА; характеристика свойств двух вариантов одноцепочечной ПА.

Научная новизна. На данный момент запатентовано несколько нуклеотидных последовательностей ПА из различных штаммов *Alcaligenes faecalis*, и в настоящей диссертационной работе впервые изучены свойства нового фермента, транслируемого с патентно-чистого гена ПА из бактерий *Alcaligenes faecalis* VKM B-1518 (DSM). Анализ литературных данных по теме диссертации показал, что существует только одна публикация, в которой описано малоудачное (очень низкие выходы и низкая удельная активность) получение одноцепочечной (пермутированной) ПА из *E.coli*. Таким образом, впервые была получена одноцепочечная ПА из бактерий *Alcaligenes faecalis* VKM B-1518 (DSM), исследованы условия экспрессии и очистки и проведена характеристика двух вариантов

фермента, а также впервые проведен рефолдинг одноцепочечной AfПА из телец включения. Полученные препараты одноцепочечной AfПА имели такие же каталитические параметры, что и фермент дикого типа.

Теоретическая и практическая значимость работы. Получение одноцепочечной ПА представляет большое теоретическое значение для фундаментальной науки, так как проведенные исследования касаются реорганизации структуры гена ПА и связанного с этим изменения пути фолдинга одноцепочечной ПА, а также возможности формирования правильной трехмерной структуры с сохранением функциональности белка. В генно-инженерных конструкциях, кодирующих два варианта одноцепочечной ПА, отсутствует участок, кодирующий сигнальный пептид, и, соответственно, не происходит транспортировки полипептида-предшественника из цитоплазмы клетки *E.coli* в периплазму, а также отсутствует участок гена, кодирующий спейсер. Если для успешного фолдинга ПА дикого типа требуется спейсер и определенная последовательность участков, кодирующих субъединицы, обеспечивающая сначала фолдинг α- субъединицы и затем на ее основе β-субъединицы, то для одноцепочечной ПА в данной диссертационной работе было показано, что успешный фолдинг до активного фермента может достигаться и в цитоплазме клетки *E.coli* без наличия спейсера при обращенном порядке фолдинга, при этом в первую очередь сворачивается β-домен, который способен самостоятельно принимать правильную конформацию, а затем α-домен. Неизменность каталитических параметров одноцепочечной ПА свидетельствует о правильной структуре активного центра. Практическая значимость работы заключается в возможности проводить направленный мутагенез на основе гена одноцепочечной ПА и получать мутантные формы в стандартизированных условиях экспрессии, не требующих оптимизации процесса культивирования для каждого конкретного мутанта.

Методология и методы исследования. В работе были использованы молекулярно-биологические, биофизические и биохимические методы исследования, такие как трансформация и культивирование рекомбинантных штаммов *E.coli*, полимеразная цепная реакция, электрофорез белков и ДНК, методы гель-фильтрации, гидрофобной и ионообменной хроматографии для очистки белков, а также дифференциальная сканирующая калориметрия, методы стационарной кинетики и компьютерные методы анализа.

Степень достоверности. Достоверность представленных в диссертации данных и сделанных выводов определяется использованием большого количества современных физико-химических методов исследования белков.

Личный вклад диссертанта. Представленные в диссертационной работе экспериментальные данные получены лично автором, либо (эксперименты по ДСК) при его непосредственном участии на всех этапах исследований, включая планирование и проведение экспериментов, обработку, оформление и публикацию результатов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Аминокислотные замены в ПА оказывают влияние на уровень экспрессии фермента в рекомбинантном штамме-продуценте, на каталитические свойства и температурную стабильность.
2. Обратный порядок фолдинга доменов одноцепочечной ПА не влияет на итоговую трехмерную структуру и строение активного центра фермента и на его каталитические свойства.
3. Локализация фолдинга одноцепочечной ПА в цитоплазме приводит к незначительному ухудшению температурной стабильности из-за неподходящей окислительно-восстановительной среды для формирования дисульфидной связи.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были представлены на международных и российских конгрессах, конференциях и школах: Школа-конференция молодых ученых «Фундаментальная наука для биотехнологии и медицины» (Москва, Россия, 2011), VII Московский международный конгресс "Биотехнология: состояние и перспективы развития" (Москва, Россия, 2013), Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2013» (Москва, Россия, 2013), International conference Biocatalysis-2013: Fundamentals & Applications (Москва, Россия, 2013), Federation of European Biochemical Societies Congress "Mechanisms in Biology": 38th FEBS Congress (Санкт-Петербург, Россия, 2013), International BioForum 2014, Russian-German session (Пущино, Россия, 2014), 10th International Conference on Protein Stabilisation (Стреза, Италия, 2014), International conference of International Network of Protein Engineering Centers (INPEC-2014, Зеленогорск, Россия, 2014), IX International congress "Biotechnology: state of the art and perspectives" (Москва, Россия, 2017), Третий междисциплинарный симпозиум по медицинской, органической и биологической химии и фармацевтике МОБИ-ХимФарма2017 (Севастополь, Россия, 2017), 11-th International Conference "Biocatalysis-2017: Fundamentals and Applications" (Московская обл., Авантель Клаб Истра, Россия, 2017).

По результатам выполненных исследований автор в 2013 г. был награжден дипломом II степени и медалью на конкурсе молодых ученых за лучшую научно-исследовательскую работу на VII Московском международном конгрессе "Биотехнология: состояние и перспективы развития" (Москва, Россия, 2013) и дипломом I степени среди аспирантов на XX Международной научной конференции «Ломоносов-2013» (Москва, Россия, 2013).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 14 печатных работ, в том числе 3 публикации (все в журналах, входящих в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий ВАК РФ) и 11 тезисов докладов конференций.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 164 страницах, содержит 41 рисунок, 19 таблиц и 192 ссылки.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

Клонирование гена, экспрессия и характеристика рекомбинантной пенициллинацилазы из *Alcaligenes faecalis* дикого типа и ее мутантных форм.

Объектом исследования в настоящей работе является пенициллинацилаза из бактерии *Alcaligenes faecalis* VKM B-1518 (DSM). Такой выбор обусловлен улучшенными физико-химическими свойствами фермента по сравнению с ПА из *E.coli*, что имеет важное значение для промышленных процессов синтеза антибиотиков и оптически активных аминов.

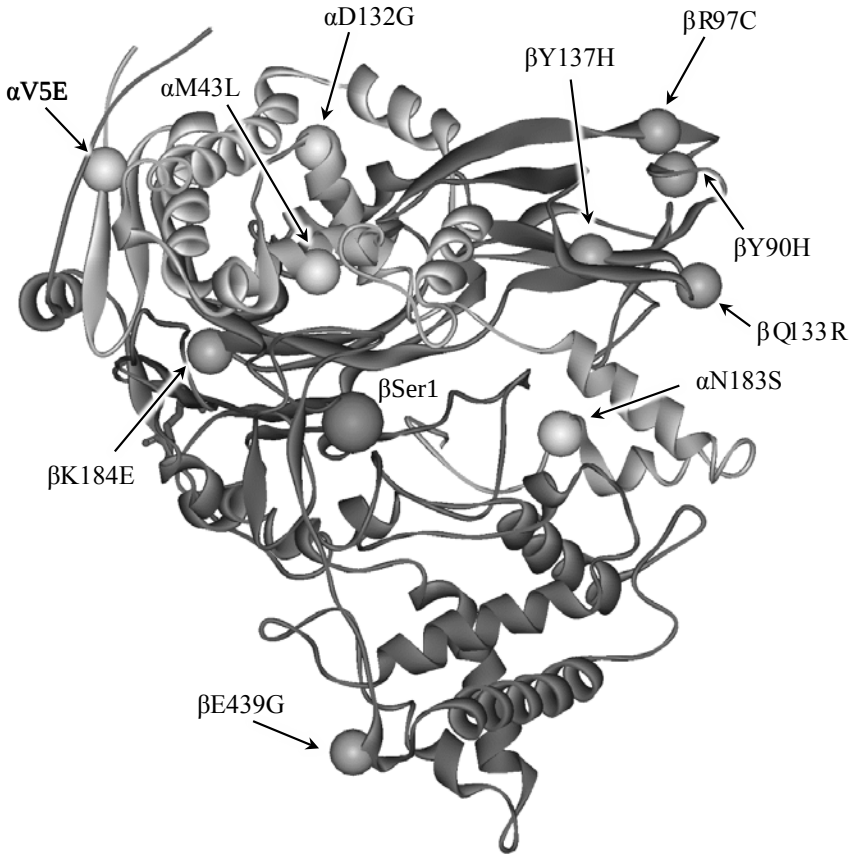

Рис. 1. Пространственное расположение аминокислотных замен в трехмерной структуре AfПА. Каталитический остаток βSer1 расположен в центре и указан сферой большего размера.

Ген ПА из *A.faecalis* VKM B-1518 (DSM) клонировали ранее в диссертации Ясной А.С (Ясная А.С., дис. канд. хим. наук, 2009). Клонирование гена AfПА осуществляли методом ПЦР в вектор на основе плазмиды pBR322. При этом в качестве матрицы использовалась геномная ДНК штамма *A.faecalis* VKM B-1518 (DSM). В результате лигирования и трансформации были отобраны восемь колоний. Секвенирование показало, что два клона имеет одинаковую нуклеотидную последовательность, которая была принята за фермент дикого типа. Сравнение аминокислотной последовательности фермента дикого типа AfПА с тремя другими

известными ферментами ПА из *A.faecalis* показало, что ПА из *A.faecalis* VKM B-1518 (DSM) имеет восемь уникальных аминокислотных замен, а степень идентичности нуклеотидной последовательности по сравнению с указанными ферментами составляет 91-94%. Остальные шесть клонов содержали дополнительные аминокислотные замены (рис. 1).

Согласно выравниванию аминокислотных последовательностей, дополнительные мутации локализованы в сигнальной последовательности, в участках гена, кодирующих две субъединицы, а также в спейсере. Проведено культивирование полученных рекомбинантных штаммов. Культивирование мутантных AfПА проводили в системе экспрессии на основе штамма *E.coli* TG1 при температуре 15°C в течение 65 часов.

На рисунке 2 показаны электрофореграммы препаратов ферментов wt-AfПА и AfПА M1-6 по окончании культивирования. На электрофореграмме отчетливо видны две полосы, соответствующие α- и β-субъединице фермента (23,8 и 62,7 кДа соответственно).

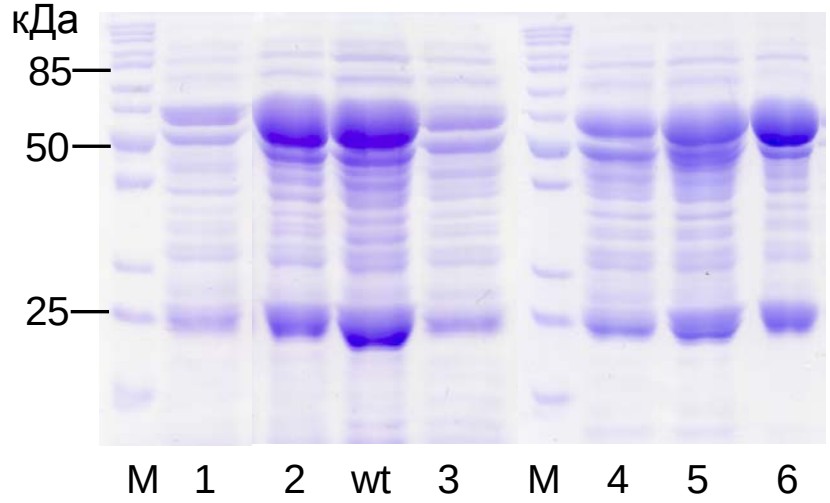

Рис. 2. Аналитический SDS-ПААГ электрофорез образцов мутантных AfПА (M1–M6) и фермента дикого типа (wt) после культивирования; M – маркер молекулярной массы.

Было обнаружено, что уровень экспрессии заметно отличается для разных мутантных форм. Полученные результаты свидетельствуют о влиянии аминокислотных замен на уровень биосинтеза активной рекомбинантной AfПА. По всей видимости, это связано с тем, что соответствующие аминокислотные замены могут приводить к иной вторичной структуре и, следовательно, оказывать влияние на транспортировку и фолдинг полипептида-предшественника. Для характеристики свойств были выбраны мутантные формы M2, M4, M5 и M6 как имеющие наибольший выход по активности (табл. 1). Для исследования свойств ферментов были использованы неочищенные препараты, полученные обессоливанием периплазматического экстракта.

Кинетические параметры V_{max} и K_m были рассчитаны методом нелинейной регрессии из графика зависимости начальной скорости реакции гидролиза NIPAB

(*п*-нитро-*м*-карбоксианилид фенилуксусной кислоты) от концентрации субстрата. Для расчета величины каталитической константы определяли концентрацию активных центров фермента титрованием необратимым ингибитором фенилметилсульфонилфторидом (PMSF) (Svedas et al., 1977).

Таблица 1.

Экспрессия AfПА дикого типа и ее мутантов в клетках *E.coli* TG1.

Фермент AfПА	Выход биомассы, г/л среды	Активность, ед./л среды	Удельная активность, ед./г биомассы	Активность, ед./л среды	Удельная активность, ед./г биомассы
		в периплазматическом экстракте		в культуральной жидкости	
WT	26±4	11500±1700	450±70	350±50	14±2
M1	28±4	950±140	34±5	290±40	10±2
M2	30±4	10100±1500	340±50	260±40	9±1
M3	27±4	990±150	37±6	144±22	5±1
M4	29±4	1700±250	59±9	104±16	4±1
M5	31±5	7580±1140	246±40	213±32	7±1
M6	29±4	9490±1420	325±50	250±40	9±1

Таблица 2.

Значения каталитических параметров и констант скорости инактивации AfПА.

Фермент AfПА	k_{cat}, c^{-1}	K_m, мкМ	k_{cat}/K_m, $мкМ^{-1}\cdot с^{-1}$	k_{in}, 10^{-4} $с^{-1}$
WT	**138±5**	**5,2±0,4**	**27±3**	**3,97±0,08**
M2	104±4	3,6±0,3	29±3	4,21±0,07
M4	152±5	5,5±0,2	28±2	9,59±0,16
M5	154±4	5,7±0,3	27±2	11,0±1,4
M6	159±7	6,2±0,5	26±3	33,1±6,2

Данные были аппроксимированы методом линейной регрессии. Значения k_{cat} и K_m приведены в таблице 2. Мутация βQ133R в гене AfПА M2 локализована на поверхности глобулы в основании конуса активного центра и может способствовать наблюдаемому увеличению сродства к субстрату. Здесь имеет место замена полярной аминокислоты (Gln) на положительно заряженный остаток (Arg). В случае мутации βK184E реализуется замена положительно заряженного остатка (Lys) на отрицательно заряженный (Glu), локализованный в β-листе внутри глобулы. Вероятно, соответствующие замены аминокислотных остатков βQ133 и βK184

приводят к более эффективному связыванию субстрата и к понижению величины K_m. Мутантные формы AfПА М4, 5, 6 и имеют близкие значения константы Михаэлиса в пределах погрешности эксперимента по сравнению с wt-AfПА, но характеризуются более высокими величинами каталитической константы.

Для выбранных ферментов wt-AfПА и AfПА М4, М5, М6 была изучена кинетика термоинактивации при температуре 54°С в калий-фосфатном буферном растворе (0,01 М KH_2PO_4, 0,1 М KCl; pH 8,0). Кривые термоинактивации можно аппроксимировать экспоненциальной функцией, и в полулогарифмических координатах они представляют собой прямые. Таким образом, процесс термоинактивации соответствует кинетике реакции первого порядка. Из графиков зависимости остаточной активности от времени были рассчитаны значения констант скорости инактивации k_{in} как тангенс угла наклона прямой. Величина k_{in} характеризует термостабильность фермента. Сравнение констант скорости инактивации (табл. 2) для изученных ферментов показало, что мутантные формы AfПА М4, М5, М6 проявляют более низкую термостабильность, чем фермент дикого типа.

Несмотря на различия в K_m и k_{cat}, каталитическая эффективность у мутантных форм М 2, М4, М5 и М6 примерно одинаковая, в пределах ошибки эксперимента. Таким образом, мутанты не обладали преимуществами в области катализа и проявляли более низкую термостабильность. Поскольку эксперименты по изучению свойств не выявили мутантных форм, которые обладали преимуществами по сравнению с ферментом дикого типа, дальнейшая работа с мутантами была нецелесообразна, поэтому работа была продолжена с ферментом дикого типа.

Более подробно была изучена температурная стабильность AfПА дикого типа. В качестве дополнительного метода анализа термостабильности был использован метод дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) и получены кривые ДСК для фермента дикого типа. Эксперименты по ДСК проводили в сотрудничестве с к.б.н. Клейменовым С.Ю. Установлено, что фермент wt-AfПА денатурирует необратимо и содержит только один калориметрический домен. Для ДСК было проведено отдельное культивирование и очистка фермента методом гидрофобной и ионообменной хроматографии. В результате получено 20 мг гомогенного белка. В рамках данного эксперимента было изучено влияние концентрации фермента на кривую ДСК при фиксированной скорости нагрева, а также зависимость кривых ДСК от скорости сканирования при фиксированной концентрации фермента. Было установлено, что, во-первых, температура плавления не зависит от концентрации фермента и, во-вторых, кривые ДСК смещаются вправо с увеличением скорости сканирования. Полученные результаты свидетельствуют, что процесс инактивации белка необратимый. Так как кривая ДСК имеет один максимум, молекула фермента не содержит дополнительных калориметрических доменов.

Таким образом, в первой части диссертационной работы осуществлена экспрессия шести клонов и фермента дикого типа, полученных при клонировании гена AfПА из штамма *Alcaligenes faecalis* VKM B-1518 (DSM), а также проведена характеристика свойств некоторых мутантных форм AfПА. Результаты

свидетельствуют о влиянии аминокислотных замен на уровень биосинтеза белка. Исследование кинетических параметров и температурной стабильности фермента дикого типа и мутантных форм AfПА показало, что мутации могут оказывать существенное влияние на свойства фермента. Появление заряженных остатков внутри белковой глобулы и увеличение гидрофобности поверхности молекулы белка приводят к дестабилизации молекулы фермента и пониженной термостабильности.

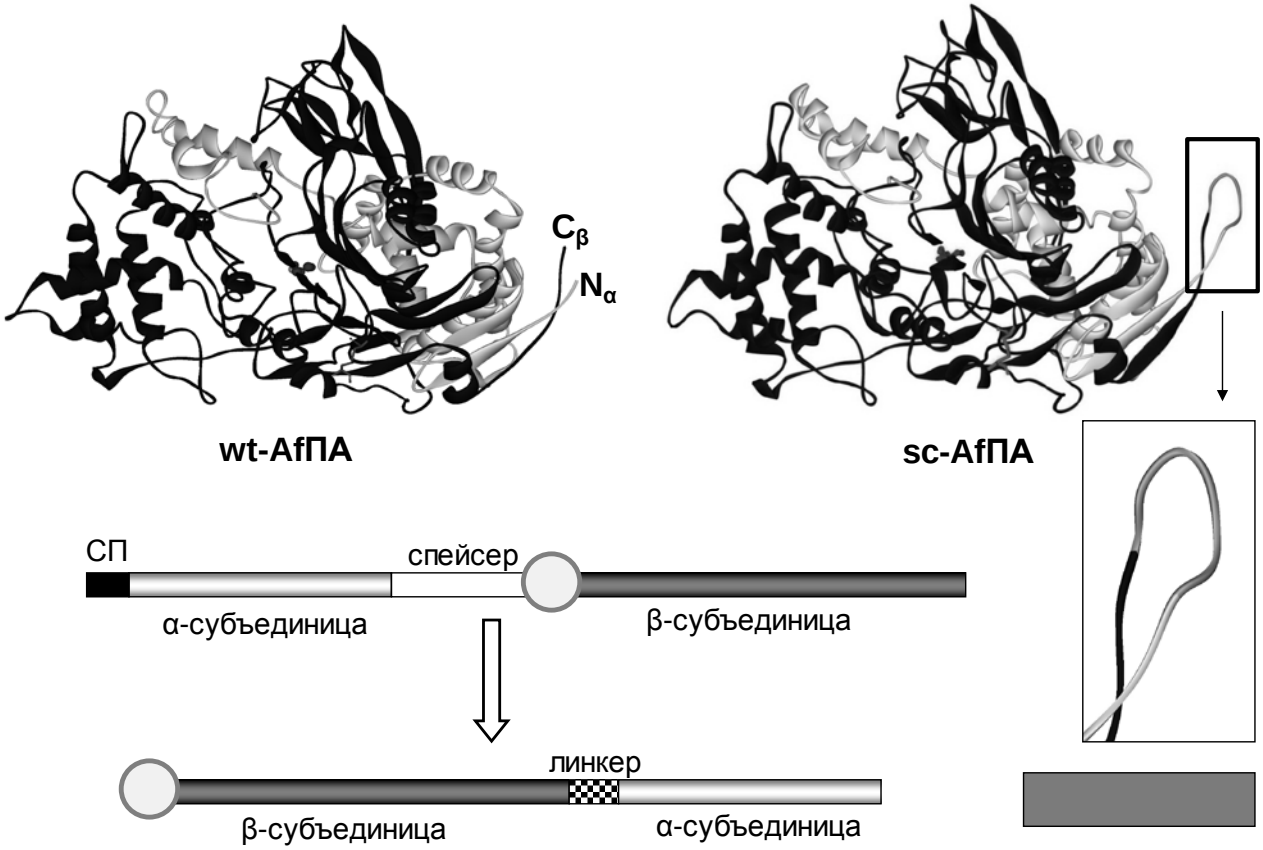

Рис. 3. Компьютерное моделирование линкера одноцепочечной (пермутированной) AfПА и схема генно-инженерной конструкции sc-AfПА. СП – сигнальный пептид, Ser1 – каталитический остаток βSer1 на N-конце β-субъединицы. N_α – N-конец α-субъединицы, C_β – С-конец β-субъединицы.

Одноцепочечная пенициллинацилаза из *Alcaligenes faecalis*.

Компьютерное моделирование структуры одноцепочечной sc-AfПА проводили на основе модельной структуры AfПА VKM B-1518 (DSM) (wt-AfПА) в сотрудничестве с к.ф.-м.н. Упоровым И.В. Модельная структура фермента дикого типа wt-AfПА была построена методом гомологичного моделирования согласно выравниванию по известной рентгеновской структуре ПА из *E.coli* (PDB 1E3A).

Анализ трехмерной структуры AfПА дикого типа (wt-AfПА) показал, что N-конец α-субъединицы и С-конец β-субъединицы пространственно сближены и образуют β-лист, что позволяет соединить N- и С-концы коротким пептидом (рис. 3).

В процессе компьютерного моделирования рассматривались различные варианты линкера, различающихся по аминокислотному составу и длине, и в

результате были выбраны две наиболее перспективные сшивки. Отличия между ними заключались в отсутствии остатка Pro551 на С-конце β-субъединицы в случае одного варианта одноцепочечной АfПА (sc-AfПА2). Остаток Pro придает жесткость полипептидной цепи, уменьшая подвижность области соединительной петли, и соответственно может влиять на стабильность белка. Длину линкера подбирали так, чтобы исключить конформационное напряжение в области N- и С-концов, и рассматривали варианты из 6, 7 и 8 аминокислотных остатков. В качестве линкера была выбрана последовательность аминокислот, состоящая из двух одинаковых блоков: GGGSGGGS. Моделирование осуществляли в предположении, что соединительная петля образует β-поворот и соединяет два β-тяжа за счет ковалентной связи. Процедура получения гена одноцепочечной sc-AfПА включала проведение трех реакций ПЦР. Новая система экспрессии была создана на основе плазмиды pET24a(+) и штамма *E.coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS. Культивирование рекомбинантного штамма-продуцента в условиях для wt-AfПА (15°С; 0,1 мМ IPTG; 65 ч) показало, что максимальный выход по активности sc-AfПА в 25 раз меньше (200 Ед./л среды) по сравнению с исходным ферментом дикого типа (5000 Ед./л среды). Тем не менее, выходы активных и растворимых одноцепочечных форм были значительно ниже по сравнению с контрольным экспериментом для фермента дикого типа в тех же условиях и составили около 3% общего белка клетки (табл. 3).

Оптимизация условий культивирования рекомбинантного штамма *E.coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS проводилась по нескольким параметрам: температура культивирования, концентрация индуктора IPTG, поглощение $A_{600нм}$ культуры во время индукции, концентрация хлорида кальция, процент посевного материала, состав среды и объем среды в колбе. Температура культивирования и концентрация индуктора оказали наибольшее влияние на выход активного фермента. В результате оптимизации условий культивирования выход активной и растворимой sc-AfПА повысили в 5 раз.

При анализе эффективности и уровня экспрессии важно определить, в какой форме синтезируется белок, растворимой или нерастворимой, и в каком количестве. Метод анализа по ферментативной активности позволяет определять только активный растворимый белок и не подходит в таких случаях, когда белок растворимый, но неактивный, либо когда белок синтезируется в виде нерастворимых телец включения. Растворимую и нерастворимую фракцию общего белка клетки анализировали методом электрофореза в денатурирующих условиях. На рисунке 4 показан электрофорез образцов фермента дикого типа и его двух одноцепочечных форм. Исходя из ширины полос следует, что уровень экспрессии одноцепочечных форм sc-AfПА1 и sc-AfПА2 по отношению к растворимому белку клетки крайне низкий. Если сравнить нерастворимые фракции для wt-AfПА и двух вариантов sc-AfПА, то можно заметить широкую полосу для wt-AfПА и более узкие полосы такой же массы (на уровне 85 кДа) для одноцепочечных sc-AfПА. Это может свидетельствовать о накоплении wt-AfПА в виде нерастворимого предшественника и о накоплении sc-AfПА в нерастворимой форме.

Таблица 3.

Экспрессия AfПА дикого типа (wt-AfПА) и двух одноцепочечных форм (sc-AfПА1 и sc-AfПА2) в клетках *E.coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS*.

Фермент AfПА	Выход биомассы, г/л среды	Активность, ед./л среды	Удельная активность, ед./г биомассы	Активность, ед./л среды	Удельная активность, ед./г биомассы
		в бесклеточном экстракте		в культуральной жидкости	
**15°C, 65 ч					
wt-AfПА	20±3	5400±800	276±41	840±130	43±6
sc-AfПА1	20±3	68±10	3,4±0,5	21±3	1,1±0,2
sc-AfПА2	20±3	58±5	2,9±0,4	20±3	1,0±0,2
**20°C, 26 ч					
wt-AfПА	5±1	1980±300	380±60	640±100	122±18
sc-AfПА1	17±2	670±100	41±6	8±1	0,5±0,1
sc-AfПА2	16±2	660±100	40±6	9±1	0,5±0,1

*Условия культивирования: среда 2YT, индукция 0,1 мМ IPTG.
**Температура и продолжительность культивирования после индукции.

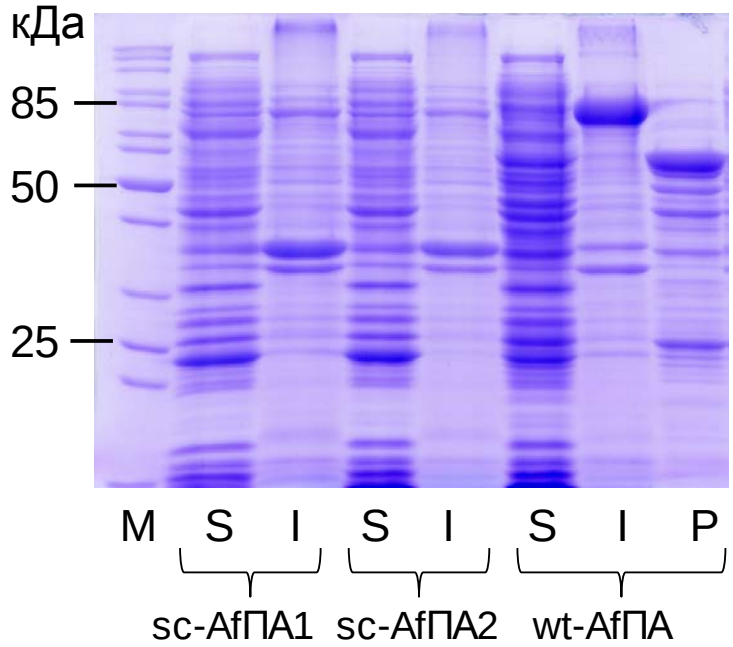

Рис. 4. Аналитический SDS-ПААГ электрофорез образцов sc-AfПА1, sc-AfПА2 и wt-AfПА после культивирования (20°C; 24 ч; 0,1 мМ IPTG; *E.coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS). M – маркер молекулярной массы, S – растворимая фракция (бесклеточный экстракт), I – нерастворимая фракция (клеточный осадок), P – периплазматический экстракт.

Поскольку температура оказывает значительный вклад в общий уровень экспрессии, а повышение температуры часто увеличивает долю нерастворимого белка, был проведен электрофорез растворимой и нерастворимой фракции, при

этом было установлено, что уровень экспрессии одноцепочечной формы sc-AfПА достигает наибольшего значения при температуре культивирования 30°C, и фермент накапливается преимущественно в нерастворимой форме (рис. 4).

Поскольку на электрофорезе нерастворимой фракции (культивирование при температуре 30°C; рис. 5) была обнаружена широкая полоса, соответствующая по массе одноцепочечной AfПА, было решено провести рефолдинг фермента из клеточного осадка.

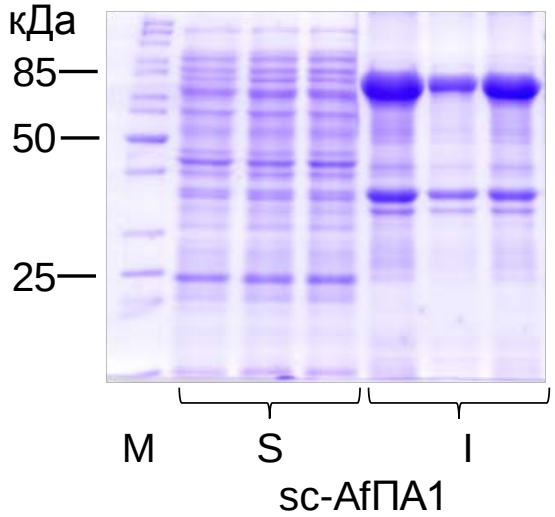

Рис. 5. Аналитический SDS-ПААГ электрофорез образцов sc-AfПА1 после культивирования (30°C; 4 ч; 0,1 мМ IPTG; *E.coli* BL21(DE3) CodonPlus/pLysS). M – маркер молекулярной массы, S – растворимая фракция (бесклеточный экстракт), I – нерастворимая фракция (клеточный осадок) (культивирование проводилось в трех повторах).

В результате рефолдинга первого варианта одноцепочечной sc-AfПА1 (рис. 6) активность наблюдалась при разбавлении исходного раствора солюбилизированного клеточного осадка до конечной концентрации мочевины 1,0 М. При рефолдинге второго варианта sc-AfПА2 максимальная активность наблюдалась при концентрации мочевины 0,3 М (рис. 7).

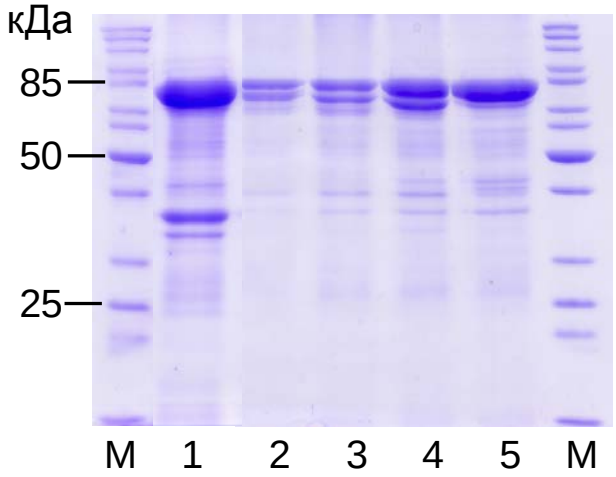

Рис. 6. Рефолдинг первого варианта одноцепочечной sc-AfПА1. Аналитический SDS-ПААГ, 1 – нерастворимая фракция после культивирования 4 ч при 30°C, 2-5 – образцы sc-AfПА1 после рефолдинга (разбавление белка в 8, 5, 4 и 3 раза; конечная концентрация мочевины 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 М).

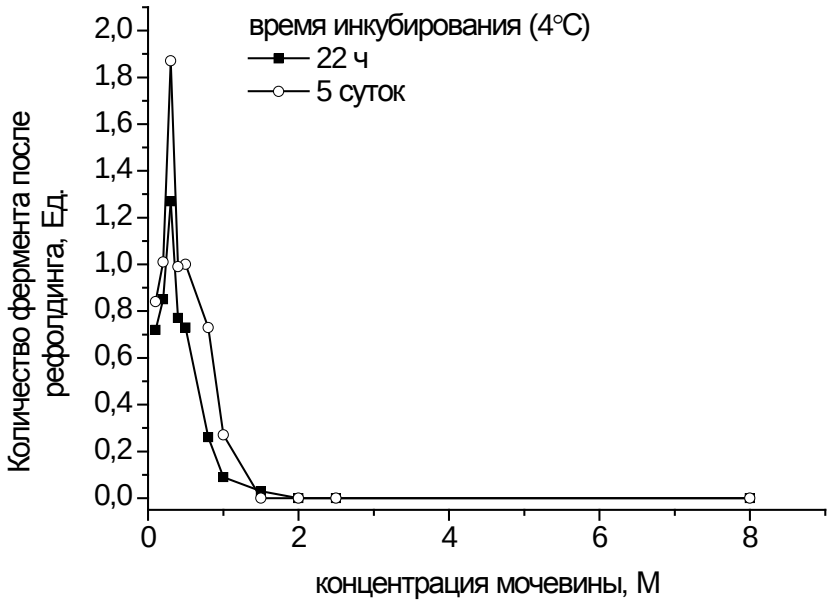

Рис. 7. Зависимость активности фермента sc-AfПА2 после рефолдинга от итоговой концентрации мочевины в буфере для рефолдинга.

Эффективность рефолдинга зависит от степени разбавления белка, концентрации мочевины и продолжительности рефолдинга. Таким образом, была показана возможность успешного рефолдинга двух вариантов одноцепочечной AfПА. Дальнейшее изучение кинетики и оптимизация условий рефолдинга в перспективе позволит увеличить количество активного фермента. Ввиду того что самый высокий уровень экспрессии sc-AfПА в клетках *E.coli* в виде нерастворимых телец включения достигается при температуре 30°C за относительно короткий период времени (4 ч), рефолдинг из клеточного осадка представляет собой перспективный этап получения фермента в активной и растворимой форме в количестве, достаточном для изучения термостабильности методом ДСК и для кристаллизации одноцепочечной AfПА. Из электрофореграмм на рисунке 5 видно, что фермент содержит меньше примесей в процентном отношении по сравнению с содержанием в бесклеточном экстракте, что, возможно, позволит упростить процедуру очистки фермента после рефолдинга.

Для изучения свойств фермента дикого типа wt-AfПА и двух одноцепочечных форм были использованы очищенные препараты. Очистка включала методы гидрофобной хроматографии (Toyopearl Butyl 650 M) и ионообменной хроматографии (MonoQ). Характеристика ферментов включала определение кинетических параметров, изучение температурной стабильности и измерение pH-зависимости активности. Было установлено, что кинетические параметры имеют близкие значения для wt-AfПА и двух одноцепочечных форм sc-AfПА. Это служит косвенным свидетельством того, что ковалентное соединение двух субъединиц не приводит к изменению конформации активного центра, и, скорее всего, общая третичная структура также сохраняется. Неизменность трехмерной структуры означает, что фолдинг одноцепочечной AfПА проходит успешно, несмотря на обращение порядка сворачивания полипептидной цепи. Кинетические параметры (K_m, V_m и k_{cat}) определяли спектрофотометрически с хромогенным субстратом

NIPAB. Для расчета каталитической константы k_{cat} измеряли концентрацию фермента методом титрования активных центров необратимым ингибитором PMSF. Величины кинетических параметров для двух вариантов sc-AfПА и фермента wt-AfПА дикого типа приведены в таблице 4. Полученные значения константы Михаэлиса и каталитической константы для трех ферментов несущественно отличаются между собой, что свидетельствует об отсутствии влияния новой генетической конструкции на структуру активного центра и каталитические свойства одноцепочечных вариантов AfПА.

Таблица 4.

Каталитические параметры (NIPAB; 0,01 М KH_2PO_4, 0,1 М KCl, pH 8,0; 30°C).

Фермент	k_{cat}, c^{-1}	K_m, мкМ
wt-AfПА	138±5	5,2±0,4
sc-AfПА1	143±1	4,6±0,2
sc-AfПА2	143±2	4,3±0,2

Термостабильность ферментов изучали в калий-фосфатном буферном растворе. Для этого измеряли кинетику термоинактивации фермента. Исследована зависимость термостабильности от температуры инактивации, концентрации и pH буферного раствора.

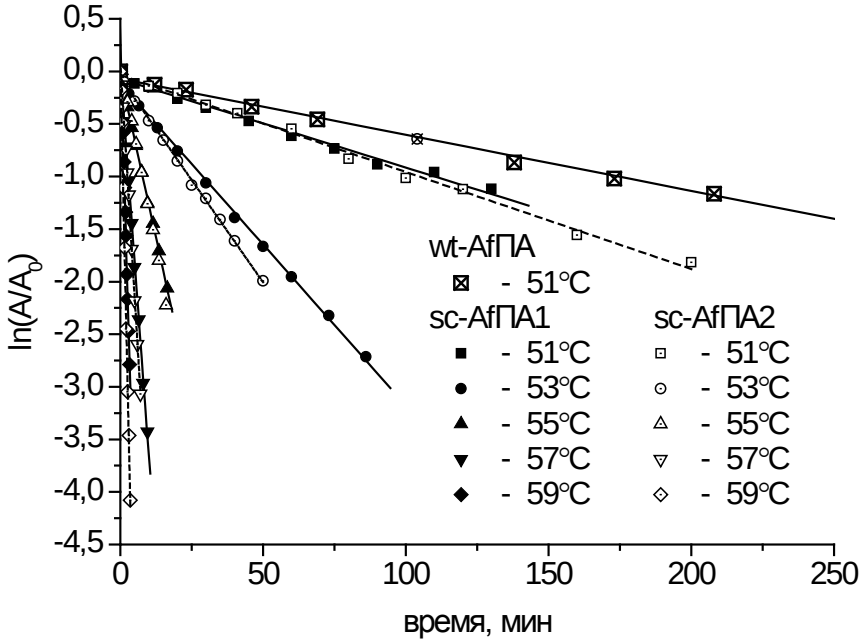

Рис. 8. Зависимость остаточной активности фермента от времени в полулогарифмических координатах (0,1 М KH_2PO_4, pH 8,0).

Температурная стабильность повышается с увеличением концентрации буферного раствора и понижением величины pH. Изученные ферменты имеют одинаковый характер зависимости термостабильности от указанных параметров,

однако в абсолютном отношении одноцепочечные формы AfПА были менее стабильны по сравнению с ферментом дикого типа. В случае одноцепочечной ПА ковалентная сшивка двух субъединиц не приводит к повышению термостабильности. Это может быть связано с локальной лабильностью структуры одноцепочечного варианта sc-AfПА в области соединительной петли.

Процесс термоинактивации для фермента дикого типа и двух одноцепочечных форм соответствует кинетике реакции первого порядка. Экспериментальные данные в полулогарифмических координатах могут быть аппроксимированы линейной зависимостью (рис. 8).

В таблице 5 приведены величины константы скорости инактивации k_{in} для трех ферментов в диапазоне температуры 51-59°C. Из полученных данных следует, что термостабильность ферментов понижается в ряду wt-AfПА>sc-AfПА1>sc-AfПА2. Отличие составляет в среднем 30% между wt-AfПА и sc-AfПА1 и 17% между двумя вариантами одноцепочечной sc-AfПА.

Таблица 5.

Величины константы скорости инактивации для wt-AfПА и sc-AfПА1-2 (0,1 М калий-фосфатный буфер pH 8,0).

	k_{in}, c^{-1}		
T, °C	wt-AfПА	sc-AfПА1	sc-AfПА2
51,0	$(8,90\pm0,20)\cdot10^{-5}$	$(1,40\pm0,05)\cdot10^{-4}$	$(1,54\pm0,04)\cdot10^{-4}$
53,0	$(4,08\pm0,12)\cdot10^{-4}$	$(5,10\pm0,08)\cdot10^{-4}$	$(6,48\pm0,11)\cdot10^{-4}$
55,0	$(1,61\pm0,02)\cdot10^{-3}$	$(2,07\pm0,02)\cdot10^{-3}$	$(2,30\pm0,04)\cdot10^{-3}$
57,0	$(5,15\pm0,06)\cdot10^{-3}$	$(6,16\pm0,06)\cdot10^{-3}$	$(7,43\pm0,15)\cdot10^{-3}$
59,0	$(1,42\pm0,03)\cdot10^{-2}$	$(1,70\pm0,02)\cdot10^{-2}$	$(2,00\pm0,04)\cdot10^{-2}$

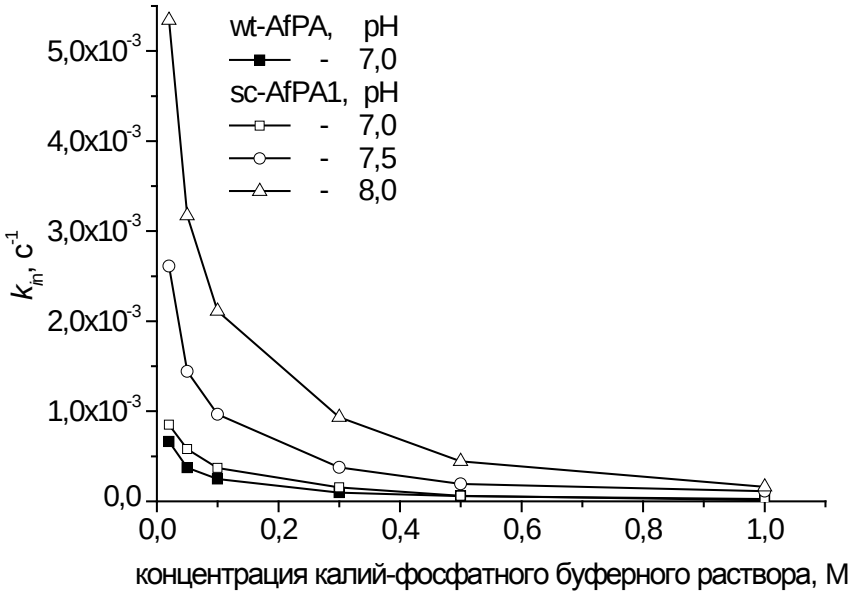

Рис. 9. Зависимость величины константы скорости инактивации от концентрации калий-фосфатного буферного раствора для wt-AfПА и sc-AfПА1 (56°C).

Влияние концентрации буферного раствора на кинетику термоинактивации было изучено для фермента дикого типа и первого варианта одноцепочечной sc-AfПА1 при трех значениях pH (рис. 9). Было показано, что константа скорости реакции инактивации возрастает с увеличением pH и понижением концентрации буферного раствора, и, следовательно, температурная стабильность при этих условиях падает. Закономерности изменения k_{in} для фермента дикого типа и первого варианта одноцепочечной sc-AfПА1 аналогичны.

Так как реакция инактивации мономолекулярная, для обработки полученных данных можно применить теорию активированного комплекса (ТАК). Согласно основному уравнению ТАК (1), экспериментальные данные линеаризуются в координатах $\ln(k_{in}/T)=f(1/T)$ (2), как показано на рисунке 10.

$$k_{in} = \frac{k_B T}{h} \cdot \exp\left(-\frac{\Delta G^{\neq}}{RT}\right) = \frac{k_B T}{h} e^{\frac{\Delta S^{\neq}}{R} - \frac{\Delta H^{\neq}}{RT}} \qquad (1)$$

$$\ln\left(\frac{k_{in}}{T}\right) = \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) - \frac{\Delta G^{\neq}}{RT} = \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{\Delta S^{\neq}}{R} - \frac{\Delta H^{\neq}}{R} \cdot \frac{1}{T} = const - \frac{\Delta H^{\neq}}{R} \cdot \frac{1}{T} \qquad (2)$$

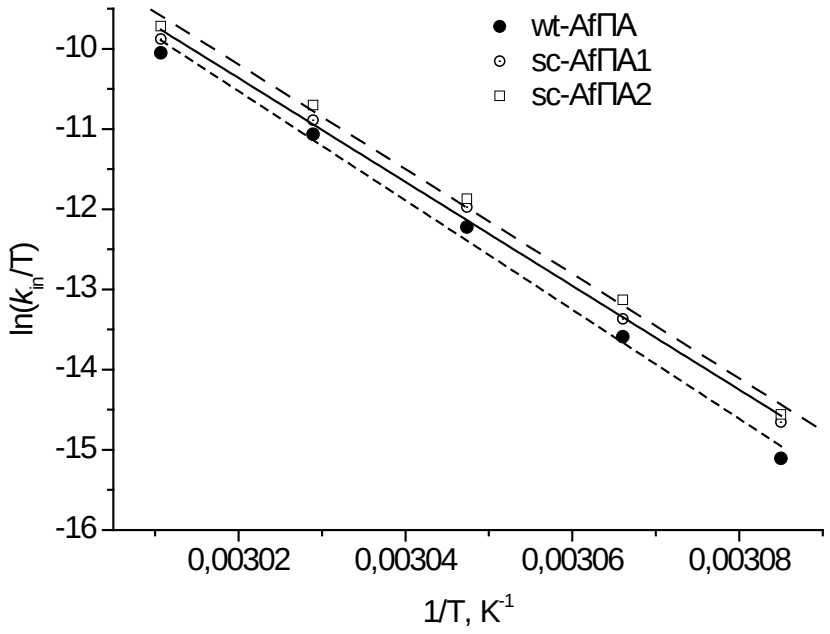

Рис. 10. Температурная зависимость констант скорости инактивации в координатах $\ln(k_{in}/T)$-1/T.

Величины энтальпии $\Delta H^{\neq}$ и энтропии $\Delta S^{\neq}$ активации, рассчитанные из графика (рис. 10) с помощью теории ТАК, представлены в таблице 6. Эти значения одинаковы для sc-AfПА и wt-AfПА в пределах погрешности эксперимента и характерны для процесса денатурации фермента.

Таблица 6.

Значения параметров активации.

	$\Delta H^{\neq}$, кДж·моль$^{-1}$	$\Delta S^{\neq}$, Дж·моль$^{-1}$·К$^{-1}$
wt-AfПА	570±20	1420±70
sc-AfПА1	540±20	1340±60
sc-AfПА2	540±20	1350±60

В качестве дополнительного метода анализа термостабильности были получены кривые ДСК для фермента дикого типа. Установлено, что фермент wt-AfПА денатурирует необратимо и содержит только один калориметрический домен.

На рисунках 11 и 12 представлены графики температурной зависимости парциальной удельной теплоемкости $C_p(T)$ при разных условиях.

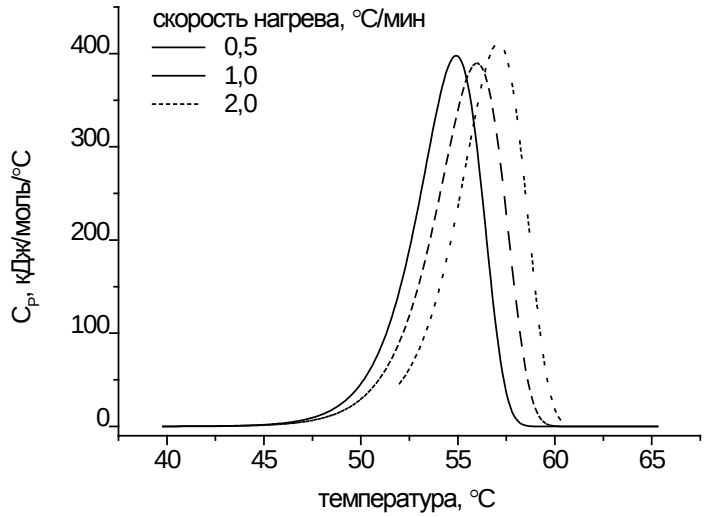

Рис. 11. Кривые ДСК wt-AfПА, полученные при разной скорости нагрева (при концентрации фермента 3 мг·мл$^{-1}$; 0,1 М калий-фосфатный буфер, pH 8,0).

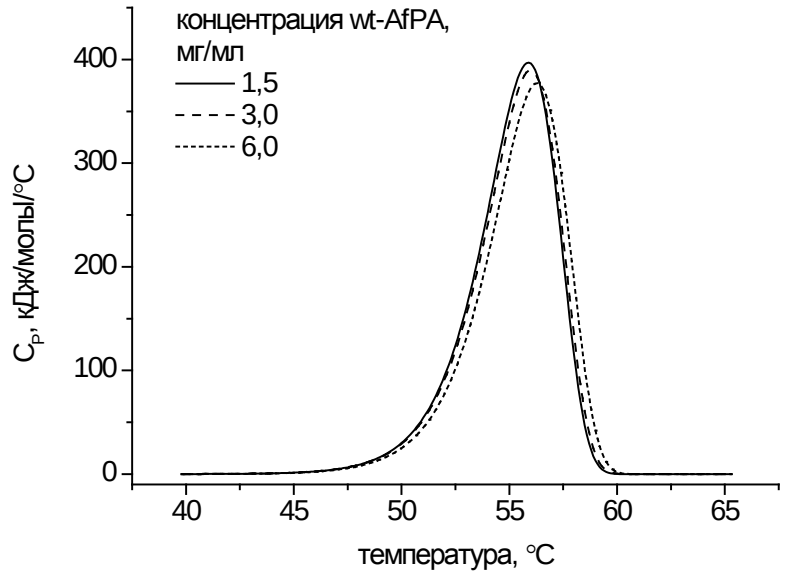

Рис. 12. Кривые ДСК wt-AfПА при разных концентрациях фермента фермента (скорость сканирования 1 °С·мин$^{-1}$; 0,1 М калий-фосфатный буфер, pH 8,0).

Площадь пика на экспериментальной кривой ДСК пропорциональна изменению калориметрической энтальпии ΔH реакции термоденатурации белка, а максимум кривой соответствует температуре фазового перехода T_{max} (табл. 7).

Таблица 7.

Параметры тепловых переходов AfПА дикого типа, измеренных методом ДСК. Условия: 0,1 М калий-фосфатный буфер, pH 8,0.

Зависимость кривых плавления от концентрации AfПА			
концентрация wt-AfПА, мг·мл$^{-1}$	1,5	3	6
скорость нагрева, °С/мин	1,016	1,015	1,01
ΔH*, Дж·моль$^{-1}$	1807	1800	1766
T_{max}*, °С	55,9	56	56,3

Зависимость кривых плавления от скорости сканирования			
концентрация wt-AfПА, мг·мл$^{-1}$	3	3	3
скорость нагрева, °С/мин	0,509	1,015	1,841
ΔH, Дж·моль$^{-1}$	1717	1800	1820
T_{max}, °С	54,9	56	57,1

*ΔH – калориметрическая энтальпия, T_{max} – температура фазового перехода.

Можно предположить, что, несмотря на принципиально новый путь фолдинга, sc-AfПА приобретает правильную третичную структуру в целом и конформацию активного центра в частности. Более низкая термостабильность sc-AfПА по сравнению с ферментом дикого типа, вероятно, обусловлена конформационной подвижностью в области соединительной петли либо, возможно, связана с отсутствием дисульфидной связи в молекуле одноцепочечной формы фермента.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что аминокислотные замены в пенициллинацилазе G из *Alcaligenes faecalis* VKM B-1518 (DSM) могут влиять на уровень синтеза активного рекомбинантного фермента. Появление заряженных остатков внутри белковой глобулы и увеличение гидрофобности поверхности молекулы белка приводят к дестабилизации молекулы фермента и пониженной термостабильности.

2. Температурная стабильность wt-AfПА дикого типа зависит от pH, концентрации и состава буферного раствора и увеличивается с понижением величины pH и повышением концентрации буфера. Изучение термоинактивации wt-AfПА методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) показало, что процесс термоденатурации необратимый и не зависит от концентрации белка. Фермент содержит один калориметрический домен и характеризуется температурой плавления 56,1±0,2 °С при скорости сканирования 1 °С·мин$^{-1}$.

3. Проведено компьютерное моделирование трехмерной структуры одноцепочечной AfПА. Показана возможность получения такого фермента. Проведена оптимизация и предложено два варианта сшивок. Создана генетическая конструкция, кодирующая одноцепочечную sc-AfПА. Показано, что одноцепочечная sc-AfПА экспрессируется в *E.coli* в активной и растворимой форме. Часть фермента

присутствует в нерастворимой форме. Общий выход активной sc-AfПА составил до 1000 ед. активности с литра среды. Наибольший выход по активности sc-AfПА достигается при 20°С через 17-20 ч после индукции, в то время как для фермента дикого типа оптимальные время и температура культивирования составляют 65 часов и 15°С.

4. Наибольший уровень экспрессии одноцепочечных форм, по результатам SDS-ПААГ электрофореза, достигается при температуре 30°С за 4 ч в виде нерастворимых телец включения. Показана возможность эффективного восстановления активности одноцепочечной ПА из нерастворимых агрегатов с помощью рефолдинга в мочевине.

5. Изучение свойств полученных одноцепочечных sc-AfПА показало, что они не отличаются от фермента дикого типа по каталитическим параметрам (даже немного лучше), но в 1,2-1,4 раза уступают по температурной стабильности.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Степашкина А.В.**, Ясная А.С., Березин А.И., Тишков В.И. Изучение влияния pH на термостабильность пенициллинацилазы из *Alcaligenes faecalis*. // Вестник Московского Университета, Серия 2: Химия. 2010. Т. 51. № 3. С.164-167.
2. **А.В. Степашкина**, С.С. Савин, О.Е. Скиргелло, В.И. Тишков. Экспрессия и характеристика мутантных форм пенициллинацилазы из *Alcaligenes faecalis*. // Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. 2014. Т. 55. № 2. С. 116-122.
3. **A.V. Stepashkina**, S.S. Savin, V.I. Tishkov. Purification and characterization of permuted penicillin acylase from *Alcaligenes faecalis. //* FEBS Journal. 2013. V.280, S.1, P.94.
4. **Степашкина А.В.**, Тишков В.И. Получение биокатализаторов на основе пермутированной пенициллинацилазы из *Alcaligenes faecalis*. // Школа-конференция молодых ученых «Фундаментальная наука для биотехнологии и медицины»: материалы конференции, г. Москва, Россия, 29-30 сент. 2011 г., с. 65-67.
5. **Степашкина А.В.**, Савин С.С., Тишков В.И. Получение и свойства пермутированной пенициллинацилазы из *Alcaligenes faecalis*. // VII Московский международный конгресс "Биотехнология: состояние и перспективы развития": материалы конгресса, г. Москва, Россия, 19-22 марта 2013 г., с. 165-166 (Ч. 2).
6. **Степашкина А.В.**, Тишков В.И. Инженерия четвертичной структуры пенициллинацилазы из *Alcaligenes faecalis. //* Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2013»: материалы международного молодежного форума, г. Москва, Россия, 8-13 апреля 2013 г.
7. **A.V. Stepashkina**, S.S. Savin, V.I. Tishkov. Single-chain penicillin acylase from Alcaligenes faecalis as new genetic construction for rapid expression in *E.coli. //*

International conference Biocatalysis-2013: Fundamentals & Applications: Abstracts, Moscow, Russia, July 2-5, 2013, P.33.

8. **Stepashkina A.V.**, Tishkov V.I. Penicillin acylase from *Alcaligenes faecalis*: cloning, expression and preparation of permuted enzyme. // International BioForum 2014, Russian-German session, Pushchino, Russia, April 21-25, 2014, Programme & Abstracts Collection, P.31-32.
9. **Stepashkina A.V.**, Tishkov V.I. Thermal stability of the wild-type and permuted penicillin acylase. // Protstab2014, 10th International Conference on Protein Stabilisation, Stresa (Lake Maggiore), Italy, May 7-9, 2014, P.68.
10. **Stepashkina A.V.**, Uporov I.V., Savin S.S., Tishkov V.I. Permutation of penicillin acylase: impact on the expression efficiency and enzyme properties. // International Network of Protein Engineering Centers (INPEC), International conference INPEC-2014, Russia, St.Petersburg region, Zelenogorsk, September 10-14, 2014, P.27.
11. Tishkov V.I., Pometun A.A., Zarubina S.A., Fedorchuk V.V., Fedorchuk E.A., **Stepashkina A.V.**, Atroshenko D.L., Parshin P.D., Virolainen T.S., Kovalevsky R.P., Chubar T.A., Boiko K., Eldarov M., Savin S.S. New paradigm in biocatalysts creation. The proceedings of IX International congress «Biotechnology: state of the art and perspectives», Moscow, February 20-22, 2017, LLC "RED GROUP, part 1, p.40.
12. Тишков В.И., Пометун А.А., **Степашкина А.В.**, Каргов И.С., Зарубина С.А., Атрошенко Д.Л., Паршин П.Д., Ковалевский Р.П., Виролайнен Т.С., Авданина Д.А., Лобанова Е.А., Жгун А.А., Эльдаров М.А., Чубарь Т.А., Бойко К.,Федорчук Е.А., Федорчук В.В., D'Oronzo E., Facheris S., Secundo F., Савин С.С. “Новые и улучшенные биокатализаторы для синтеза лекарств и медицинской диагностики”. Сборник тезисов докладов Третьего Междисциплинарного Симпозиума по Медицинской, Органической и Биологической Химии и Фармацевтике 2017 под редакцией К.В. Кудрявцева и Е.М. Паниной. – М. : «Перо», 2017, с. 68. ISBN 978-5-906961-26-6.
13. **А.В Степашкина**, И.В. Упоров, С.С. Савин, В.И Тишков. Одноцепочечная пенициллинацилаза из *Alcaligenes faecalis*: экспрессия в *E.coli* и характеристика. // Сборник тезисов докладов Третьего Междисциплинарного Симпозиума по Медицинской, Органической и Биологической Химии и Фармацевтике 2017 под редакцией К.В. Кудрявцева и Е.М. Паниной. – М. : «Перо», 2017, ISBN 978-5-906961-26-6, с. 118.
14. Tishkov V.I., Pometun A.A., **Stepashkina A.V.**, Fedorchuk V.V., Zarubina S.A., Kargov I.S., Atroshenko D.L., Parshin P.D., Kovalevski R.P., Fedorchuk E.A., D'Oronzo E., Facheris S., Secundo F., Urlacher V.B., Savin S.S. Rational design of practically important enzymes. Abstracts of 11-th International Conference "Biocatalysis-2017: Fundamentals and Applications", Moscow region, Avantel Club Istra, June 25-30, 2017. – Moscow: Innovations and High Technologies MSU Ltd, 2017, ISBN 978-5-9500292-3-3, p. 27.